

ПОЧТОВЫЙ АДРЕС:

125315, Москва, ул. Балтийская, 8.
Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«ФГБНУ общей патологии и патофизиологии»

Редакция журнала
«Патологическая физиология
и экспериментальная терапия».
Home page: www.pfiet.ru
E-mail: path.physiol@yandex.ru

Зав. редакцией
Н.Р.Соболь
+7 906 793 5467
Техническая редакция
А.С.Акопов

ЛР №010215 от 29.04.97.

Издатель: Иришкин Дмитрий
E-mail: genius-media@mail.ru

Входит в Перечень ведущих рецензируе-
мых научных журналов и изданий,
рекомендованных ВАК России для пуб-
ликации значимых результатов диссерта-
ций на соискание ученой степени докто-
ра и кандидата наук.

5-летний ИФ РИНЦ 2015 0,690

Журнал включен в базу данных Scopus

Журнал «Патологическая физиология и
экспериментальная терапия» индексиру-
ется в следующих иностранных изданиях:
PubMed; medline; Excerpta Medica;
Apicultural Abstracts; Biological Abstracts;
Biotechnology Research Abstracts;
Chemical Abstracts; Index to Dental Literature;
International Aerospace Abstracts;
Nutrition Abstracts and Reviews;
Ulrich's International Periodicals Directory

Подписной индекс по каталогу
агентства «Роспечать»: **71456**

Сдано в набор 25.12.2017 г.
Подписано в печать 21.02.2018 г.

ISSN 0031-2991
Пат. физиол. и экспер. тер.
2018. Том 62. № 1. 1—120

Перепечатка материалов и использование их в
любой форме, в том числе и в электронных СМИ,
возможны только с письменного разрешения из-
дателя.
За содержание рекламных публикаций
ответственность несет рекламодатель.

© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич, 2017.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НИИ ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ И ПАТОФИЗИОЛОГИИ»**

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

*Ежеквартальный рецензируемый научно-практический журнал
Основан в 1957 г.*

Том 62, № 1, 2018

январь — март

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Б.Б. Мороз

Ю.В. Архипенко, Е.И. Асташкин, С.В. Грачев,
Н.С. Гурко (ответственный секретарь), Т.А. Гуськова,
И.С. Гушин (зам. главного редактора),
Г. Дауни (США), А.В. Ефремов, В.Б. Кошелев,
Н.А. Крупина, А.А. Кубатиев, П.Ф. Литвицкий,
Р. Маллет (США), О. Мацуо (Япония),
В.В. Новицкий, Г.В. Порядин,
В.К. Решетняк (зам. главного редактора),
Р. Сьюелл (Великобритания)

Редакционный совет

Ю.В. Балякин (Москва), Ю.Ю. Бяловский (Рязань),
В.Т. Долгих (Омск), А.М. Дыгай (Томск),
Д.А. Еникеев (Уфа), В.П. Куликов (Барнаул),
В.П. Михайлов (Ярославль), В.Г. Овсянников (Ростов-на-Дону),
С.Н. Орлов (Москва), Н.Н. Петрищев (Санкт-Петербург),
Л.А. Северьянова (Курск), В. Шварц (Германия),
А.П. Ястребов (Екатеринбург)

125315, Moscow, Baltiyskaya str., 8

Home page: www.pfiet.ru
E-mail: path.physiol@yandex.ru

ЛР №010215 от 29.04.97.

E-mail: genius-media@mail.ru

ИФ РИНЦ 2015 0,690

ISSN 0031-2991
Pathological
physiology
and experimental
therapy
2018. Vol. 62. № 1. 1–120

Moscow

© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич, 2017.

THE INSTITUTE OF GENERAL PATHOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY

PATOLOGICHESKAYA FIZIOLOGIYA I EKSPERIMENTAL'NAYA TERAPIYA

Pathological physiology and experimental therapy

*Quarterly reviewed science and practical journal
Published since 1957*

Vol. 62, № 1, 2018

January—March

Editor in chief B.B. Moroz

Assistant editors in chief:

I.S. Gushchin, V.K. Reshetnyak

Executive editor, scientific editor: N.S. Gourko

Members of editorial board:

Yu.V. Archipenko, E.I. Astashkin, H. Downey (USA),
S.V. Grachev, T.A. Guskova, A.V. Efremov,
V.B. Koshelev, N.A. Krupina, A.A. Kubatiev,
P.F. Litvitskiy, R. Mallet (USA), O. Matsuo (Japan),
V.V. Novitskiy, G.V. Poryadin, R. Sewell (UK)

Staff

Yu.V. Balyakin (Moscow), Yu.Yu. Byalovskiy (Ryazan),
V.T. Dolgikh (Omsk), A.M. Dygay (Tomsk), D.A. Enikeev (Ufa),
V.P. Kulikov (Barnaul), V.P. Mikhailov (Yaroslavl),
V.G. Ovsyannikov (Rostov-na-Donu), S.N. Orlov (Moscow),
N.N. Petrishchev (Sankt-Peterburg),
L.A. Severyanova (Kursk), V. Shvarz (Germany),
A.P. Yastrebov (Ekaterinburg)

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Орехова Н.А., Собенин И.А., Митрофанов К.Ю., Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Карагодин В.П., Орехов А.Н.* Ассоциация гетероплазмии мутаций митохондриального генома с ишемической болезнью сердца 4
- Мезентцева Л.В., Перцов С.С.* Взаимосвязь между числом эктопических фокусов и степенью хаотичности фибрилляции желудочков 11
- Цибульников С.Ю., Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Иванов В.В.* Хроническое периодическое воздействие холода не влияет на артериальное давление и устойчивость сердца к действию ишемии и реперфузии 17
- Афанасьев С.А., Егорова М.В., Куцыкова Т.В., Попов С.В.* Влияние свободных жирных кислот на поглощение кислорода изолированными кардиомиоцитами крыс при ишемическом или диабетическом поражении сердца 22
- Сokolovskaya A.A., Viryus Э.Д., Александрин В.В., Роткина А.С., Никифорова К.А., Московцев А.А., Иванов А.В., Кубатиев А.А.* Апоптоз тромбоцитов при глобальной ишемии головного мозга у крыс 27
- Оберган Т.Ю., Ляпина М.Г., Успенская М.С., Ляпина Л.А.* Особенности влияния гепарина из пiona совместно с аргинином на растворение венозных тромбов у крыс 36
- Раецкая А.А., Калиш С.В., Лямина С.В., Малышева Е.В., Буданова О.П., Бахтина Л.Ю., Малышев И.Ю.* Репрограммированные *in vitro* на М3 фенотип макрофаги останавливают рост солидной карциномы *in vivo* 41
- Баева Т.А., Гейн С.В.* Временной фактор в регуляции цитокиновой секреции у мышей бета-эндорфином 47
- Хобракова В.Б., Будаева Е.Р.* Влияние ориентина, гентиопикросида и олеаноловой кислоты, выделенных из *Gentiana algida* Pall, на состояние иммунной системы в эксперименте 54
- Оразов М.Р., Радзинский В.Е., Хамошина М.Б., Носенко Е.Н., Галина Т.В., Духин А.О., Оразмуратов А.А., Токаева Э.С., Барсеян Л.К., Закирова Я.Р.* Патологический нейрогенез — ключевое звено патогенеза тазовой боли, обусловленной аденомиозом 59
- Анищенко А.П., Алчинова И.Б., Вялкина М.В., Медведева Ю.С., Яковенко Е.Н., Бурдюкова Е.В., Гуревич К.Г.* Оценка влияния занятий физической культурой по модифицированной методике на характер обменных процессов в организме студентов 65
- Юдин М.А., Коньшаков Ю.О., Венгерович Н.Г., Владимиров О.О., Алексева И.И., Шербашов К.А., Быков В.Н.* Изучение последствий острых поражений веществами пульмонотоксического действия 71

ОБЗОРЫ

- Пирожков С.В., Литвицкий П.Ф.* Роль инфламмосом в патогенезе социально-значимых заболеваний человека 77
- Бочаров Е.В., Кучеряну В.Г., Бочарова О.А.* Функциональные грани дофаминергической системы и рак (часть 2) 90
- Белобородова Н.В., Мороз В.В., Бедова А.Ю.* О роли ароматических микробных метаболитов 97

МЕТОДИКА

- Иванов Ю.Д., Козлов А.Ф., Галиуллин Р.А., Иванова Н.Д., Татур В.Ю., Зиборов В.С., Юшков Е.С., Пleshakova T.O.* Генерация и аккумуляция заряда в проточной системе для выявления белковых маркеров заболеваний 109

ИНФОРМАЦИЯ

- Скуратовская Л.Н., Хевитт М.В.* Удачный пример диалога культур . . . 117
- Информационное письмо 119

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Orekhova N.A., Sobenin I.A., Mitrofanov K.Yu., Sazonova M.A., Postnov A.Yu., Karagodin V.P., Orekhov A.N.* Association of heteroplasmic of mutations of mitochondrial genome with coronary heart disease 4
- Mezentseva L.V., Pertsov S.S.* Interconnection between the number of ectopic focuses and degree of chaoticity of ventricular fibrillation 11
- Tsibulnikov S.Yu., Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Ivanov V.V.* Chronic periodic cold exposure had no affect the blood pressure and stability of heart to action ischemia and reperfusion 17
- Afanas`ev S.A., Egorova M.V., Kutsykova T.V., Popov S.V.* Influence of free fatty acids on oxygen consumption by isolated rat cardiomyocytes in ischemic or diabetic heart disease 22
- Sokolovskaya A.A., Viryus E.D., Aleksandrinn V.V., Rotkina A.S., Nikiforova K.A., Moskovtsev A.A., Ivanov A.V., Kubatiev A.A.* Platelets apoptosis in rats after global brain ischemia 27
- Obergan T.Yu., Lyapina M.G., Uspenskaya M.S., Lyapina L.A.* Features of the effect of heparinoid from the pion together with arginine on the dissolution of venous thrombi in rats 36
- Raetskaya A.A., Kalish S.V., Lyamina S.V., Malysheva E.V., Budanova O.P., Bakhtina L.Yu., Malyshev I.Yu.* Reprogrammed *in vitro* on M3 phenotype macrophages stop the growth of solid carcinoma *in vivo* 41
- Baeva T.A., Gein S.V.* The time factor in beta-endorphin regulation of cytokines secretion in mice 47
- Khobrakova V.B., Budaeva E.R.* The influence of orientin, gentiopicroside and oleanolic acid isolated from *Gentiana algida* Pall, on the state of immune system in the experiment 54
- Orazov M.R., Radzinskiy V.E., Khamoshina M.B., Nosenko E.N., Galina T.V., Dukhin A.O., Orazmuratov A.A., Tokaeva E.S., Barsegyan L.K., Zakirova Y.R.* Pathological neurogenesis: A key step in the pathogenesis of pelvic pain caused by adenomyosis 59
- Anischenko A.P., Alchinova I.B., Vyalkina M.V., Medvedeva Yu.S., Yakovenko E.N., Burdukova E.V., Gurevich K.G.* Assessment of the influence of physical activity by a modified method on metabolic processes in students 65
- Yudin M.A., Kon`shakov Yu.O., Vengerovich N.G., Vladimirova O.O., Alekseeva I.I., Sherbashov K.A., Bykov V.N.* The study of consequences of acute injuries by agents of pulmonotoxic action 71

REVIEWS

- Pirozhkov S.V., Litvitskiy P.F.* Role of inflammasomes in pathogenesis of diseases with a high impact on public health 77
- Bocharov E.V., Kucheryanu V.G., Bocharova O.A.* Functional facets of dopaminergic system and cancer. Part 2 90
- Beloborodova N.V., Moroz V.V., Bedova A.Yu.* The role of aromatic microbial metabolites 97

METHODS

- Ivanov Yu.D., Kozlov A.F., Galiullin R.A., Ivanova N.D., Tatur V.Yu., Ziborov V.S., Yushkov E.S., Pleshakova T.O.* Generation and accumulation of charge in a flow system for detecting protein markers of diseases 109

INFORMATION

- Larissa N. Skuratovskaya, Maria W. Hewitt.* Good Example of Dialogue of Cultures Information Letter 117

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616-092

Орехова Н.А.¹, Собенин И.А.^{2,3}, Митрофанов К.Ю.^{2,3}, Сазонова М.А.^{2,3},
Постнов А.Ю.², Карагодин В.П.⁴, Орехов А.Н.³

Ассоциация гетероплазмии мутаций митохондриального генома с ишемической болезнью сердца

¹ МГУ им. М.В.Ломоносова, 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

² ФГБУ «Национальный Российский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, 121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15-а

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г.Москва, ул. Балтийская, д.8

⁴ Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова, 117997, Россия, Москва, Стремянный переулок, 36

Цель исследования. Усовершенствование алгоритма оценки генетической предрасположенности к развитию ишемической болезни сердца (ИБС), инфаркта миокарда (ИМ). **Методика.** Для оценки диагностической значимости степени гетероплазмии митохондриального было выполнено определение этого показателя у 100 здоровых лиц и 325 больных ИБС, в том числе у 225 больных ИБС с перенесенным инфарктом миокарда. Методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) было проанализировано девять мутаций митохондриального генома, которые имеют корреляцию со степенью выраженности каротидного атеросклероза. **Результаты.** В настоящей работе проведена сравнительная оценка результатов генотипирования образцов ДНК участников исследования без клинических проявлений атеросклероза (условно здоровых лиц) и больных ИБС. В итоге была разработана математическая модель определения генетического риска ишемической болезни сердца, включающая анализ степени гетероплазмии четырех наиболее информативных генетических маркеров (m.15059G>A, m.3256C>T, m.12315G>A и m.13513G>A) и оценку полученных результатов с помощью ряда статистических методов. Данная модель объясняла не менее 60% вариабельности клинических проявлений атеросклероза (таких, как ИБС и ИМ) и не зависела от других факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний. **Заключение.** На основе анализа суммарной мутационной нагрузки митохондриального генома была разработана математическая модель определения генетической предрасположенности к ишемической болезни сердца и инфаркту миокарда.

Ключевые слова: атеросклероз; ишемическая болезнь сердца; митохондриальные мутации; гетероплазмия; инфаркт миокарда; генетическая предрасположенность.

Для цитирования: Орехова Н.А., Собенин И.А., Митрофанов К.Ю., Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Карагодин В.П., Орехов А.Н. Ассоциация гетероплазмии мутаций митохондриального генома с ишемической болезнью сердца. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 4–10. DOI:

Для корреспонденции: Орехова Нина Александровна, e-mail: orekhovanina@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проводилось при поддержке Российского научного фонда, грант 14-14-01038.

Поступила 18.05.2017

Orekhova N.A.¹, Sobenin I.A.^{2,3}, Mitrofanov K.Yu.^{2,3}, Sazonova M.A.^{2,3},
Postnov A.Y.², Karagodin V.P.⁴, Orekhov A.N.³

Association of heteroplasmic mutations in the mitochondrial genome with coronary heart disease

¹ M.V. Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

² National Medical Research Centre of Cardiology, 15-a 3rd Cherepkovskaya Str., Moscow 121552, Russia

³ Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8 Baltiyskaya Str., 125315 Moscow, Russia

⁴ G.B. Plekhanov Russian University of Economics, Stremyany Pereulok 36, Moscow 117997, Russia

Aim. To improve the algorithm for assessing the genetic predisposition to development of cardiovascular diseases. **Methods.** To evaluate the diagnostic value of the degree of mitochondrial heteroplasmy, this index was determined for 100 healthy individuals and 325 patients with coronary heart disease (CHD), including 225 CHD patients after myocardial infarction. The method of real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to analyze 9 mutations in the mitochondrial genome, which correlated with the extent of carotid atherosclerosis. **Results.** A mathematical model was developed to determine the genetic risk of CHD based on calculation of the total mutational load in the mitochondrial genome by

mtDNA variants m.12315G>A in MT-TL2 gene, m.15059G>A in MT-CYB gene, m.3256C>T in MT-TL1 gene, and m.13513G>A in MT-ND5 gene. This model explained at least 60% of the variability in clinical manifestations of atherosclerosis and did not depend on other cardiovascular risk factors. **Conclusion.** Based on the analysis of total mutational load in the mitochondrial genome, a method was developed to assess the genetic risk for development of CHD and myocardial infarction.

Keywords: coronary heart disease, mitochondrial mutations, heteroplasmy, infarction.

For citation: Orekhova N.A., Sobenin I.A., Mitrofanov K.Yu., Sazonova M.A., Postnov A.Yu., Karagodin V.P., Orekhov A.N. Association of heteroplasmic of mutations of mitochondrial genome with coronary heart disease. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(1): 4–10. (in Russian). DOI:

For correspondence: Nina Orekhova, e-mail: orekhovanina@yandex.ru

Information about authors:

Orekhov A.N., <http://orcid.org/0000-0002-6495-1628>

Sazonova M.A., <http://orcid.org/0000-0002-8610-4593>

Karagodin V.P., <http://orcid.org/0000-0003-0501-8499>

Funding: The study was supported by the Russian Science Foundation, grant 14-14-01038.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Received 18.05.2017

Введение

Сердечно сосудистые заболевания (ССЗ) в большинстве стран, в том числе и в России, занимают первое место в структуре смертности и заболеваемости [1]. Несмотря на значительные достижения биологии и медицины в области изучения ССЗ, успехи терапии остаются недостаточными. Основные факторы риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и современные способы оценки и прогнозирования риска объясняют около 70% случаев развития атеросклероза и связанных с ним заболеваний, таких, как, например, ишемическая болезнь сердца (ИБС) и инфаркт миокарда [2].

Генетическую оценку гаплотипов в настоящее время можно считать наиболее эффективным и перспективным способом оценки предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям [3, 4]. В онтогенезе возможно появление мутаций в кодирующих областях митохондриальной ДНК (мтДНК), которые впоследствии могут привести к развитию различных патологических процессов у человека, таких, как стеноз коронарных артерий, глухота, кардиомиопатия, диабет или инфаркт миокарда [5, 6]. Однако все еще остается малоизученным механизм митохондриальных мутаций и их корреляция с возникновением и развитием сердечно-сосудистых заболеваний, особенно при ИБС [4, 7–10]. Следствием данных мутаций в митохондриях могут быть дефекты в структуре ферментов дыхательной цепи и транспортных РНК (тРНК), снижение концентрации ферментов, митохондриальная дисфункция [5, 9, 10]. Вполне возможно, что данные процессы способствуют возникновению и развитию атеросклероза.

Такое клиническое проявление атеросклероза, как ИБС, является полигенным многофакторным заболеванием [2, 11]. Согласно эпидемиологическим исследованиям, возраст, генетическая предрасположенность, артериальная гипертензия, сахарный диабет, гиперхолестеринемия, курение и мужской пол являются основными факторами риска ИБС [2]. Атеросклероз коронарных артерий, который сопровождается сужением просвета сосуда (атеросклеротическими бляшками), является причиной ИБС приблизительно в 97–98% случаев [11, 12]. Ишемическая болезнь сердца может привести к инфаркту миокарда и при умеренном стенозировании коронарных сосудов и отсутствии видимых симптомов заболевания [2, 12–15].

Атеросклероз без видимых клинических проявлений (субклинический атеросклероз) является весьма распространенной патологией. Клинические симптомы могут проявляться после многих лет неуклонно прогрессирующего атеросклеротического поражения артерий. В настоящее время число случаев субклинического атеросклероза у лиц зрелого и пожилого возраста, не имеющих клинических проявлений атеросклеротических заболеваний, близко к 100% [16–18].

На основании современных алгоритмов оценки риска развития ИБС можно выделить 3 группы риска: высокий риск (приблизительно 8% населения), средний риск (около 15% населения) и низкий/умеренный риск (примерно 77% населения). В этих группах риск инфаркта миокарда и внезапной смерти составляет 32%, 14,8% и 2,7% соответственно [19]. В результате в группе высокого риска происходит около 37% всех случаев инфаркта миокарда и внезапной

сердечной смерти в популяции, в группе среднего риска — приблизительно 33% случаев, а в группе с низким и умеренным риском — около 30% случаев [1]. Таким образом, почти треть случаев инфарктов миокарда в популяции практически невозможно предсказать, поскольку у лиц с низким и умеренным риском отсутствует воздействие традиционных факторов риска ИБС. Следовательно, требуются усовершенствованные алгоритмы оценки степени риска, и генетическая диагностика предрасположенности к развитию атеросклероза и ССЗ может стать существенным компонентом таких алгоритмов.

Одним из перспективных генетических маркеров риска развития ССЗ могут быть мутации митохондриального генома. При гетероплазмии в митохондриях могут одновременно присутствовать неизмененные и мутантные копии ДНК. Количество мутантных копий мтДНК в клетке может варьировать от 0% до 100%, хотя степень гетероплазмии зависит от типа ткани в организме человека [20]. Распределение клонов мутантной мтДНК в тканях в процессе онтогенеза является случайным. Возможно, что нормальные митохондрии подвергаются постоянному окислительному стрессу, и доля митохондрий, содержащих мутантные копии мтДНК, возрастает в тканях при старении [18].

На данный момент известно несколько мутаций митохондриального генома, ассоциированных с атеросклеротическими поражениями аорты и сонных артерий. Данные мутации локализованы в генах 2 и 5 субъединиц NADH-дегидрогеназы, в 6 генах тРНК, в генах 12S субъединицы рибосомальной РНК. Согласно источникам литературы, данные мутации связаны с митохондриальными цитопатиями, клинически проявляющимися как синдром MERRF, несемейные формы дилатационной (ДКМП) и гипертрофической кардиомиопатии (ГКМП), сахарный диабет 2 типа, инсульт, энцефалопатия, синдром MIDD, кардиоэнцефаломиопатия [21, 22].

Цель исследования — проверка гипотезы, что мутации мтДНК, ассоциированные с формированием атеросклеротических бляшек, могут иметь диагностическую значимость в отношении клинических проявлений атеросклероза — ИБС и инфаркта миокарда.

Методика

В исследовании участвовали 325 больных ИБС, в том числе 225 больных ИБС с перенесённым инфарктом миокарда. Контрольная группа состояла из 100 условно здоровых лиц без клинических проявлений атеросклероза. Все пациенты давали информированное согласие на участие в исследовании. В качестве материала для исследования использовали образцы

ДНК, выделенные из клеток крови. Подбор пациентов проводили в поликлинике № 202 г. Москвы и Российском кардиологическом научно-производственном комплексе.

Выделение ДНК осуществлялось из крови методом фенол-хлороформной экстракции с использованием протеиназы К [23]. Концентрацию ДНК в полученных образцах определяли спектрофотометрически с использованием NanoPhotometer Pearl UV/VIS с SDRAM, P-34 (Implen, Германия). Образцы ДНК разводили в TE-буфере до концентрации 0,03 мкг/мкл и хранили до проведения генотипирования при -20°C.

Генотипирование мтДНК проводили с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), с выщеплением 5'-концевой метки (TaqMan). Для проектирования праймеров и зондов использовали нуклеотидную последовательность полного генома мтДНК базы данных GenBank. Были использованы программы Primer 3, Oligocalculator, PrimerBlast и DinaMelt [18—22, 24]. Проверка на отсутствие взаимной гомологии между парами праймеров и соответствующих зондов и на отсутствие гомологии с нуклеотидными последовательностями ядерной ДНК была проведена с помощью программ DinaMelt. Спроектированные олигонуклеотиды были произведены компанией «Синтол» (Москва, Россия). Нуклеотидные последовательности праймеров для амплификации участков мтДНК, содержащих вариантный нуклеотид, и TaqMan-зондов представлены в табл. 1. Постановку ПЦР-РВ и проверку на специфичность осуществляли на амплификаторах АНК-32 (Синтол, Россия) и Real Time PCR System 7500 Fast (Applied Biosystems, США). Сигнал ПЦР-РВ регистрировали по каналам флуорофоров ROX и FAM, которые детектировали продукт амплификации мутантного и нормального аллеля соответственно. Состав реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ представлен в табл. 2.

На приборах Real Time PCR System 7500 Fast и АНК-32 проводился ПЦР-анализ с выщеплением 5'-концевой метки (TaqMan система).

Статистический анализ результатов проводили с помощью программ SigmaPlot 12.0 (SSI, США), IBMSPSS 21.0 (IBMSPSS, США) и Statistica 8.0 (StatSoft, США). Были использованы функции ковариационного анализа, описательной статистики, параметрической и непараметрической статистики, вариационного анализа, корреляционного анализа, линейной и логистической регрессии. Кроме того, использовали тесты для независимых выборок по Краскеллу—Уоллису, Манну—Уитни и t-тест [25]. Данные представлены в виде средней величины с указанием стандартного отклонения, или в виде медианы

Таблица 3

Критерий однородности дисперсий

Мутация	F-критерий	Значение
m.5178C>A	0,409	0,523
m.3336T>C	0,897	0,344
m.13513G>A	4,312	0,043
m.15059G>A	2,834	0,093
m.1555A>G	0,970	0,326
m.12315G>A	10,086	0,002
m.14459G>A	6,405	0,012
m.3256C>T	4,445	0,036
m.14846G>A	18,115	0,001

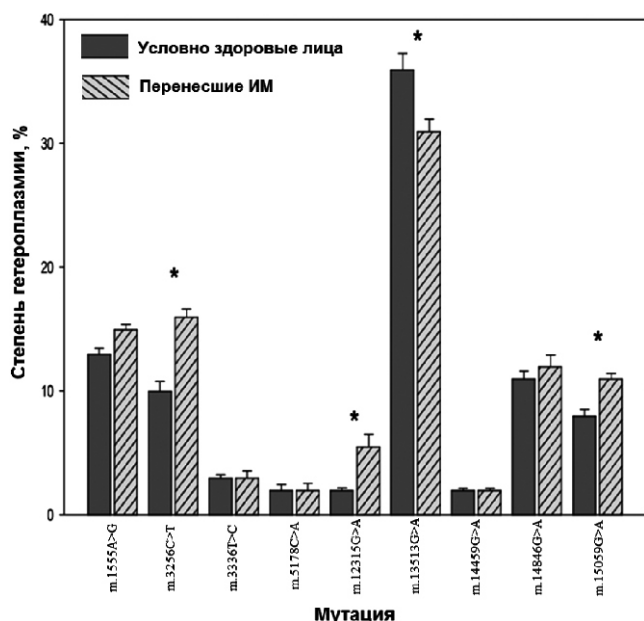


Рис. 1. Сравнение показателей степени гетероплазии мтДНК у здоровых лиц и больных ИБС с перенесенным инфарктом миокарда.

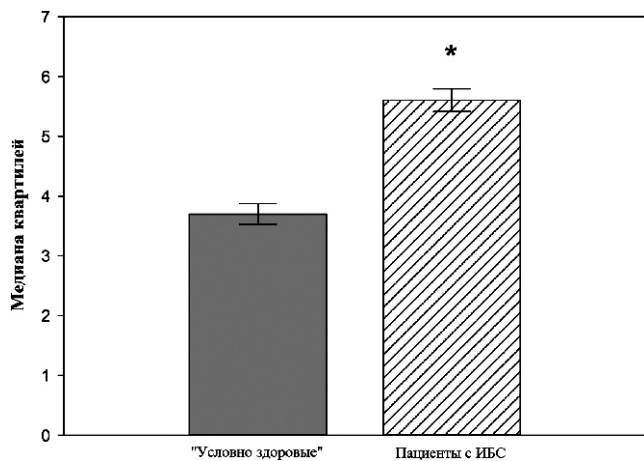


Рис. 2. Анализ суммарной мутационной нагрузки мтДНК по мутациям m.15059G>A, m.3256C>T, m.12315G>A и m.13513G>A.

ку не улучшали диагностических характеристик модели. Сокращение числа маркеров до информативного минимума объясняется тем, что оно приводит к упрощению использования теста без потери точности диагностики и значительному снижению затрат на тест-системы.

Значения исследуемого признака (показатели гетероплазии) были перекодированы в порядковую шкалу по квартилям (от 1 до 4). Суммарная мутационная нагрузка представляла собой результат сложения этих порядковых значений с учётом знака коэффициента линейной регрессии.

На рис. 2 представлены значения суммарной мутационной нагрузки мтДНК условно здоровых лиц и больных ИБС (независимо от наличия перенесенного инфаркта миокарда в анамнезе). Как видно на рис. 2, мутационная нагрузка мтДНК больных ИБС существенно выше, чем у лиц без клинических проявлений атеросклероза. Согласно результатам, представленным на рис. 2, можно рассматривать 3 группы, различающиеся по суммарной мутационной нагрузке мтДНК: 1 — группа низкого генетического риска, в которой преобладают условно здоровые лица; 2 — группа умеренного генетического риска, занимающая промежуточное положение; 3 — группа высокого генетического риска, в которой значения суммарной му-

тационной нагрузки мтДНК выше среднего значения данного показателя у больных ИБС.

На основании полученных результатов можно утверждать, что уровень гетероплазмы четырех митохондриальных мутаций m.12315G>A (ген MT-TL2), m.3256C>T (ген MT-TL1), m.15059G>A (ген MT-CYB) и m.13513G>A (ген MT-ND5) связан с атеросклерозом и его клиническими проявлениями, такими, как ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда [5, 6]. Данные мутации, локализованные в генах, кодирующих тРНК-Лейцин, субъединицу 5 NADH-дегидрогеназы и цитохром В, могут вызывать дефекты в белковых цепях дыхательных ферментов и транспортных РНК, синтезирующихся непосредственно в митохондриях. Вероятно, данный процесс может приводить к дисфункции ферментов и тРНК в митохондриях. В результате в клетках может снижаться уровень АТФ, возникать энергетическое голодание клеток и, в виде компенсации, их неограниченная пролиферация. Вследствие этого может возрастать вероятность развития атеросклероза.

Согласно разработанной математической модели, суммарная нагрузка 4 исследуемых митохондриальных мутаций (m.12315G>A, m.13513G>A, m.3256C>T и m.15059G>A) объясняет около 60% вариабельности клинических проявлений атеросклероза и не зависит от других атерогенных факторов.

Информация, полученная в ходе данного исследования, может быть использована в медицинской генетике и клинической практике для оценки предрасположенности к атеросклеротическим заболеваниям, а также для семейного анализа ИБС.

Заключение

Таким образом, на основе анализа суммарной мутационной нагрузки митохондриального генома разработана математическая модель выявления генетической предрасположенности к развитию ИБС и инфаркта миокарда, включающая анализ степени гетероплазмы 4 наиболее информативных генетических маркеров (m.15059G>A, m.3256C>T, m.12315G>A и m.13513G>A) и оценку полученных результатов с помощью ряда статистических методов. Данная модель охватывает около 60% вариабельности клинических проявлений атеросклероза (ИБС и инфаркта миокарда), и не зависит от других атерогенных факторов.

References

1. McCullagh K.G., Duance V.C., Bishop K.A. The distribution of collagen types I, III and V(AB) in normal and atherosclerotic human aorta. *J. Pathol.* 1980; 130: 45-55.

2. Zhelankin A.V., Sazonova M.A. Association of the mutations in the human mitochondrial genome with chronic non-inflammatory diseases: type 2 diabetes, hypertension and different types of cardiomyopathy. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya* 2012; 3:123-8. (in Russian)

3. Sobenin I.A., Chistiakov D.A., Bobryshev Y.V., Postnov A.Y., Orekhov A.N. Mitochondrial mutations in atherosclerosis: new solutions in research and possible clinical applications. *Curr Pharm Des.* 2013; 19: 5942-53.

4. Yu E., Mercer J., Bennett M. Mitochondria in vascular disease. *Cardiovasc Res.* 2012; 95: 173-82.

5. Turner R.C., Cull C.A., Frighi V., Holman R.R. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS). 1999; 281: 2005-2012.

6. Chinnery P.F., Thorburn D.R., Samuels D.C. et al. The inheritance of mtDNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet.* 2000; 16: 500-5.

7. Kaufmann P., Koga Y., Shanske S., et al. Mitochondrial DNA and RNA processing in MELAS. *Ann. Neurol.* 1996; 40: 172-80.

8. Lightowlers R.N., Chinnery P.F., Turnbull D.M., Howell N. Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends. Genet.* 1997; 13: 450-5.

9. Robinson B.H. Human Complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. *Biochem. Biophys. Acta* 1998; 1364: 271-26.

10. Sukernik R.I., Derbeneva O.A. Starikovskaya E.B. Mitochondrial genome and mitochondrial disease in humans. *Genetics.* 2002; 38: 1-10.

11. Mitrofanov K.I., Sazonova M.A. Association of point mutations in human nuclear and mitochondrial genome with coronary artery disease. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya* 2012; 2:51-5. (in Russian)

12. Ivanova M.M., Borodachev E.N., Sazonova M.A. Human pathologies associated with mutations of mitochondrial genome. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya* 2012; 3:115-22. (in Russian)

13. Sobenin I.A., Zhelankin A.V., Mitrofanov K.Y., Sinyov V.V., Sazonova M.A., Postnov A.Y., Orekhov A.N. Mutations of Mitochondrial DNA in Atherosclerosis and Atherosclerosis-Related Diseases. *Curr. Pharm. Des.* 2015; 21(9):1158-63.

14. Singh V.N. Coronary Heart Disease. *Medicine Health*, 2002.

15. Hodis H., Mack W., LaBree L. et al. Reduction in carotid arterial wall thickness using lovastatin and dietary therapy: A randomized, controlled clinical trial. *Ann. Intern. Med.* 1996; 124: 548-56.

16. Benjamin E.J., Wolf P.A., D'Agostino R.B., Silbershatz H., Kannel W.B., Levy D. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998; 98: 946-52.

17. Lang T.A., Secic M. *How to report statistics in medicine: annotated guidelines for authors, editors, and reviewers.* Second edition. American College of Physicians, Philadelphia, 2006.

18. <http://frodo.wi.mit.edu/> accessed date 25.02.2017

19. Mehrazin M., Shanske S., Kaufmann P., et al. Longitudinal changes of mtDNA A3243G mutation load and level of functioning in MELAS. *Am. J. Med. Genet. A.* 2009; 149: 584-7.

20. <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/Oligo-Calc.html> / accessed date 27.01.2017

21. <http://mfold.rna.albany.edu/?q=dinamelt> / accessed date 15.03.2017

22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> accessed date 17.01.2017

23. Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Sinyov V.V., Galitsyna E.V., Orekhova V.A., Melnichenko A.A., Orekhov A.N., Ravani A.L., Sobenin I.A. New markers of atherosclerosis: a threshold level of heteroplasmy in mtDNA mutations. *Vessel Plus* 2017; 1: 182-91.

24. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch/ accessed date 09.02.2017

25. Assmann G., Cullen P., Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Muenster (PROCAM) study. *Circulation* 2002; 105: 310-5.

Сведения об авторах:

Орехова Нина Александровна, науч. сотр. Научно-исследовательского института атеросклероза, Инновационный центр Сколково;

Собенин Игорь Александрович, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП и лаб. мед. генетики ФГБУ «Национальный Российский исследовательский центр кардиологии»;

Митрофанов Константин Юрьевич, науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП;

Сазонова Маргарита Александровна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП лаб. ангиопатологии ФГБУ «Национальный Российский исследовательский центр кардиологии»;

Постнов Антон Ювенальевич, доктор мед. наук, зав. лаб. сердечно-сосудистой патологии ФГБУ «Национальный Российский исследовательский центр кардиологии»;

Орехов Александр Николаевич, доктор биол. наук, проф. биохимии, зав. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП;

Карагодин Василий Петрович, доктор биол. наук, проф. каф. товароведения и товарной экспертизы РЭУ им. Г.В. Плеханова.

© Мезенцева Л.В., Перцов С.С., 2018
УДК 616-092

Мезенцева Л.В., Перцов С.С.

Взаимосвязь между числом эктопических фокусов и степенью хаотичности фибрилляции желудочков

ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина», 125315, г.Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Электрическая активность сердца при фибрилляции желудочков регистрируется на ЭКГ как хаотичное чередование разных по амплитуде и длительности возбуждений. Для количественного анализа этих показателей широко используются методы математического моделирования и теории хаоса. Цель исследования — использование методов математического моделирования для изучения взаимосвязи между степенью хаотичности процесса фибрилляции желудочков и количеством эктопических фокусов, функционирующих в миокарде желудочков. Электрическую активность сердца при фибрилляции желудочков моделировали суммой N -независимых импульсных потоков с различными амплитудно-частотными и фазовыми характеристиками. Степень хаотичности электрической активности сердца оценивали с помощью энтропии и фазовых портретов амплитуд фибриллярных осцилляций. Методом компьютерного моделирования рассчитывали теоретические зависимости степени хаотичности фибриллярных осцилляций от количества импульсных потоков. Результаты теоретических расчетов сопоставляли с результатами физиологических экспериментов, выполненных на крысах и собаках. Показано, что степень хаотичности фибриллярных осцилляций различна у крыс и собак и зависит от числа эктопических фокусов, функционирующих в миокарде желудочков. Для крыс были характерны двухочаговые типы моделей фибрилляции желудочков, для собак — многоочаговые (4—5 фокусов) типы моделей.

Ключевые слова: фибрилляция желудочков; энтропия; математическое моделирование.

Для цитирования: Мезенцева Л.В., Перцов С.С. Взаимосвязь между числом эктопических фокусов и степенью хаотичности фибрилляции желудочков. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 11–16. DOI:

Для корреспонденции: Мезенцева Лариса Валентиновна, доктор биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. системных механизмов эмоционального стресса НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина, e-mail: l.v.mezentseva@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.05.2017

Mezentseva L.V., Pertsov S.S.

Interrelation between the number of ectopic foci and the chaoticity degree of ventricular fibrillation

P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

Cardiac electrical activity during ventricular fibrillation shows on electrocardiogram as chaotic alternation of excitations different in amplitude and duration. Methods of mathematical modeling and the chaos theory are widely used for quantitative analysis of these irregularities. The aim of the present work was using methods of mathematical modeling to study the interrelation between the chaoticity degree of ventricular fibrillation and the number of myocardial ectopic pacemakers. Cardiac electrical activity during ventricular fibrillation was modeled as a sum of N independent pulse streams with various amplitude-frequency and phase characteristics. The chaoticity degree of heart electrical activity was estimated using entropy and phase portraits of fibrillar oscillations. Theoretical dependences between the chaoticity degree of ventricular fibrillation and the number of pulse streams were calculated using computer modeling. Results of computer experiments were compared with those of real physiological experiments on rats and dogs. The chaoticity degree of fibrillar oscillations was shown to be different in rats and dogs and dependent on the number of ectopic pacemakers functioning in the myocardium. Two-focal types of ventricular fibrillation models were characteristic of rats and multifocal (4—5 foci) types we characteristic of dogs.

Keywords: ventricular fibrillation; entropy; mathematical modeling.

For citation: Mezentseva L.V., Pertsov S.S. Interconnection between the number of ectopic focuses and degree of chaoticity of ventricular fibrillation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2018; 62(1): 11–16. (in Russian). DOI:

Information about authors: Mezentseva L.V., <http://orcid.org/0000-0001-5750-5366>

For correspondence: Larisa V. Mezentseva, Doct. Biol. Sci, lead researcher of the System Mechanisms of Emotional Stress Laboratory «Anokhin Institute of Normal Physiology», e-mail: l.v.mezentseva@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Received 20.05.2017

Введение

При фибрилляции желудочков (ФЖ) происходит нарушение нормального ритмогенеза в сердце, которое проявляется на ЭКГ как хаотичное чередование разных по амплитуде и длительности фибриллярных осцилляций. Для количественной оценки степени хаотичности фибриллярных осцилляций получили широкое распространение подходы, использующие представления о динамическом хаосе [1—6]. Мерой степени хаотичности ФЖ служат такие показатели, как энтропия, корреляционная размерность хаоса, число волновых фронтов, константы Ляпунова, геометрия фазовых портретов и другие. Экспериментальные исследования свидетельствуют, что эти показатели различны у разных видов животных [6—7]. Для изучения механизмов, лежащих в основе возникновения фибрилляторного хаоса, в настоящее время широко используются методы математического моделирования [8—11]. Ранее нами была разработана математическая модель процесса ФЖ [12], позволяющая выполнять компьютерное моделирование ФЖ в условиях различного числа эктопических фокусов. *Цель работы* — проведение экспериментально-расчетных исследований для изучения взаимосвязи между фибрилляторным хаосом и количеством эктопических фокусов у разных животных.

Методика

Для анализа использовали результаты экспериментов, проведенных на 5 крысах-самцах Вистар массой 250—300 г (30 эпизодов ФЖ) и 5 собаках массой 8000—16000 г (30 эпизодов ФЖ). ФЖ у наркотизированных животных (нембутал, 40 мг/кг) вызывали пачкой электрических импульсов длительностью 5 мс, наносимых в ранимый период сердечного цикла (восходящая часть зубца «Т» на ЭКГ) через электроды, расположенные на миокарде левого желудочка. Амплитуду стимулов постепенно увеличивали до достижения порога ФЖ (ПФЖ). ЭКГ во II стандартном отведении регистрировали с помощью миниграфа-82 фирмы Siemens. Экспериментальные записи ЭКГ сравнивали с расчетными, полученными методом компьютерного моделирования. В основу математической модели было положено предположение, что анализируемый ЭКГ-сигнал

представляет собой суммарную электрическую активность $F(t)$, которую можно представить в виде суммы N -независимых импульсных потоков (эктопических фокусов) $F_i(t-x_i)$ с прямоугольной формой импульса, постоянной частотой (f_i) и амплитудой (A_i) и различными величинами сдвигов фаз x_i между потоками:

$$F(t) = \sum_{i=1}^N F_i(t - x_i), \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (1)$$

Компьютерное моделирование проводили с помощью специально разработанной программы MODVF [13]. Программа позволяет исследовать зависимость суммарной электрической активности $F(t)$ от количественных характеристик импульсных потоков: N , F_i , A_i , x_i . Вычислительные эксперименты проводились при различных вариантах комбинаций параметров: $N = 2 \dots 5$, $f_i = 3 \dots 20$ Гц, $A_i = 1 \dots 8$ усл.ед., $x_i = 0 \dots 5$ усл.ед. По каждому животному было протестировано 50 вариантов моделей. Длительности импульсов предполагались много меньшими, чем величины соответствующих межимпульсных интервалов и поэтому в расчет не принимались. Поиск характеристик модели, при которых достигается наилучшее соответствие между результатами вычислительных и физиологических экспериментов, осуществлялся с помощью метода наименьших квадратов (МНК-метод) [12]. С этой целью была выполнена аппроксимация экспериментальных распределений амплитуд фибриллярных осцилляций $P_{exp}(A_i)$ теоретическими распределениями $P_{th}(A_i)$. Для оценки отклонения функции $P_{exp}(A_i)$ от $P_{th}(A_i)$, и поиска той теоретической функции, которая наиболее близко соответствовала экспериментальной, использовали критерий минимума среднего квадратичного отклонения

$$D = \int |P_{exp}(A_i) - P_{th}(A_i)|^2 dA_i \quad \min \quad (2)$$

Практическая реализация этого алгоритма осуществлялась путем построения гистограмм распределения амплитуд фибриллярных осцилляций и поиска минимума функции

$$D = \sum_{i=1}^m |P_i(эксп) - P_i(мод)|^2 \quad \min \quad (3)$$

где $i = 1, 2, \dots, m$ — номера столбцов экспериментальной ($P_i(эксп)$) и рассчитанной с помощью модели ($P_i(мод)$) гистограммы; m — число разрядов гистограммы.

Расчеты по МНК-методу выполняли с учетом соответствующего данному эксперименту масштаба характеристик теоретических ЭКГ, что достигалось умножением на корректирующие коэффициенты, позволяющие перевести шкалу частот эктопических фокусов из усл. ед в Гц. Методом компьютерного моделирования были проведены расчеты теоретических временных рядов фибриллярных осцилляций для различных вариантов комбинаций параметров. Затем визуальным сравнением расчетных гистограмм распределения амплитуд с экспериментальными гистограммами, отбирали 10 наиболее близких вариантов, после чего из них МНК — методом находили оптимальный вариант. Степень хаотичности процесса ФЖ оценивали с помощью энтропии, фазовых портретов амплитуд фибриллярных осцилляций, а также величины индекса кратности $W = T/tcp$, служащей оценкой степени дробления периода исходного ритма [6]. Здесь T — длительность периода синусового ритма, предшествующего ФЖ (среднее значение), tcp — средний интервал между последовательными осцилляциями ФЖ. Величину энтропии оценивали по формуле

$$S = -k \int P(x, t) \log P(x, t) dx \quad (4)$$

где $P(x,t)$ — плотность вероятности того или иного состояния системы в данный момент времени t , оцениваемая по гистограмме распределения амплитуд; k — коэффициент пропорциональности, мы полагали $k = 1$.

Хаос-анализ экспериментальных и расчетных кривых (построение фазовых портретов, расчет величины энтропии) проводили с использованием специально разработанной программы «СНАОС». Статистический анализ экспериментальных и теоретических ЭГ проводили с использованием стандартных средств, входящих в пакет прикладных программ Excel for Windows, v.6.0. Статистическую значимость различия показателей оценивали с помощью t -критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований свидетельствуют о различиях характеристик амплитудно-временной упорядоченности фибриллярных осцилляций у крыс и собак. Эти различия имеют как качественный, так и количественный характер. Качественные различия можно видеть визуально на рис. 1, где представлены фрагменты ЭКГ при ФЖ у крысы и собаки. У крысы (рис. 1, А) процесс ФЖ скорее периодический с модулированием по амплитуде типа биений, возникающих при сложении двух гармонических колебаний с разными амплитудно-частотными характеристиками. Иная картина имеет место у собак (рис. 1, Б).

У последних амплитудно-временная упорядоченность процесса ФЖ ниже, процесс более хаотический, что подтверждается результатами дальнейших количественных исследований. Мы исходили из предположения, что количественные характеристики степени хаотичности процесса фибриллярных осцилляций зависят от числа функционирующих в миокарде желудочков эктопических фокусов.

Методом компьютерного моделирования рассчитывали теоретические процессы ФЖ для моделей с различным числом эктопических фокусов и различными вариантами комбинаций их амплитудно-частот-

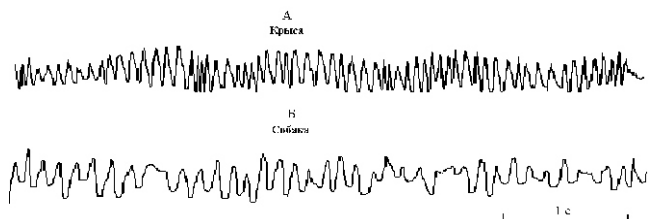


Рис. 1. Фрагменты исходных записей ЭКГ-сигнала при ФЖ у крысы и собаки. Ось абсцисс — время, с; ось ординат — амплитуда фибриллярных осцилляций (A_i , усл. ед).

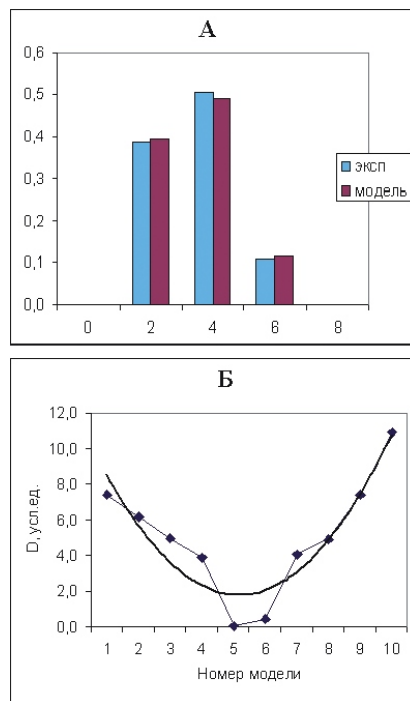


Рис. 2. Аппроксимация модели и эксперимента (крыса) по МНК-методу. А — экспериментальные и расчетные гистограммы амплитуд фибриллярных осцилляций. Ось абсцисс — величина амплитуды (A_i , усл.ед); ось ординат — относительное число осцилляций с данной амплитудой. Б — аппроксимация модели и эксперимента по МНК-методу. Ось абсцисс — номер модели, ось ординат — значения D , усл. ед., рассчитанные по формуле 3 для каждого варианта модели.

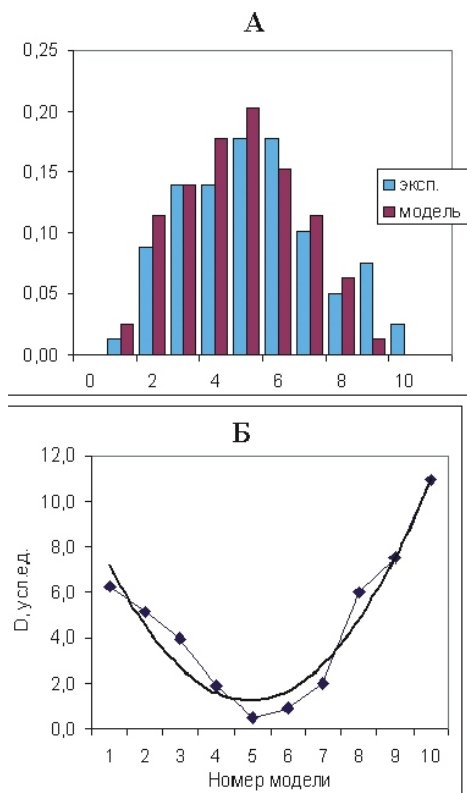


Рис. 3. Аппроксимация модели и эксперимента (собака) по МНК-методу. А — экспериментальные и расчетные гистограммы амплитуд фибриллярных осцилляций. Ось абсцисс — величина амплитуды, усл. ед.; ось ординат — относительное число осцилляций с данной амплитудой. Б — аппроксимация модели и эксперимента по МНК-методу. Ось абсцисс — номер модели, ось ординат — значения D, усл. ед., рассчитанные по формуле 3 для каждого варианта модели.

ных характеристик и осуществляли поиск варианта модели, наилучшим образом аппроксимирующего экспериментальные записи ЭКГ. Расчеты показали, что для крысы (rat1) минимальное значение величины D достигается на модели двухочаговой ФЖ с частотами эктопических источников 9,14 Гц и 22,85 Гц. Величина амплитуды первого источника составляет 3 усл. ед., а второго источники — 2 усл. ед. На

рис. 2 показаны экспериментальная и теоретическая гистограмма распределения амплитуд фибриллярных осцилляций этой крысы (рис. 2, А), а также МНК-методика поиска оптимального варианта модели методом полиномиальной аппроксимации (рис. 2, Б). Аналогичные расчеты, выполненные для остальных крыс, показали, что для четырех животных оптимальными вариантами были модели двухочаговой ФЖ и у одной крысы была трехочаговая ФЖ.

В отличие от крыс, оптимальными моделями для собак были модели многоочаговой ФЖ. На рис. 3 показаны экспериментальная и теоретическая гистограмма распределения амплитуд фибриллярных осцилляций собаки (dog1), а также МНК-методика поиска оптимального варианта модели методом полиномиальной аппроксимации. Расчеты показали, что для этой собаки минимальное значение величины D достигается применительно к пятиочаговому варианту модели с частотами эктопических фокусов 13,08 Гц, 7,62 Гц, 11,21 Гц, 9,76 Гц и 11,41 Гц. У 3 фокусов величины амплитуд составляли 2 усл. ед., у 2 фокусов — 1 усл. ед. Аналогичные расчеты, выполненные для остальных собак, показали, что у 2 собак оптимальными вариантами были модели четырехфокусной эктопии у 3 собак — пятифокусные модели.

Сравнительный анализ степени хаотичности фибриллярных осцилляций у крыс и собак показал, что одновременно с более высоким значением числа эктопических источников у собак по сравнению с крысами, у собак отмечаются и более высокие показатели степени хаотичности процесса ФЖ, что можно видеть из таблицы.

Как экспериментальные, так и расчетные значения энтропии у собак статистически значимо превышают эти же величины для крыс. Аналогичный результат имеет место и для показателя W — индекса кратности. Если для крыс этот показатель составляет 2,8 ед., то у собак он значительно выше — 4,0 ед. Величины индекса кратности коррелируют с расчетными оценками числа эктопических фокусов, значе-

Таблица

Сравнительные характеристики показателей амплитудно-временной упорядоченности экспериментальных и расчетных процессов ФЖ у крыс и собак

Вид животных	Крысы (M ± m)		Собаки (M ± m)	
	Эксперимент	Расчет	Эксперимент	Расчет
Энтропия (S), усл. ед.	1,5 ± 0,2	1,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2 *	2,4 ± 0,3*
Индекс кратности (W)	2,8 ± 0,2	—	4,0 ± 0,3*	—
ЧСС до ФЖ, Гц	5,9 ± 0,4	—	2,6 ± 0, 5 *	—
Частота фибриллярных осцилляций, Гц	16,5 ± 1,3	17,3 ± 0,8	10,1 ± 0,8 *	9,6 ± 0,6*
Число эктопических фокусов	—	2,2 ± 0,3	—	4,6 ± 0,4*

Примечание. * p < 0,05 по сравнению с крысами.

ния которых равны соответственно 2,2 ед. для крыс и 4,6 ед. для собак. Полученные результаты свидетельствуют о том, что показатели степени хаотичности процесса ФЖ зависят от числа функционирующих в сердце эктопических фокусов: чем больше число эктопических фокусов, тем выше степень хаотичности процесса ФЖ. У собак число эктопических фокусов больше, чем у крыс, поэтому степень хаотичности процесса ФЖ у собак выше, чем у крыс.

Полученные нами результаты касаются степени хаотичности фибриллярных осцилляций. Они описывают временную составляющую общей пространственно-временной гетерогенности электрической активности сердца, которая складывается из двух составляющих: пространственной гетерогенности и временной гетерогенности. Для регистрации разных составляющих используются разные экспериментальные методики. Если для изучения временной составляющей требуются классические записи ЭКГ, дополненные современным программным обеспечением их обработки и анализа, то для изучения пространственной гетерогенности используются различные виды картирования сердца. Так, для выявления электрической негетерогенности миокарда у больных с желудочковыми аритмиями, в работе [14] использовалась методика многополюсного поверхностного изопотенциального ЭКГ-картирования сердца; методика оптического картирования с применением потенциал-чувствительных красителей была применена авторами для изучения распространения возбуждения в миокарде легочных вен крысы [15]. Широкое применение в электрофизиологических исследованиях и клинической практике находят также методы 3D электрофизиологического картирования CARTO [16]. Эта система позволяет построить трехмерные изображения из множества эндокардиальных участков, которые последовательно картируются и обозначаются определенной цветовой гаммой, в соответствии с локальным временем активации. В работе [17] для уточнения момента возникновения экстрасистол в кардиоцикле и локализации эктопического центра использовались методы апекскардиографии (АКГ). Однако, несмотря на большое разнообразие применяемых в настоящее время методов картирования, вопросы пространственного распределения электрической негетерогенности миокарда желудочков при ФЖ и решения проблемы локализации эктопических фокусов у человека до сих пор остаются открытыми. Причиной тому является жизнеугрожающий характер этой аритмии, относящейся к медицине критических состояний, когда минуты решают все. Поэтому большая часть информации относительно динамических паттернов пространственной гетерогенности электрической активности миокарда при ФЖ получена либо

методом математического моделирования, либо в экспериментах на животных. Так, в работе [18] авторы изучали характеристики степени хаотичности пространственных паттернов и количество фазовых сингулярностей при ФЖ у млекопитающих различных видов. Сравнивались мелкие животные (кролики) с крупными (свиньи). Результаты исследований показали, что показатели степени хаотичности пространственных паттернов процесса ФЖ, а также количество фазовых сингулярностей у свиней статистически значимо превышают аналогичные показатели у кроликов. Электрическая стабильность сердца была выше у кроликов, чем у свиней; у кроликов процесс ФЖ носил, как правило, спонтанно-обратимый, а у свиней — спонтанно необратимый характер. Аналогичное имело место и в наших экспериментах. У мелких животных (крысы) в подавляющем большинстве случаев экспериментально вызванные ФЖ были кратковременные и спонтанно-обратимые, в то время как у крупных (собаки) практически все эпизоды ФЖ были спонтанно-необратимые. Известно, что электрическая стабильность сердца, оцениваемая по порогам возникновения ФЖ, различна у разных видов животных [6, 7, 18], в частности, у крыс она выше, чем у собак. Последнее может свидетельствовать о том, что чем больше число эктопических фокусов в миокарде желудочков, тем выше степень хаотичности фибриллярных осцилляций и тем ниже электрическая стабильность сердца у данного вида животного.

Таким образом, результаты проведенных модельных исследований временных характеристик фибриллярных осцилляций свидетельствуют том, что число функционирующих в миокарде желудочков эктопических фокусов при ФЖ определяет показатели степени хаотичности фибриллярных осцилляций и это число различно для разных видов животных. Полученные результаты согласуются с результатами исследований степени хаотичности пространственных характеристик ФЖ [18—20] и свидетельствуют в пользу предположения о том, что различия числа эктопических фокусов и степени хаотичности процесса ФЖ отражают различия структурно-функциональной организации миокарда желудочков у разных видов животных.

References

1. Cappiello G., Das S., Mazomenos E.B., Maharatna K., Koulaouzidis G., Morgan J., Puddu P.E. A statistical index for early diagnosis of ventricular arrhythmia from the trend analysis of ECG phase-portraits. *Physiol Meas.* 2015; 36(1): 107-31.
2. Ganesan A.N., Kuklik P., Gharaviri A., Brooks A., Chapman D., Lau D.H. et al. Origin and characteristics of

high Shannon entropy at the pivot of locally stable rotors: insights from computational simulation. *PLoS One* 2014; 9(11): e110662.

3. Mysiak A., Kobusiak-Prokopowicz M., Kaaz K., Jarczewska K., Glabisz W. Characteristics of chaotic processes in electrocardiographically identified ventricular arrhythmia. *Cardiol J.* 2017; 24(2): 151-8.

4. St-Yves G., Davidsen J. Influence of the medium's dimensionality on defect-mediated turbulence. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 2015; 91(3):032926.

5. Qu Z. Chaos in the genesis and maintenance of cardiac arrhythmias. *Prog Biophys Mol Biol.* 2011; 105(3): 247-57.

6. Mezentseva L.V., Kashtanov S.I., Vostricov V.A., Zviagintseva M.A., Koscharskaia I.L. Analysis of ECG in ventricular fibrillation in mans and animals based on chaos theory. *Biofizika* 2002; 47(2): 352-59.

7. Panescu D., Kroll M., Brave M. Limitations of animal electrical cardiac safety models. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2014; 6483-6.

8. Maruyama T, Sakaguchi H. Spiral chaos, ventricular fibrillation and defibrillation: simulation study toward painless defibrillation. *Fukuoka Igaku Zasshi.* 2014; 105(6): 131-8.

9. Pravdin S.F., Dierckx H., Katsnelson L.B., Solovyova O., Markhasin V.S., Panfilov A.V. Electrical wave propagation in an anisotropic model of the left ventricle based on analytical description of cardiac architecture. *PLoS One* 2014; 9(5):e93617.

10. Vandersickel N., Kazbanov I.V., Defauw A., Pijnappels D.A., Panfilov A.V. Decreased repolarization reserve increases defibrillation threshold by favoring early after depolarizations in an in silico model of human ventricular tissue. *Heart Rhythm.* 2015; 12(5): 1088-96.

11. Zheng Y., Wei D., Zhu X., Chen W., Fukuda K., Shimokawa H. Ventricular fibrillation mechanisms and cardiac

restitutions: An investigation by simulation study on whole-heart model. *Comput Biol Med.* 2015; 261-8.

12. Mezentseva L.V. Computer Modeling of Ventricular Fibrillation. *Biophysics* 2012; 57(2): 247-52.

13. Mezentseva L.V. Program MODVF — Mathematical Modeling of Ventricular Fibrillation. The certificate on the state registration of the computer program № 2011610618. 23.03. 2011.

14. Strutynskiy A.V., Glazunov A.B., Cygankov E.V., Banzelyuk E.N., Kallaeva A.N. Capabilities of revealing myocardium electrical inhomogeneity in patients with ventricular arrhythmias at multipole superficial ECG-mapping of the heart *Mezhdunarodnyy meditsinskiy zhurnal* 2004; 2: 17-21. (in Russian)

15. Kuz'min V.S., Rozenshtrauh L.V. Excitation Conduction in the Rat Pulmonary Veins Myocardium assessed by the optical mapping. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova* 2012; 98; 9: 1119-30. (in Russian)

16. Revishvili A.Sh., Rzaev F.G., Dzhetybaeva S.K. Electrophysiological diagnostics and catheter treatment of complex cardiac arrhythmias with the use of three-dimensional electro-anatomical mapping. *Vestnik Aritmologii* 2004; 34: 32-7. (in Russian)

17. Germanova O.A., Germanov A.V., Kryukov N.N., Germanova I.K., Borzenkova G.A. Functional classification of extrasystoles. *Materialy VII Vserossiyskogo sezda aritmologov Moscow, 1-3 june 2017.* Moscow; 2017: 12-3. (in Russian)

18. Park S.A., Gray R.A. Optical Mapping of Ventricular Fibrillation Dynamics. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 859: 313-42.

19. Behradfar E., Nygren A., Vigmond E.J. The role of Purkinje-myocardial coupling during ventricular arrhythmia: a modeling study. *PLoS One* 2014; 9(2):e88000.

20. Jalife J.I. Spatial and temporal organization in ventricular fibrillation. *Trends Cardiovasc Med.* 1999 Jul; 9(5): 119-27.

Сведения об авторах:

Перцов Сергей Сергеевич, доктор мед. наук, член-корр. РАН, зам. директора НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина.

© Коллектив авторов, 2018
УДК 612.017

Цибульников С.Ю.^{1,2}, Маслов Л.Н.¹, Нарыжная Н.В.¹, Иванов В.В.³

Хроническое периодическое воздействие холода не влияет на артериальное давление и устойчивость сердца к действию ишемии и реперфузии

¹ НИИ кардиологии, 634012, г. Томск, Россия, ул. Киевская, д. 111

² Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 634050, г. Томск, Россия, просп. Ленина, д. 30

³ Сибирский государственный медицинский университет, 634050, г. Томск, Россия, Московский тракт, д. 2

Цель: исследовать периодическое воздействие холода на крыс самцов Вистар. **Методика.** Исследования проводились по двум протоколам (8 ч, +4°C, 4 нед.) и (1,5 ч, +4°C, 4 нед.). Ишемию (45 мин) моделировали путем перевязки левой нисходящей коронарной артерии, с последующей реперфузией (120 мин). Выявление зоны некроза и зоны риска проводили по методу J. Neckar и соавт. Определяли уровень кортизола и кортикостерона иммуноферментным методом. **Результаты.** Было установлено, что периодическое воздействие холода не является хроническим стрессом. Было показано, что периодическое воздействие холода на организм крыс не влияет на показатели гемодинамики и устойчивость сердца к патогенному действию ишемии и реперфузии. **Заключение.** Периодическое воздействие холода на организм крыс не влияет на показатели гемодинамики и устойчивость сердца к патогенному действию ишемии и реперфузии.

Ключевые слова: стресс; холод; адаптация; сердце; ишемия.

Для цитирования: Цибульников С.Ю., Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Иванов В.В. Хроническое периодическое воздействие холода не влияет на артериальное давление и устойчивость сердца к действию ишемии и реперфузии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 17–21. DOI:

Для корреспонденции: Маслов Леонид Николаевич, доктор мед. наук, проф., руководитель лаб. экспериментальной кардиологии НИИ кардиологии, e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (РНФ) грант 14-15-00008.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.03.2017

Tsibulnikov S.Yu.^{1,2}, Maslov L.N.¹, Naryzhnaya N.V.¹, Ivanov V.V.³

Chronic intermittent cold exposure does not influence blood pressure and resistance of the heart to ischemia and reperfusion

¹ Research Institute of Cardiology, Kievskaya Str. 111, Tomsk 634012, Russia

² National Research Tomsk Polytechnic University, Prospekt Lenina 30, Tomsk 634050, Russia

³ Siberian State Medical University, Moskovsky Trakt 2, Tomsk 634050, Russia

Objective: To study the effect of periodic cold exposure on Wistar male rats. **Methods:** The study was conducted according to two protocols: 8 h at +4°C for 4 weeks and 1.5 h at +4°C for 4 weeks. Ischemia (45 min) was induced by ligation of the left descending coronary artery followed by reperfusion (180 min). Necrosis zone and area at risk were detected according to the method described by J. Neckar et al. Concentrations of cortisol and corticosterone were measured using the enzyme immunoassay. **Results:** The intermittent cold exposure was shown not to be chronic stress. The intermittent action of cold on the body of rats did not influence hemodynamic parameters or resistance of the heart to the detrimental effect of ischemia and reperfusion. **Conclusion:** The intermittent cold exposure of rats did not influence hemodynamic parameters or resistance of the heart to the detrimental effect of ischemia and reperfusion.

Keywords: stress; cold; adaptation; heart; ischemia.

For citation: Tsibulnikov S.Yu., Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Ivanov V.V. Chronic periodic cold exposure had no affect the blood pressure and stability of heart to action ischemia and reperfusion. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya.* (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2018; 62(1): 17–21. (in Russ.). DOI:

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. This work was supported by the Russian Science Foundation (RNF) grant 14-15-00008.

Information about authors:Tsibulnikov Sergey, <http://orcid.org/orcid.org/0000-0003-1534-2516>Maslov Leonid, <http://orcid.org/orcid.org/0000-0002-6020-1598>Natalia Naryzhnaya, <http://orcid.org/orcid.org/0000-0003-2264-1928>Vladimir Ivanov, <http://orcid.org/orcid.org/0000-0003-3326-729X>**Received** 10.03.2017**Введение**

Известно, что длительное пребывание пришлого населения в условиях Заполярья ведет к росту сердечно-сосудистых заболеваний [1]. Так, заболеваемость артериальной гипертонией среди мигрантов на Крайнем Севере возрастает по мере увеличения длительности проживания в Заполярье и достигает 61% у людей, проживших в этом регионе более 15 лет [2]. Заболеваемость острым инфарктом миокарда (ОИМ) у мигрантов, прибывших на Крайний Север, резко возрастает после 7—10 лет пребывания в Заполярье [3]. Среди больных ОИМ в Норильске лица молодого возраста (менее 44 лет) составляют 24% [4]. Важно отметить, что повышенная частота ОИМ и гипертонии у мигрантов на Крайнем Севере может быть связано не только с холодом, но и с другими факторами среды, как, например, полярный день/полярная ночь, а также со сменой образа жизни.

Экспериментальные исследования свидетельствуют, что длительное холодное воздействие может оказать негативное влияние на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы у подопытных животных. Так, ещё в 1956 г. было показано, что 20-дневная адаптация крыс к непрерывному воздействию холода (+5°C) приводит к увеличению у них артериального давления (АД) [5]. В 1990 г. О. Shechtman и соавт. [6] установили, что гипертензивный эффект адаптации (+5°C, 39 сут.) сохраняется, по меньшей мере, в течение 30 сут. после помещения крыс в комнатную температуру. Однако эти данные касаются только длительного непрерывного воздействия холода. Между тем, люди, работающие на Крайнем Севере, подвергаются периодическому воздействию низких температур, которое вызывает у них гипертоническую болезнь [2]. Как влияет подобное воздействие на АД у подопытных животных, до настоящей работы было не известно. Нет данных о том, как периодическая холодовая экспозиция изменяет устойчивость сердца к ишемии и реперфузии. Установлено, что адаптация крыс к периодическому воздействию холода (1—2°C, 3 ч, 5 раз в неделю) в течение 60 сут. не влияет на аритмогенный эффект кратковременной коронароокклюзии и реперфузии у крыс [7]. Однако было неизвестно, может ли периодическая холодовая экспозиция усугубить некроз

кардиомиоцитов, вызванный ишемией и реперфузией сердца.

Цель работы: оценить влияние периодического воздействия холода на артериальное давление и устойчивость сердца к действию ишемии и реперфузии.

Методика

Исследование выполнено на крысах-самцах Вистар массой 200—220 г. Использовали 2 протокола исследований. В первом случае животных подвергали воздействию температуры +4°C по 8 ч ежедневно в течение 4 нед. [8]. Согласно второму протоколу, крысы находились в холодильной камере при +4°C по 1,5 ч ежедневно в течение 28 сут. [9]. В группу контроля включены животные массой 200-220 г, которые находились при температуре +24°C. Коронароокклюзию моделировали через 24 ч после прекращения холодного воздействия.

Для моделирования коронароокклюзии крысы были наркотизированы α -хлоралозой (50 мг/кг, внутривенно, Sigma) и подключены к аппарату искусственной вентиляции легких «SAR-830 Series» (CWE Inc. США). Коронароокклюзию и реперфузию осуществляли по методу J.E. Schultz и соавт. [10]. Правая сонная артерия была канюлирована для измерения артериального давления (АД), которое регистрировали с помощью датчика давления SS13L (Biopac System Inc., Goleta, Калифорния, США), сопряженного с аппаратом для электрофизиологических исследований MP35 (Biopac System Inc., Goleta, США). Этот же аппарат использовали для записи ЭКГ. После 45 мин ишемии лигатуру ослабляли и восстановление кровотока подтверждали появлением эпикардальной гиперемии. Продолжительность реперфузии составляла 2 ч. Регистрацию ЭКГ осуществляли во время периода ишемии и в течение 30 мин после возобновления коронарного кровообращения с помощью аппарата для электрофизиологических исследований MP35 (Biopac System Inc., Goleta, США). Запись и обработку полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения INSTBSL-W компании Biopac System Inc., (Goleta, США).

При оценке нарушений ритма сердца принимали во внимание только желудочковые формы аритмий:

- единичные желудочковые экстрасистолы (6—16 за 10 мин);
- множественные желудочковые экстрасистолы (более 16 за 10 мин или 3—4 следующих друг за другом преждевременных сокращения);
- желудочковая тахикардия (более 4 последовательных желудочковых экстрасистол);
- желудочковая фибрилляция.

Выявление зоны некроза и зоны риска проводили по методу J. Necka и соавт. [11]. Зоной риска принято называть миокард, подвергшийся ишемии-реперфузии. После реперфузии сердца удаляли из грудной клетки и промывали с помощью шприца через канюлированную аорту физиологическим раствором, содержащим 125 МЕ/мл гепарина. Для определения области риска (ОР) лигатуру вновь затягивали и миокард окрашивали струйно через аорту 5% перманганатом калия. После промывки с помощью слайсера HSRA001-1 (Zivic Instruments, Pittsburgh, США) делались срезы сердца толщиной в 1 мм перпендикулярно к продольной оси. Область риска не окрашивалась перманганатом калия. Зона некроза выделялась из зоны риска путем окрашивания 1%-ным раствором 2,3,5-трифенил тетразолия хлорида в течение 30 мин при 37°C. Некротизированный миокард не окрашивался, поскольку в погибших кардиомиоцитах отсутствовали дегидрогеназы. После окончания окраски срезы помещали в 10% раствор формальдегида на 1 сут. На следующий день после окрашивания правый желудочек удалялся и срезы сканировались с обеих сторон сканером HP Scanjet C4050. Размер области риска и зоны инфаркта (ЗИ) определяли компьютеризированным планиметрическим методом. Размер зоны инфаркта выражался в процентах от размера зоны гипоперфузии (область риска), как соотношение ЗИ/ОР.

В отдельную серию экспериментов было включено 12 адаптированных и 15 контрольных крыс, которых использовали для определения уровня гормонов, надпочечников, селезенки, тимуса. Одним из показате-

лей адаптации к холоду у животных является относительное увеличение массы бурого жира [12, 13], поэтому у адаптированных животных взвешивали межлопаточный бурый жир.

Непосредственно после декапитации, которую осуществляли под эфирным наркозом, у крыс забирали кровь, которую центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 3000 об/мин. Полученную сыворотку крови замораживали в морозильной камере (при -18°C) и хранили до 2 нед. Измерение уровня кортикостерона проводили иммуоферментным методом набором «Corticosterone (Human, Rat, Mouse) ELISA» RE52211 (IBL International GmbH, Германия) на микропланшетном ридере «Infinite 200 PRO» (Tecan GmbH, Австрия). Измерение уровня кортизола проводили радиоиммунным методом с помощью набора «Cortisol RIA KIT» IM1841 (Beckman Coulter, Immunotech, Прага, Чехия). Радиоактивность проб определяли с помощью многоканального радиометра РИГ-12 «Прогресс-РИА» (Россия, Санкт-Петербург).

Статистическая обработка данных. Количественные значения выражали как среднее арифметическое (М) ± стандартная ошибка среднего (SEM). Статистическую значимость антиаритмического эффекта оценивали с помощью критерия χ^2 . Метод Манна—Уитни использовали для определения значимости влияния адаптации к холоду на соотношение ЗИ/ОР, уровень гормонов, массу тела крыс и массу бурого жира.

Результаты и обсуждение

Установлено, что прерывистое воздействие холода (8 ч, +4°C, 4 нед.) вызывает увеличение массы межлопаточного бурого жира в полтора раза по сравнению с интактными животными, изменений массы других органов мы не наблюдали (табл. 1). Уровень кортизола и кортикостерона в сыворотке крови не изменялся относительно показателей интактных крыс (табл. 1). Как известно бурый жир играет важную роль в термогенезе и акклиматизации к холоду [14],

Таблица 1

Морфологические показатели стресс-реакции у крыс (М ± SEM)

	Масса крысы, г	Тимус, мг	Н/п, мг	Селезенка, мг	Кортикостерон, нМоль/л	Кортизол, нМоль/л	Бурый жир, мг
Контроль, n = 15	282,6 ± 9,3	240,5 ± 13,2	35,6 ± 2,1	1059,5 ± 96,1	2568,5 ± 93,3	58,3 ± 12,2	300,4 ± 38,2
Холод 8 ч, n = 12	566,7 ± 28,9 p<0,01	272,5 ± 13,7	33,1 ± 1,1	1052,8 ± 58,6	2571,5 ± 98,5	49,7 ± 5,5	566,66 ± 28,9*
Холод 1,5 ч, n = 12	311,7 ± 21,1	244,5 ± 15,2	34,2 ± 1,9	1060,2 ± 64,3	2589,7 ± 99,8	41,9 ± 6,1	311,7 ± 21,02

Примечание. М — среднее значение масс органов; m — ошибка среднего; n — число крыс в группе; p < 0,01 — достоверность относительно интактных животных.

Таблица 2

Влияние хронического холодого воздействия на частоту возникновения ишемических и реперфузионных аритмий

Группа	Ишемия								Реперфузия			
	Фаза 1а (1–10 минута)				Фаза 1б (10–20 минута)				БЖА	МЖЭ	ЖТ	ЖФ
	БЖА	МЖЭ	ЖТ	ЖФ	БЖА	МЖЭ	ЖТ	ЖФ				
Контроль, n = 15	2 (13)	13 (87)	10 (67)	6 (40)	6 (40)	9 (60)	6 (40)	2 (13)	13 (77)	2 (13)	0 (0)	0 (0)
Холод +4°C по 8 ч в день 4 недели (группа сравнения 1), n = 10	1 (10)	9 (90)	8 (80)	4 (40)	4 (40)	6 (60)	6 (60)	1 (13)	8 (80)	2 (20)	0 (0)	0 (0)
Холод +4°C по 1,5 часа ежедневно 4 недели (группа сравнения 2), n = 10	0 (0)	10 (100)	8 (80)	5 (50)	4 (40)	6 (60)	6 (60)	1 (13)	8 (80)	2 (20)	0 (0)	0 (0)

Примечание. БЖА — без желудочковых аритмий; МЖЭ — множественные желудочковые аритмии; ЖТ — желудочковая тахикардия; ЖФ — желудочковая фибрилляция; n — количество животных с нарушением ритма, в скобках указан процент от общего числа животных в группе

поэтому увеличение массы бурой жировой ткани является показателем адаптации к холодому воздействию. Представленные данные свидетельствуют о том, что акклиматизация к холоду произошла, не вызвав стресса. Следовательно, подобное хроническое воздействие (+4°C, 8 ч/сут., 4 нед.) является исключительно адаптивной реакцией на холод.

Мы обнаружили, что кратковременное прерывистое воздействие холода (+4°C, 1,5 ч/сут., 4 нед.) изменений массы бурого жира и других органов не вызывает. Уровень кортизола и кортикостерона в сыворотке крови не изменялся относительно интактных крыс (табл. 1). Поскольку масса бурого жира в этой серии экспериментов не менялась, то можно утверждать, что и адаптация к холоду не происходила. Следовательно, периодическое кратковременное воздействие холода (+4°C, 1,5 ч/сут., 4 нед.) не является ни стрессом, ни адаптацией к холоду. Данные о массе органов и уровне гормонов согласуются с полученными нами ранее результатами [15].

При моделировании коронароокклюзии-реперфузии было показано, что выбранные нами модели

адаптации к холоду не оказывают эффекта на частоту возникновения ишемических и реперфузионных желудочковых аритмий (табл. 2).

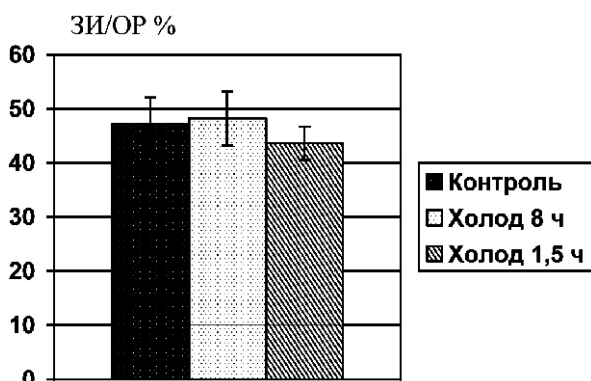
Кроме того, нами установлено, что адаптация к периодическому действию холода не оказывает влияния на показатели гемодинамики, о чём говорит отсутствие изменений частоты сердечных сокращений и артериального давления. Нельзя исключить того, что обнаруженное нами резкое увеличение массы крыс и содержания бурого жира (табл. 1) было результатом стрессорной активации гормональных систем, которая исчезает при завершении формирования адаптации к холоду.

Как показано на рисунке, у крыс, подвергнутых холодому воздействию по выбранным нами протоколам, индекс ЗИ/ОР не изменялся относительно животных контрольной группы.

Таким образом, длительное прерывистое воздействие холода (8 ч, +4°C, 4 нед.) является исключительно адаптивной реакцией на холод, а кратковременное прерывистое воздействие холода (+4°C, 1,5 ч/сут., 4 нед.) не является ни стрессом, ни адаптацией. Периодическое воздействие холода на организм крыс не влияет на показатели гемодинамики и устойчивость сердца к патогенному действию ишемии и реперфузии. Вместе с тем, исходя из полученных данных, нельзя исключить других возможных перекрестных защитных эффектах адаптации с помощью кратковременных воздействий холода.

References

- Maslov L.N., Vychuzhanova E.A., Gorbunov A.S., Tsubul'nikov S.Yu. The role of dyslipidemia in the pathogenesis of vascular events among Arctic populations. *Vestnik RAMN* 2014; (7-8): 133-6. (in Russian)
- Skavronskaya T.V., Leus A.I., Fedoseeva L.A., Kumarnovskaya T.A., Preobrazhenskiy D.V. The prevalence of hy-



Влияние холодовой адаптации на соотношение ЗИ/ОР у крыс.

pertension among the workers of the enterprises of the gas industry in the region of the Far North. *Kardiologiya*. 2005; 45(3): 84. (in Russian)

3. Turchinskiy V.I. Cardiac aspects of human adaptation in the Far North. *Vestnik AMN SSSR*. 1979; (6): 23-32. (in Russian)

4. Turchinskiy V.I., Sakharova S.I. The clinical course of myocardial infarction in young people under the conditions of the industrial city of the Far North. *Kardiologiya*. 1979; 19(5): 39-45. (in Russian)

5. Adolph E.F. General and specific characteristics of physiological adaptations. *Am. J. Physiol.* 1956; 184(1): 18-28.

6. Shechtman O., Papanek P.E., Fregly M.J. Reversibility of cold-induced hypertension after removal of rats from cold. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1990; 68(7): 830-5.

7. Barbarash N.A., Khaliulin I.G., Bykova O.V. Adaptation to a periodic load and cold, as a factor in the prevention of cardiac arrhythmias and contractility in acute myocardial ischemia in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 1993; (3): 10-2. (in Russian)

8. van Bergen P., Fregly M.J., Papanek P.E. Effect of a reduction in sodium intake on cold-induced elevation of blood pressure in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1992; 200(4): 472-9.

9. Bozhko A.P., Gorodetskaya I.V. Meaning of thyroid hormones in the implementation of the protective effects of cold adaptation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 1994; (4): 29-32. (in Russian)

10. Schultz J.E., Hsu A.K., Gross G.J. Ischemic preconditioning is mediated by a peripheral opioid receptor mechanism in the intact rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997b; 29: 1355-62.

11. Neckar J., Szarszoi O., Herget J. et al. Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia. *Physiol. Res.* 2003; Vol. 52: 171-5.

12. Lim S., Honek J., Xue Y., Seki T., Cao Z., Andersson P., Yang X., Hosaka K., Cao Y. Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice. *Nat. Protoc.* 2012; 7(3): 606-15.

13. Hauton D., May S., Sabharwal R., Deveci D., Egginton S. Cold-impaired cardiac performance in rats is only partially overcome by cold acclimation. *J. Exp. Biol.* 2011; 214(Pt 18): 3021-31.

14. Cannon B., Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 2004; 84(1): 277-359.

15. Maslov LN, Tsibulnikov S.Yu., Naryzhnaya NV, Ivanov VV, Tsibulnikova M.R. Chronic exposure to cold — adaptation without stress. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2016; (1): 28-31.

Сведения об авторах:

Цибульников Сергей Юрьевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментальной кардиологии, НИИ кардиологии; Национальный исследовательский Томский политехнический университет, e-mail: tsibulnikov@outlook.com;

Маслов Леонид Николаевич, доктор мед. наук, проф., руководитель лаб. экспериментальной кардиологии НИИ кардиологии, e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

Нарыжная Наталья Владимировна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментальной кардиологии, НИИ кардиологии, e-mail: natalynar@yandex.ru;

Иванов Владимир Владимирович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., Сибирский государственный медицинский университет, e-mail: ivanovvv1953@gmail.com

© Коллектив авторов, 2018
УДК 612.176.2

Афанасьев С.А., Егорова М.В., Куцыкова Т.В., Попов С.В.

Влияние свободных жирных кислот на поглощение кислорода изолированными кардиомиоцитами крыс при ишемическом или диабетическом поражении сердца

Научно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634012, Томск, Россия, ул. Киевская, д. 111А

Цель исследования — оценка влияния свободных полиненасыщенных и насыщенных жирных кислот (ЖК) на поглощение кислорода изолированными кардиомиоцитами интактных крыс и крыс с ишемическим или диабетическим поражением сердца. **Методика.** Опыты проведены на крысах-самцах Вистар (250—300 г). Инфаркт миокарда вызывали перевязкой левой коронарной артерии, сахарный диабет (СД) — однократной инъекцией стрептозотоцина в дозе 60 мг/кг, внутривенно. Изолированные кардиомиоциты получали ферментативным способом. Потребление кислорода оценивали полярографически при разной насыщенности инкубационной среды кислородом ($[O_2] \leq 8$ мг/л и $[O_2] \geq 16$ мг/л). В качестве жирных кислот, добавляемых в инкубационную среду, использовали арахидоновую и пальмитиновую кислоты (20 мкМ/л). **Результаты.** Установлено, что в среде инкубации с высоким содержанием кислорода скорость его потребления изолированными кардиомиоцитами, из сердец крыс с ишемическим или диабетическим поражением сердца, в 2—2,5 раза превышает таковую в кардиомиоцитах из сердца интактных крыс. Введение в среду инкубации 20 мкМ арахидоновой или пальмитиновой ЖК статистически значимо увеличивало потребление кислорода кардиомиоцитами интактных крыс. При моделируемых патологиях был получен прямо противоположный результат. В среде инкубации с низким содержанием кислорода была зафиксирована более низкая исходная скорость дыхания кардиомиоцитов, независимо от того, из сердец крыс какой группы они были выделены. Присутствие жирных кислот приводило к еще большему снижению скорости потребления кислорода кардиомиоцитами интактных крыс. В кардиомиоцитах из сердец с ишемическим поражением жирные кислоты снижали скорость потребления кислорода практически до значений, полученных для кардиомиоцитов интактных крыс. Напротив, жирные кислоты не оказывали заметного влияния на дыхание кардиомиоцитов из сердца крыс с диабетическим поражением. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что и насыщенные, и ненасыщенные свободные ЖК, на клеточном уровне, способны поддерживать баланс между поступлением и расходом кислорода. Действие ЖК определяется функциональным состоянием кардиомиоцитов и содержанием кислорода во внеклеточном пространстве. Это обстоятельство, вероятно, влияет на состояние энергетического метаболизма кардиомиоцитов и при реальном ишемическом или диабетическом поражении сердца пациентов.

Ключевые слова: кардиомиоциты; стрептозотоциновый диабет; жирные кислоты; постинфарктный кардиосклероз.

Для цитирования: Афанасьев С.А., Егорова М.В., Куцыкова Т.В., Попов С.В. Влияние свободных жирных кислот на поглощение кислорода изолированными кардиомиоцитами крыс при ишемическом или диабетическом поражении сердца. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 22—26. DOI:

Для корреспонденции: Афанасьев Сергей Александрович, доктор мед. наук, зав. лаб. молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики НИИ кардиологии, Томский НИМЦ, e-mail: Tursky@cardio-tomsk.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы статьи подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Поступила 28.09.2017

Afanas`ev S.A., Egorova M.V., Kutsykova T.V., Popov S.V.

Effect of free fatty acids on oxygen consumption by isolated rat cardiomyocytes in ischemic or diabetic heart disease

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, 111/a Kievskaya Str., Tomsk 634012, Russia

Aim. To evaluate the effect of free polyunsaturated and saturated fatty acids on oxygen uptake by isolated cardiomyocytes in intact rats and animals with ischemic or diabetic heart disease. **Methods.** This was a non-randomized, controlled study on three groups of male Wistar rats each containing 10 rats weighing 250—300 g. Myocardial infarction («heart attack») was produced by ligation of the left coronary artery; diabetes mellitus («diabetes») — by a single injection

of streptozotocin 60 mg/kg, i.p. The control group consisted of intact animals. Cardiomyocytes were isolated by an enzymatic method. Oxygen consumption was assessed polarographically at different saturation of the incubation medium with oxygen ($[O_2] \leq 8$ mg/l and $[O_2] \geq 16$ mg/l). Arachidonic and palmitic acid were used as fatty acids to be added to the incubation medium. **Results.** In the high-oxygen incubation medium, the rate of O_2 consumption by isolated cardiomyocytes from hearts of rats with ischemic or diabetic heart lesions was 2—2.5 times higher than in cardiomyocytes from heart of intact rats. Supplementing the incubation medium with 20 μ M arachidonic or palmitic acid statistically significantly increased oxygen consumption by cardiomyocytes of intact rats. An opposite result was obtained in models of diseases. In the low-oxygen incubation medium, the baseline rate of cardiomyocyte respiration was lower, no matter from which group of rats they had been isolated. The presence of fatty acids led to an even greater decrease in the rate of oxygen consumption by cardiomyocytes of intact rats. In cardiomyocytes from hearts with ischemic injury, fatty acids reduced the rate of oxygen consumption practically to the values observed for cardiomyocytes of intact rats. In contrast, fatty acids did not exert a noticeable effect on respiration of cardiomyocytes from the heart rats with diabetic lesions. **Conclusion.** The results suggested that saturated and unsaturated free fatty acids are able to maintain a balance between O_2 supply and utilization. The effect of fatty acids is determined by functional state of cardiomyocytes and oxygen content in the extracellular space. This fact apparently influences cardiomyocyte energy metabolism in patients with ischemic or diabetic heart disease.

Keywords: cardiomyocytes, fatty acids, streptozotocin-induced diabetes, myocardial infarction.

For citation: Afanas`ev S.A., Egorova M.V., Kutsykova T.V., Popov S.V. Influence of free fatty acids on oxygen consumption by isolated rat cardiomyocytes in ischemic or diabetic heart disease. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(1): 22—26. (in Russian). DOI:

For correspondence: Afanas`ev Sergey A., Doctor med., Head Laboratory of Molecular Cell Pathology and Genetic Diagnosis, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia; 634012, 111/a, Kievskaya str., Tomsk city, Russian Federation, e-mail: Tursky@cardio-tomck.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Afanasiev S.A., <http://orcid.org/0000-0001-6066-3998>

Egorova M.V., <http://orcid.org/0000-0003-0301-3547>

Popov S.V., <http://orcid.org/0000-0002-9050-4493>

Received 28.09.2017

Введение

Хорошо известно, что одним из факторов, приводящих к нарушению функциональной состоятельности миокарда, является несоответствие между увеличением потребности миокарда в кислороде и нарастанием кислородного и энергетического дефицита. Этот фактор имеет место при формировании сердечной недостаточности ишемического генеза и развитии «метаболической ишемии» миокарда при сахарном диабете [1]. Возникновение такого дисбаланса связывают с тем, что жирные кислоты ингибируют окисление глюкозы в кардиомиоцитах [1—3]. Среди результатов экспериментальных и клинических исследований нередко можно встретить противоречивые данные об интенсивности процессов окисления жирных кислот в кардиомиоцитах и, соответственно, о «кислородном запросе» миокарда [1, 4], что связано с получением данных на разных объектах и в разных условиях. Одной из проблем при работе является невозможность воспроизведения условий естественной оксигенации и ее регуляции, обусловленной поступлением кислорода из крови и изменением коронарного кровотока.

В последние годы была доказана высокая значимость длинноцепочечных жирных кислот в поддержании и регуляции функциональной активности патологического миокарда [5—7]. Эти работы вновь актуализируют вопрос о взаимосвязи окисления жирных кислот в кардиомиоцитах и росте «кислородного запроса» миокарда.

Цель исследования — оценка влияния свободных полиненасыщенных и насыщенных жирных кислот (ЖК) на поглощение кислорода изолированными кардиомиоцитами интактных крыс и крыс с ишемическим или диабетическим поражением сердца.

Методика

Выполнено нерандомизированное контролируемое исследование. В работе использовано 3 группы крыс-самцов Вистар (масса 250—300 г), группа «контроль» (интактные крысы $n = 10$), группа «инфаркт» ($n = 10$) и группа «диабет» ($n = 10$). Крысы имели свободный доступ к воде и пище, и содержались в стандартных условиях вивария.

Инфаркт миокарда воспроизводили у крыс перевязкой левой передней нисходящей коронарной артерии [8, 9], сахарный диабет — однократной инъекцией стрептозотоцина («Sigma», США) в дозе 60 мг/кг, внутривенно [10]. Через 6 нед. после перевязки коронарной артерии у крыс формировался постинфарктный кардиосклероз, а инъекция стрептозотоцина приводила к развитию сахарного диабета I типа. Диабет верифицировали по увеличению в крови крыс концентрации глюкозы (в 3—4,5 раза), снижению массы тела, развитию полиурии и полидипсии. Работу с животными проводили в соответствии с этическими требованиями, предъявляемыми к работе с экспериментальными животными (Федеральный закон «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г. и приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики»).

Для получения изолированных кардиомиоцитов применяли метод ферментативного разделения миокарда взрослой крысы собственной модификации [11, 12]. Скорость потребления кислорода кардиомиоцитами определяли полярографически, используя электрод Кларка [12, 13]. Инкубацию кардиомиоцитов проводили в растворе Krebs—Хенселяйта с добавлением 2 мМ CaCl₂. Измерения выполняли в термостабилизированной но не газоизолированной ячейке при температуре раствора 37°C и рН 7,4 в условиях постоянного перемешивания магнитной мешалкой. Концентрацию белка в пробе определяли методом Лоури.

Все измерения проводили в течение 1-го часа после получения суспензии изолированных кардиомиоцитов. Учитывая высокую чувствительность кардиомиоцитов к кислороду, инкубацию осуществляли в средах с низким (6—8 мг/л) и с высоким (16—20 мг/л) содержанием кислорода, обозначенных как [O₂] ≤ 8 мг/л и [O₂] ≥ 16 мг/л соответственно. Для насыщения среды инкубации кислородом использовали газовую смесь карбоген (O₂ — 95%, CO₂ — 5%). В качестве полиненасыщенной и насыщенной жирных кислот использовали, соответствен-

но, арахидоновую и пальмитиновую кислоты («Sigma», США) которые добавляли в среду инкубации в концентрации 20 мкМ/л. Скорость потребления кислорода выражали как нМ O₂ в минуту на 1 мг белка.

Размер выборки предварительно не рассчитывался, а величины показателей представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили по критерию Шапиро—Вилка. При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках гипотезу о равенстве средних выборочных величин проверяли, используя t-критерий Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при p < 0,05.

Результаты и обсуждение

Ни одна из крыс опытных групп после перевязки коронарной артерии или инъекции стрептозотоцина не погибла и, по прошествии шести недель, все животные были взяты в следующий этап исследования. Согласно данным представленным в табл. 1, исходная скорость потребления кислорода изолированными кардиомиоцитами, полученными из сердец крыс с ишемическим или диабетическим поражением сердца, в 2—2,5 раза превышает таковую в кардиомиоцитах из сердца интактных крыс.

Введение в среду инкубации клеток свободных жирных кислот, как пальмитиновой, так и арахидоновой, приводило к статистически значимому (при использовании пальмитиновой кислоты почти на 32%) увеличению потребления кислорода кардиомиоцитами интактных крыс. Напротив, в группах «инфаркт» и «диабет» было отмечено не менее выраженное снижение скорости потребления кислорода.

При сопоставлении данных, представленных в табл. 1 и 2, видно, что в среде инкубации с низким содержанием кислорода была зафиксирована более низкая исходная скорость дыхания кардиомиоцитов независимо от того, из сердец крыс какой группы они

Таблица 1

Скорость поглощения кислорода (нМ в мин на мг белка) изолированными кардиомиоцитами при высокой концентрации кислорода ([O₂] ≥ 16 мг/л) в среде инкубации

Группы крыс	Условия инкубации		
	Без добавок	Пальмитиновая кислота, 20 мкМ /л	Арахидоновая кислота, 20 мкМ /л
Контроль	65,4 ± 3,0	86,2 ± 5,0#	85,0 ± 7,1#
"Инфаркт"	152,3 ± 8,5*	102,1 ± 6,5*#	125,3 ± 9,5*#
"Диабет"	164,3 ± 12,4*	128,3 ± 9,8*#	118,2 ± 6,5*#

Примечание. * — p < 0,05 в сравнении с соответствующим показателем в контрольной группе; # — p < 0,05 внутригрупповые сравнения

были выделены. Различия для групп «контроль», «диабет» и «инфаркт» составили 1,3, 1,7 и 1,9 раза соответственно. Введение в этих условиях в инкубационную среду пальмитиновой или арахидоновой кислоты приводило к еще большему снижению скорости потребления кислорода кардиомиоцитами интактных крыс. В группе «инфаркт» жирные кислоты снижали скорость потребления кислорода кардиомиоцитами практически до значений, полученных в контрольной группе (интактные крысы). Однако в группе «диабет» ни одна из использованных жирных кислот не оказывала заметного влияния на дыхание кардиомиоцитов (табл. 2).

Из полученных данных следует, что изменение интенсивности дыхания изолированных кардиомиоцитов в присутствии свободных жирных кислот может быть разнонаправленным. Наблюдаемый эффект зависит как от функционального состояния кардиомиоцитов, так и от содержания кислорода во внеклеточном пространстве. Оба эти фактора способны влиять на градиент O_2 , и, следовательно, скорость его диффузии в кардиомиоциты. Разное влияние жирных кислот на интенсивность потребления кислорода в кардиомиоцитах интактных крыс и крыс с ишемическим или диабетическим поражением миокарда, по всей видимости, объясняется разными метаболическими возможностями их митохондрий. В первую очередь, здесь имеет значение способность митохондрий утилизировать кислород и использовать жирные кислоты в качестве энергетического субстрата.

Полученные результаты согласуются с представлениями о метаболических сдвигах в миокарде в результате ишемии и сахарного диабета [3, 14, 15]. Насыщенные и ненасыщенные свободные жирные кислоты приводили к однонаправленным изменениям потребления кислорода кардиомиоцитами, выделенными из миокарда интактных крыс и крыс с ишемическим или диабетическим поражением сердца. Отсутствие различий в эффектах жирных кислот на дыхание кардиомиоцитов в рассматриваемых условиях позволяет предположить, что оно является проявлением неспе-

цифического действия жирных кислот на митохондриальные процессы, как это было показано нами ранее [13].

Выявленная разнонаправленность действия и кислород-зависимость влияния жирных кислот, как насыщенной, так и ненасыщенной, по-видимому, объясняется именно функциональным состоянием митохондрий, их способностью утилизировать кислород и использовать жирные кислоты в качестве энергетического субстрата. Традиционно считается, что жирные кислоты увеличивают кислородный запрос кардиомиоцитов, что, в свою очередь, должно увеличивать кислородный дефицит при ишемии миокарда [3, 14, 15]. Однако наши результаты не согласуются с этим. Напротив, судя по полученным данным, жирные кислоты поддерживают определенный баланс между поступлением кислорода и его расходом на уровне клетки.

Результаты нашей работы перекликаются с предположениями и выводами, сделанными другими исследователями [4, 6]. Так, авторы этих публикаций отмечают, что в здоровом организме стойкое повышение циркулирующих жирных кислот не является необходимым и потенциально способно привести к нарушению функциональной активности миокарда. Однако жирные кислоты необходимы для поддержания нормальной активности кардиомиоцитов при уже развившихся заболеваниях сердца. Одним из возможных механизмов обнаруженных эффектов экзогенных жирных кислот на дыхание кардиомиоцитов может быть их способность как увеличивать неспецифическую проницаемость мембран митохондрий, так и ингибировать эти процессы в патологическом миокарде.

Таким образом, результаты свидетельствуют о том, что как насыщенные, так и ненасыщенные жирные кислоты, на клеточном уровне, способны поддерживать баланс между поступлением кислорода и его расходом. Действие свободных жирных кислот на интенсивность дыхания изолированных кардиомиоцитов определяется как их функциональным состоянием, так и содержанием кислорода во внеклеточном про-

Таблица 2

Скорость поглощения кислорода (нМ в мин на мг белка) изолированными кардиомиоцитами при низкой концентрации кислорода ($[O_2] \leq 8$ мг/л) в среде инкубации

Группы крыс	Условия инкубации		
	Без добавок	Пальмитиновая кислота, 20 мкМ /л	Арахидоновая кислота, 20 мкМ /л
Контроль	49,5 ± 2,1	32,4 ± 3,0#	30,5 ± 4,1#
"Инфаркт"	81,3 ± 6,5*	49,3 ± 6,3*#	51,3 ± 5,5*#
"Диабет"	97,8 ± 4,0*	104,3 ± 8,8*	108,5 ± 10,0*

Примечание. * — $p < 0,05$ в сравнении с соответствующим показателем в контрольной группе; # — $p < 0,05$ внутригрупповые сравнения

странстве. Это обстоятельство, вероятно, может определять состояние энергетического метаболизма кардиомиоцитов при реальном ишемическом или диабетическом поражении сердца пациентов. Одним из возможных механизмов обнаруженных эффектов экзогенных жирных кислот может быть их влияние на неспецифическую проницаемость мембран митохондрий.

References

1. Orudzheva S.A., Zvyagin A.A. Assessment of functional reserves of cardiovascular system in patients with diabetes. Dangers of anesthesia and anesthetic management capabilities of patients with purulent-necrotic forms of diabetic foot syndrome. *Novosti anesthesiologii and Intensive Care*. 2006; 3:1-19. (in Russian)
2. Velkov V. Free fatty acids — a risk factor for insulin resistance and ischemia: Prospects for risk assessment and diagnosis. *Poliklinika*. 2008; 4: 50-1. (in Russian)
3. Lopaschuk G.D., Ussher J.R., Folmes C.D., Jaswal J.S., Stanley W.C. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*. 2010; 90(1): 207-58.
4. Brindley D.N., Kok B.P.C., Kienesberger P.C., Lehner R., Dyck J.R.B. Shedding light on the enigma of myocardial lipotoxicity: the involvement of known and putative regulators of fatty acid storage and mobilization. *Am J Physiol*. 2010; 298: E897-E908.
5. Chowdhury R., Warnakula S., Kunutsor S., Crowe F., Ward H.A., Johnson L. et al. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2014; 160(6): 398-406.
6. Mozaffarian D., Lemaitre R.H., King I.B., Song X., Huang H., Sacks F.M. et al. Plasma Phospholipid Long-Chain Omega-3 Fatty Acids and Total and Cause-Spe-

cific Mortality in Older Adults: the Cardiovascular Health Study. *Ann Intern Med*. 2013; 158: 515-25.

7. Van Bilsen M., Planavila A. Fatty acids and cardiac disease: fuel carrying a message. *Acta Physiol*. 2014; 211(3): 476-90.

8. Rebrova T.Yu., Kondratieva D.S., Afanasiev S.A., Barzah E.I. Activity of lipid peroxidation and the functional state of the myocardium during cardiac remodeling in rats after experimental myocardial infarction. *Kardiologiya*. 2007; (6): 41-5. (in Russian)

9. Afanasiev S.A., Rebrova T.Yu., Kondratieva D.S. Features phospholipid composition of erythrocyte membranes in a myocardial infarction. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2007; (53): 541-46. (in Russian)

10. Afanasiev S.A., Kondratieva D.S. Popov S.V. Developing a model of comorbidity of heart failure and diabetes mellitus type 1 in the experiment. *Bulleten experimentalnoy Biologii i Meditsyny*. 2012; (153): 523-26. (in Russian)

11. Egorova M.V., Afanasiev S.A., Popov S.V. A simple method for the isolation of cardiomyocytes from adult rat heart. *Bulleten experimentalnoy Biologii i Meditsyny*. 2005; 140: 357-60. (in Russian)

12. Egorova M.V., Afanasiev S.A., Popov S.V. Role of phospholipase A2 in the activation respiration of isolated cardiomyocytes under postinfarction cardiosclerosis. *Bulleten experimentalnoy Biologii i Meditsyny*. 2008; 146: 631-33. (in Russian)

13. Egorova M.V., Afanasiev S.A. The regulatory role of free fatty acids in the maintenance of membrane homeostasis heart mitochondria in experimental myocardial ischemia. *Bulleten sibirskoy meditsyny*. 2012; (3): 31-8. (in Russian)

14. Aleksandrov A.A. Diabetic heart: Scramble for mitochondria. *Consilium medicum*. 2003; (5): 509-13. (in Russian)

15. Ashrafian H., Redwood C., Blair E., Watkins H. Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion. *Trends Genet*. 2003; (19): 263-8.

Сведения об авторах:

Афанасьев Сергей Александрович, доктор мед. наук, проф., зав. лаб. молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики, e-mail: Tursky@cardio-tomsk.ru;

Егорова Маргарита Владимировна, канд. биол. наук, мл. науч. сотр.;

Куцыкова Татьяна Викторовна, аспирант;

Попов Сергей Валентинович, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, руководитель отд. хирургического лечения сложных нарушений ритма сердца и электрокардиостимуляции.

© Коллектив авторов, 2018

УДК 577.125.8:615.217.4+616.12-008.331.1

Соколовская А.А.¹, Вирус Э.Д.¹, Александрин В.В.¹, Роткина А.С.¹,
Никифорова К.А.¹, Московцев А.А.^{1,2}, Иванов А.В.¹, Кубатиев А.А.^{1,2}

Апоптоз тромбоцитов при глобальной ишемии головного мозга у крыс

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, Балтийская, 8² ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

Цель исследования. Ишемические повреждения головного мозга, являются одной из наиболее частой причин инвалидности и смертности во всем мире. Недавно была установлена роль апоптоза тромбоцитов в патофизиологии инсульта, однако его механизмы до сих пор остаются невыясненными. Несмотря на различные экспериментальные модели, направленные на мониторинг апоптоза тромбоцитов, результаты, относительно изучения и выявления апоптоза тромбоцитов при ишемии головного мозга у крыс, весьма немногочисленны. Цель исследования — анализ апоптоза тромбоцитов с помощью метода проточной цитофлуориметрии на модели глобальной ишемии мозга у крыс. **Методика.** В экспериментах использовано 6 крыс-самцов Вистар в возрасте от 5 до 6 мес., разделенных на 2 группы: интактный контроль (К) и глобальная ишемия головного мозга. Модель глобальной ишемии головного мозга у крыс воспроизводилась путём билатеральной окклюзии общих сонных артерий на фоне гипотензии. Уровень системного артериального давления снижали посредством кровопотери до 40—45 мм рт. ст. Суспензию тромбоцитов крыс получали методом гельфильтрации с использованием сефарозы 2В. Для анализа экстернализации фосфатидилсерина (ФС) тромбоциты крыс инкубировали с Аннексином V-PE в связывающем буфере. Для оценки митохондриального мембранного потенциала (ММП) тромбоциты инкубировали с катионным красителем JC-1. После инкубации образцы немедленно анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). **Результаты.** Согласно полученным данным, экстернализация ФС на тромбоцитах крыс, перенесших инсульт, была значительно выше ($53,45 \pm 4,21\%$), чем в контрольной группе крыс ($5,27 \pm 2,40\%$). Данный эффект подтверждается выраженной деполяризацией митохондриальных мембран ($\Delta\Psi_m$). После экспериментальной ишемии мозга почти 40% тромбоцитов было деполяризовано. **Заключение.** Используемый в работе подбор методов и маркеров обеспечивает понимание механизмов апоптоза тромбоцитов как в экспериментальных, так и в клинических условиях. Полученные данные позволяют сделать заключение, что апоптоз тромбоцитов является одним из факторов развития глобальной ишемии головного мозга у крыс. Результаты могут быть использованы для понимания механизмов, участвующих в развитии ишемического повреждения, что, в свою очередь, может быть использовано при разработке новых терапевтических стратегий.

Ключевые слова: тромбоциты; апоптоз; глобальная ишемия мозга; аннексин-5; митохондриальный мембранный потенциал; проточная цитометрия.

Для цитирования: Соколовская А.А., Вирус Э.Д., Александрин В.В., Роткина А.С., Никифорова К.А., Московцев А.А., Иванов А.В., Кубатиев А.А. Апоптоз тромбоцитов при глобальной ишемии головного мозга у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 27—35. DOI:

Для корреспонденции: Соколовская Алиса Анатольевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. регуляции агрегатного состояния крови, отдел молекулярной и клеточной патофизиологии, ФГБНУ НИИОПП, e-mail: alice.sokolovskaya@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Поступила 11.01.2018

Sokolovskaya A.A.¹, Virus E.D.¹, Aleksandrin V.V.¹, Rotkina A.S.¹,
Nikiforova K.A.¹, Moskovtsev A.A.^{1,2}, Ivanov A.V.¹, Kubatiev A.A.^{1,2}

Platelets apoptosis in rats after global brain ischemia

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia² Russian Medical Academy of Postdoctoral Education, Barrikadnaya Str. 2/1, Moscow 12599, Russia

Aim. Stroke is one of the most common causes of disability and mortality worldwide. Multiple experimental models of stroke have focused on monitoring of platelet apoptosis. However, studies on and detection of platelet apoptosis in rats with ischemic stroke are very scarce. We investigated platelet apoptosis in rats with global brain ischemia using flow cytometry. **Methods.** Experiments were carried out on healthy, adult Wistar male rats weighing 300—350 g. The rats were divided into

the following 2 groups: intact rats and rats with global brain ischemia. Global brain ischemia was induced by two-vessel (2-VO) carotid occlusion in combination with hypotension. Systemic blood pressure was reduced by 40—45 mm Hg by inducing haemorrhage. Platelets were isolated by gel filtration on Sepharose 2B. For evaluation of phosphatidylserine (PS) externalization, platelets were incubated with Annexin V-PE and analyzed on FACSCalibur (BD Biosciences). Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) was measured during platelets apoptosis using JC-1, a mitochondrial membrane potential indicator. Platelets were analyzed by flow cytometry immediately after the incubation. **Results.** PS externalization on platelets was significantly greater after global brain ischemia ($53.45 \pm 4.21\%$) than in the control group ($5.27 \pm 2.40\%$). Pronounced depolarization of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) confirmed this finding. In the rat group with experimental brain ischemia, almost 40% ($35.24 \pm 5.21\%$) of platelets were depolarized. **Conclusion.** Our results provide insight into mechanisms involved in platelet apoptosis during ischemic stroke and can be used in further development of new therapeutic strategies.

Keywords: platelets, apoptosis, global brain ischemia, Annexin-V, mitochondrial membrane potential, flow cytometry.

For citation: Sokolovskaya A.A., Virus E.D., Aleksandrin V.V., Rotkina A.S., Nikiforova K.A., Moskovtsev A.A., Ivanov A.V., Kubatiev A.A. Platelets apoptosis in rats after global brain ischemia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(1): 27—35. (in Russian). DOI:

For correspondence: Alisa Sokolovskaya, PhD, Leading Researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «General Pathology and Pathophysiology», e-mail: alice.sokolovskaya@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Sokolovskaya A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0112-2734>

Virus E.D., <https://orcid.org/0000-0001-9371-6494>

Aleksandrin V.V., <https://orcid.org/0000-0003-4625-6522>

Rotkina A.S., <https://orcid.org/0000-0003-1969-2679>

Nikiforova K.A., <https://orcid.org/0000-0002-4119-7175>

Ivanov A.V., <http://orcid.org/0000-0002-2424-6115>

Kubatiev A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>

Received 11.01.2018

Введение

Ишемические повреждения головного мозга, являются одной из наиболее частой причин инвалидности и смертности во всем мире [1]. В клинических условиях была установлена связь между развитием инсульта и аномальной активностью апоптоза тромбоцитов [2].

Установлено, что для апоптоза тромбоцитов характерны те же события, что и для ядросодержащих клеток. Это — деполаризация мембран митохондрий ($\Delta\Psi_m$), активация и транслокация проапоптотических белков Вах и Вак в митохондрию, появление (экстернализация) фосфатидилсерина (ФС) на внешней поверхности мембран, высвобождение апоптогенного цитохрома С из митохондриального межмембранного пространства в цитозоль, активация каспаз 3, 9 и 8 [3—5]. По данным последних исследований экстернализация ФС на внешней стороне плазматической мембраны тромбоцитов является независимым процессом от активации каспаз [6]. Все большее число работ указывает на потенциальное воздействие биоэнергетики митохондрий на активацию и агрегацию тромбоцитов. Более того, доказано, что образование митохондриального мембранного по-

тенциала (ММП) играет решающую роль в контроле апоптоза тромбоцитов [7, 8]. Оказалось, что различные стимулы (тромбин, кальций ионофор А23187, антитела против гликопротеина GpIIb) способны индуцировать деполаризацию ММП в тромбоцитах крови [9].

При исследовании роли тромбоцитов в ишемии, предпочтение отдается моделям *in vitro* [10, 11]. В свою очередь, различия в функциональной организации мозга у человека и животных не являются препятствием для исследования молекулярного и клеточного ответа при глобальной ишемии мозга [12]. До последнего времени модели глобальной ишемии *in vivo* активно использовались для понимания механизмов, участвующих в эволюции ишемического повреждения.

Как правило, для изучения апоптоза тромбоцитов используются тромбоциты человека [3, 5, 12], собак и мышей [9, 13]. Исследования ММП в контроле апоптоза тромбоцитов грызунов, и в частности в тромбоцитах крыс, весьма немногочисленны [14]. Следует также отметить, что изучение и выявление апоптоза тромбоцитов при ишемии мозга у крыс ранее не проводилось.

Большое число разных методов позволяет регистрировать процесс апоптоза тромбоцитов на фоне различных патофизиологических процессов. Однако основные проблемы анализа апоптоза тромбоцитов связаны с их повышенной чувствительностью к стрессу, к механическим нагрузкам (центрифугирование) или к резким изменениям температуры. Поэтому крайне важно использовать быстрый и надежный метод регистрации апоптоза, к примеру, такой, как точная цитофлуориметрия.

Цель исследования — анализ апоптоза тромбоцитов с помощью метода проточной цитофлуориметрии на модели глобальной ишемии мозга у крыс.

Методика

Экспериментальная модель

В эксперименте использовано 6 крыс-самцов Вистар в возрасте от 5 до 6 мес., массой от 450 до 500 г (виварий НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва). Работу выполняли с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755 и «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.03.1986.

Глобальная ишемия головного мозга у крыс производилась путём билатеральной окклюзии общих сонных артерий на фоне гипотензии. Уровень системного артериального давления (АД) снижали посредством кровопотери до 40—45 мм рт. ст. (до 30% объема циркулирующей крови или $2,5 \pm 0,2$ мл/100 г массы), после чего следовала двусторонняя окклюзия общих сонных артерий в течение 10 мин, затем реинфузия крови и снятие зажимов с сонных артерий. Кровопотерю и реинфузию осуществляли через бедренную артерию. В эксперименте использовано 2 группы крыс: интактный контроль (К) и глобальная ишемия головного мозга. Кровь, полученная от крыс без ишемии, использовалась для контрольных исследований.

Реактивы и растворы

В работе использовали агонисты активации тромбоцитов: коллаген (Stano-Log Corp, Havertown, США), кальциевый ионофор A23187 (Alexis Corporation, Swiss). Додецилсульфат натрия (SDS) и Диметилсульфоксид (ДМСО) — реагенты компании Sigma Aldrich (США). Для измерения ММП использовали JC-1 — липофильный катион 5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазол карбоцианин йодид, 5 мг (Molecular Probes, США). Буфер Тироде (без кальция) — 4 мМ HEPES, 135 мМ NaCl,

2,7 мМ KCl, 2,4 мМ KCl, 2,4 мМ MgCl₂, 5,6 мМ D-глюкоза, 3,3 мМ NaH₂PO₄, 0,35 мг/мл бычий сывороточный альбумин, рН 7,4. Фосфатно-солевой буфер (ФСБ) с 1% раствором параформальдегида (ПФА) для фиксации клеток.

Выделение тромбоцитов

Кровь (~3,15 мл) из яремной вены животного забирала в стерильные пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта 3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 9:1. Кровь центрифугировали на рефрижераторной лабораторной центрифуге (Jouan BR4i multifunction Centrifuge, Франция) 10 мин при 200 г и температуре 23°C. Отбор богатой тромбоцитами плазмы (PRP) производили в объёме 3/4 для более полного отделения от эритроцитов и лейкоцитов, а оставшийся осадок центрифугировали для получения бедной тромбоцитами плазмы (PPP) в течение 15 мин при 1000 g.

Для гельфильтрации тромбоцитов колонку заполняли гелем сефарозой 2B (Sepharosa 2B, Sigma), объём колонки примерно в 10 раз превышал объём наносимой PRP. Тромбоциты считали в камере Горяева с использованием инвертированного микроскопа Axiovert 40 (Carl Zeiss, Германия). Количество отмытых тромбоцитов доводили буфером Тироде до концентрации 2×10^8 /мл.

Проточная цитофлуориметрия

Тромбоциты в количестве 1×10^6 — 2×10^6 клеток в 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами FITC Mouse Anti-Rat CD61, clone F11 (BD Pharmingen, San Jose, США) 30 мин при 4°C. В качестве изотипического контроля использовали антитела FITC Mouse IgG1, κ (BD Pharmingen, San Jose, США). После инкубации образцы клеток фиксировали добавлением 400 мкл 1% раствора параформальдегида в ФСБ и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованном воздухоохлаждаемым аргоновым лазером (длина волны 488 нм). В каждом образце накапливали 30 000 событий. Сбор данных проводили в программе CELLQuest (Becton Dickinson, США).

Для оценки экстернализации ФС полученные суспензии тромбоцитов крыс ресуспендировали в буфере Тироде и разводили до концентрации 1×10^7 тромбоцитов/мл. В качестве отрицательного контроля использовали покоящиеся интактные тромбоциты, полученные от контрольных крыс. В качестве положительного контроля тромбоциты контрольных крыс инкубировали с ионофором кальция A23187 (5 мкМ) при комнатной температуре 15 мин. Затем тромбоциты в количестве 1×10^6 в 10 мкл переносили из поло-

жительного контроля в пробирку, содержащую 100 мкл Аннексин V-PE в связывающем буфере (BD Pharmingen, США). Те же процедуры выполнялись при исследовании тромбоцитов крыс после ишемии мозга и неактивированных интактных тромбоцитов. Все образцы инкубировали при комнатной температуре в темноте 15 мин. После чего добавляли 400 мкл связывающего буфера и немедленно анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. В каждом образце накапливали 30 000 событий. Сбор данных проводили в программе CELLQuest (Becton Dickinson, США).

Анализ митохондриального мембранного потенциала (ММП) ΔΨm

Смесь тромбоцитов доводили до нужного объема буфером Тироде для тромбоцитов (1 × 10⁸ тромбоцитов/мл). В качестве положительного контроля тромбоциты контрольных крыс инкубировали с апоптоз-индуцирующими агентами: тромбином (10 нм), или А23187 (5 мкМ) при комнатной температуре 15 мин. В качестве отрицательного контроля использовали покоящиеся интактные тромбоциты, полученные от контрольных крыс.

Каждый исследуемый образец инкубировали с JC-1 (2 мкг/мл) в течение 30 мин при 37°С. Образец доводили буфером Тироде до объема 1 мл и немедленно анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Интенсивность флуоресценции регистрировали в зеленой 588 нм (FL1) и красной 710 нм (FL2) областях. В каждом гейте анализировали 30 000 событий. Сбор данных проводили в программе CELLQuest (Becton Dickinson, США).

Статистическая обработка результатов

Каждый опыт в конкретных экспериментальных условиях проводили в трех-четырёх повторах. Результаты проточной цитометрии представлены как среднее арифметическое и стандартное отклонение. Для определения статистической значимости различий между средними при доверительном уровне 95% (ρ<0,05) использовали *t*-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании апоптоз тромбоцитов анализировали на модели крыс после глобальной ишемии мозга с помощью метода экстернализации

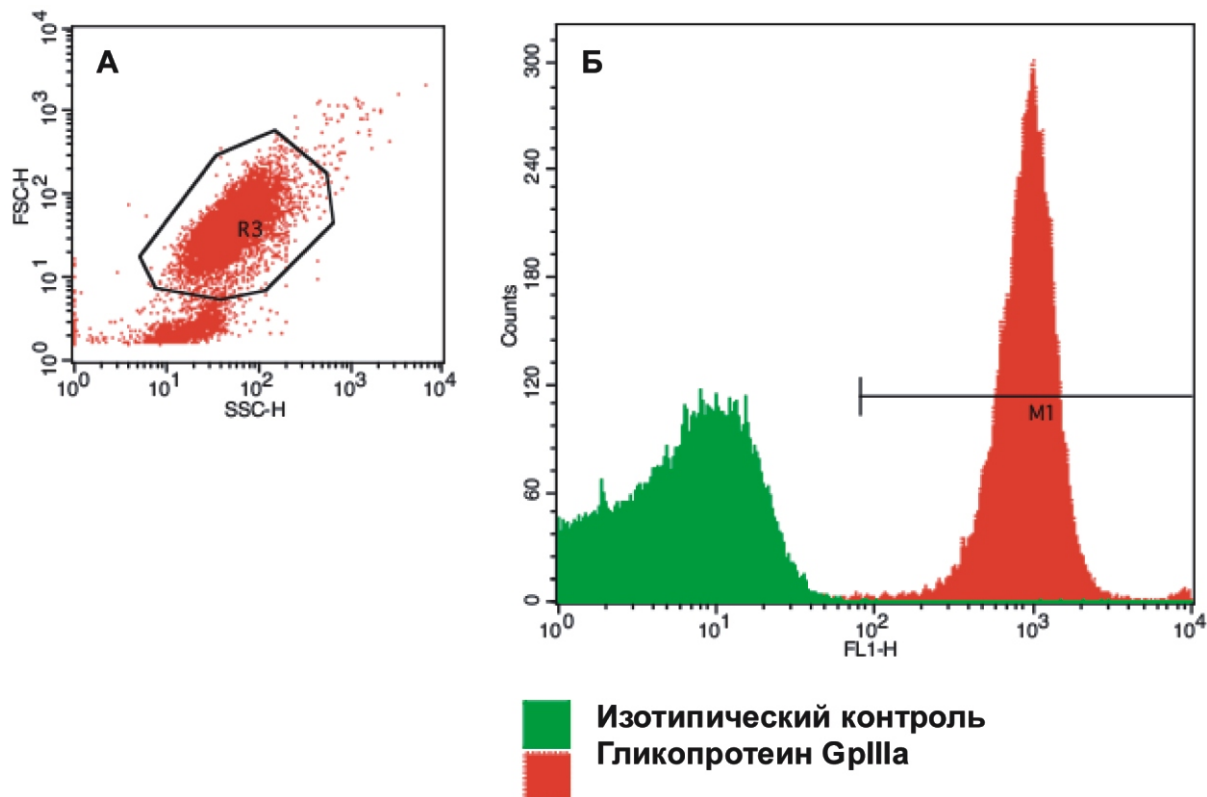


Рис. 1. Цитометрический анализ экспрессии гликопротеина GpIlla на поверхности тромбоцитов крыс. Тромбоциты инкубировали с антителами анти-CD61/FITC и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. А — цитограмма на основании прямого FSC и бокового SSC светорассеивания. Показан гейт — R3, содержащий основной пул клеток тромбоцитов; Б — соответствующая гистограмма. В качестве изотипического контроля — FITC Mouse IgG1, κ.

ФС и анализа ММП. Тромбоциты, полученные после гельфильтрации, тестировали на экспрессию специфического поверхностного маркера гликопротеина GРIIa. Как видно на рис. 1, тромбоциты, полученные для данного эксперимента, стабильно экспрессировали поверхностный маркер гликопротеин GРIIa. Процент CD61⁺ во всех случаях был около 95% ($96,75 \pm 2,01\%$, mean \pm SEM, n = 6).

Экстернализацию ФС на внешнюю сторону плазматической мембраны выявляли с помощью антикоагулянтного белка Аннексина V, который используется для выявления ранних апоптотических клеток с помощью проточной цитофлуориметрии [12, 15]. В качестве положительного контроля использовали тромбоциты контрольных крыс, инкубированные с ионо-

формом кальция A23187, который является золотым стандартом для индукции апоптоза.

Тромбоциты анализировали на основе параметров, измеряемых проточной цитофлуориметрией. На цитограмме проточного цитофлуориметра FACSCalibur на основании прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеивания устанавливали соответствующее окно дискриминации (гейт), который содержал основной пул тромбоцитов, с целью удаления мелких (дебрис) и крупных (агрегаты) частиц. На рис. 2 представлен цитометрический анализ распределения частиц по размеру (FSC) и гранулярности (SSC) в контрольном образце (рис. 2, А) и в образце тромбоцитов крыс после экспериментальной ишемии мозга (рис. 2, Б).

Средняя панель (рис. 2, В, Г, Д) показывает dot plot эксперимента, где по оси X расположены тром-

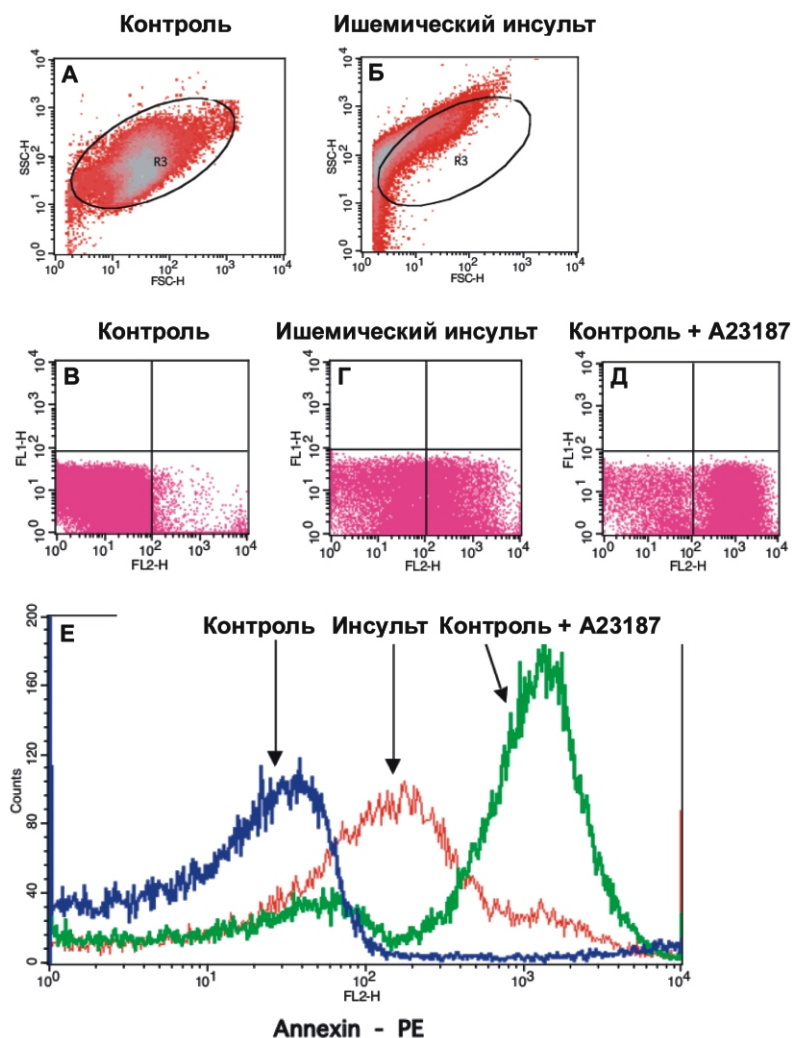


Рис. 2. Цитометрический анализ экспрессии ФС на тромбоцитах крыс: (А) — в контрольной группе крыс, (Б) — в группе крыс после экспериментального ишемического инсульта. В, Г, Д — dot plot и соответствующие гистограммы (Е) (overlay). Тромбоциты контрольных крыс, активированные ионофором кальция A23187 (5 мкМ), использовали в качестве положительного контроля. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

боциты, окрашенные Аннексином V-PE. Нижняя панель на рис. 2 (E) показывает три различные гистограммы данного эксперимента путем их наложения (overly).

В экспериментах было зарегистрировано, что экспрессия ФС на тромбоцитах крыс, после глобальной ишемии мозга ($53,45 \pm 4,21\%$, mean \pm SEM, n = 3) значительно более выражена (рис. 2, Г, E), чем в контрольной группе ($5,27 \pm 2,40\%$ mean \pm SEM, n = 3) (рис. 2, А, E). Под воздействием положительного контроля A23187 почти 90% ($95,18 \pm 4,13\%$, mean \pm SEM, n = 4) тромбоцитов были активированы (рис. 2, Д, E).

Деполяризация мембраны также является одним из важных событий апоптоза тромбоцитов. По некоторым данным, формирование агрегатов JC-1 очень чувствительно к перепадам температуры, поэтому нами был использован метод, при котором тромбоциты инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин [16]. Принцип метода заключается в том, что в присутствии повышенного мембранного потенциала

краситель JC-1 накапливается в виде J-агрегатов в матрице поляризованных митохондрий, что регистрируется по каналу красной флуоресценции (FL2). Во время деполяризации митохондрий JC-1 не накапливается внутри мембраны, он образует мономерные формы, регистрируемые по каналу зелёной флуоресценции (FL1). То есть происходит изменение флуоресценции от красной (FL2) к зелёной (FL1), что и можно зарегистрировать методом проточной цитометрии. Как показано на рис. 3 (А) количество JC-1 агрегатов в тромбоцитах от контрольных крыс составляло почти 90% ($82,23 \pm 7,21\%$, mean \pm SEM, n = 3). В тромбоцитах крыс после экспериментальной ишемии мозга около 40% ($35,24 \pm 5,21\%$, mean \pm SEM, n = 3) тромбоцитов было деполяризовано (рис. 3Г). Активация тромбоцитов от контрольных крыс под воздействием ионофора кальция A23187 приводила к падению мембранного потенциала, около 80% тромбоцитов было деполяризовано ($75,19 \pm 5,21\%$, mean \pm SEM, n = 3) (рис. 3, Б). Под воздействием тромбина почти 50% тромбоцитов

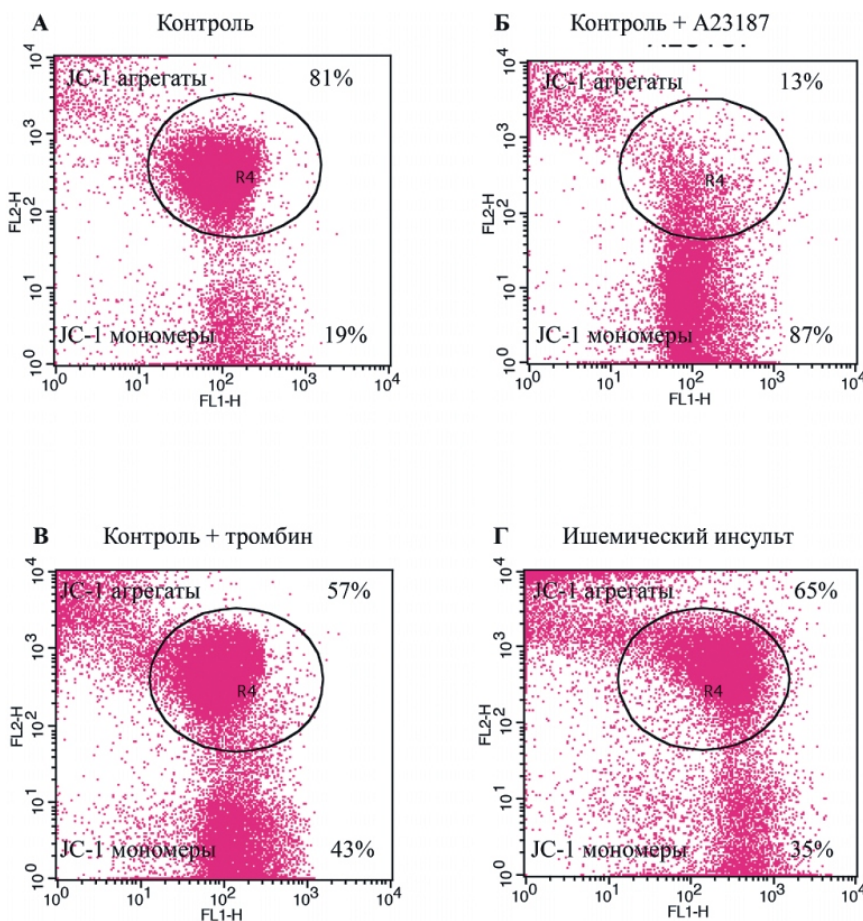


Рис. 3. Деполяризация мембранного потенциала ($\Delta\psi_m$) в тромбоцитах крыс: в контрольной группе — (А), в группе контрольных крыс, активированных ионофором кальция A23187 (Б) и тромбином (В), в группе крыс после экспериментального ишемического инсульта (Г). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

($43,12 \pm 6,07\%$, mean \pm SEM, $n = 3$) было деполяризовано (рис. 3, В).

Многие экспериментальные модели используются для изучения ишемического инсульта, а механизмы повреждения клеток определяют путем тестирования эффектов клеточного стресса или клеточной смерти в конкретной модели. Модели ишемического инсульта, использованные для животных, очень напоминают поражение при инсульте, наблюдаемое у пациентов [13, 17].

Существует 2 основных способа воспроизведения ишемического инсульта *in vivo*: методы фокальной и глобальной ишемии [18, 19]. В первом случае в мозге формируется инфарктное ядро (зона некроза), окруженное пенумброй («ишемической полутени»). В ядерной зоне нейроны гибнут по механизму некроза, тогда как в пенумбре по механизму апоптоза [20]. В случае глобальной ишемии мозга очага некроза не образуется, и гибель отдельных нервных клеток происходит преимущественно по механизму апоптоза [21]. Предполагается, что циркуляторная гипоксия приводит к активации тромбоцитов и секреции ими тромбосана А₂, который способствует констрикции церебральных артериол и снижению кровотока [22]. В то же время явление апоптоза в тромбоцитах в этих условиях до сих пор не изучалось.

Апоптоз тромбоцитов может возникать как при агонист-индуцированной активации тромбоцитов (коллаген, тромбин, АДФ), так и при индукции нефизиологическими агонистами, такими, как форбол-меристатацетат (РМА) и ионофор кальция А₂₃₁₈₇ [12]. Процессы и пути, участвующие в обеспечении ФС экспозиции в каждом из этих случаях различны.

Известно, что не все активированные тромбоциты демонстрируют экспрессию ФС [23]. С другой стороны, присутствие ФС на мембранах активированных тромбоцитов ускоряет важнейшие реакции свертывания на несколько порядков. При активации размер некоторых тромбоцитов может значительно варьировать как следствие формирования микрочастиц МЧ [24, 25]. Одновременное стимулирование рецепторов тромбина и коллагена является наиболее распространенным механизмом производства МЧ [26].

Исследования показывают, что биохимические маркеры апоптоза (деполяризация ММП, активация каспазы-3) и морфологические изменения, сопровождающие терминальную фазу апоптоза (сжатие тромбоцитов и формирование МЧ) сильно зависят от формирования поры, изменяющей проницаемость мембраны митохондрий МРТР [8]. Как известно, именно от степени и продолжительности открытия МРТР зависит судьба клетки при инсульте мозга и инфаркте миокарда [27]. Согласно некоторым данным, апоптоз в тромбоцитах индуцирует высвобождение

МЧ, которые играют важную роль в процессах воспаления и коагуляции [28].

Установлено, что один только метод не может быть использован для подтверждения того, что тромбоциты гибнут по классическому пути апоптоза [9].

Согласно требованиям, выдвинутым Номенклатурным комитетом по изучению гибели клеток (NCCD), рекомендовано, в первую очередь, использовать одновременно несколько различных маркеров апоптоза, таких, как деполяризация митохондриальной мембраны $\Delta\Psi_m$, экспрессия белков Вах и Вак, активация каспазы-9 и каспазы-3, экстернализация ФС, образование МЧ [9, 29]. И второе, идентифицировать апоптотические тромбоциты по сравнению с положительным и отрицательным контролем.

Для установления оптимального протокола измерения тромбоцитов грызунов, особенно важны такие факторы, как подготовка крови, фиксация тромбоцитов, тип антикоагулянта, методы анестезии и методы исследования функций тромбоцитов. Проточный цитометрический анализ функций тромбоцитов имеет то преимущество, что он может быть использован для процедуры фиксации клеток, что, в свою очередь, позволяет блокировать обменные процессы в клетках, и оставляет активационно-зависимые антигены на поверхности клетки. Поэтому возможность активации артефактных клеток сводится к минимуму [30].

Следует отметить, что тромбоциты крыс по морфологическим свойствам ближе к человеческим тромбоцитам. Кроме того, количество крови, полученное от крыс, позволяет получать достаточное количество тромбоцитов из РРР, столь необходимое для различных функциональных методов [10, 30].

Заключение

Таким образом, на модели глобальной ишемии мозга у крыс с помощью метода проточной цитометрии было показано, что экспрессия ФС на тромбоцитах крыс после глобальной ишемии мозга была значительно выше, чем в контрольной группе крыс. Феномен апоптоза тромбоцитов при глобальной ишемии мозга у крыс был подтвержден с помощью выраженной деполяризации митохондриальной мембраны ($\Delta\Psi_m$). Соответствующий подбор методов и маркеров могут помочь в понимании механизмов апоптоза тромбоцитов как в экспериментальных, так и в клинических условиях. В свою очередь, экспериментальная модель глобальной ишемии мозга у крыс может быть использована для изучения механизмов, участвующих в эволюции ишемического повреждения мозга и поиске новых препаратов в предотвращении апоптоза тромбоцитов.

References

1. Wardlaw J.M., von Kummer R., Farrall A.J., Chappell F.M., Hill M., Perry D. A. Large web-based observer reliability study of early ischaemic signs on computed tomography. The Acute Cerebral CT Evaluation of Stroke Study (ACCESS). *PLoS One*. 2010; 5(12). doi:10.1371/journal.pone.0015757
2. Cevik O. The apoptotic actions of platelets in acute ischemic stroke. *Biol Rep*. 2013; 40: 6721-7. doi:10.1007/s11033-013-2787-9.
3. Leytin V. *Blood Rev*. 2012; Mar; 26(2): 51-63. doi:10.1016/j.blre.2011.10.002.
4. Josefsson EC, White MJ, Dowling MR, Kile BT. Platelet life span and apoptosis. *Methods Mol Biol*. 2012; 788: 59-71. doi: 10.1007/978-1-61779-307-3_5.
5. Mindukshev I.V., Rukoyatkina N.I., I.A. Dobrylko, E.A. Skvertchinskaya, E.R. Nikitina, Krivoslyk V.V., S.P. Gambaryan, A.I. Krivchenko. Characterisation of enucleated cells apoptosis: human platelets and erythrocytes. *Russkiy zhurnal fiziologii* 2013; 99(1): 93-110. (in Russian)
6. Artemenko E.O., Sveshnikova A.N., Panteleev M.A. Programmed cell death of platelets during their overactivation. *Oncohematology* 2014; 3: 63-6. doi: http://dx.doi.org/10.17650/1818-8346-2014-9-3-63-66.
7. Barile C.J., Herrmann P.C., Tyvoll D.A., Colman J.P., Decreau R.A., Bull B.S. Inhibiting platelet-stimulated blood coagulation by inhibition of mitochondrial respiration. *PNAS*. 2012; 109: 2539-43. doi:10.1073/pnas.1120645109.
8. Leytin V., Allen D.J., Mitochondrial control of platelet apoptosis: effect of cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *Laboratory Investigation* 2009; 89: 374-84. doi:10.1038/labinvest
9. Kassassir H., Siewiera K., Przygodzki T., Labieniec-Watala M. and Watala C. Only the Truth Would Enlighten Us — The Advantages and Disadvantages of Flow Cytometry as a Method of Choice in the Study of Mouse and Rat Platelets, Flow Cytometry — Select Topics, M.Sc. Ingrid Schmid (Ed.), InTech. 2016. doi: 10.1182/blood-2012-06-437723.
10. Holloway Paul M., and Gavins Felicity N.E. Modeling Ischemic Stroke In Vitro: The Status Quo and Future Perspectives. *Stroke* 2016; 47(2): 561-9. doi:10.1161/STROKEAHA.115.011932.
11. Sommer C.J. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017; 133(2): 245-61. doi:10.1007/s00401-017-1667-0
12. Gyulkhandanyan A.V., Mutlu A., Freedman J., Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 2012; 33, : 397-411. doi: 10.1007/s11239-012-0688-8.
13. Dasgupta S.K., Argaiz E.R., Mercado J.E., Maul H.O., Garza J., Enriquez A.B., et al. Platelet senescence and phosphatidylserine exposure. *Transfusion* 2010; 50: 2167-75. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.02676.x
14. Wu F., Liu Y., Luo L., Lu Y., Yew D.T., Xu J. et al. Platelet mitochondrial dysfunction of DM rats and DM patients. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2015; 8: 6937-46.
15. Gibbins and Martyn P. Mahaut-Smith (eds.), Platelets and Megakaryocytes: Volume 3, Additional Protocols and perspectives. *Methods in Molecular Biology* 2012; vol. 788.
16. Verhoeven A.J., Verhaar R., Gouwerok Eric G.W., and Korte D. The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality. *Transfusion* 2005; 45:82-89. doi: 10.1111/j.1537-2995.2005.04023.x.
17. Mergenthaler P., Dirnagl U., Meisel A: Pathophysiology of stroke: Lessons from animal models. *Metabolic Brain Disease* 2004; 19: 151-67. PMID: 15554412.
18. Cimino A., Balduini W., Carloni S., Gelosa P., Guerini U., Tremoli E., Sironi L. Neuroprotective effect of simvastatin in stroke: A comparison between adult and neonatal rat models of cerebral ischemia. *Neurotoxicology* 2005; 26: 929-33.
19. Woodruff T.M., Thundyil J., Sung-Chun T., Christopher G. Sobey, Stephen M. et al. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Molecular Neurodegeneration* 2011; 6: 11. doi:10.1186/1750-1326-6-11.
20. Jiang Y., Wu J., Keep R.F., Hua Y., Hoff J.T., Xi G. Hypoxia-inducible factor-1alpha accumulation in the brain after experimental intracerebral hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow. Metab*. 2002; 22: 689-96. DOI: 10.1097/00004647-200206000-00007.
21. Martin L.J., Sieber F.E., Traystman R.J. Apoptosis and Necrosis Occur in Separate Neuronal Populations in Hippocampus and Cerebellum after Ischemia and Are Associated with Differential Alterations in Metabotropic Glutamate Receptor Signaling Pathways. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2000 Jan; 20(1):153-67. PubMed: 10616804.
22. Rahangdale S., Yeh S.Y., Novack V., Stevenson K., Barnard M.R., Furman M.I. et al. The influence of intermittent hypoxemia on platelet activation in obese patients with obstructive sleep apnea. *J. Clin. Sleep Med*. 2011 Apr 15; 7(2): 172-8. PMID: PMC3077345.
23. Leytin, V., Allen, D.J., Lyubimov, E. & Freedman, J. Higher thrombin concentrations are required to induce platelet apoptosis than to induce platelet activation. *British Journal of Haematology*. 2007; 136: 762-4. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06503.x.
24. Rukoyatkina N., Begonja A. J., Geiger J., Eigenthaler M., Walter U., Gambaryan S. Phosphatidylserine surface expression and integrin alpha IIb beta 3 activity on thrombin/convulxin stimulated platelets/particles of different sizes. *Br J Haematol*. 2009; 144 (4): 591-602. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07506.x.
25. Paltsyn A.A. Platelet microparticles. *Pathologicheskaya fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2017; 61(1): 99-105.
26. Melki I., Tessandier N., Zufferey A., & Boilard E. Platelet microvesicles in health and disease. *Platelets*. 2017; 28(3): 214-21. doi: 10.1080/09537104.2016.1265924.
27. Mattson M.P., Kroemer G. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med*. 2003; 9: 196-205. doi:10.1016/S1471-4914(03)00046-7.
28. VanWijk M.J., VanBavel E., Sturk A., Nieuwland R., Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research* 2003; 59: 277-87. PMID: 12909311.
29. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. 2009; 16(1):3-11. doi:10.1038/cdd.2008.150.
30. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Reviews*. 2005; 19: 111-23. doi:10.1016/j.blre.2004.05.002.

Сведения об авторах:

Соколовская Алиса Анатольевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП;

Вирус Э.Д., канд. хим. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП;

Александрин В.В., канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник ФГБНУ НИИОПП;

Роткина А.С., науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП;

Никифорова К.А., аспирантка ФГБНУ НИИОПП;

Московцев А.А., канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, доцент каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России;

Иванов А.В., канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП;

Кубатиев А.А., доктор мед. наук, акад. РАН, руководитель отдела молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП, зав. каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2018
УДК 612.115.3:612.115.064

Оберган Т.Ю., Ляпина М.Г., Успенская М.С., Ляпина Л.А.

Особенности влияния гепариноида из пиона совместно с аргинином на растворение венозных тромбов у крыс

ФГБОУВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119234, г. Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1, строение 12

Цель исследования. Изучить влияние сочетанного применения гепариноида из пиона молочноцветкового, обладающего антикоагулянтным и фибринолитическим действием, и аргинина, улучшающего реологические свойства крови, на процессы фибрино- и тромбообразования, вызванные введением тромбoplastина. **Методика.** Эксперименты выполнены на крысах-самцах Вистар ($n = 36$) массой 200—220 г. Процессы фибринообразования с последующим тромбообразованием вызывали внутривенным введением 0,4 мл 1% бычьего тромбoplastина (модель тромбообразования — МТ). Для изучения эффективности сочетанного подкожного применения препаратов определяли антикоагулянтную и фибриндеполимеризационную активность каждого препарата в отдельности. За 30 мин до введения смеси гепариноида с аргинином (в соотношении 1:4 по весу) внутривенно вводили тромбoplastин. Контролем служили животные, которым вводили физиологический раствор в том же объеме и в аналогичных условиях опыта. **Результаты.** Установлено в условиях *in vitro*, что препарат, включающий гепариноид из корней пиона молочноцветкового и аргинин при весовом соотношении 1:4, обладал антикоагулянтной и собственной фибриндеполимеризационной активностью. При подкожном введении этого препарата в минимальных дозах (0,05 мг на 200 г массы тела) в крови крыс повышались антикоагулянтная, суммарная, неферментативная и ферментативная фибринолитическая активность и снижалась до нормальных значений концентрация фибриногена. На модели крыс с тромбообразованием, вызываемым введением тканевого тромбoplastина, показан антитромботический и тромболитический эффекты исследуемого препарата. Впервые показано, что применение этого препарата через 30 мин после начала тромбообразования у крыс препятствовало развитию процессов тромбообразования или даже способствовало растворению свежих образующихся фибриновых сгустков. **Заключение.** Сочетанное применение гепариноида из пиона с аргинином в минимально действующих дозах усиливает деполимеризацию фибрина и препятствует процессам тромбообразования. Исследование может служить экспериментальным обоснованием применения препаратов при тромботических осложнениях с целью благоприятного воздействия на растворение свежих только что образующихся тромбов.

Ключевые слова: гепариноид из пиона; аргинин; деполимеризация фибрина; антитромботические препараты.

Для цитирования: Оберган Т.Ю., Ляпина М.Г., Успенская М.С., Ляпина Л.А. Особенности влияния гепариноида из пиона совместно с аргинином на растворение венозных тромбов у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 36—40. DOI:

Для корреспонденции: Ляпина Людмила Анисимовна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр., каф. физиологии человека и животных, лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова, биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: lyapinal@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.05.2017

Obergan T.Yu., Lyapina M.G., Uspenskaya M.S., Lyapina L.A.

Features of the effect of peony heparinoid combined with arginine on dissolution of venous thrombi in rats

M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Bldg 12, Moscow 119234, Russian Federation

The aim was to study the efficacy of a combination of a heparinoid from *Paeonia lactiflora* roots, which exerts anticoagulant and fibrinolytic effects, and arginine, which improves blood rheologic properties, in fibrin and thrombus formation induced by administration of thromboplastin. **Methods.** Experiments were performed on male Wistar rats ($n = 36$) weighing 200—220 g. Processes of fibrin formation with subsequent thrombosis were induced by administration of 1% bovine thromboplastin (0.4 ml, i.v.) (thrombosis model, МТ). To study the effect of the combined subcutaneous treatment, minimum fibrin depolymerizing and anticoagulant activity of each drug was evaluated individually. Thromboplastin was injected 30 minutes prior to administration of the heparinoid and arginine mixture (weight ratio 1:4). Animals receiving saline in the

same amount and under similar experimental conditions served as controls. **Results.** Co-administration of heparinoid and arginine at minimum doses (0.05 mg) stimulated fibrin depolymerization and anticoagulant effects of each drug and did not increase the risk of bleeding. **Conclusion.** The combined use of peony heparinoid with arginine at minimum active doses increased fibrin depolymerization and prevented thrombosis. The study can serve as an experimental justification for using these drugs in thrombotic complications to favorably influence dissolution of fresh, recently formed blood clots.

Keywords: peony heparinoid; arginine; fibrin depolymerization; antithrombotic drugs.

For citation: Obergan T.Yu., Lyapina M.G., Uspenskaya M.S., Lyapina L.A. Features of the effect of heparinoid from the pion together with arginine on the dissolution of venous thrombi in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Experimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(1): 36–40. (in Russian). DOI:

For correspondence: Ludmila A. Lyapina, Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher, Head of Laboratory of protective systems of blood name prof. B.A. Kudrjashov, Federal Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Leninsky gory, 1, str. 12, Moscow, 119234, Russian Federation, e-mail: lyapinal@mail.ru

Information about authors:

Obergan T.Yu., <http://www.orcid.org/0000-0002-3760-3943>

Lyapina M.G., <http://www.orcid.org/0000-0001-6039-5161>

Uspenskaya M.S., <http://www.orcid.org/0000-0002-5368-4026>

Lyapina L.A., <http://www.orcid.org/0000-0002-8983-652X>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 10.05.2017

Введение

Процессы тромбообразования сопутствуют многим заболеваниям, в том числе сердечно-сосудистым, сахарному диабету, метаболическому синдрому и др. Современные патофизиологические представления о возникновении в организме предпосылок для процессов образования фибрина с последующим переходом в тромбозы [1] диктуют необходимость поиска нетоксичных противотромботических препаратов, сочетающих ряд свойств — антикоагулянтных, фибринолитических и антитромботических [2]. Такими свойствами обладают растительные компоненты гликозаминогликановой природы [3, 4]. С другой стороны, известно также, что аминокислота аргинин оказывает влияние на улучшение противосвертывающего потенциала крови и сосудистого тонуса организма вследствие выхода из сосудистого эндотелия противотромботических веществ [5, 6]. В настоящее время известна способность веществ животного и растительного происхождения проявлять антикоагулянтную активность [7—12]. Кроме того, в некоторых растениях [13] выявлены компоненты, снижающие концентрацию фибриногена крови, усиливающие ее фибринолиз, активность антитромбина III, а также снижающие агрегацию тромбоцитов.

Изучена функциональная активность гепариноида из пиона молочнокветкового, которая играет важную роль в восстановлении противосвертывающего потенциала крови при развитии гиперкоагуляции [14].

Цель исследования — изучение сочетанного применения гепариноида из корней пиона молочнокветкового, обладающего антикоагулянтным и фибринолитическим действием, и аргинина, улучшающего реологические свойства крови, на процессы фибрино- и тромбообразования, вызванные введением тканевого тромбопластина.

Методика

В исследованиях применялся полученный нами гепариноподобный препарат (гепариноид) из корней молочнокветкового пиона (ГП) [14]. Уровень гепарина в препарате гепариноида определен амидолитическим методом.

Опыты проведены на 75 белых крысах-самцах Wistar массой 200—220 г. Все эксперименты на животных осуществлялись в соответствии с этическими принципами и документами, рекомендованными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург 15.06.2006). Животные содержались в стандартных условиях вивария на обычном лабораторном рационе при свободном доступе к воде и пище. Поставлено 2 серии экспериментов. В первой серии определяли *in vitro* процессы фибринообразования и влияние на них смеси гепариноида из пиона совместно с аргинином в соотношении 1:4 по весу. Для характеристики параметров плазмы крови готовили нестабилизированные фактором XIIIa фибриновые

пластины, на которые наносили отдельно по 0,05 мл гепариноида в концентрации 0,05 мкг (по гепарину), аргинина в концентрации 0,2 мкг и их смеси, содержащей 0,05 мкг гепарина и 0,2 мкг аргинина. Контролем служили образцы, содержащие физиологический раствор. После 2 ч инкубации проб при 37°C в течение 2 ч производили измерение фибриндеполимеризационной активности (ФДПА) препаратов по зонам лизиса на нестабилизированном фибрине. Во второй серии в экспериментах использовано 65 крыс. В условиях *in vivo* изучали образование фибрина в процессе тромбообразования, которое вызывали введением тромбопластина (модель тромбообразования — МТ). Эффективность сочетанного применения препаратов оценивали по антикоагулянтной и фибриндеполимеризационной активности каждого препарата. Тромбообразование вызывали внутривенным введением каждой крысе по 0,4 мл 1%-ного бычьего тромбопластина. Через 30 мин после этого животным опытной группы (группа 4) подкожно вводили смесь гепариноида с аргинином, содержащую по 10 мкг гепарина и 40 мкг аргинина в 0,2 мл физиологического раствора NaCl. Контролем служили животные (группа 1), которые получали вместо смеси физиологический раствор в том же объеме и тем же способом. Животным группы 2 вводили гепариноид, содержащий в 0,2 мл 10 мкг гепарина, группы 3 — аргинин, содержащий 40 мкг в 0,2 мл. Животным группы 5 (Норма) не делали никаких инъекций. Кровь брали из *vena jugularis* через 60 мин после введения крысам смеси или ее составных частей. В качестве консерванта использовали 3,8%-ный раствор цитрата натрия в соотношении 9:1. Кровь центрифугировали при 3000g в течение 10—12 мин для получения бедной тромбоцитами плазмы.

В плазме крови определяли следующие биохимические параметры гемостаза: всю суммарную фибринолитическую активность (СФА), неферментативную (НФ) и ферментативную (ФФ) фибринолитическую активность на нестабилизированных фибриновых пластинах и антикоагулянтную активность по

тесту активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Кроме того, проводили измерения концентрации фибриногена [15].

Все данные обработаны статистически с применением непараметрического критерия Вилкоксона (программа Statistica 6).

Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов (табл. 1) в условиях *in vitro* установлена высокая ФДПА смеси гепариноида с аргинином, которая проявлялась в максимальной степени по сравнению с ее составными частями. Кроме того, ФДПА смеси практически обуславливала всю СФА. Антикоагулянтная активность в присутствии плазмы крови здоровых крыс была наивысшей в смеси гепариноида с аргинином.

Во второй серии экспериментов (табл. 2) у животных группы 1 (контроль) через 60 мин после инъекции физиологического раствора на фоне введения тромбопластина наблюдалось развитие состояния повышенной свертываемости крови по сравнению с Нормой (группа 5): снижались антикоагулянтная активность (по тесту АЧТВ) на 56% и фибринолитическая активность, а именно, СФА — на 107%, НФ — на 303%, ФФ — на 40%, повышалась концентрации фибриногена плазмы на 27%. В группах 2 (введение гепариноида) и 3 (введение аргинина) на фоне введения тромбопластина выявлено повышение АЧТВ на 30% и 8,5%, СФА — на 41% и 12%, НФ — на 92% и 23%, ФФ — на 24% и 9% соответственно по сравнению с контролем (группа 1). У опытной группы 4 отмечалось полное восстановление свертываемости крови: АЧТВ резко увеличилось на 40%, СФА, НФ и ФФ — на 107%, 342% и 26% соответственно по сравнению с соответствующими образцами плазмы контрольной группы 1.

Таким образом, на МТ у крыс сочетанное применение гепариноида из пиона совместно с аргинином привело к усилению противосвертывающих эффектов

Таблица 1

Сочетанное влияние гепариноида из пиона и аргинина на процессы фибринообразования в условиях *in vitro* (M ± m)

Препараты	АЧТВ, с + плазма крыс	СФА, мм ²	ФДПА, мм ²		ФФ, мм ²
			Без плазмы крови		
Контроль — физ. р-р (n = 7)	36,2 ± 2,2	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Гепариноид (n = 7)	40,0 ± 1,8*	2,4 ± 0,3*	2,4 ± 2,0**	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Аргинин (n = 6)	36,7 ± 1,7	0,9 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Опыт — гепариноид + аргинин (n = 7)	45,6 ± 0,7**	48,8 ± 1,8**	48,6 ± 0,7**	0,2 ± 0,05	0,2 ± 0,05

Примечание. АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время, собственная СФА — суммарная фибринолитическая активность, собственная ФДПА — фибриндеполимеризационная активность, ФФ — ферментативный фибринолиз; * — p<0,05; ** — p<0,01 — по сравнению с контролем 1

Таблица 2

Влияние сочетанного применения гепариноида из пиона и аргинина на процессы фибринообразования на фоне введенного тромбoplastина крысам (модель тромбообразования) в условиях *in vivo* ($M \pm m$)

Вводимые препараты на фоне тромбoplastина	АЧТВ, с	СФА, мм ²	НФ, мм ²	ФФ, мм ²	Ф, мг%
Группа 1 (контроль) — физиологический раствор (n = 8)	22,1 ± 1,3 (100%)	10,1 ± 2,4 (100%)	2,6 ± 0,1 (100%)	7,5 ± 1,8 (100%)	380 ± 12,4 (100%)
Группа 2 — гепариноид (n = 7)	28,9 ± 1,5* (130%)	14,3 ± 1,4* (141%)	5,0 ± 0,7** (192%)	9,3 ± 0,9* (124%)	310 ± 10,0 * (81%)
Группа 3 — аргинин (n = 7)	24,0 ± 1,0 (108,5%)	11,4 ± 0,9 (112%)	3,2 ± 0,7** (123%)	8,2 ± 0,5* (109%)	356 ± 11,5 (93%)
Группа 4 (опыт) — гепариноид + аргинин (n = 8)	31,1 ± 0,9** (140%)	21,0 ± 1,3** (207%)	11,5 ± 1,1** (442%)	9,5 ± 1,0* (126%)	288 ± 9,8** (75%)
Группа 5 (Норма) — без препаратов (n = 8)	32,5 ± 1,5** (146%)	21,0 ± 0,4** (207%)	10,5 ± 0,9** (403%)	10,5 ± 2,0* (140%)	280,0 ± 7,5** (73%)

Примечание. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ — по сравнению с контролем (группа 1) Ф — концентрация фибриногена

в организме на фоне введенного тромбoplastина, вызывающего генерацию тромбина и резкую гиперкоагуляцию [1]. Следовательно, исследуемая смесь обладала защитным противотромботическим эффектом. Важно отметить, что отдельно гепариноид из пиона также оказывал противотромботические эффекты, но в значительно меньшей степени, чем смесь. Исследование может служить экспериментальным обоснованием совместного применения гепариноида из пиона и аргинина в низких дозах для предупреждения тромботических осложнений при развитии гиперкоагуляции в организме.

Заключение

Результаты исследования свидетельствуют о том, что сочетанное применение гепариноида из корней пиона в дозе 50 мкг/кг массы тела крыс и аргинина в дозе 200 мкг/кг массы тела усиливают противосвертывающие свойства обоих препаратов и препятствуют развитию процессов фибрино- и тромбообразования в организме при их провокации. Использование исследуемых препаратов в низких дозах снижает риск возникновения побочных геморрагических эффектов. Комплексный препарат растительного гепариноида и аргинина может относиться к перспективным противотромботическим средствам, так как оказывает противосвертывающий эффект в условиях генерации тромбина в кровотоке.

References

1. Furie B., Furie B.K. Formation of the clot. *Thromb Res.* 2012; 130(1): S44-6.
2. De Asevedo T.C., Bezerra M.E., Santos M.G., Souza L.A., Marques C.T., Benevides H.M., Leute E.L. Heparinoids algal and their anticoagulant, hemorrhagic activities and platelet aggregation. *Biomed Pharmacother.* 2009; 63(7): 477-83.

3. Krichevsky L.A. A low molecular weight heparins in the modern system of control of blood clotting. *Anestesiologiya and reanimatologiya. Meditsinskaya reabilitatsiya.* 2015; 16(117): 42-8. (in Russian)

4. Kristanov N.A., Safonova M.Yu., Bolotova V.S., Pavlova E.D., Sakanyan E.J. Prospects for the use of plant polysaccharides as therapeutic and prophylactic tools. *Vestnik VGU, seriya Biologiya, Khimiya, Farmatsiya.* 2005; 1: 212-21. (in Russian)

5. Mirmiran P., Bahadoran Z.G., Gaseu A., Asisi F. The Association of Dietary L-Arginine Intake and Serum Nitric Oxide Metabolites in Adults: A Population-Based Study. *Nutrients* 2016; 8 (5).

6. Trashkov A.P., Kovalenko A.L., Vasil'ev A.G., Valeev V.V. L-arginine as dietary supplement for improving microvascular function. Pathophysiological and clinical aspects of using L-arginine in cardiology and and angiology. *Angiol Sosud Khir.* 2016; 22 (3): 9-15.

7. Arslan R., Bektas N., Bor Z., Sener E. *Pharm Biol.* 2015; 53(2): 275-9.

8. Collic-Jouault S., Bavington C., Delbarre-Ladrat C. Heparin-like entities from marine organisms. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2012; 207: 423-49.

9. Sogut O., Erdogan M.O., Kose R., Boleken M.E., Kaya H., Gokdemir M.T., Ozgonul A., Iynen I., Albayrak L., Dokuzoglu M.A. Hemostatic efficacy of a traditional medicinal plant extract (Ankaferd Blood Stopper) in bleeding control. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2015; 21(4): 348-53.

10. Wu M., Xu L., Zhao L., Xiao C., Gao N., Luo L., Yang L., Li Z., Chen L., Zhao J. Structural analysis and anticoagulant activities of the novel sulfated fucan possessing a regular well-defined repeating unit from sea cucumber. *Mar. Drugs.* 2015; 13 (4): 2063-84.

11. Xiao C., Lian W., Zhou L., Gao N., Xu L., Chen J., Wu M., Peng W., Zhao J. Interactions between depolymerized fucosylated glycosaminoglycan and coagulation proteases or inhibitors. *Thromb Res.* 2016; 146: 59-68.

12. Zhang S.B. In vitro antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates. *J. Food Chem.* 2016; 202: 1-8.

13. Nsimba M.M., Yamamoto C., Lami J.N., Hayakawa Y., Kaji T. Effect of a Congolese herbal medicine used in sickle cell anemia on the expression of plasminogen activators in human coronary aortic endothelial cells culture. *J. Ethnopharmacol.* 2013; 146(2): 594-9.

14. Lyapina M.G., Uspenskaya M.S., Maistrenko, E.S. On the mechanism of the anticoagulant action of the extract from the roots of *Paeonia lactiflora*. *Mezhdunarodniy Zhurnal Prikladnykh I Fundamentalnykh Issledovaniy*. 2016; 11(6): 1091-3. (in Russian)

15. Lyapina L.A., Grigorieva M.E., Obergan T.Yu., Shubina T.A. *Theoretical and practical issues of studying the func-*

tional state of the anticoagulation system of blood [Teoreticheskoe i prakticheskoe issledovanie funktsionalnogo sostoyaniya protivosvertvyvaushey sistemy krovi]. Moscow, Advanced Solutions; 2012. (in Russian)

Сведения об авторах:

Оберган Тамара Юрьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ, e-mail: tobergan@mail.ru;

Ляпина Маргарита Григорьевна, ведущий специалист лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных, e-mail: lyapinarita@gmail.com;

Успенская Марианна Сергеевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Ботанического сада МГУ, e-mail: ms-uspenskaaya@yandex.ru;

Ляпина Людмила Анисимовна, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., зав. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, e-mail: lyarinal@mail.ru

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616-092

Раецкая А.А.¹, Калиш С.В.¹, Лямина С.В.¹, Малышева Е.В.¹,
Буданова О.П.², Бахтина Л.Ю.², Малышев И.Ю.^{1,2}

Репрограммированные *in vitro* на М3 фенотип макрофаги останавливают рост солидной карциномы *in vivo*

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный медицинский стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; 127473, г. Москва, Россия, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

² ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8

Цель исследования. Доказательство гипотезы, что репрограммированные *in vitro* на М3 фенотип макрофаги при введении в организм будут существенно ограничивать развитие солидной карциномы *in vivo*. **Методика.** Рост солидной опухоли инициировали у мышей *in vivo* путем подкожной инъекции клеток карциномы Эрлиха (КЭ). Инъекцию макрофагов с нативным М0 фенотипом и с репрограммированным М3 фенотипом проводили в область формирования солидной КЭ. Репрограммирование проводили с помощью низких доз сыворотки, блокаторов факторов транскрипции STAT3/6 и SMAD3 и липополисахарида. Использовали две схемы введения макрофагов: раннее и позднее. При раннем введении макрофаги вводили на 1-е, 5-е, 10-е и 15-е сут. после инъекции клеток КЭ путем обкалывания макрофагами с четырех сторон область развития опухоли. При позднем введении, макрофаги вводили на 10-е, 15-е, 20-е и 25-е сут. Через 15 и 30 сут. после введения клеток КЭ солидную опухоль иссекали и измеряли ее объем. Эффект введения макрофагов оценивали качественно по визуальной и пальпаторной характеристикам солидной опухоли и количественно по изменению ее объема по сравнению с группой без введения макрофагов (контроль). **Результаты.** Установлено, что М3-STAT3/6-SMAD3 макрофаги при раннем введении от начала развития опухоли оказывают выраженный антиопухолевый эффект *in vivo*, который был существенно более выражен, чем при позднем введении макрофагов. **Заключение.** Установлено, что введение репрограммированных макрофагов М3-STAT3/6-SMAD3 ограничивает развитие солидной карциномы в экспериментах *in vivo*. Противоопухолевый эффект более выражен при раннем введении М3 макрофагов. Обнаруженные в работе факты делают перспективным разработку клинической версии биотехнологии ограничения роста опухоли, путем предварительного программирования антиопухолевого врожденного иммунного ответа «в пробирке».

Ключевые слова: репрограммирование макрофагов; солидная карцинома.

Принятые сокращения:

IFN- γ — интерферон-гамма. IFN-gamma является важнейшим противовоспалительным цитокином.

TGF- β — трансформирующий фактор роста — мультифункциональный цитокин

ЭДТА — этилендиаминтетраацетат

PBS — фосфатно-солевой буфер

Для цитирования: Раецкая А.А., Калиш С.В., Лямина С.В., Малышева Е.В., Буданова О.П., Бахтина Л.Ю., Малышев И.Ю. Репрограммированные *in vitro* на М3 фенотип макрофаги останавливают рост солидной карциномы *in vivo*. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(1): 41–46. DOI:

Для корреспонденции: Малышев Игорь Юрьевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, руководитель лаб. стресса и адаптации ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», e-mail: iymalyshev1@gmail.com

Финансирование. Статья написана при финансовой поддержке ведущих научных школ, Соглашение № 14.W02.16.9835-НП об условиях использования гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ НП-9835.2016.7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.07.2017

Raetskaya A.A.¹, Kalish S.V.¹, Lyamina S.V.¹, Malysheva E.V.¹,
Budanova O.P.², Bakhtina L.Yu.², Malyshev I.Yu.^{1,2}

Macrophages reprogrammed *in vitro* to the M3 phenotype stop growth of solid carcinoma *in vivo*

¹ A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Delegatskaya Str. 20, Bldg.1, Moscow 127473, Russia

² Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8 Baltiyskaya Str., Moscow, 125315, Russia

Aim. To verify a hypothesis that macrophages reprogrammed *in vitro* to the M3 phenotype and injected into the body substantially restrict the development of solid carcinoma *in vivo*. **Methods.** Growth of a solid tumor was initiated in mice *in vivo* with a subcutaneous injection of Ehrlich carcinoma (EC) cells. Macrophages with a native M0 phenotype or reprogrammed towards the M3 phenotype were injected into the region of developing solid EC. Reprogramming was performed using low doses of serum, STAT3/6 and SMAD3 transcription factor blockers, and lipopolysaccharide. Two schemes of macrophage administration were used: early and late. With the early administration, macrophages were injected on days 1, 5, 10, and 15 following the injection of EC cells at four sides of the tumor development area. With the late administration, macrophages were injected on days 10, 15, 20, and 25. At 15 and 30 days after the EC cell injection, the solid tumor was excised and its volume was measured. The effect of macrophage administration was assessed both qualitatively by visual and palpation characteristics of solid tumor and quantitatively by changes in the tumor volume compared with the group without the macrophage treatment. **Results.** M3-STAT3/6-SMAD3 macrophages administered early after the onset of tumor development exerted a pronounced antitumor effect *in vivo*, which was significantly greater than the antitumor effect of the late administration of M3-STAT3/6-SMAD3 macrophages. **Conclusion.** The observed significant inhibition of *in vivo* growth of solid carcinoma by M3 macrophages makes promising the development of a clinical version of the biotechnology for restriction of tumor growth by *in vitro* pre-programming of the antitumor, innate immune response.

Keywords: macrophages, carcinoma, reprogramming.

For citation: Raetskaya A.A., Kalish S.V., Lyamina S.V., Malysheva E.V., Budanova O.P., Bakhtina L.Yu., Malyshev I.Yu. Reprogrammed *in vitro* on M3 phenotype macrophages stop the growth of solid carcinoma *in vivo*. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(1): 41–46. (in Russian). DOI:

For correspondence: Igor Yu. Malyshev, Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Pathological Physiology of the Moscow State University of Medicine and Dentistry n.a. A.I. Evdokimov; 20, str. 1, ul. Delegatskaya, d., Moscow, 127473, Russia, Head of stress and adaptation laboratory of the Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8, ul. Baltiyskaya, Moscow, 125315, Russian Federation, e-mail: iymalyshev1@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study was conducted with the Governmental financial support represented by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Agreement dated May 5, 2016, № 14.W02.16.9835-НШ)

Information about authors:

Malyshev I.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-2381-9612>

Budanova O.P., <http://orcid.org/0000-0002-6650-5082>

Received 10.07.2017

Введение

Макрофаги играют ключевую роль в нарушениях иммунного ответа при канцерогенезе [1, 2]. В зависимости от действующих факторов и микроокружения, макрофаги приобретают либо провоспалительный M1, либо противовоспалительный M2 фенотип [3–7]. M1 макрофаги способствуют уничтожению опухолевых клеток благодаря усиленной продукции оксида азота (NO) [8], провоспалительных цитокинов [9, 10], активации натуральных киллеров [11] и презентации опухолевых антигенов лимфоцитам [12]. Однако опухоли, как правило, продуцируют много противовоспалительных цитокинов TGF- β , IL-10, IL-13 и др. [13, 14], которые, активируя факторы транскрипции M2 фенотипа STAT3, STAT6 и SMAD3, перепрограммируют противоопухолевые M1 макрофаги в проопухолевые M2 [15, 16]. При этом M2 фенотип макрофагов начинает продуцировать большое количество противовоспалительных цитокинов, плохо представлять опухолевые антигены лимфоцитам [17–19], что способствует росту опухоли [1, 2].

Ранее нами показано, что блокирование STAT3, STAT6 и SMAD3 предупреждает проопухолевое репрограммирование M1 макрофагов. M1 макрофаги с заблокированными STAT3, STAT6 и SMAD3, в отличие от исходных M1 макрофагов, в ответ на действие проопухолевых противовоспалительных цитокинов отвечали усилением продукции антиопухолевых провоспалительных цитокинов, благодаря чему сохраняли свои антиопухолевые свойства, замедляя деление опухолевых клеток *in vitro* и увеличивая *in vivo* продолжительность жизни мышей с асцитной КЭ [20]. Мы обозначили такой фенотип макрофагов как фенотип переключения, или как M3 фенотип [16, 20].

Учитывая эти данные, мы предположили, что с помощью репрограммированных *in vitro* M3 макрофагов можно ограничить не только развитие асцитной КЭ, но и солидной КЭ *in vivo*. Цель исследования состояла в проверке этой гипотезы.

Методика

Экспериментальные животные. Эксперименты проведены на мышах линии C57BL/6J и BALB/c с учетом требований *ry* ВОЗ (www.cioms.ch/publica-

tions/guidelines). Мыши были получены из питомника «Андреевка» (<http://andreevka.msk.ru>). Протокол экспериментов был одобрен Комитетом по этике Московского государственного медико-стоматологического университета.

Реактивы. Stat3 ингибитор (S3I204) (Axon Medchem, USA, cat# 2312), Stat6 ингибитор (As1517499) (Axon Medchem, USA, cat# 1992), IFN- γ (Invitogen, USA, cat# PMC4034), LPS (Sigma-Aldrich, USA, cat# L3755), SMAD3 inhibitor (SIS3) (Calbiochem, USA, cat# 566405), FBS (Thermo Hyclone, UK, cat# SV30160.03).

Моделирование и характеристика солидной карциномы Эрлиха. Опухолевый рост инициировали подкожным введением мышам 500 тысяч клеток КЭ в 5 мкл физиологического раствора. Клетки КЭ были предоставлены «Российским онкологическим научным центром им. Н.Н. Блохина». Выбор модели солидной КЭ мышей определяется тем, что:

1) солидная КЭ воспроизводит многие аспекты канцерогенеза опухоли поджелудочной железы, рака яичников, простаты, толстой и прямой кишки [21, 22, 24];

2) мышиную модель солидной КЭ обычно используется для оценки противоопухолевых эффектов [25, 26];

3) солидная КЭ легко воспроизводится экспериментально и легко оценивается характер её роста. Через 15 и 30 сут. после введения клеток КЭ солидную опухоль иссекали, измеряли ее размеры и объем, помещая иссеченную опухоль в наполненную водой мензурку с мерной шкалой.

Выделение макрофагов. Нативные макрофаги (M0 фенотип) были выделены путем перитонеального смыва у мышей [27]. После выделения из перитонеальной жидкости макрофаги культивировали в питательной среде RPMI-1640 (10% фетальная бычья сыворотка (FBS), пенициллин 100 ЕД/мл, стрептомицин 100 мкг/мл) при 37°C в 5% CO₂.

In vitro репрограммирование макрофагов на M3-STAT3/6-SMAD3 фенотип. Были получены макрофаги с M0 фенотипом и с M3-STAT3/6-SMAD3 фенотипом. Для получения M0 фенотипа макрофаги культивировали в течение 12 ч с 10% FBS, затем стимулировали липополисахаридом (ЛПС) (500 нг/мл) в течение 24 ч. Для получения M3-STAT3/6-SMAD3 фенотипа макрофаги культивировали в течение 12 ч без FBS [4] с добавлением IFN- γ (20 нг/мл) [28], ингибитора STAT3 (5 мкг/мл), ингибитора STAT6 (10 мкг/мл) и ингибитора SMAD3 (2 нмоль/мл) [20], после чего стимулировали ЛПС в концентрации 500 нг/мл еще в течение 24 ч.

Инъекция макрофагов в область подкожного развития солидной карциномы Эрлиха. Клетки групп «M0» и «M3-STAT3/6-SMAD3» удалялись со дна лунки

культурального планшета путем инкубирования при 37°C в присутствии PBS, содержащий 5 мМ ЭДТА [5]. Концентрация макрофагов доводилась до 8×10^6 клеток в 0,2 мл PBS. Использовали 2 схемы введения макрофагов: раннее и позднее введение. При раннем введении — на 1-е, 5-е, 10-е и 15-е сут. после подкожной инъекции клеток КЭ мышам, место развития опухоли обкалывали с четырех сторон макрофагами по 2×10^6 макрофагов на инъекцию/сторону (рис. 1).

При позднем введении макрофаги вводили на 10-е, 15-е, 20-е и 25-е сут. после подкожной инъекции клеток КЭ мышам, тем же способом и в тех же концентрациях, что и при раннем введении. В итоге было сформировано 5 групп животных:

- Группа «Опухоль» — мыши, которым подкожно вводили клетки КЭ (n = 8);
- Группа «Опухоль + M0-раннее введение» — мыши, которым подкожно вводили клетки КЭ и макрофаги группы M0 на ранних стадиях развития опухоли (n = 8);
- Группа «Опухоль + M3-STAT3/6-SMAD3-раннее введение» — мыши, которым подкожно вводили клетки КЭ и макрофаги группы M3-STAT3/6-SMAD3 на ранних стадиях развития опухоли (n = 8);
- Группа «Опухоль + M0-позднее введение» — мыши, которым подкожно вводили клетки КЭ и макрофаги группы M0 на поздних стадиях развития опухоли (n = 8);
- Группа «Опухоль + M3-STAT3/6-SMAD3-позднее введение» — мыши, которым подкожно вводили клетки КЭ и макрофаги группы M3-STAT3/6-SMAD3 на поздних стадиях развития опухоли (n = 8).

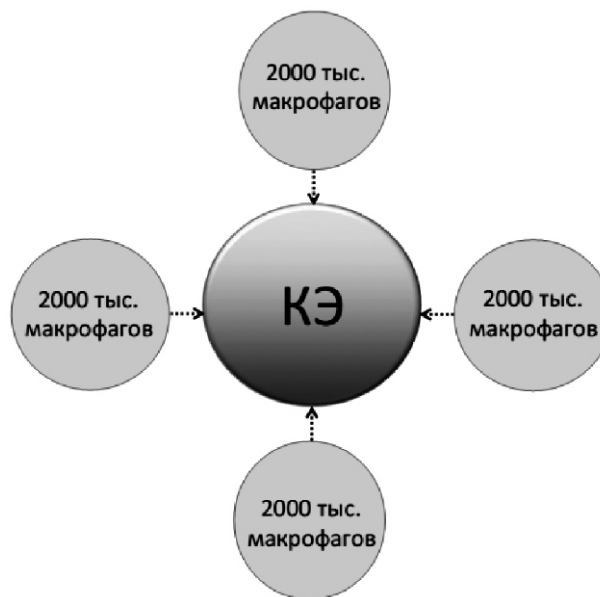


Рис. 1. Топографическая схема обкалывания КЭ макрофагами. КЭ — клетки карциномы Эрлиха.

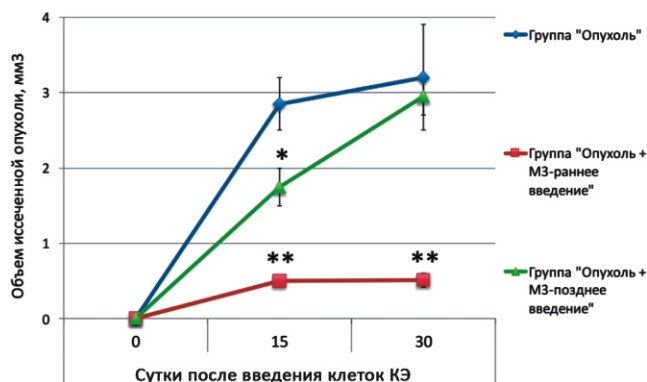


Рис. 2. Эффект раннего и позднего введения М3-STAT3/6-SMAD макрофагов на объем иссеченной опухоли КЭ. Значимые отличия: между группами «Опухоль» и «М3-STAT3/6-SMAD3-раннее введение»: ** $p < 0,01$; между группами «Опухоль» и «М3-STAT3/6-SMAD3-позднее введение»: * $p < 0,05$

Эффект введения макрофагов оценивали качественно по визуальной и пальпаторной характеристике формирующейся солидной опухоли и количественно по изменению объема опухоли по сравнению с группой «Опухоль» на 15-е и 30-е сут. после введения клеток КЭ.

Статистический анализ проводили с использованием критерия Стюдента—Ньюмана—Келса. Данные представлены в виде среднего значения (M), учитывающего стандартную ошибку среднего значения ($\pm SEM$). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для подтверждения воспроизводимости *in vivo*, обнаруженного нами ранее противоопухолевого эффекта репрограммированных макрофагов *in vitro* [20], было оценено действие макрофагов фенотипа «М3-STAT3/6-SMAD3» на объем солидной КЭ у мышей.

Качественный визуальный анализ развития солидной КЭ после подкожного введения клеток КЭ показал следующее. Во всех пяти группах на 10-е сут. после введения клеток КЭ у мышей всех групп в месте инъекции клеток КЭ стали обнаруживаться едва различимые опухолевидные образования без признаков изменения кожного покрова. На 15-е сут. после введения клеток КЭ во всех группах мышей опухолевидные образования стали более отчетливо различимы, характеризовались эластично-твердой консистенцией, были подвижны при пальпации, признаки изменения кожного покрова отсутствовали.

Существенные качественные отличия между группами стали обнаруживаться на 30-е сут. после введения клеток КЭ. В группах «Опухоль», «Опухоль + М0-раннее введение» и «Опухоль + М0-позднее введение» видимые опухолевидные образования увеличились в объеме, имели плотную консистенцию и были малоподвижны при пальпации. В группе «Опухоль + М3-STAT3/6-SMAD3-раннее введение» видимые опухолевидные образования при качественной оценке практически не изменились, а в группе «Опу-

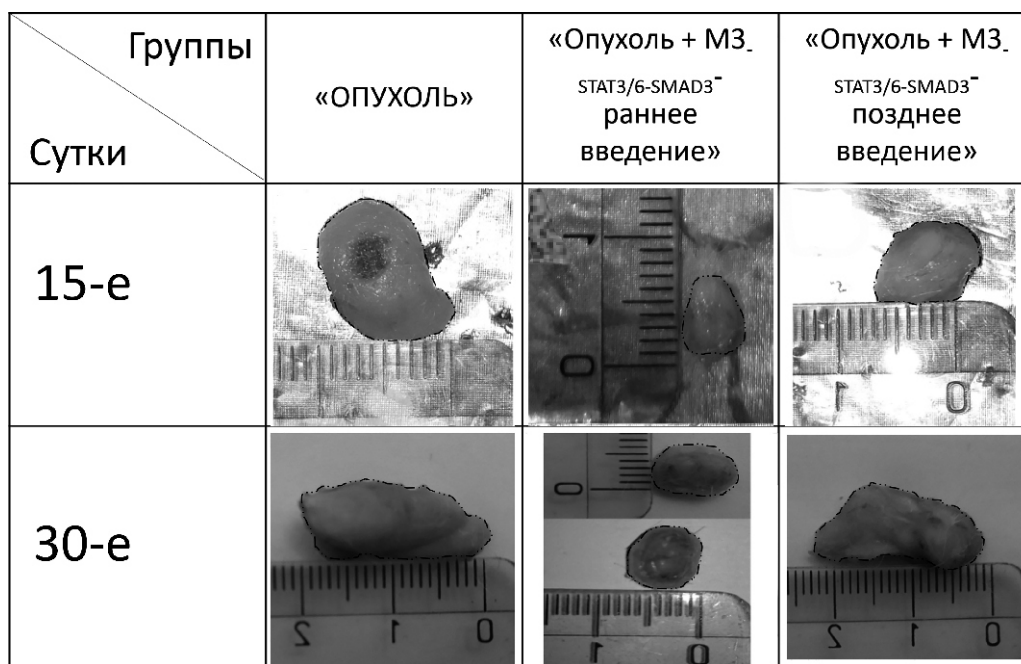


Рис. 3. Репрезентативные примеры размера иссеченных опухолей у мышей разных групп на разных сроках. (Границы опухоли обведены пунктирной линией).

холь + МЗ-STAT3/6-SMAD3-позднее введение» незначительно увеличились, по сравнению с 15-ми сут.

Количественная оценка эффектов раннего и позднего введения МЗ-STAT3/6-SMAD макрофагов на объем солидной карциномы Эрлиха у мышей представлена на рис. 2. В группе «Опухоль» на 15-е сут. после введения клеток КЭ объем иссеченной опухоли составлял $2,85 \pm 0,35$ мм³, а на 30-е сут. — $3,20 \pm 0,70$ мм³. В группах «Опухоль + М0-раннее введение» и «Опухоль + М0-позднее введение» количественные характеристики развития опухоли статистически значимо не отличались от группы «Опухоль», и поэтому на рис. 2 не представлены.

В группе «Опухоль + МЗ-STAT3/6-SMAD3-раннее введение» на 15-е сут. после введения клеток КЭ объем иссеченной опухоли составлял $0,50 \pm 0,07$ мм³, а на 30-е — $0,51 \pm 0,09$ мм³. В группе «Опухоль + МЗ-STAT3/6-SMAD3-позднее введение» на 15-е сут. после введения клеток КЭ объем иссеченной опухоли составлял $1,75 \pm 0,25$ мм³, а на 30-е сут. — $2,95 \pm 0,25$ мм³.

На рис. 3 представлены размеры иссеченных опухолей у мышей разных групп на разных сроках.

Как видно на рис. 3, раннее введение МЗ макрофагов существенно ограничило развитие солидной карциномы Эрлиха: на 15-е и 30-е сут. объем опухоли был почти в 6 раз меньше по сравнению с группой «Опухоль», которой макрофаги не вводили. Антиопухолевый эффект МЗ макрофагов при позднем введении был выражен существенно слабее, по сравнению с эффектом раннего введения МЗ макрофагов.

Результаты проведенного исследования подтвердили наше предположение о том, что рост солидной КЭ может быть эффективно ограничен с помощью МЗ макрофагов. Макрофаги уже давно привлекают внимание в качестве мишеней для антиопухолевой терапии. Антиопухолевую активность макрофагов пытались усилить путем стимуляции Toll-like рецепторов и ингибирования рецепторов к TGF- β [29]; культивирования в среде без сыворотки [5]; усиления активности генов, отвечающих за экспрессию IFN- γ и IL-12 [30]; связывания проопухолевых факторов или их рецепторов на макрофагах [31, 32] и т.д. Все эти подходы направлены на формирование противоопухолевых М1 фенотипа макрофагов, но опухоль перепрограммирует М1 фенотип в М2 [15], что снижает эффективность противоопухолевых эффектов [33].

По сравнению с М1 макрофагами, МЗ макрофаги оказывали более выраженное антиопухолевое действие *in vitro* и способствовали увеличению продолжительности жизни экспериментальных мышей с асцитной КЭ [20, 33]. Более выраженный противоопухолевый эффект этих макрофагов по сравнению с М1

может быть связан с большей воспалительной активностью МЗ макрофагов и способностью сохранять антиопухолевые свойства в проопухолевой среде.

Ранее мы показали, что инъекции МЗ макрофагов мышам с асцитной карциномой Эрлиха, увеличивают продолжительность жизни этих мышей примерно на 100% [20]. Макрофаги являются клетками врожденного иммунного ответа, поэтому в данной работе, по сути, была продемонстрирована возможность программирования антиопухолевых врожденного иммунного ответа *in vitro*, в условиях отсутствия влияния опухоли, и дальнейшего эффективного его использования в условиях *in vivo*.

Обнаруженные в работе факты, существенного подавления роста опухоли МЗ макрофагами делают перспективной разработку клинической версии биотехнологии ограничения роста опухоли МЗ макрофагами путем предварительного программирования антиопухолевых иммунного ответа «в пробирке».

References

1. Condeelis J., Pollard J.W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006; 124(2): 263-6.
2. Sica A., Schioppa T., Mantovani A., Allavena P. Tumor-associated macrophages are a distinct M2 polarized population promoting tumor progression: potential targets of anti-cancer therapy. *European Journal of Cancer* 2006; 42(6): 717-27.
3. Mills C.D., Thomas A.C., Lenz L.L., Munder M. Macrophage: SHIP of Immunity. *Frontiers in Immunology* 2014; 5: 620.
4. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *The Journal of Immunology* 2000; 164(12): 6166-73.
5. Rey-Giraud F., Hafner M., Ries C.H. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One* 2012; 7(8): e42656.
6. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* 2000; 5: 953-64.
7. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* 2002; 23(11): 549-55.
8. Zeini M., Traves P.G., Lopez-Fontal R., Pantoja C., Matheu A., Serrano M. et al. Specific contribution of p19 (ARF) to nitric oxide-dependent apoptosis. *The Journal of Immunology* 2006; 177(5): 3327-36.
9. Tsung K., Dolan J.P., Tsung Y.L., Norton J.A. Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection. *Cancer Research* 2002; 62(17): 5069-75.
10. Ibe S., Qin Z., Schuler T., Preiss S., Blankenstein T. Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions. *The Journal of Experimental Medicine* 2001; 194(11): 1549-59.
11. Sharma M. Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease. *Critical Reviews in Biotechnology* 2009; 30(1): 1-22.

12. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21(2): 137-48.
13. Khong H.T., Restifo N.P. Natural selection of tumor variants in the generation of «tumor escape» phenotypes. *Nature Immunology* 2002; 3(11): 999-1005.
14. Zou W. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 2006; 6(4): 295-307.
15. Stout R.D., Watkins S.K., Suttles J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 2009; 86(5): 1105-9.
16. Malyshev I., Malyshev Yu. Current concept and update of the macrophage plasticity concept: intracellular mechanisms of reprogramming and M3 macrophage «switch» phenotype. *BioMed Research International* 2015; 2015: 341308.
17. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic-cell defects. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4 (12): 941-52.
18. Kono Y., Kawakami S., Higuchi Y., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. Antitumor effect of nuclear factor- κ B decoy transfer by mannose-modified bubble lipoplex into macrophages in mouse malignant ascites. *Cancer Science* 2014; 105(8): 1049-55.
19. Kalish S.V., Lyamina S.V., Usanova E.A., Manukhina E.B., Larionov N.P., Malyshev I.Yu. Macrophages reprogrammed in vitro towards the M1 phenotype and activated with LPS extend lifespan of mice with ehrlich ascites carcinoma. *Medical Science Monitor Basic Research* 2015; 21: 226-34.
20. Kalish S., Lyamina S., Manukhina E., Malyshev Y., Raetskaya A., Malyshev I. M3 Macrophages Stop Division of Tumor Cells In Vitro and Extend Survival of Mice with Ehrlich Ascites Carcinoma. *Medical science monitor basic research* 2017; 23: 8-19.
21. Cavazzoni E., Bugiantella W., Graziosi L., Franceschini M.S., Donini A. Malignant ascites: pathophysiology and treatment. *International Journal of Clinical Oncology* 2013; 18(1): 1-9.
22. Becker G., Galandi D., Blum H.E. Malignant ascites: systematic review and guideline for treatment. *European Journal of Cancer* 2006; 42(5): 589-97.
23. Ahmed N., Stenvers K.L. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Frontiers in Oncology* 2013; 3: 256.
24. Saif M.W., Siddiqui I.A., Sohail M.A. Management of ascites due to gastrointestinal malignancy. *Annals of Saudi Medicine* 2009; 29(5): 369-77.
25. Kono Y., Kawakami S., Higuchi Y., Maruyama K., Yamashita F., Hashida M. Antitumor effect of nuclear factor- κ B decoy transfer by mannose-modified bubble lipoplex into macrophages in mouse malignant ascites. *Cancer Science* 2014; 105(8): 1049-55.
26. Ray T., Chakrabarti M.K., Pal A. Hemagglutinin protease secreted by *V. cholerae* induced apoptosis in breast cancer cells by ROS mediated intrinsic pathway and regresses tumor growth in mice model. *Apoptosis* 2016; 21(2): 143-54.
27. Zhang X., Goncalves R., Mosser D.M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Current Protocols in Immunology* 2008; Chapter 14: Unit 14.1.
28. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience*. 2008; 1(13): 453-61.
29. Peng J., Tsang J.Y., Li D., Niu N., Ho D.H., Lau K.F. et al. Inhibition of TGF- β signaling in combination with TLR7 ligation re-programs a tumoricidal phenotype in tumor-associated macrophages. *Cancer Letters* 2013; 331(2): 239-49.
30. Satoh T., Saika T., Ebara S., Kusaka N., Timme T.L., Yang G. et al. Macrophages transduced with an adenoviral vector expressing IL-12 suppress tumor growth and metastasis in a preclinical metastatic prostate cancer model. *Cancer Research* 2003; 63(22): 7853-7860.
31. Baay M., Brouwer A., Pauwels P., Peeters M. and Lardon F. Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clinical and Developmental Immunology* 2011; 2011: 565187.
32. Aharinejad S., Abraham D., Paulus P., Abri H., Hofmann M., Grossschmidt K. Colony-stimulating factor-1 antisense treatment suppresses growth of human tumor xenografts in mice. *Cancer Research* 2002; 62(18): 5317-24.
33. Malyshev I.Yu. Phenomena and signaling mechanisms reprogramming of macrophages. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya* 2015; 59(2): 99-111. (in Russian)

Сведения об авторах:

Раецкая Анастасия Александровна, лаб. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, e-mail: mohnush@mail.ru;

Калиш Сергей Валерьевич, ст. лаб. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, e-mail: anahorettes@mail.ru;

Лямина Светлана Владимировна, доктор мед. наук, проф. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, e-mail: svlvs@mail.ru;

Мальшева Елена Васильевна, доктор мед. наук, проф., каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, e-mail: iymalyshev1@gmail.com;

Буданова Ольга Петровна, ст. науч. сотр. лаб. регуляторных механизмов стресса и адаптации ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», e-mail: ova17@list.ru;

Бахтина Лидия Юрьевна, вед. науч. сотр. лаб. регуляторных механизмов стресса и адаптации ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»;

Мальшев Игорь Юрьевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, руководитель лаб. стресса и адаптации ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», e-mail: iymalyshev1@gmail.com

© Коллектив авторов, 2018
УДК 612.017.1

Баева Т.А.¹, Гейн С.В.^{1,2}

Временной фактор в регуляции цитокиновой секреции у мышей бета-эндорфином

¹ ФБГНУ «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН, 614081, г. Пермь, Россия, ул. Голева, д. 13

² ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», 614990, г. Пермь, Россия, ул. Букирева, д. 15

Эндогенные опиоидные пептиды играют важную роль в регуляции иммунных процессов. **Цель работы** — изучение влияния бета-эндорфина на уровни кортикостерона в плазме периферической крови мышей, секрецию IL-2, IL-4 и IFN- γ мышечными спленоцитами, а также продукцию IL-1 β и IL-10 перитонеальными макрофагами *in vivo* через 1 ч и через 6 ч после введения пептида. **Методика.** Исследования выполнены на беспородных мышцах-самцах массой 22–25 г. Бета-эндорфин вводили однократно внутривентриально в дозах 100—0,0005 мкг/кг. Через 1 или 6 ч после введения бета-эндорфина животных выводили из эксперимента, выделяли перитонеальные макрофаги и спленоциты для культивирования. **Результаты.** Установлено, что введение бета-эндорфина в дозах 100, 0,01, 0,0005 мкг/кг за 1 ч до выведения животных из эксперимента приводило к угнетению спонтанной продукции IL-1 β макрофагами. Введение пептида за 6 ч в дозе 1 мкг/кг приводило к угнетению продукции IL-1 β стимулированными макрофагами. β -эндорфин выражено снижал продукцию IL-10 во всех исследуемых дозах как при введении за 1 ч, так и за 6 ч до выведения животных из эксперимента. Пептид усиливал Кон А — индуцированную продукцию IL-4 как через 1 ч, так и через 6 ч после инъекции. Продукция IL-2 спленоцитами угнеталась через 1 ч после введения пептида, и стимулировалась через 6 ч после введения. На продукцию IFN- γ введение β -эндорфина влияния не оказывало. Концентрация кортикостерона в плазме крови интактных мышей под воздействием β -эндорфина не изменялась. **Заключение.** Бета-эндорфин, несмотря на быстрое ферментативное расщепление в организме, способен оказывать пролонгированные иммуномодулирующие эффекты, которые могут менять свою направленность с течением времени.

Ключевые слова: бета-эндорфин; макрофаги; спленоциты; мышь; цитокины; IL-1 β ; IL-10; IL-2; IL-4; IFN- γ ; кортикостерон; зимозан.

Для цитирования: Баева Т.А., Гейн С.В. Временной фактор в регуляции цитокиновой секреции у мышей бета-эндорфином. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 47–53. DOI:

Для корреспонденции: Баева Татьяна Александровна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. биохимии развития микроорганизмов, e-mail: simonjkarperm80@mail.ru

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума УрО РАН «Молекулярная и клеточная биология»

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 26.05.2017

Баева Т.А.¹, Gein S.V.^{1,2}

The time factor in beta-endorphin regulation of cytokine secretion in mice

¹ Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the RAS, Goleva Str. 13, Perm 361408113

² Perm State University, Bukireva Str. 15, Perm 614990

Endogenous opioid peptides play an important role in regulation of immune processes. **The work objective** was to study the effect of beta-endorphin on corticosterone levels in murine peripheral blood plasma, secretion of IL-2, IL-4, and IFN- γ by murine splenocytes, and production of IL-1 β and IL-10 by peritoneal macrophages *in vivo* at 1 h and 6 h following administration of the peptide. **Methods.** Investigations were performed on mice weighing 22–25 g. Beta-endorphin (100–0,0005 μ g/kg, *i.p.*) was administered once. One or six hours after the beta-endorphin administration, the animals were withdrawn from the experiment, peritoneal macrophages and splenocytes were isolated for culturing. **Results.** Administration of beta-endorphin at doses of 100, 0.01, and 0.0005 μ g/kg 1 h before sacrificing animals led to suppression of macrophage spontaneous production of IL-1 β . Administration of the peptide at a dose of 1 μ g/kg within 6 hours prior to sacrificing resulted in inhibition of IL-1 β production by stimulated macrophages. Beta-endorphin at all doses reduced the IL-10 production both 1 h and 6 h before sacrificing the mice. The peptide enhanced Con A-induced production of IL-4 both 1 h and 6 h after injection. Production of IL-2 by splenocytes was inhibited 1 h after administration of the peptide and stimulated 6 h after the peptide administration. Administration of β -endorphin had no effect on the IFN- γ production. β -en-

dorphin did not change plasma corticosterone concentrations in intact mice. **Conclusion.** Beta-endorphin, despite its rapid enzymatic cleavage, is able to exert long-term immunomodulatory effects, which can change their direction over time.

Keywords: beta-endorphin; macrophages; splenocytes; mouse; cytokines; IL-1 β ; IL-10; IL-2; IL-4; IFN-gamma; corticosterone; zymosan.

For citation: Baeva T.A., Gein S.V. The time factor in beta-endorphin regulation of cytokines secretion in mice. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2017; 61(4): 47–53. (in Russian). DOI:

For correspondence: Tatyana A. Baeva, PhD of Biological Sciences, Researcher, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural branch of the RAS, 13, Goleva str, Perm, 614081, Russian Federation, e-mail: simonjkaperm80@mail.ru

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement. This work was financially supported by the Programme of the Presidium of RAS «Fundamental science for medicine».

Information about authors:

Baeva T.A., <http://orcid.org/0000-0003-3827-7876>

Gein S.V., <http://orcid.org/0000-0002-0799-3397>

Received 26.05.2017

Введение

Изучение эндогенных соединений с опиоидной активностью открывает новые перспективы в понимании механизмов регуляции гомеостаза. Данные литературы, накопленные за всю историю исследований эндогенных опиоидов, показывают огромное значение этих соединений в процессах регуляции боли, развития стресса и воспаления [1, 2]. Большое внимание привлекает к себе регуляция опиоидной системой секреторной активности клеток иммунной системы [3, 4]. Цитокины, продуцируемые преимущественно активированными клетками, представляют собой крайне важную универсальную систему регуляции функций как врождённого, так и адаптивного иммунитета и играют ключевую роль в процессах запуска, формирования и определения доминирующего типа иммунного ответа (Th1/Th2). Одним из важнейших цитокинов является IL-1 β , основной фактор, индуцирующий и формирующий реакции адаптивного иммунитета. За процессы поддержания пролиферации и функциональной Th1/Th2-дифференцировки Т-лимфоцитов отвечают, главным образом, IL-2, IL-4, IFN- γ , в то время как IL-10 является ведущим супрессорным цитокином. Основными продуцентами IL-2, IL-4 и IFN-gamma в организме являются клетки лимфоцитарного звена, в то время как за продукцию IL-1 β и IL-10 отвечают преимущественно клетки макрофагальной линии [4].

Одним из основных эндогенных соединений, проявляющих высокую биологическую активность в отношении клеток иммунной системы через активацию опиатных рецепторов, является бета-эндорфин. Согласно данным литературы, бета-эндорфин относится к молекулам короткодистантного действия, так как очень быстро расщепляется протеазами крови, цереб-

роспинальной жидкости и других биологических сред [3]. Поэтому в экспериментах с его участием одним из методологических приемов является ограничение временного промежутка между введением пептида и каким-либо другим экспериментальным воздействием. Так, например, ранее нами было показано, что стимулирующее влияние бета-эндорфина 0,0005 мкг/кг на количество антителообразующих клеток (АОК) в селезёнке наблюдается преимущественно при введении пептида в момент близкий к введению антигена, при увеличении времени между инъекциями пептида и антигена эффект бета-эндорфина нивелировался [5].

Тем не менее, наличие в организме сложнейших регуляторных систем дает возможность предполагать существование опосредованных, отсроченных по времени эффектов. Одним из механизмов опосредованных эффектов бета-эндорфина может являться модуляция продукции гормонов гипоталамо-гипофизарной оси и в частности кортикостерона, продуцируемого клетками коры надпочечников [6].

Цель исследования — изучение влияния бета-эндорфина на уровень кортикостерона в плазме периферической крови мышей, секрецию IL-2, IL-4 и IFN- γ мышинными спленоцитами, а также продукцию IL-1 β и IL-10 перитонеальными макрофагами *in vivo* через 1 ч и через 6 ч после введения пептида.

Методика

Объект исследования

Исследования были выполнены на беспородных мышцах-самцах массой 22—25 г. Животных содержали в условиях лабораторного вивария при 12-часовом

цикле освещения и неограниченным доступом к воде и пище (гранулированный корм). Перед началом эксперимента животные адаптировались к условиям вивария в течение 8—10 дней. Животных выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом. Все эксперименты были проведены в соответствии с рекомендациями и этическими нормами [7].

Основные экспериментальные подходы

Введение препаратов

В экспериментах использовали бета-эндорфин (Skytek Laboratories, США), который вводили однократно внутривентриально в дозах от 100 до 0,0005 мкг/кг массы животного. Все животные были разбиты на следующие группы:

- 1 — контроль;
- 2 — бета-эндорфин в дозе 0,0005 мкг/кг;
- 3 — бета-эндорфин в дозе 0,01 мкг/кг;
- 4 — бета-эндорфин в дозе 1 мкг/кг;
- 5 — бета-эндорфин в дозе 100 мкг/кг.

Животным контрольной группы вводили эквивалентный объем 0,9% NaCl. Одну половину животных выводили из эксперимента через 1 ч, а вторую через 6 ч после введения бета-эндорфина. Выделение спленоцитов и перитонеальных макрофагов осуществляли по стандартным методикам [8].

Определение концентрации кортикостерона через 1 час и через 6 часов после введения бета-эндорфина

Сыворотки крови после выведения животных из эксперимента собирали в утренние часы с 8.00 до 11.00, замораживали и хранили при температуре -20°C. Концентрацию кортикостерона определяли методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческой тест-системы Enzo (США) и спектрофотометра TECAN (Австрия).

Оценка продукции IL-4, IL-2 и IFN-γ спленоцитами

Спленоциты культивировали в пластиковых круглодонных 24-луночных планшетах (завод «Медполимер», Санкт-Петербург). Каждая культура содержала $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл полной культуральной среды, которую готовили *ex tempore* на основе среды RPMI 1640 («Gibco Live Technology», США) с добавлением 10 mM HEPES («Sigma»), 2 mM L-глутамин («Sigma»), 100 мкг/мл гентамицина, меркаптоэтанол (10^{-3} M) из расчета 10 мкл на 1 мл и 10% ЭТС (эмбриональная телячья сыворотка, «Биолот»). Показатели pH доводили NaOH до 7,4. Культивирование осуществляли во влажной атмосфере с 5% CO₂

при 37°C в течение 24 (для IL-2) или 48 ч (для IFN γ и IL-4) ч. В экспериментах использовали дозу бета-эндорфина 0,0005 мкг/кг, в качестве митогена использовали конканавалин А (КонА) в концентрации 20 мкг/мл. Выбор рабочей дозы пептида и концентрации митогена основывался на ранее проведенных исследованиях [5, 9].

Оценка продукции IL-1 β и IL-10 перитонеальными макрофагами

Перитонеальные макрофаги культивировали способом, аналогичным для спленоцитов. В качестве индуктора использовали опсонизированный зимозан (ОЗ) в концентрации 150 мкг/мл. Для оценки секреции IL-1 β и IL-10 макрофагами использовали супернатанты 24-часовых культур, которые предварительно замораживали и хранили при -20°C. Количественное определение всех цитокинов проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью наборов для мышей (Quantikine ELISA Mouse, R&D, США) по методике, предложенной производителем.

Статистическая обработка результатов

Полученный материал обрабатывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа для непарных данных. Статистическую значимость различий между группами оценивали с помощью критерия наименьшей значимой разницы (LSD-тест) Фишера. Все результаты на рисунках и в таблицах представлены в виде средней арифметической и её стандартной ошибки ($M \pm m$).

Результаты и обсуждение

Установлено, что введение бета-эндорфина за 1 ч до выведения животных из эксперимента приводило к угнетению спонтанной продукции IL-1 β макрофагами в дозах 100, 0,01, 0,0005 мкг/кг (табл. 1). При этом стимулированная зимозаном секреция IL-1 β в группах животных, которым вводили бета-эндорфин, статистически значимо не отличалась от значений в контрольной группе. При введении пептида за 6 ч до выделения перитонеальных макрофагов активность проявила только дозировка 1 мкг/кг, которая приводила к угнетению стимулированной продукции IL-1 β (табл. 2).

Более выраженное влияние бета-эндорфин оказывал на продукцию IL-10. При введении мышам за 1 ч до выделения макрофагов, бета-эндорфин в дозах 1 и 0,01 мкг/кг оказывал угнетающее влияние на спонтанную секрецию IL-10 (табл. 1). При выделении макрофагов через 6 ч после введения бета-эндорфина все исследуемые дозы пептида оказали выраженное

угнетающее действие на уровни IL-10 в спонтанных культурах (табл. 2). В стимулированных культурах значимый эффект пептида на продукцию IL-10 был зарегистрирован только при введении бета-эндорфина в дозе 1 мкг/кг за 6 ч до выделения перитонеальных макрофагов (табл. 2).

Таким образом, бета-эндорфин угнетал продукцию как про-(IL-1β), так и противовоспалительных (IL-10) факторов. Наиболее выражены эффекты проявлялись в нестимулированных клеточных культурах, однако, если в отношении IL-1 beta более выраженные эффекты получили в культурах макрофагов, выделенных через 1 ч после инъекции пептида, то в случае с IL-10 самые сильные эффекты бета-эндорфина были получены на клетках, выделенных через 6 ч по-

сле введения пептида. Ранее нами было показано, что в системе *in vitro* бета-эндорфин усиливал продукцию IL-1β в ЛПС-стимулированных культурах лейкоцитов человека [10]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что эффекты бета-эндорфина в системах *in vitro* и *in vivo* могут иметь противоположную направленность, которая так же зависит от наличия активирующего сигнала.

При оценке влияния пептида на продукцию IFN-γ, IL-2 и IL-4 за 1 ч или за 6 ч до выведения животных из эксперимента были получены следующие результаты.

В культурах, стимулированных Кон А наблюдалось усиление продукции IL-4 как через 1 ч, так и через 6 ч после инъекции бета-эндорфина. На спонтан-

Таблица 1

Влияние бета-эндорфина на продукцию IL-1β и IL-10 перитонеальными макрофагами в условиях введения пептида за 1 ч до выделения клеток

Экспериментальное воздействие	Культуры	Концентрация цитокина, пкг/мл	
		IL-1β	IL-10
Контроль	Спонтанные	93,55 ± 14,43 (n = 9)	223,5 ± 21,19 (n = 6)
	Зимозан	141,11 ± 12,41 (n = 8)	407,51 ± 36,43 (n = 6)
100 мкг/кг	Спонтанные	43,03 ± 3,49 *** (n = 9)	171,59 ± 28,55 (n = 6)
	Зимозан	116,89 ± 45,69 (n = 9)	208,36 ± 71,73 (n = 6)
1 мкг/кг	Спонтанные	67,59 ± 10,64 (n = 9)	131,66 ± 28,26 * (n = 6)
	Зимозан	183,72 ± 40,50 (n = 9)	153,26 ± 10,56 (n = 6)
0,01 мкг/кг	Спонтанные	32,34 ± 6,76 *** (n = 7)	103,93 ± 20,89 ** (n = 6)
	Зимозан	78,77 ± 22,87 (n = 9)	240,75 ± 95,46 (n = 6)
0,0005 мкг/кг	Спонтанные	40,05 ± 8,13 *** (n = 9)	151,91 ± 28,16 (n = 6)
	Зимозан	123,05 ± 35,04 (n = 9)	312,52 ± 105,87 (n = 6)

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочкой отмечены значения, статистически значимо отличающиеся от аналогичных показателей в контрольной группе; уровни значимости: * — p<0,05, ** — p<0,01, *** — p<0,001 по LSD-критерию Фишера

Таблица 2

Влияние бета-эндорфина на продукцию IL-1β и IL-10 перитонеальными макрофагами в условиях введения пептида за 6 ч до выделения клеток

Экспериментальное воздействие	Культуры	Концентрация цитокина, пкг/мл	
		IL-1β	IL-10
Контроль	Спонтанные	20,38 ± 7,46 (n = 9)	142,15 ± 4,36 (n = 6)
	Зимозан	109,06 ± 13,28 (n = 6)	387,33 ± 23,59 (n = 5)
100 мкг/кг	Спонтанные	14,62 ± 5,61 (n = 9)	64,40 ± 4,50 *** (n = 6)
	Зимозан	108,40 ± 13,13 (n = 6)	277,36 ± 20,84 (n = 6)
1 мкг/кг	Спонтанные	33,72 ± 20,29 (n = 9)	76,60 ± 7,07 *** (n = 6)
	Зимозан	52,70 ± 9,65* (n = 8)	241,07 ± 12,58* (n = 6)
0,01 мкг/кг	Спонтанные	48,63 ± 20,17 (n = 7)	90,63 ± 17,06 *** (n = 6)
	Зимозан	81,12 ± 29,97 (n = 5)	403,12 ± 26,05 (n = 6)
0,0005 мкг/кг	Спонтанные	27,66 ± 13,82 (n = 9)	80,53 ± 6,28 *** (n = 6)
	Зимозан	69,03 ± 9,86 (n = 8)	453,01 ± 69,09 (n = 6)

ную продукцию IL-4 спленocyтaми бeтa-эндорфин не оказывал значимого влияния (рис. 1, А).

В работе не было выявлено эффекта пептида на Кон А-индуцированную продукцию IL-2 независимо от времени введения. В то же время было зарегистри-

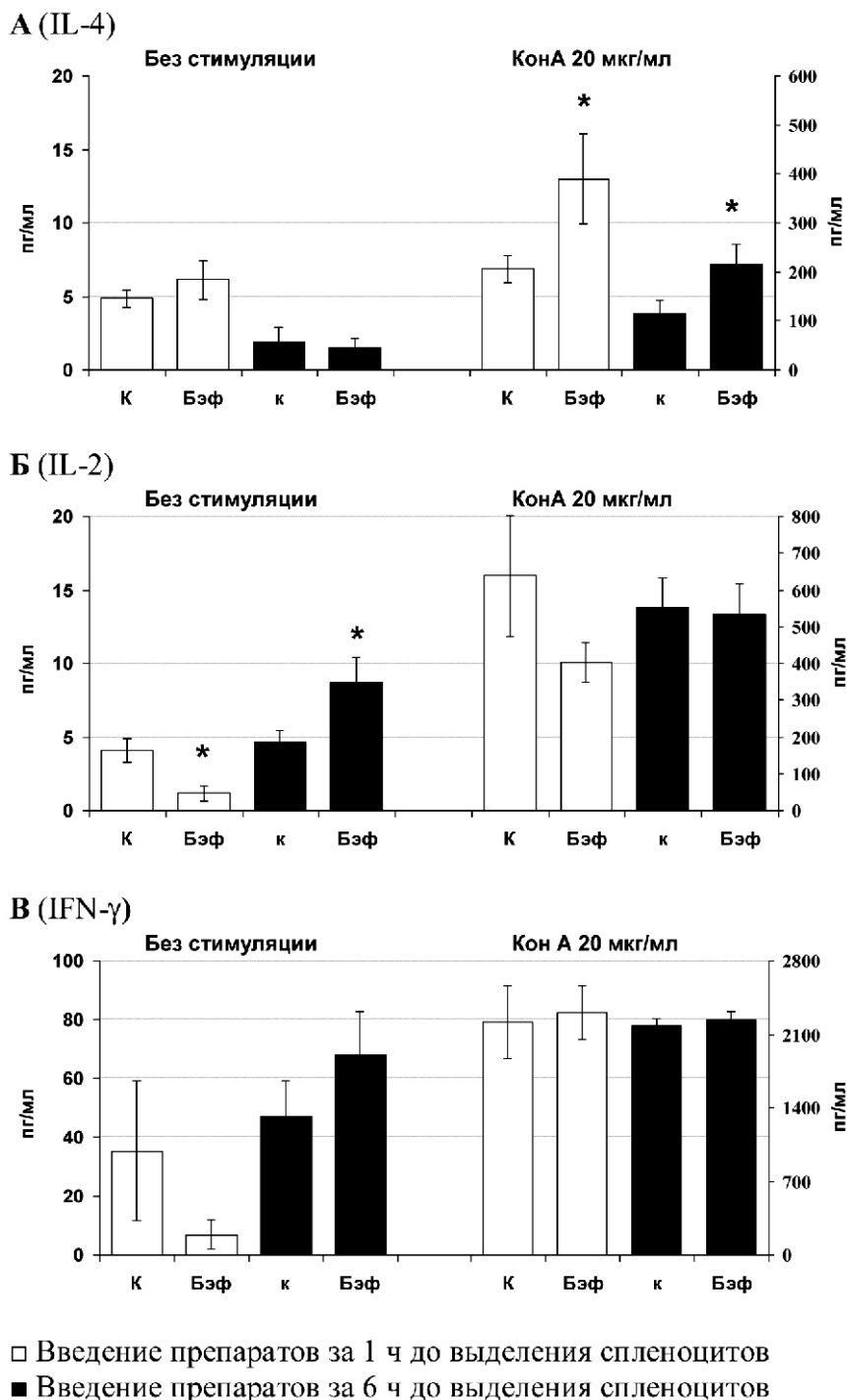


Рис. 1. Влияние бeтa-эндорфина на спонтанную и КонА-индуцированную секрецию IL-4 (А), IL-2 (Б) и IFN-γ (В) спленocyтaми мыши в зависимости от времени введения пептида. * – $p < 0,05$ по непарному t-критерию Стьюдента. По оси абсцисс: К – контроль; Бэф – бeтa-эндорфин в дозе 0,0005 мкг/кг. Концентрация цитокинов в нестимулированных культурах представлена по левой оси ординат, а в стимулированных культурах – по правой.

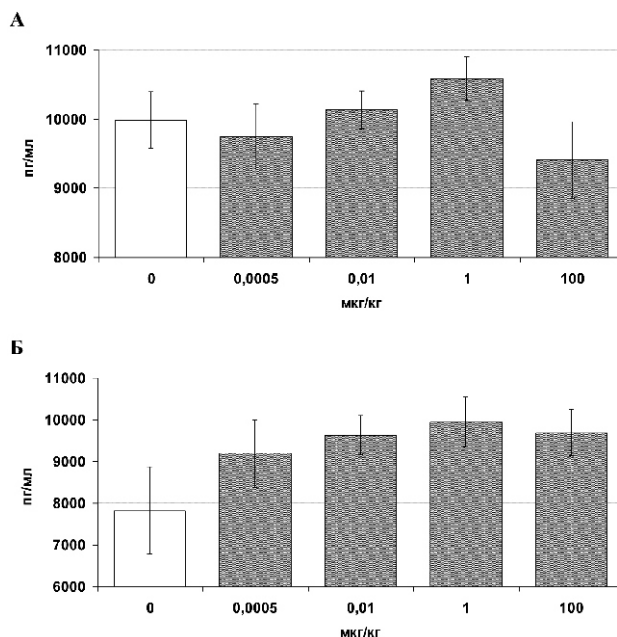


Рис. 2. Влияние бета-эндорфина на уровни кортикостерона в периферической крови в зависимости от времени введения. (А) — через 1 ч после введения бета-эндорфина, (Б) — через 6 ч после введения бета-эндорфина. По оси ординат — концентрация кортикостерона, по оси абсцисс — доза бета-эндорфина.

ровано разнонаправленное влияние бета-эндорфина на уровни IL-2 в спонтанных культурах спленоцитов: в группе животных, которым пептид вводили за 1 ч до забоя, наблюдалось угнетение секреции исследуемого цитокина, а через 6 ч после введения — стимуляция (рис. 1, Б). Как показано на рис. 1, В, продукция IFN-γ как в спонтанных, так и в стимулированных клеточных культурах статистически значимо не изменялась под воздействием бета-эндорфина.

Таким образом, введение бета-эндорфина стимулирует Кон А-индуцированную продукцию IL-4 независимо от времени воздействия пептида, в то время как направленность его эффектов в отношении секреции IL-2 зависит от временного промежутка между инъекцией пептида и выведением животных из эксперимента. Ранее было показано, что стимулирующее влияние бета-эндорфина в дозе 0,0005 мкг/кг на антилогенез в селезенке наблюдается преимущественно при введении пептида в момент близкий к введению антигена [5, 9]. В то же время, как показывают представленные в данной работе результаты, усиление продукции IL-4, основного Th2-поляризующего фактора, может сохраняться и через 6 ч после введения пептида.

Помимо прямого действия на клетки иммунной системы, бета-эндорфин может влиять на их активность опосредованно, через модуляцию продукции гормонов гипоталамо-гипофизарной оси и, в частно-

сти, кортикостерона, продуцируемого клетками коры надпочечников. В этой связи нами было исследовано влияние различных доз бета-эндорфина на уровень кортикостерона у интактных мышей за 1 ч (рис. 2, А) и за 6 ч (рис. 2, Б) до выведения животных из эксперимента (рис. 2). Было отмечено, что концентрация кортикостерона в плазме крови мышей под воздействием бета-эндорфина не изменяется как в ранние, так и в поздние сроки после введения пептида, что, в свою очередь, свидетельствует об отсутствии опосредованности эффекта пептида через продукцию кортикостерона.

По данным литературы известно, что наиболее выраженное влияние на функции гипоталамо-гипофизарной оси бета-эндорфин оказывает в условиях стресса, угнетая секрецию кортикотропин-рилизинг-фактора (КРФ) в гипоталамусе через налоксонзависимый механизм [11]. Кроме того, бета-эндорфин может оказывать прямое действие на кору надпочечников, и наличие или отсутствие его эффекта будет зависеть от экспрессии того или иного типа рецептора [12].

Таким образом, бета-эндорфин, несмотря на короткий период полураспада в биологических средах, играет важную роль в регуляции функций клеток адаптивного и врожденного иммунитета. С одной стороны, независимо от времени воздействия пептид усиливает продукцию спленоцитами IL-4, угнетает продукцию IL-1β и IL-10 макрофагами перитонеальной полости. С другой стороны, от времени воздействия пептида зависит направленность эффектов бета-эндорфина на секрецию IL-2, а также выраженность влияния исследуемого пептида на уровни IL-1beta и IL-10. Данные эффекты не связаны с изменением уровня кортикостерона в плазме крови экспериментальных животных.

References

1. Bodnar R. Endogenous opiates and behavior: 2014. *Peptides*. 2016; 75: 18-70.
2. Sitte N., Busch M., Mousa S., Labuz D, Rittner H, Gore C. at al. Lymphocytes upregulate signal sequence-encoding proopiomelanocortin mRNA and beta-endorphin during painful inflammation *in vivo*. *Journal of Neuroimmunology*. 2007; 183: 133-45.
3. Smith M.E. Neuropeptides as signal molecules in common with leukocytes and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Behavior and Immunity*. 2008; 22: 3-14.
4. Akdis M., Aab A., Altunbulakli C., Azkur K., Costa R.A., Cramer R. at al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor b, and TNF-a: Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016; 138(4): 984-1010.
5. Gein S.V., Baeva T.A., Nebogatikov V.O. Effects of beta-endorphin on functional activity of mouse splenocytes under conditions of *in vivo* blockade of μ,δ-opioid receptors.

Bulluten eksperimentalnoy biologii i meditsiny. 2014; 9: 344 — 48. (in Russian)

6. Sunal R., Tuncel N., Sumer N. Effect of beta-endorphin and cold stress on heart noradrenalin levels in rats. *Annals of the New York Academy of Science*. 1987; 496: 158-60.

7. *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes*. European Treaty Series. Strasburg, 1986.

8. Friemel H. *Immunological methods. [Immunologicheskie metody]*. Moscow; Meditsina; 1987. (in Russian)

9. Gein S.V., Baeva T.A., Nebogatikov V.O., Tendryakova S.P. Beta-endorphin effects on antibody production, proliferation, and secretion of Th1/Th2 cytokines in vivo. *Bulluten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* 2011; 11: 526-29. (in Russian)

10. Gein S.V., Gorshkova K.G., Tendrykova S.P. Regulation of IL-16 α and IL-8 production by μ , δ -opiate receptor agonists in vitro. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. Sechenova*. 2008; 7: 812 -21. (in Russian)

11. O'Connor T., O'Halloran D., Shanahan F. The stress response and the hypothalamic- pituitary- adrenal axis: from molecule to melancholia. *Oxford Journal of Medicine*. 2000; 93: 323-33.

12. Navolotskaya E.V., Kovalitskaya Y.A., Zolotarev YU. A., Kolobov A.A., Kampe-Nemm E.A., Malkova N.V. et al. Identification and characterization of opioid receptor beta-endorphin rat adrenal cortex. *Biokhimiya*. 2004; 4: 1071-78. (in Russian)

Сведения об авторах:

Баева Татьяна Александровна, канд. биол. наук, науч. сотр.;

Гейн Сергей Владимирович, доктор мед. наук, проф., вед. науч. сотр., e-mail: gein@iegm.ru

© Коллектив авторов, 2018
УДК 615.32: 612.017.1

Хобракова В.Б.^{1,2}, Будаева Е.Р.¹

Влияние ориентина, гентиопикросида и олеаноловой кислоты, выделенных из *Gentiana algida* Pall, на состояние иммунной системы в эксперименте

¹ ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН, 670047, г. Улан-Удэ, Россия, ул. Сахьяновой, д. 6

² ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет», 670000, г. Улан-Удэ, Россия, ул. Смолина, д. 24-а

Цель исследования — определение иммуномодулирующих свойств ориентина, гентиопикросида и олеаноловой кислоты, выделенных из надземной части горечавки холодной (*Gentiana algida* Pall.) при азатиоприновой иммуносупрессии. **Методика.** опыты проведены на 100 мышках-самцах линии F1 (СВАхС57В1/6) массой 18—20 г. Иммунодефицит моделировали пероральным введением азатиоприна в дозе 50 мг/кг ежедневно в течение 5 сут. (контроль). Опытные группы животных на фоне азатиоприновой иммуносупрессии получали ориентин (15 мг/кг), гентиопикросид (12 мг/кг) и олеаноловую (4 мг/кг) 1 раз в сут. внутривентрикулярно в течение 14 сут. Интактная группа мышей получала очищенную воду по схеме. Действие испытуемых соединений на состояние клеточного звена иммунного ответа оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) согласно стандартной методике локальной ГЗТ. Состояние гуморального иммунитета оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза по А.Д. Cunningham (1965). Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами вариационной статистики с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента. **Результаты.** Установлено, что испытуемые биологически активные вещества: ориентин, гентиопикросид, олеаноловая кислота, способны снижать супрессивное действие цитостатика азатиоприна на клеточно-опосредованную иммунную реакцию и антителогенез, что проявляется в повышении индекса реакции гиперчувствительности замедленного типа в 1,3—1,7 раза, абсолютного и относительного числа антителообразующих клеток в 1,6—1,8 раза по сравнению с контролем. Установлено, что наиболее выраженным иммуномодулирующим действием обладают ориентин и олеаноловая кислота. **Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют, что ориентин, гентиопикросид и олеаноловая кислота, выделенные из надземной части горечавки холодной *Gentiana algida*, обладают иммуномодулирующим действием в отношении клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при экспериментальной азатиоприновой иммуносупрессии, что обосновывает целесообразность их дальнейшего исследования с целью создания новых эффективных иммуномодуляторов.

Ключевые слова: ориентин; олеаноловая кислота; гентиопикросид; *Gentiana algida* Pall.; иммуномодулирующая активность; азатиоприн; иммуносупрессия; реакция гиперчувствительности замедленного типа; антителогенез.

Для цитирования: Хобракова В.Б., Будаева Е.Р. Влияние ориентина, гентиопикросида и олеаноловой кислоты, выделенных из *Gentiana algida* Pall, на состояние иммунной системы в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 54—58. DOI:

Для корреспонденции: Хобракова Валентина Бимбаевна, доктор биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментальной фармакологии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН, e-mail: val0808@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.02.2017

Khobrakova V.B.^{1,2}, Budaeva E.R.¹

Effects of orientin, gentiopicroside and oleanolic acid isolated from *gentiana algida* pall. on the immune system status in experiments

¹ Institute of General and experimental biology, Sakh'yanovoi str. 6, Ulan-Ude, 670047, Russia

² Buryat State University, Smolina Str. 24a, Ulan-Ude 670000, Russia

The study objective was to evaluate the immune modulating effects of orientin, gentiopicroside, and oleanolic acid isolated from the aerial part of *Gentiana algida* Pall. on cellular and humoral immune responses in azathioprine immunosuppression. **Methods.** Experiments were carried out on CBA male mice (n = 100; 18—20 g). Immune deficiency was modeled by intragastrical administration of azathioprine 50 mg/kg once a day for 5 days. Experimental groups consisted of animals receiving orientin, gentiopicroside, and oleanolic acid (15, 12, and 4 mg/kg, respectively, once a day,

intragastrically, for 14 days) against the background of azathioprine immunosuppression. The intact group received purified water on the same schedule. Effects of the tested compounds on the cellular immunity status were evaluated in the reaction of delayed-type hypersensitivity (DTH) according to a standard method for local DTH. The humoral immunity status was evaluated by the number of antibody-forming cells determined by the method of local hemolysis by A.J. Cunningham (1965). Statistical analysis was performed using standard methods of variation statistics with a parametric Student's *t*-test. **Results.** The studied biologically active substances, orientin 15 mg/kg, gentiopicroside 12 mg/kg, and oleanolic acid 4 mg/kg, reduced the suppressive action of azathioprine on cell-mediated immune and antibody responses; the index of delayed type hypersensitivity reaction was 1.3 to 1.7 times increased; and both absolute and relative numbers of antibody-forming cells were 1.6 to 1.8 times increased as compared with the control group. Therefore, orientin and oleanolic acid rendered most pronounced immunomodulating effects. **Conclusion.** These results showed that orientin, gentiopicroside and oleanolic acid isolated from the aerial part of *Gentiana algida* displayed a marked immune modulating activity, which justifies their further study to create new, effective immune modulators.

Keywords: orientin; oleanolic acid; gentiopicroside; *Gentiana algida*; immune modulating activity; azathioprine; immune suppression; delayed-type hypersensitivity response; antibody response.

For citation: Khobrakova V.B., Budaeva E.R. The influence of orientin, gentiopicroside and oleanolic acid isolated from *Gentiana algida* Pall. on the state of immune system in the experiment. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(1): 54–58. (in Russian). DOI:

For correspondence: Valentina B. Khobrakova, Doctor of Biological Sciences, Senior staff scientist Federal State Budgetary Institution of Science «Institute of General and Experimental Biology» SB RAS; 6, ul. Sakh'yanovoi, Ulan-Ude, 670047, Russian Federation, e-mail: val0808@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Khobrakova V.B., <http://orcid.org/0000-0002-4689-5706>

Budaeva E.R., <http://orcid.org/0000-0001-9348-2368>

Received 03.02.2017

Введение

Эффективность терапии заболеваний на фоне снижения иммунного статуса организма, зависит не только от вида патологии, факторов внешней среды, в том числе стресса, но и от применяемого медикаментозного лечения. На лекарственном рынке большинство иммуномодуляторов представлено средствами синтетического происхождения, длительное применение которых влечет за собой множество побочных эффектов. Иммунокорректирующие средства растительного происхождения обладают более мягким действием и низкой токсичностью, что делает возможным их продолжительное использование без риска развития побочных эффектов. Данные многочисленных исследований свидетельствуют, что иммуномодулирующей активностью обладают флавоноиды, фенолпропаноиды, дубильные вещества, полисахариды, тритерпеновые сапонины, эфирные масла, витамины и другие биологически активные компоненты растительного происхождения [1–7].

Объектами изучения иммунокорректирующего действия явились индивидуальные извлечения из наземной части горечавки холодной (*Gentiana algida* Pall.) — ориентин, гентиопикрозид и олеаноловая

кислота. Индивидуальные соединения и суммарные препараты из *G. algida* обладают противовоспалительным [8], антифунгальным [9], противотрихомонадным [10], антибактериальным [11] и гемостатическим [12] действием. Ранее нами была установлена выраженная иммуномодулирующая активность сухого экстракта *Gentiana algida* Pall [13, 14]. Содержание в нем флавоноидов, тритерпенов и иридоидов составляло 86,91, 23,98 и 82,07 мг/г соответственно.

Цель работы — определение иммуномодулирующих свойств ориентина, гентиопикрозида и олеаноловой кислоты, выделенных из наземной части горечавки холодной (*Gentiana algida* Pall.), при азатиоприновой иммуносупрессии.

Методика

Эксперименты проведены на 100 мышах-самцах линии F1 (СВАхС57Bl/6) массой 18–20 г. (Питомник «Столбовая»). Животные находились в стандартных условиях вивария в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (GLP) и приказом МЗ РФ № 708Н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики». Эксперименты про-

ведены в соответствии с приказом МЗ РФ № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики» от 19.06.2003 и «Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей». Протокол исследований согласован с этическим комитетом ИОЭБ СО РАН (протокол № 7 от 12.11.2013.). Из эксперимента животных выводили дислокацией шейных позвонков под легким эфирным наркозом.

Действие индивидуальных извлечений из надземной части *G. algida* на показатели клеточного и гуморального звеньев иммунитета было изучено на животных в состоянии иммунодепрессии, вызванной цитостатиком азатиоприном (50 мг/кг), который вводили контрольной группе животных перорально 1 раз в сут. в течение 5 сут. БАВ вводили опытным группам животных на фоне азатиоприна в экспериментально-терапевтических дозах: ориентин — 15 мг/кг, гентиопикрозид — 12 мг/кг, олеаноловая кислота — 4 мг/кг перорально 1 раз в сут. в течение 14 сут. Интактная и контрольная группы животных получали воду по аналогичной схеме.

Состояние клеточного звена иммунного ответа оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) согласно стандартной методике локальной ГЗТ [15]. Мышей сенсибилизировали внутрибрюшинным введением 0,1%-ной взвеси эритроцитов барана (ЭБ) в физиологическом растворе. На 4-е сут. под подошвенный апоневроз задней лапки вводили разрешающую дозу антигена — 50 мкл 50%-ной взвеси ЭБ. В контрлатеральную лапку инъецировали физиологический раствор в том же объеме. Оценку реакции ГЗТ проводили спустя 24 ч по разнице масс опытной и контрольной лап. Индекс реакции ГЗТ (I_p) рассчитывали по формуле:

$$I_p = [(M_{оп} - M_k) / M_k] \cdot 100\%,$$

где

$M_{оп}$ — масса опытной лапы,

M_k — масса контрольной лапы.

Воздействие ориентина, гентиопикрозида и олеаноловой кислоты из *G. algida* на состояние гуморального иммунитета оценивали по количеству антитело-

образующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза по A.J. Cunningham [16]. Мышей иммунизировали внутрибрюшинно ЭБ в дозе 2×10^8 клеток/мышь. Величину иммунного ответа оценивали по числу антителообразующих клеток (АОК) на селезенку и на 10^6 клеток спленоцитов на 5-е сут. после иммунизации.

Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами вариационной статистики с использованием непараметрического критерия У-Манна—Уитни. Различия между данными контроля и опыта считали статистически значимыми при вероятности 95% ($p \leq 0,05$) [17].

Результаты и обсуждение

При исследовании влияния ориентина, олеаноловой кислоты и гентиопикрозида на клеточно-опосредованную реакцию ГЗТ установлено, что исследуемые вещества в условиях азатиоприновой иммуносупрессии восстанавливают индекс данной реакции. Введение азатиоприна приводило к снижению индекса реакции ГЗТ (ИР ГЗТ) на 39% по сравнению с тем же показателем в интактной группе (табл. 1).

При введении ориентина, олеаноловой кислоты и гентиопикрозида опытным группам животных в дозах 15, 4, 12 мг/кг, соответственно, наблюдали увеличение индекса реакции ГЗТ в 1,7; 1,4 и 1,3 раза соответственно по сравнению с данными в контрольной группе (табл. 1).

При исследовании влияния индивидуальных извлечений из *G. algida* на процессы антителообразования установлено, что данные вещества восстанавливают показатели гуморального иммунного ответа в условиях азатиоприновой иммуносупрессии. Введение азатиоприна приводило к снижению как абсолютного числа АОК, так и числа АОК на 10^6 спленоцитов на 39% и 40% соответственно по сравнению с теми же показателями в интактной группе (табл. 2). При введении ориентина, гентиопикрозида и олеаноловой кислоты на фоне супрессии наблюдали статистически значимое увеличение количества АОК в аб-

Таблица 1

Влияние ориентина, гентиопикрозида и олеаноловой кислоты из *G. algida* на выраженность реакции ГЗТ

Группы животных	ИР ГЗТ, %
Интактная, n = 10	32,42 ± 3,18
Контрольная (азатиоприн), n = 10	19,77 ± 1,40*
Опытная 1 (азатиоприн + ориентин), n = 10	33,29 ± 2,61**
Опытная 2 (азатиоприн + олеаноловая кислота), n = 10	28,33 ± 2,73**
Опытная 3 (азатиоприн + гентиопикрозид), n = 10	24,94 ± 1,71**

Примечание. Здесь и в табл. 2 различия статистически значимы по сравнению с данными: * — в интактной группе, ** — в контрольной группе, ($p < 0,05$, n — количество животных в группе).

Таблица 2

Влияние ориентина, гентиопикроза и олеаноловой кислоты из *G. algida* на антителообразование

Группа животных	Абсолютное число АОК на селезенку	Число АОК на 10 ⁶ спленоцитов
Интактная, n = 10	66591 ± 4997	166,1 ± 12,9
Контрольная (азатиоприн), n = 10	40717 ± 3387*	99,8 ± 8,8*
Опытная 1 (азатиоприн + ориентин), n = 10	75642 ± 3986**	180,46 ± 11,03**
Опытная 2 (азатиоприн + олеаноловая кислота), n = 10	63000 ± 5685**	179,18 ± 16,27**
Опытная 3 (азатиоприн + гентиопикрозид), n = 10	56855 ± 5134**	164,6 ± 14,63**

солютных значениях в 1,86; 1,59; 1,62 раза и при расчете на 10⁶ спленоцитов — в 1,81; 1,65; 1,79 раза соответственно по сравнению с данными в контрольной группе животных (табл. 2).

Полученные экспериментальные данные позволяют заключить, что ориентин, гентиопикрозид и олеаноловая кислота, выделенные из *G. algida*, способны ослаблять супрессивное действие азатиоприна на показатели клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа; более выраженным эффектом обладают ориентин и олеаноловая кислота.

Результаты проведенного исследования согласуются с данными работ, в ходе которых было установлено иммуномодулирующее действие флавоноида ориентина, выделенного из листьев *Jatropha curcas* L. [18], флавоноидов ориентина и витексина из *Trollius chinensis* [19]. М. Bahgat и соавт. выявили иммуномодулирующее действие иридоидов, выделенных из листьев *Citharexylum quadrangular* [20]. В работах J. Wang и соавт. [21] и A. Jimenes-Arellanes и соавт. [22] установлен иммуномодулирующий эффект олеаноловой кислоты из *Ligustrum lucidum*, *Chamaedorea tepejilote*, *Lantana hispida*. В исследованиях E.S. Yamamoto и соавт. показано, что использование тритерпеновой фракции, выделенной из листьев *Vaccaria uncinella*, повышает иммунный ответ у инфицированных мышей [23].

Таким образом, индивидуальные извлечения: ориентин, гентиопикрозид и олеаноловая кислота, выделенные из надземной части *G. algida*, обладают выраженным иммуномодулирующим действием, что позволяет рекомендовать их для дальнейшего изучения с целью создания новых растительных иммуномодулирующих препаратов.

References

- Han R., Wu W.Q., Wu X.P., Liu C.Y. Effect of total flavonoids from the seeds of *Astragalus complanatus* on natural killer cell function. *J. Ethnopharmacol.* 2015; 15(173): 157-65.
- Paszkiwicz M., Budzinska A., Rozalska B., Sadowska B. The immunomodulatory role of plant polyphenols (Review). *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej.* 2012; 66: 637-46.

- Kaleem Q.M., Akhtar M., Awais M.M., Saleem M., Zafar M., Iqbal Z. et al. Studies on *Embllica officinalis* derived tannins for their immunostimulatory and protective activities against coccidiosis in industrial broiler chickens. *The Scientific World Journal.* 2014; 378473. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/378473>.

- Danilets M.G., Belskiy Yu.P., Gur'ev A.M., Belousov M.V., Belskaya N.V., Trofimova E.S. et al. Effect of plant polysaccharides on Th1-dependent immune response: screening investigation. *Experimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya.* 2010; 73(6): 19-22. (in Russian)

- Zhang J., Cao W., Tian J., Yue R., Li L., Guo B. et al. Evaluation of novel saponins from *Psammosilene tunicoides* and their analogs as immunomodulators. *Int. Immunopharmacol.* 2012; 14(1): 21-6.

- Vajdy M. Immunomodulatory properties of vitamins, flavonoids and plant oils and their potential as vaccine adjuvants and delivery systems. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2011; 11(11): 1501-13.

- Il'derbaev O.Z., Il'derbaeva G.O. The influence of the triterpenoid from *Betula pendula* on the reactivity of an organism exposed to action of the dust-radiating factor. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2011; (3): 47-8. (in Russian)

- Khotsaev Zh.Ts. Anti-inflammatory activity of the dry extract from *Gentiana algida* Pall. *Razrabotka i vnedrenie novykh metodov i sredstv traditsionnoy meditsiny.* Moscow; 2001: 202-4. (in Russian)

- Tan R.X., Wolfender J.-L., Ma W.G., Zhang L.X., Hostettmann K. Secoiridoids and antifungal aromatic acids from *Gentiana algida*. *Phytochemistry.* 1996; 41: 111-6.

- Rubinichik M.A. Trihomonostatic properties of higher plants. *Phytontsity.* Kiev; 1972: 128-32. (in Russian)

- Kornopoltseva T.V., Khotsaev Z.T., Aseeva T.A., Tankhaeva L.M. Anti-inflammatory and antimicrobial activity of *Gentiana algida* Pall. and *Leucanthemum sibiricum* Dc. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal.* Irkutsk; 2007; 73(6): 82-5. (in Russian)

- Shishkina E.S., Nikitin Y.P., Sobolevskaya K.A., Potekhin K.G., Minaeva V.G., Izrailson V.F. *The study of natural and synthetic medicine. [Issledovanie lekarstvennykh preparatov prirodnogo i sinteticheskogo proiskhozhdeniya].* Tomsk; 1975. (in Russian)

- Budaeva E.R., Khobrakova V.B. *Immunomodulatory effect of the dry extract of Gentiana algida* Pall. *Trudy mezhdunarodnogo foruma «Klinicheskaya immunologiya i allergologiya — mezhdistsiplinarnye problemy».* Kazan'; 2014: 48-9. (in Russian)

- Budaeva E.R., Khobrakova V.B. The influence of the dry extract from *Gentiana algida* Pall. on the phagocytosis activity of macrophages at experimental immune suppression. *Vestnik Buryatskogo gosudarstvennogo universiteta.* Ulan-Ude; 2015; 12: 96-9. (in Russian)

15. Mironov A.N., ed. *Guidelines for conducting preclinical trials of medicinal products, part 1. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv, chast' I]*. Moscow; Grif i K; 2012. (in Russian)
16. Cunningham A.J. A method of increased sensitivity for detecting single antibody forming cells. *Nature*. 1965; 207: 1106-7.
17. Sergienko V.I., Bondareva I.B. *Matematicheskaya statistika v klinicheskikh issledovaniyakh*. M.: GEOTAR-Media *The mathematical statistics in clinical research*, Moscow; GEOTAR-Media; 2006. (in Russian)
18. Abd-Alla H.I., Moharram F.A., Gaara A.H., El-Safty M.M. Phytoconstituents of *Jatropha curcas* L. leaves and their immunomodulatory activity on humoral and cell-mediated immune response in chicks. *Zeitschrift fur naturforschung section c-a jornal of biosciences*. 2009; 64(7-8): 495-501.
19. An F., Wang S.H., Tian Q.Q., Zhu D.X. Effects of orientin and vitexin from *Trollius chinensis* on the growth and apoptosis of esophageal cancer EC-109 cells. *Oncology letters*. 2015; 10(4): 2627-33.
20. Bahgat M., Shalaby N.M., Ruppel A., Maghraby A.S. Humoral and cellular immune responses induced in mice by purified iridoid mixture that inhibits penetration of *Schistosoma mansoni* cercariae upon topical treatment of mice tails. *J. Egypt. Soc. Parasitol*. 2005; 35(2): 597-613.
21. Wang J., Shan A., Liu T., Zhang C., Zhang Z. In vitro immunomodulatory effects of an oleanolic acid-enriched extract of *Ligustrum lucidum* fruit (*Ligustrum lucidum* supercritical CO2 extract) on piglet immunocytes. *Int. Immunopharmacol*. 2012; 14(4): 758-63.
22. Jimenez-Arellanes A., Luna-Herrera J., Cornejo-Garrido J., Lopez-Garcia S., Castro-Mussot M.E., Mckes-Fischer M. et al. Ursolic and oleanolic acids as antimicrobial and immunomodulatory compounds for tuberculosis treatment. *BMC Complement. Altern. Med*. 2013; 7(13): 258.
23. Yamamoto E.S., Campos B.L., Laurenti M.D., Lago J.H., Grecco Sdos S, Corbett C.E. et al. Treatment with triterpenic fraction purified from *Baccharis uncinella* leaves inhibits *Leishmania (Leishmania) amazonensis* spreading and improves Th1 immune response in infected mice. *Parasitol. Res*. 2014; 113(1): 333-39.

Сведения об авторах:

Будаева Евдокия Ринчиновна, аспирант.

© Коллектив авторов, 2018
УДК 618.14-018-02-092-07-085

Оразов М.Р.¹, Радзинский В.Е.¹, Хамошина М.Б.¹, Носенко Е.Н.², Галина Т.В.¹,
Духин А.О.¹, Оразмурадов А.А.¹, Токаева Э.С.¹, Барсегян Л.К.¹, Закирова Я.Р.¹

Патологический нейрогенез — ключевое звено патогенеза тазовой боли, обусловленной аденомиозом

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

² «Одесский национальный медицинский университет» МОЗ Украины, 65082, Украина, Одесса, пер. Валиховский, д. 2

Статья посвящена одной из актуальных проблем клинической гинекологии — тазовой боли при аденомиозе. **Цель исследования:** изучение морфологических особенностей нервного аппарата миометрия у женщин с синдромом хронической тазовой боли, обусловленной аденомиозом. **Методика.** Изучено 60 биоптатов, полученных после гистерэктомии у женщин с диффузным аденомиозом II—III степени, сопровождающимся болевым синдромом выраженной степени тяжести, не получавших гормональную терапию. Группа морфологического сравнения составила 10 биоптатов, полученных у женщин с аденомиозом, без болевого синдрома, прооперированных по поводу аномальных маточных кровотечений, также не получавших гормональную терапию. У всех пациентов получено информированное согласие на использование биологического материала в исследовании. После гистерэктомии участки стенок маток, включавшие эндометрий и миометрий подвергали стандартным гистологическим процедурам, готовили парафиновые срезы (5 мкм). Общую морфологическую оценку проводили при окраске срезов гематоксилином и эозином. Визуализацию нервных волокон осуществляли после иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания с использованием моноклональных антител (МАТ) к белкам нейрофиламентов (ДАКО, Дания) по инструкциям фирмы. **Результаты.** Изучение иннервационного аппарата матки при аденомиозе с помощью моноклональных антител к белкам нейрофиламентов выявил разнообразие волокон по толщине, плотности и интенсивности окраски. Плотность нервных окончаний, сопряженных непосредственно с очагами эндометриоза, была невелика — в зоне желез $4,1 \pm 0,3$ на мм^2 среза, в строме — $9,2 \pm 0,6$. Тонкие нервные волокна визуализировались преимущественно в строме вокруг кровеносных сосудов, сопровождающих зоны врастания эктопического эндометрия. Густое сплетение тонких нервных волокон также было обнаружено в субсерозном слое. Причем, как в субсерозном, так и в подслизистом слое миометрия преобладали разветвленные тонкие нервные волокна, количество которых статистически значимо ($p < 0,01$) превышало аналогичный показатель в группе сравнения — $17,2 \pm 1,4$ против $11,8 \pm 0,9$ на мм^2 . Сравнение иннервационного аппарата матки у женщин контрольной группы и у пациенток с аденомиозом с болевым синдромом позволяет утверждать, что именно расширение иннервационного поля в миометрии является наиболее вероятной причиной формирования тазовой боли у пациенток с аденомиозом. **Выводы.** Результаты проделанной работы продемонстрировали, что основным местом локализации нервов в матке и потенциальной причиной формирования гипералгезии при аденомиозе является миометрий с формированием аномально избыточного иннервационного аппарата вокруг очагов эктопического эндометрия, в периваскулярных регионах и в строме между пучками гладких миоцитов.

Ключевые слова: аденомиоз; хроническая тазовая боль; миометрий; иннервационный аппарат; нейрофиламенты; патологический нейрогенез.

Для цитирования: Оразов М.Р., Радзинский В.Е., Хамошина М.Б., Носенко Е.Н., Галина Т.В., Духин А.О., Оразмурадов А.А., Токаева Э.С., Барсегян Л.К., Закирова Я.Р. Патологический нейрогенез — ключевое звено патогенеза тазовой боли, обусловленной аденомиозом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 59–64. DOI:

Для корреспонденции: Оразов Мекан Рахимбердыевич, e-mail: otekan@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 18.05.2017

Orazov M.R.¹, Radzinskiy V.E.¹, Khamoshina M.B.¹, Nosenko E.N.², Galina T.V.¹,
Dukhin A.O.¹, Orazmuradov A.A.¹, Tokaeva E.S.¹, Barsegyan L.K.¹, Zakirova Y.R.¹

Pathological neurogenesis: a key step in the pathogenesis of pelvic pain caused by adenomyosis

¹ Russian University of Peoples' Friendship, Miklukho-Maklaya Str. 6, Moscow 117198

² Odessa National Medical University, Valihovsky Per. 2, Odessa 65082, Ukraine

Objective. To study morphological features of the myometrium neural apparatus in women with chronic pelvic pain syndrome associated with adenomyosis. **Methods.** 60 biopsy samples were studied, which were obtained from hysterectomies for grade I—III diffuse adenomyosis associated with severe pelvic pain syndrome. These women did not receive any hormonal therapy. The control group included 10 biopsies obtained from women with adenomyosis who had no pelvic pain syndrome and underwent a surgery for abnormal uterine bleeding. These women did not receive any hormonal therapy either. After hysterectomy, uterine wall samples including endometrium and myometrium were fixed in 10% neutral, buffered formalin (pH 7.4) for 24 hours. After dehydration, the material was embedded in paraffin highly purified with polymeric additives (Richard-Allan Scientific, USA) at a temperature $\leq 60^{\circ}\text{C}$. Overall morphological evaluation of sections was performed with H & E staining. Imaging was performed after nerve fibers immunohistochemical (IHC) staining with monoclonal antibodies (MAbs) to neurofilament proteins (DAKO, Denmark) according to the manufacturer's instructions. **Results.** Studying of the uterine innervation apparatus using monoclonal antibodies to neurofilament proteins in adenomyosis identified a variety of fiber thickness, density and color intensity. Density of nerve endings directly associated with endometriosis foci was low; 4.1 ± 0.3 per mm^2 in the glandular zone and 9.2 ± 0.6 per mm^2 in the stroma. Thin nerve fibers were visualized mainly in the stroma around blood vessels associated with the ectopic endometrium ingrowth zone. A dense plexus of thin nerve fibers was also found in the subserosal layer. Furthermore, both in myometrial subserosal and submucosal layers, ramified, thin nerve fibers predominated. The number of such fibers was significantly greater than in the comparison group (17.2 ± 1.4 vs. 11.8 ± 0.9 per mm^2 , $p < 0.01$). Comparison of the uterine innervation apparatus in women with and without chronic pelvic pain syndrome suggested that particularly the expansion of myometrium innervation field was the most likely cause for the development of pelvic pain in women with adenomyosis. **Conclusions.** The main location of uterine nerves and a potential cause for hyperalgesia in adenomyosis is the myometrium developing abnormally excessive innervation around foci of ectopic endometrium, perivascular areas, and the stroma between fibers of smooth myocytes.

Keywords: adenomyosis; chronic pelvic pain; pathogenesis; myometrium; neural apparatus; neurofilaments; pathological neurogenesis.

For citation. Orazov M.R., Radzinskiy V.E., Khamoshina M.B., Nosenko E.N., Galina T.V., Dukhin A.O., Orazmuradov A.A., Tokaeva E.S., Barsegyan L.K., Zakirova Y.R. Pathological neurogenesis: A key step in the pathogenesis of pelvic pain caused by adenomyosis. *Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian journal. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(1): 59–64. (in Russian). DOI:

For correspondence: Orazov Mekan Rahimberdievich, MD, Professor in the Department of obstetrics and gynecology with course of Perinatology of the Russian University of friendship of peoples; the branch of specialization is obstetrics and gynecology, e-mail: omekan@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare that there is no potential conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 18.05.2017

Введение

Хроническая тазовая боль (ХТБ) является ведущим клиническим симптомом аденомиоза. На сегодняшний день существует несколько гипотез, объясняющих развитие боли у женщин с аденомиозом. Как известно, в возникновении тазовой боли могут быть задействованы ноцицептивные, воспалительные и нейропатические механизмы, не исключено, что все 3 указанных механизма участвуют в патогенезе эндометриоз-ассоциированной тазовой боли [1–3]. Существуют теории, объясняющие механизмы развития ХТБ. Центральная нервная система (ЦНС) и периферическая нервная система (ПНС) взаимно влияют друг на друга. Говоря об эндометриозе, в частности об аденомиозе, это означает, что модуляция боли при ХТБ может быть обусловлена или обострена болевыми импульсами, поступающими от других внутренних органов, что обусловлено наличием висцеро-висцеральных рефлексов [4]. Было обнаружено существование динамической взаимосвязи между различны-

ми стимулами, поступающими в ЦНС от ноцицептивных нейронов спинного мозга, проходящих по дорсальным канатикам спинного мозга и одиночных нейронов. Согласно одной из теорий, боль также возникает в результате компрессии нервов очагами аденомиоза [5–8]. Другой клеточный медиатор — сосудисто-эндотелиальный фактор роста (СЭФР) — способствует неангиогенезу сосудов, кровоснабжающих нервы, поддерживая, таким образом, невральную «спраутинг» (sprouting), усиливая ХТБ [9–11]. Предполагается также роль фактора роста нервов (NGF) в зоне повреждения, поскольку наличие глубоких очагов аденомиоза было ассоциировано с повышением экспрессии данного фактора роста и развитием боли [12]. При этом NGF отводят роль не только в стимуляции роста нервов, но и в повышении чувствительности нервных окончаний, что собственно и может вести к усилению ощущения боли [13–15]. Однако при этом стоит заметить, что усиление роста нервов не всегда сопровождается развитием выраженного болевого синдрома. Так, доказано, что эндометриоз

сопровождается появлением нервных волокон в функциональном слое эндометрия, претерпевающим ежемесячную перестройку и десквамацию [16, 17]. Однако при этом не было установлено связи между количеством нервных волокон и выраженностью болевого синдрома. Предположение о том, что боль возникает в результате сдавления нервных окончаний очагами аденомиоза, было опровергнуто в исследовании с визуализацией белков нейрофиламентов, установивших, что в большинстве случаев нервы обнаруживаются вне очагов аденомиоза. И при этом тазовая боль не коррелирует с количеством нервных структур в зоне эктопического эндометрия [18].

Кроме того, без ответа остается вопрос, какие собственно клетки и структуры в стенке матки являются продуцентами перечисленных факторов роста, нейротрофинов и биологически активных веществ. Ответ на вопрос о механизмах изменения иннервационного аппарата матки кроется в анализе нейротканевых отношений.

Цель работы — изучение иннервационного аппарата и нейротканевых отношений в матке при аденомиозе, сопровождающемся синдромом ХТБ.

Методика

Изучено 60 биоптатов, полученных после гистерэктомий у женщин с диффузным аденомиозом II—III степени, сопровождающимся болевым синдромом выраженной степени тяжести, не получавших гормональную терапию. Группу морфологического сравнения составили 10 биоптатов, полученных после гистерэктомии у женщин с аденомиозом, без болевого синдрома, прооперированных по поводу аномальных маточных кровотечений, также не получавших гормональную терапию.

После гистерэктомии участки стенок маток, включающие эндометрий и миометрий подвергали стандартным гистологическим процедурам, готовили парафиновые срезы (5 мкм). Общую морфологическую оценку проводили при окраске срезов гематоксилином и эозином. Визуализацию нервных волокон осуществляли после иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания с использованием моноклональных антител (МАТ) к белкам нейрофиламентов (ДАКО, Дания) по инструкциям фирмы. С целью объективизации морфологического исследования использовали комплексный морфометрический анализ, который проводили с помощью специального программного обеспечения ImageTool version 3.0. и графического редактора Adobe Photoshop CS4 Extended v.11.0.1. Снимки выполнены на микроскопе Olympus BX51 с цифровой камерой DP70 (Olympus, Япония). Для оценки количества нервных волокон использовали

квадратно-узловую тест-систему. Среднее количество нервов, ассоциированных с очагами аденомиоза, оценивали следующим образом. Общее количество нервов в поле зрения при ув. 200 делили на количество квадратов, попадающих на участки расположения эктопического эндометрия. Аналогичным способом оценивали плотность нервных волокон в миометрии пациенток с аденомиозом и лейомиомой. Результаты представляли в виде среднего арифметического количества нервов на миллиметр площади среза в эктопическом и эктопическом эндометрии, а также в миометрии. Процедуру подсчета выполняли дважды двумя независимыми экспертами (двойное слепое исследование), неосведомленными о диагнозе и клинических характеристиках пациенток. Уровень конкордантности морфометрических результатов, полученных от независимых экспертов, составлял более 95%. Плотность нервных волокон при аденомиозе сравнивали с результатами у пациенток контрольной группы, используя тест Манна—Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Изучение иннервационного аппарата матки при аденомиозе с помощью моноклональных антител к белкам нейрофиламентов выявило разнообразие волокон по толщине, плотности и интенсивности окраски. При этом использованный иммуногистохимический маркер позволил выделить лишь единичные тонкие нервные волокна в области границы между эктопическим эндометрием и миометрием. Отдельные тонкие волокна визуализировались и вокруг очагов эктопического эндометрия, преимущественно вокруг доньшек (конусов роста) маточных желез (рис. 1).

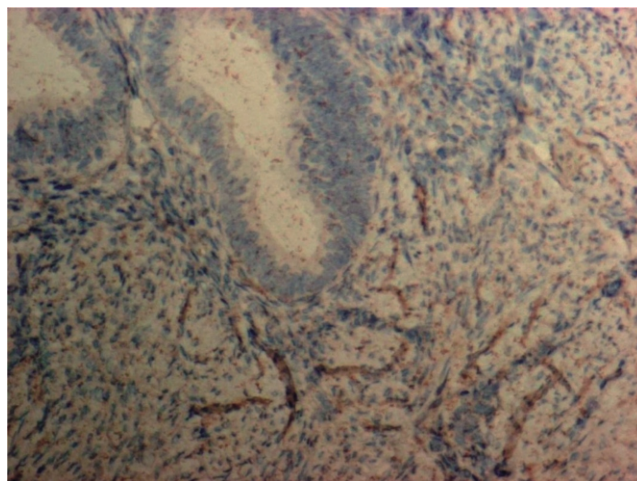


Рис. 1. Нервные волокна вокруг эндометриоидных желез в очагах аденомиоза. ИГХ с МАТ к нейрофиламентам. Ув. 400.

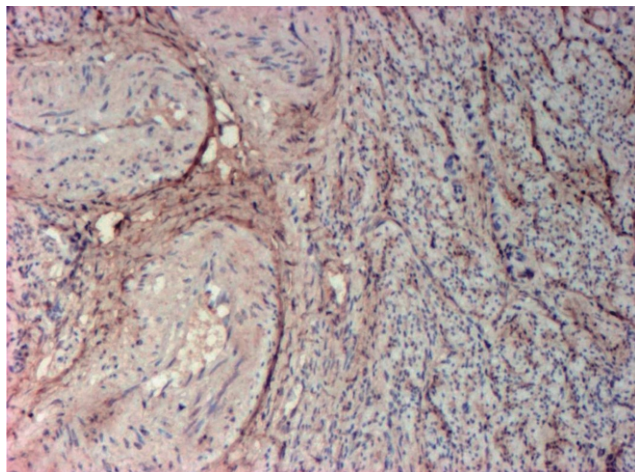


Рис. 2. Увеличение количества периваскулярных и интерстициальных нервных волокон у пациентки с аденомиозом. ИГХ с МАТ к нейрофиламентам. Ув. 200.

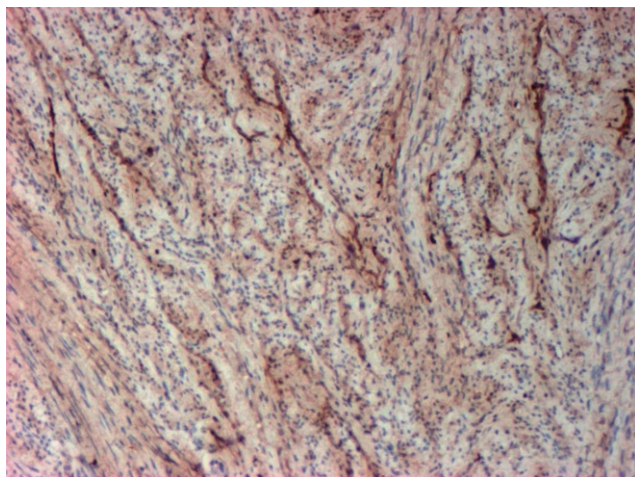


Рис. 3. Многочисленные разветвленные нервные волокна при аденомиозе в прослойках стромы в зоне ремоделирования миометрия. ИГХ с МАТ к нейрофиламентам, ув. 160.

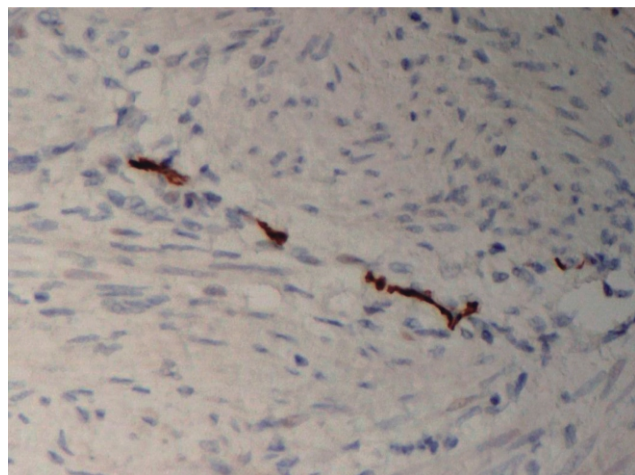


Рис. 4. Булавовидные расширения нервных волокон в миометрии сопровождаются картинами пролиферации клеток вокруг них. ИГХ с МАТ к нейрофиламентам. Ув. 400.

При этом в данном исследовании плотность нервных окончаний, сопряженных непосредственно с очагами эндометриоза, была невелика — в зоне желез $4,1 \pm 0,3$ на мм^2 среза, в строме — $9,2 \pm 0,6$. Тонкие нервные волокна визуализировались преимущественно в строме вокруг кровеносных сосудов, сопровождающих зоны врастания эктопического эндометрия. Прямая иннервация очагов эктопического роста эндометрия сенсорными и симпатическими нервами была показана на модели у крыс [4] и обнаружена в очагах эндометриоза у женщин [3]. С одной стороны, факт прямой иннервации очагов эндометриоза является основой концепции, объясняющей связь между скоростью прогрессирования эндометриоза и болью [3]. В ее основе лежит постулат о том, что рост нервных волокон ассоциирован с NGF, повышающим чувствительность чувствительных нервов [8]. Однако, судя по результатам, полученным в данном исследовании, более типичной является ассоциация нервных волокон с сосудами стромы. Это согласуется с известными закономерностями иннервации матки, сенсорные и вегетативные нервы которой ассоциированы с сосудами. С другой стороны, данный результат может отражать роль сосудов и ангиогенеза в увеличении плотности нервных волокон при аденомиозе.

Другой интересный факт, касающийся особенностей иннервации стенки матки при аденомиозе, был получен при изучении интрамурального иннервационного аппарата матки. В данной работе у пациенток с аденомиозом было выявлено превалирование нервных волокон в структуре самого миометрия (рис. 2). Максимальное количество нервных волокон в стенке матки пациенток с аденомиозом было выявлено вокруг крупных артерий сосудистого слоя миометрия и в пространствах между ними.

Кроме того, обширные разветвления тонких нервных волокон были выявлены в зонах ремоделирования миометрия — по ходу мелких сосудов, расположенных в прослойках стромы между пучками гладких миоцитов (рис. 3). Такие прослойки с мелкими сосудами и нервами были богато инфильтрированы и пронизывали всю толщу миометрия, формируя также обширную нейроваскулярную сеть.

Характерно, что визуально нервные волокна в миометрии имели извилистый ход и многочисленные разветвления, вдоль многих из них наблюдались признаки пролиферации клеток. Тогда как между самими гладкими миоцитами миометрия количество нервных волокон было незначительным. В ряде случаев вдоль этих нервов наблюдались участки извилистости и булавовидных расширений (рис. 4).

Густое сплетение тонких нервных волокон было обнаружено также в субсерозном слое. Причем как в субсерозном, так и в подслизистом слое миометрия

превалировали разветвленные тонкие нервные волокна, количество которых статистически значимо превышало аналогичный показатель в группе сравнения — $17,2 \pm 1,4$ против $11,8 \pm 0,9$ на мм^2 .

Эти результаты расходятся с данными исследования [9], в котором была проведена оценка иннервации матки при аденомиозе на основе визуализации нервов, экспрессирующих белок PGP 9.5. По данным этого исследования, при аденомиозе было зарегистрировано снижение плотности нервных волокон на границе между миометрием и эндометрием. Кроме того, автор отмечал снижение количества нервов в миометрии. Лишь в отдельных участках вокруг очагов аденомиоза было зафиксировано увеличение количества нервных терминалей. На основании этого автор сделал вывод, что аденомиоз ассоциирован со снижением количества нервных волокон.

Однако в ряде других работ, включая исследование [14], показано увеличение количества многочисленных сенсорных A δ и C-волокон, холинергических и адренергических нервов, экспрессирующих NGF, Trk-A и p75, у пациенток с аденомиозом. При этом в изучении механизмов боли при эндометриозе традиционно рассматривают нервные волокна, ассоциированные с очагами эктопического эндометрия [7, 11]. Тогда как, по нашему мнению, акцент стоит перенести на иннервационный аппарат миометрия. На основании установленных в работе фактов логично предположить, что причиной формирования синдрома тазовой боли у пациенток с аденомиозом является не только сдавление нервов в зоне эктопического эндометрия, но и формирование аномально избыточного иннервационного аппарата в самом миометрии. Тем более, что последний характеризовался гиперплазией на фоне ремоделирования сосудистого русла матки. Повышение количества нервов в миометрии у пациенток с аденомиозом может также объяснять гиперперистальтику матки у женщин, страдающих аденомиозом.

В целом, увеличение количества нервных волокон при аденомиозе связано с их ростом в следующих компартментах:

- 1) вокруг очагов эктопического эндометрия;
- 2) в периваскулярном регионе;
- 3) в строме — между пучками гладких миоцитов, где определялась густая сеть интерстициальных тонких разветвленных нервных волокон. В отличие от пациенток основной группы, у женщин контрольной группы было выявлено превалирование нервных волокон преимущественно вокруг крупных сосудов миометрия при отсутствии широко разветвленной интрамуральной сети волокон.

Сравнение иннервационного аппарата матки у женщин контрольной группы и у пациенток с аде-

номиозом позволяет сделать заключение, что именно расширение иннервационного поля в миометрии является наиболее вероятной причиной формирования тазовой боли у пациенток с аденомиозом.

Заключение

Таким образом, формирование обширной, разветвленной интерстициальной нейросети при болевой форме аденомиоза приводит к расширению иннервационного поля по сравнению с безболевогой формой, что является одной из ведущих причин ХТБ.

References

1. Orazov M.R., Radzinsky V.E., Khamoshina M.B., Nosenko E.N. Proangiogenic features in chronic pelvic pain caused by adenomyosis. *Gynecol Endocrinol.* 2016; Vol. 32: 7-10.
2. Radzinsky V.E., Orazov M.R., Khamoshina M.B., Nosenko E.N. Treatment strategies for pelvic pain associated with adenomyosis. *Gynecol Endocrinol.* 2016; Vol. 32: 19-22.
3. Radzinskiy V.E., Orazov M.R., Nosenko O.M. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in uterine tissues as one of the mechanisms of algogenesis in adenomyosis, associated with chronic pelvic pain. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 2016; (1): 32-5. (in Russian)
4. Orazov M.R., Radzinskiy V.E., Nosenko O.M. The role of inflammatory and immune reactivity in developing pain in adenomyosis. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 2016; (1): 40-4. (in Russian)
5. Adamyan L.V., Osipova A.A., Sonova M.M. Evolution of hormone therapy of endometriosis. *Problemy reproduktivnoy.* 2006; (5): 11-6. (in Russian)
6. Adamyan L.V. Clinical and embryological features of endometriosis associated infertility (literature review). *Problemy reproduktivnoy.* 2010; (5): 47-51. (in Russian)
7. Chiantera V., Abesadze E., Mechsner S. How to understand the complexity of endometriosis-related pain. *J Endometr Pelvic Pain Disord.* 2017; 9(1): 30-8.
8. Chopin N., Ballester M., B. Borghese, A. Fauconnier, H. Foulot, C. Malartic, C. Chapron. Relation between severity of dysmenorrhea and endometrioma. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 2006; 85(11): 1375-80.
9. Laufer M.R., Goitein L., Bush M. Prevalence of endometriosis in adolescent girls with chronic pelvic pain not responding to conventional therapy. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 1997; 10(4): 199-202.
10. Carter J.E. Combined hysteroscopic and laparoscopic findings in patients with chronic pelvic pain. *J. Am. Assoc. Gynecol. Laparoscop.* 1994; 2: 43-7.
11. Howard F.M. Endometriosis and mechanisms of pelvic pain. *J. Minim. Invasive Gynecol.* 2009; 16(5): 540-50.
12. Jones A.V., Hockley J.R., Hyde C., Gorman D. et al. Genome-wide association analysis of pain severity in dysmenorrhea identifies association at chromosome 1p13.2, near the nerve growth factor locus. *Pain.* 2016 Nov., 157 (11): 2571 — 81.
13. Leserman J., Zolnoun D., Meltzer-Brody S. Identification of diagnostic subtypes of chronic pelvic pain and how

subtypes differ in health status and trauma history. *Am. J. Obstet Gynecol.* 2006; 195(2): 554-60.

14. B. I. Karp, N. Sinaii, L. K. Nieman. Migraine in women with chronic pelvic pain with and without endometriosis. *Fertil. Steril.* 2011; 95(3): 895-9.

15. Vodolazkaia A., Yesilyurt B.T2., Kyama C.M., Borkor A., Schols D., Huskens D. et al. Vascular endothelial growth factor pathway in endometriosis: genetic variants and plasma biomarkers. *Fertil. Steril.* 2016; Jan 7. pii: S0015-0282(15)02185-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.12.016.

16. Check J. H. Chronic pelvic pain syndromes—traditional and novel therapies: part I surgical therapy. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2011; 38(1):10-3.

17. Danilov A.B., Davidov O.S. *Neuropathic pain. [Neuropaticheskaya bol].* Moscow: Borges; 2007. (in Russian)

18. Kogan E.A., Paramonova N.B., Nizyaeva N.V., Ezhova L.S., Phaizullina N.M. *Mechanism and pathways of generalization of endometriotic disease. Materialy VIII Mezhdunarodnogo kongressa po Reproduktivnoy Meditsine.* 2013; 326-8.

Сведения об авторах:

Оразов Мекан Рахимбердыевич, доктор мед. наук, доцент каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, отрасль специализации — акушерство и гинекология, e-mail: omekan@mail.ru;

Радзинский Виктор Евсеевич, доктор мед. наук, проф., чл.-кор. РАН, заслуженный деятель науки РФ, зав. каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, отрасль специализации — акушерство и гинекология, e-mail: radzinsky@mail.ru;

Хамошина Марина Борисовна, доктор мед. наук, проф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН; отрасль специализации — акушерство и гинекология, e-mail: mbax999@yandex.ru;

Носенко Елена Николаевна, доктор мед. наук, проф., каф. акушерства и гинекологии Одесского национального медицинского университета, отрасль специализации — акушерство и гинекология, e-mail: nosenko.olena@gmail.com;

Галина Татьяна Владимировна, доктор мед. наук, проф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, отрасль специализации — акушерство и гинекология, e-mail: tatiana.galina1@mail.ru;

Духин Армен Олегович, доктор мед. наук, проф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, отрасль специализации — акушерство и гинекологии, e-mail: dukhin@mail.ru;

Оразмурадов Агамурад Акмамедович, доктор мед. наук, проф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, отрасль специализации — акушерство и гинекология, e-mail: leily_oraz@mail.ru;

Токаева Эльвира Сериковна, аспирант кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, отрасль специализации — акушерство и гинекология, e-mail: tokaeva.e@yandex.ru;

Барсемян Лилит Корюновна, аспирант каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, отрасль специализации — акушерство и гинекология, e-mail: lilianna_91@mail.ru;

Закирова Яна Рывхатевна, аспирант каф. акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН, отрасль специализации — акушерство и гинекология, e-mail: bikmaeva90@mail.ru

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616-092

Анищенко А.П.¹, Алчинова И.Б.², Вялкина М.В.², Медведева Ю.С.²,
Яковенко Е.Н.², Бурдюкова Е.В.¹, Гуревич К.Г.¹

Оценка влияния занятий физической культурой по модифицированной методике на характер обменных процессов в организме студентов

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», 125040, Москва, Россия, ул. Делегатская, д. 20/1

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Внедрение новых методик подготовки спортсменов и обучения физической культуре требует обязательного медицинского сопровождения. Информативность диагностики функциональной адекватности используемых нагрузок достигается при условии многопараметровых одновременных тестирований систем, определяющих общий гомеостаз организма. **Цель.** Оценка изменений в преобладающем направлении обменных процессов при занятиях физической культурой по оригинальной методике, с повышенным уровнем нагрузки. **Методы.** Методом лазерной корреляционной спектроскопии исследованы пробы мочи 179 студентов 1—2 курсов, исходный возраст $17,5 \pm 1,5$ года, из них 126 девушек и 53 юноши. Для изучения параметров психомоторной регуляции (приборно-аппаратный комплекс «УПМД-01-ИНТОКС») и их связи с преобладающим направлением обменных процессов обследовано 600 школьников обоего пола в возрасте от 15 до 16 лет, неотягощенных верифицированными хроническими заболеваниями. **Результаты.** Первичное измерение было предпринято с целью выявления преобладающих направлений метаболических сдвигов в изучаемой группе до начала обучения по разработанной методике. Показано, что основной вклад вносят катаболические и анаболические сдвиги (49% и 41% соответственно) при небольшом представительстве смешанных (7%) и нормальных (3%). Через 1 год занятий по разработанной методике выявлено статистически значимое снижение доли студентов с анаболическим характером обменных процессов. Для дополнительного обоснования связи обменных процессов и параметров психомоторной функции организма, являющейся основой в обеспечении физиологии движения, было обследовано 600 школьников обоего пола в возрасте от 15 до 16 лет, неотягощенных верифицированными хроническими заболеваниями. По мере снижения анаболического и нарастания степени катаболического сдвига наблюдается снижение частот встречаемости и наиболее длительных циклов движения, а также ошибочных коррекций как со стороны экстензоров, так и флексоров. Описанная закономерность выявляется по всем 5 независимым критериям и в строгом соответствии со степенью нарастания катаболических сдвигов и, соответственно, уменьшения анаболических. **Заключение.** Обнаруженная связь характера обменных процессов с некоторыми показателями психомоторики дает основания полагать, что методика обучения физической культуре с повышенными нагрузками при дальнейшем применении окажет благотворное воздействие на здоровье студентов.

Ключевые слова: аштанга-йога; лазерная корреляционная спектроскопия; психомоторные показатели; физические нагрузки.

Для цитирования: Анищенко А.П., Алчинова И.Б., Вялкина М.В., Медведева Ю.С., Яковенко Е.Н., Бурдюкова Е.В., Гуревич К.Г. Оценка влияния занятий физической культурой по модифицированной методике на характер обменных процессов в организме студентов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(1): 65–70. DOI:

Для корреспонденции: Гуревич Константин Георгиевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. ЮНЕСКО «Здоровый образ жизни — залог успешного развития» ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», e-mail: kgurevich@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках гранта Президента РФ МК -2287.2017.7

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.06.2017

Anischenko A.P.¹, Alchinova I.B.², Vyalkina M.V.², Medvedeva Yu.S.²,
Yakovenko E.N.², Burdyukova E.V.¹, Gurevich K.G.¹

Assessment of the influence of physical activity by a modified method on metabolic processes in students

¹ FSBEI HE «A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry» of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 20/1 Delegatskaya str., 127473 Moscow, Russia

² FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8 Baltiyskaya str., 125315 Moscow, Russia

Introduction of new methods of athletic training and physical education requires obligatory medical support. The optimal approach is the technique that allows achieving intensive progress of sports mastery and physical fitness under conditions of greatest balance of individual indicators and integrated level of functional systems that determine the adaptive reserves of the body and fully meet the criteria of healthy population of the same age and gender. Informative diagnostics of functional adequacy of physical exercise can be achieved via simultaneous multivariate testing of systems determining the integral body homeostasis. **Goal.** Evaluation of changes in prevailing direction of metabolic processes during physical exercise by the original methodology characterized by intensive physical exercise. **Methods.** Urine samples from 179 first-second-year students aged 17.5 ± 1.5 years (initially), 126 girls and 53 boys, were analyzed by laser correlation spectroscopy. To study parameters of psychomotor regulation (UPMD-01-INTOKS complex) and their correlations with predominant direction of metabolic processes 600 schoolchildren of both sexes aged 15–16 years without documented chronic diseases (I health group) were tested. **Results.** Baseline parameters were measured to characterize the prevailing directions of metabolic shifts in the examined group before the start of training by the developed technique. Predominant contribution of catabolic and anabolic shifts (49% and 41%, respectively) and minor contribution of mixed (7%) and normal (3%) shifts were found. After 1-year training by the developed technique, the number of students with anabolic type of metabolic processes significantly decreased. As anabolic shifts decrease and catabolic shifts increase, the frequencies of the longest movement cycles of both extensors and flexors, the most erroneous corrections, and the most stressed states of flexor-extensor muscles decreased. This pattern was revealed for all 5 independent criteria and in strict accordance with the increase of catabolic and decrease in anabolic shifts. **Conclusion.** The revealed correlation between the directions of metabolic processes and some psychomotor parameters suggests that this technique will have a positive impact on the health of students.

Keywords: ashtanga yoga; laser correlation spectroscopy; psychomotor parameters; physical exercise.

For citation: Anischenko A.P., Alchinova I.B., Vyalkina M.V., Medvedeva Yu.S., Yakovenko E.N., Burdukova E.V., Gurevich K.G. Assessment of the influence of physical activity by a modified method on metabolic processes in students. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62 (1): 65–70. (in Russian). DOI:

For correspondence: Konstantin Gurevich, Doctor of Medical Sciences, Prof. (Medicine), Head of the Department of chair UNESCO «Healthy life — style for successful development» of Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov, e-mail: kgurevich@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The work was supported by the President of Russian Federation Grant MK -2287.2017.7

Information about authors:

Anischenko A.P. <http://orcid.org/0000-0002-7924-8505>

Alchinova I.B., <http://orcid.org/0000-0001-5294-7317>

Medvedeva Yu.S., <http://orcid.org/0000-0003-0414-8427>

Gurevich K.G., <http://orcid.org/0000-0002-7603-6064>

Received 13.06.2017

Введение

Созданная в стране система медицинского обеспечения физической культуры и спорта в течение последних лет пережила определенный период стагнации, связанный как с серьезными финансовыми трудностями отрасли, так и с реорганизацией, ликвидацией, изменением организационно-правовых форм физкультурных и спортивных организаций, а также некоторых специализированных лечебно-профилактических учреждений. Внедрение новых методик подготовки спортсменов и обучения физической культуре требует обязательного медицинского сопровождения. При этом оптимальной методикой является та, которая позволяет достигать интенсивного роста спортив-

ного мастерства и физической подготовленности при наибольшей сбалансированности отдельных показателей и интегрального уровня функциональных систем, определяющих адаптационные резервы организма и в полной мере отвечающих критериям популяции лиц практически здоровой группы населения того же возраста и пола. Информативность диагностики функциональной адекватности используемых нагрузок достигается при условии многопараметровых одновременных тестирований систем, определяющих общий гомеостаз. Для интегральной оценки параметров системы гомеостаза биологических жидкостей, составляющих внутреннюю среду организма, применяют различные методы исследования их субфракционного со-

става. Одним из методов, успешно зарекомендовавших себя для массовых обследований, является лазерная корреляционная спектроскопия (ЛКС) биологических жидкостей.

Проведенные исследования субфракционного состава сыворотки крови высококвалифицированных спортсменов, занимающихся циклическими и ациклическими видами спорта и лиц контрольной группы, показывают, что они заметно отличаются [1, 2].

Цель исследования — оценка изменений в преобладающем направлении обменных процессов при занятиях физической культурой по оригинальной методике, отличающейся повышенным уровнем нагрузки.

Методика

Для проведения исследования были привлечены студенты 1—2 курсов Московского государственного медико-стоматологического университета (МГМСУ), исходный возраст $17,5 \pm 1,5$ лет, из них 126 девушек и 53 юноши. Все студенты дали письменное добровольное согласие на участие в исследовании. Работа одобрена этическим комитетом МГМСУ (протокол № 0214 от 27.02.2014). Исследование проводилось в конце учебного года (1 курс — май 2015) и через год (2 курс — май 2016).

Критериями включения в исследование служили: отсутствие тяжелых соматических заболеваний, беременности или кормления грудью, сохранность менструального цикла, способность читать и понимать по-русски, подписанное информированное согласие на участие в исследовании, регулярное посещение занятий физической культурой, выполнение нормативов ГТО.

Критериями исключения были: тяжелые сопутствующие заболевания, невозможность или несогласие подписать информированное согласие.

Были сформированы две группы:

- группа 1 — студенты обучались по стандартной методике преподавания физической культуры;
- группа 2 — студенты обучались по модифицированной методике преподавания физической культуры, разработанной нами на основе аштанги-йоги [3, 4].

Студенты принимали участие в программе на основании высказанного согласия. В процессе исследования регистрировались изменения роста, веса, окружности талии. Для оценки уровня метаболизма методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) исследовали 179 проб мочи. Изменение физиологического состояния организма приводит к изменению метаболических процессов, что, в свою очередь, ведет к изменению состава биологических жидкостей. Определение субфракционного состава нативных биологических жидкостей дает точное представ-

ление о процентном соотношении составляющих их биосубстратов и позволяет получить интегральные показатели, отражающие динамическое состояние изучаемой системы [5].

У обследуемых студентов собирали утреннюю мочу, отбирали образцы по 1,5 мл, замораживали и хранили при -18°C . При этом не допускалось даже однократное размораживание биологического материала до момента его исследования. Непосредственно перед измерением пробы размораживали, центрифугировали при 3000 об/мин 15 мин, надосадочную жидкость отбирали. Образец в объеме 0,2 мл заливали в кювету лазерного корреляционного спектрометра «ЛКС-03-ИНТОКС» (Сертификат RU.C. 39.003.A N 5381), измерение проводили в частотном диапазоне 8 кГц в количестве 2000 накоплений. Регуляризацию спектра проводили с использованием нелинейной шкалы (программы «Spectrometer», «Urine», входящие в программное обеспечение спектрометра). Результатом расчета при таком способе обработки является гистограмма, где по оси ординат — процентный вклад частиц в светорассеяние, а по оси абсцисс — их размер в нанометрах. В зависимости от изменения процентного вклада в светорассеяние частиц той или иной фракции семиотическая классификация результатов ЛК-спектрометрии предполагает идентификацию 8 различных направлений сдвигов [6]:

- 0 — нормологическиподобный;
- 1 — аллергоподобный;
- 2 — интоксикационноподобный;
- 3 — катаболическиподобный;
- 4 — аутоиммуноподобный;
- 5 — дистрофическиподобный;
- 6 — аллерго-интоксикационноподобный;
- 7 — интоксикационно-аутоиммуноподобный.

При этом каждому симптомокомплексу соответствует несколько степеней выраженности: начальная (1), умеренная (2), выраженная (3).

Для дополнительного обоснования связи обменных процессов и параметров психомоторной функции организма, являющейся основой в обеспечении физиологии движения, было обследовано 600 школьников обоего пола в возрасте от 15 до 16 лет, неотягощенных верифицированными хроническими заболеваниями. Все обследования проведены с письменного согласия родителей или их законных представителей. Оценку обменных процессов проводили методом ЛКС. Оценку психомоторных показателей проводили на приборно-аппаратном комплексе «УПМД-01-ИНТОКС» (ООО «ИНТОКС», г. Санкт-Петербург, регистрационное удостоверение МЗ РФ 29/03041202/5085-03). Программой предусмотрена оценка следующих показателей пси-

хомоторной координации [7]: скоростные показатели движений по длительности цикла движения и времени изменения двигательного стереотипа при смене амплитуды движения руки; а также по латентным периодам реакции на световой и звуковой стимулы; точностные показатели движений по ошибке сенсорной коррекции флексоров и экстензоров (рассчитывается по величине «промахов» курсора в точках перемены направления движения); плавность движения (рассчитывается на основе соотношения гармоник спектра Фурье как доля основной гармоники в процентах).

Результаты и обсуждение

Первичное измерение было предпринято для характеристики преобладающих направлений метаболических сдвигов в изучаемой группе до начала обучения по разработанной методике. Результаты приведены на рис. 1, где видно, что основной вклад вносят катаболические и анаболические сдвиги (49% и 41%, соответственно) при небольшом представительстве смешанных (7%) и нормологическиподобных (3%). Подобное соотношение характерно для Московского региона и было показано в ЛК-исследованиях различных биологических жидкостей близких по возрасту контингентов [8, 9, 10]. В связи с этим данные по ЛК-спектрометрии мочи студентов, обучавшимся по стандартной методике физвоспитания, не приводятся.

Через год в группах студентов, занимавшихся как по стандартной программе (группа 1), так и по разработанной нами методике (группа 2) увеличиваются рост и вес, что связано с физиологическими процессами роста организма. Закономерным также является прирост индекса массы тела (как отношение веса тела в килограммах к квадрату роста в метрах) по сравнению с исходными данными. Однако в группе 1 данный прирост происходит преимущественно за счет жировой ткани, а в группе 2 — за счет активной костно-мышечной ткани. У юношей группы 2 окружность талии существенно ниже, чем у юношей группы 1. Хотя содержание жировой массы у юношей группы 1 находится в диапазоне нормальных значений, есть основания утверждать, что занятия физической культурой по модифицированной методике могут снижать риск развития центрального ожирения у представителей сильного пола. У девушек полученные данные косвенно свидетельствуют, что модифицированная методика занятий снижает риск развития общего ожирения.

С этими изменениями согласуются сдвиги в характере метаболических сдвигов через 1 год занятий по разработанной методике (рис. 2). Выявлено статистически значимое снижение доли студентов с анаболическим характером обменных процессов.

Было показано, что занятия по разработанной методике не оказывают отрицательного влияния на выполнение норм ГТО (бег, прыжки, подтягивания, отжимания).

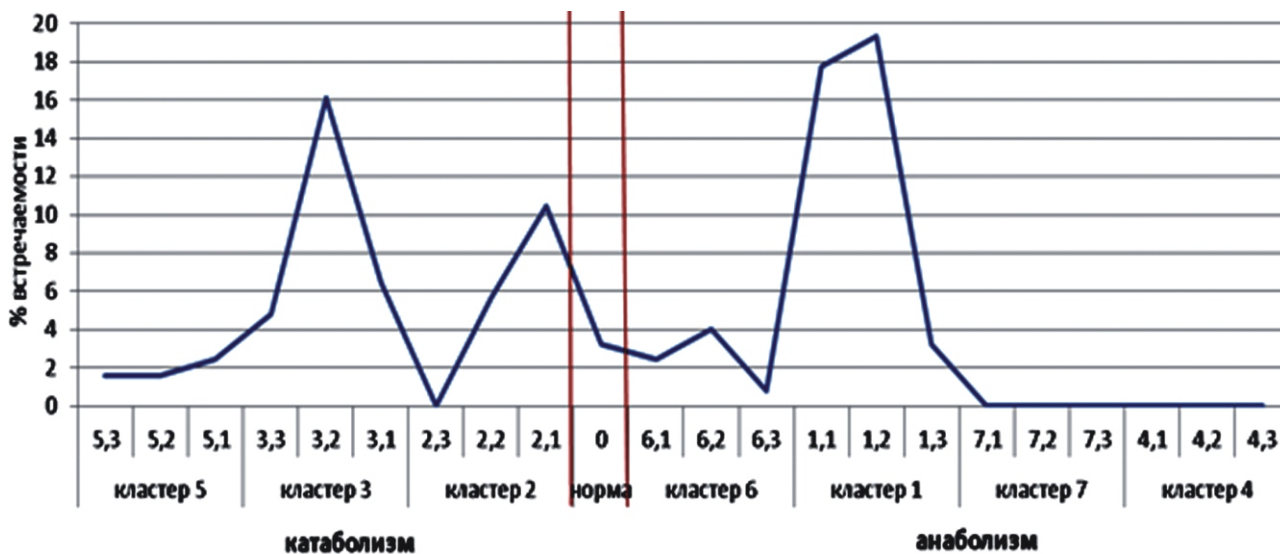


Рис. 1. Частоты встречаемости различных направлений и степеней выраженности метаболических сдвигов. По оси абсцисс — характер и степень выраженности сдвига (кластер 1 — аллергоподобный, кластер 2 — интоксикационноподобный, кластер 3 — катаболическиподобный, кластер 4 — аутоиммунноподобный, кластер 5 — дистрофическиподобный, кластер 6 — аллерго-интоксикационноподобный, кластер 7 — интоксикационно-аутоиммунноподобный, кластер 0 — норма; цифра после точки — степень выраженности сдвига: 1 — начальная; 2 — умеренная; 3 — выраженная). По оси ординат — частота встречаемости сдвига, %.

Представляло интерес выяснить, могут ли изменения в характере обменных процессов оказывать влияние на психомоторные функции организма. Для этого была обследована группа московских старшеклассников. Поскольку характер метаболизма заметно варьирует в различные сезоны года, обследование было проведено также в апреле-мае. Были выявлены следующие направления метаболических сдвигов:

1. Нормологическиподобные ЛК-спектры (14,5% от всей популяции), условно принятые за точку отсчета;
2. Анаболическиподобные сдвиги (18,7%), отличающиеся от первых определенным сдвигом в сторону высокомолекулярных субфракций;
3. Начальные катаболическиподобные сдвиги (55,5%), отличающиеся незначительным сдвигом в сторону относительно низкомолекулярных функций;
4. Умеренные катаболическиподобные сдвиги (5,8%), отличающиеся более значительным сдвигом в сторону низкомолекулярных сдвигов;
5. Выраженные катаболическиподобные сдвиги (5,5%), отличающиеся контрастированием в спектре наиболее низкомолекулярных функций.

В каждой из 5 выделенных на основе ЛКС-исследования групп мы анализировали частоты встречаемости тех или иных численных психомоторных параметров. Для этого в каждом параметре были выделены по 5 дискретных зон, где первой зоне соответствовали наилучшие функциональные значения, а пятой — наихудшие. В табл. 1 приведены соответствующие границы зон для отдельных параметров.

Исследованная нами группа параметров имеют достаточно воспроизводимую кинетику изменчивости:

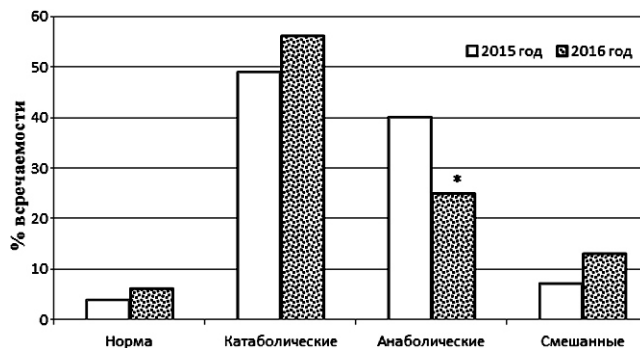


Рис. 2. Изменения в частотах встречаемости различных направлений метаболических сдвигов после занятий физической культурой по модифицированной методике. По оси абсцисс — направления сдвигов, по оси ординат — частота встречаемости, %. * — $p = 0,03$ по методу Фишера.

по мере снижения анаболического и нарастания степени катаболического сдвига наблюдается снижение частот встречаемости и наиболее длительных циклов движения, и наиболее ошибочных коррекций как со стороны экстензоров, так и флексоров. Описанная закономерность выявляется по всем 5 независимым критериям и в строгом соответствии со степенью нарастания катаболических сдвигов и, соответственно, уменьшения анаболических.

Заключение

Изменение физиологического состояния организма приводит к изменению метаболических процессов, что, в свою очередь, ведет к изменению состава биологических жидкостей. Определение субфракционно-

Границы зон параметров при тестировании психомоторики

Название параметра	Численные значения для зон				
	I	II	III	IV	V
Длительность цикла движения (с)	До 0,74	0,74—0,88	0,89—1,24	1,25—1,45	Выше 1,45
Ошибка коррекции флексоров (%)	До 2,06	2,06—3,3	3,31—6,8	6,81—9,37	Выше 9,37
Сгибательно-разгибательный тонус (%)	До -25	-25 — -3,5	-3,6—32,3	32,4—49	Выше 49

Примечание. В табл. 2 приведена зависимость параметров психомоторики от того или иного характера метаболизма

Таблица 1

Зависимость параметров психомоторики от характера метаболических сдвигов

Название параметра	Коэффициент регрессии				
	Анаболическиподобные сдвиги	Нормологическиподобные сдвиги	Начальные катаболическиподобные сдвиги	Умеренные катаболическиподобные сдвиги	Выраженные катаболическиподобные сдвиги
Длительность цикла движения	0,4214	1,5643	-0,25	-1,25	-2,571
Ошибка коррекции флексоров	2,95	-0,6	0,15	-1,15	-5,75
Сгибательно-разгибательный тонус	3,85	-0,2	-0,35	-1	-7,2

Таблица 2

го состава нативных биологических жидкостей дает точное представление о процентном соотношении составляющих их биосубстратов и позволяет получить интегральные показатели, отражающие динамическое состояние изучаемой системы. В настоящей работе при использовании методики обучения физической культуре с повышенными нагрузками зафиксированы сочетанные изменения в направлении обменных сдвигов и антропометрических показателей. Ранее было показано, что в группе исходно здоровых лиц модифицированная методика приводит к снижению содержания жировой массы и повышению — активной костно-мышечной и основного обмена [11, 12]. Обнаруженная связь характера обменных процессов с некоторыми показателями психомоторики дает основания полагать, что эта методика при дальнейшем применении окажет благотворное воздействие на здоровье студентов.

References

1. Sokolovsky V.S., Noskin L.A., Bazhora Yu.I. Express estimation of the homeostasis system in the dynamics of athletes physical activity. *Teoriya i praktika fizicheskoy kul'tury*. 1991; (11): 2-5. (in Russian)
2. Akmaev I.G., Aleksandrov A.S., Alchinova I.B., Bosharov E.V., Karganov M.Yu., Kryzhanovskii G.N. et al. *Sanology [Sanologiya]*. Moscow: Nauka; 2014. (in Russian)
3. Anishchenko A.P., Arkhangelskaya A.N., Dmitrieva E.A., Urakov A.L., Rogoznaya E.V., Ignatov N.G. et al. Development and justification of modified technique of physical training for students. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2016; 23(6): 105-9. (in Russian)
4. Anishchenko A.P., Arkhangelskaya A.N., Gurevich K.G., Dmitrieva E.A., Ignatov N.G., Osadchenko I.V. et al. Improvement of physical education programmes for

students. Medical aspects. *Sportivnaya meditsina: nauka i praktika*. 2016; 6(2): 73-81. (in Russian)

5. Titov V.N., Karganov M.Yu., Rotenko A.A., Dmitriyev V.A., Alchinova I.B., Arkhipova E.N. Biological functions and biological reactions. Laser correlation spectroscopy in the evaluation of intercellular medium purity. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2009; (6): 21-35. (in Russian)

6. Karganov M.Yu., Alchinova I.B., Yakovenko E.N., Kovalova O.I., Medvedeva Yu.S., Vyalkina M.V. Application of the method of laser correlation spectroscopy in laboratory medicine. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(9): 533-4. DOI 10.18821 / 0869-2084-2016-61-9. (in Russian)

7. Pankova N.B., Lebedeva M.A., Slezko V.N., Khorokin N.N., Vinogradov V.N., Kurneshova L.E. et al. Psycho-motor co-ordination and sensory-motor reactivity in patients with vertebral pathology. *Patogenez*. 2003; 1(1): 86-9. (in Russian)

8. Aleshchenko A.V., Alchinova I.B., Dmitrieva O.S., Dmitrieva G.P., Karganov M.Yu., Kozhevnikova M.I. et al. Use of a cytogenetic method for buccal epithelium study, and a method of laser correlation spectrometry for health disturbances monitoring in children. *Tsitologiya*. 2006; 48(2): 169-72. (in Russian)

9. Pankova N.B., Alchinova I.B., Afanasieva E.V., Karganov M.Yu. Characteristics of cardiovascular system indexes and nature of metabolic changes in adolescents with pre-hypertention from different regions of Russia. *Valeologiya*. 2009; (2): 32-6. (in Russian)

10. Karganov M., Alchinova I., Arkhipova E., Dubovoi R. Non-invasive polysystemic analysis of ecological and anthropogenic factors influence on children. *J. Trends of Biomedicine*. 2009; 24(1): 26-7.

11. Anishchenko A.P., Arkhangelskaya A.N., Ignatov N.G., Gurevich K.G. Physical training and sport for weight management in children and teenagers. *Sportivnaya meditsina*. 2016; (3): 85-91. (in Russian)

12. Anishchenko A.P., Arkhangelskaya A.N., Ignatov N.G., Gurevich K.G. Dynamics of medical school undergraduate students' physical development and physical readiness indicators under the influence of physical training with the primary use of ashtanga-yoga. *Fizicheskaya kul'tura i sport: nauka i praktika*. 2016; (4): 61-6. (in Russian)

Сведения об авторах:

Анищенко Александр Петрович, канд. пед. наук, зав. каф. физического воспитания и здоровья ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России;

Алчинова Ирина Борисовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Вялкина Маргарита Вячеславовна, мл. науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Медведева Юлия Сергеевна; канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Яковенко Елена Николаевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Бурдюкова Екатерина Владимировна, канд. мед. наук, ст. лаборант каф. ЮНЕСКО «Здоровый образ жизни — залог успешного развития» ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России;

Гуревич Константин Георгиевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. ЮНЕСКО «Здоровый образ жизни — залог успешного развития» ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

© Коллектив авторов, 2018
УДК 615.099.06

Юдин М.А.¹, Коньшаков Ю.О.², Венгерович Н.Г.¹, Владимирова О.О.¹,
Алексеева И.И.¹, Шербашов К.А.², Быков В.Н.¹

Изучение последствий острых поражений веществами пульмонотоксического действия

¹ ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины»

Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Лесопарковая, д. 4

² ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академии им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, 194044, г. Санкт-Петербург, Россия, ул. Академика Лебедева, д. 6

Цель исследования — изучение особенностей развития последствий острого поражения веществами пульмонотоксического действия. **Методика.** Исследование выполнено на 160 белых нелинейных крысах-самцах массой 180—220 г. Для оценки развития последствий острого поражения пульмонотоксикантами использовали модели отравления фосгеном, диоксидом азота и паракватом. Проводили оценку гравиметрических показателей легочной ткани и изменений толерантности к физической нагрузке по показателю продолжительности плавания «до отказа» с грузом 7% от массы тела животного. Также проводилась морфологическая оценка тяжести поражения ткани легких. **Результаты.** Установлено, что однократное поражение крыс пульмонотоксикантами в дозе $1LC_{50}$ в остром периоде сопровождается развитием комплекса морфологических и функциональных изменений, характерных для токсического отека лёгких. У части животных наблюдалось выраженное снижение функциональных возможностей, патологоанатомическим субстратом которых являлось нарушение структуры легочной паренхимы с деструкцией и фиброзированием бронхов и сосудов, развитием выраженной панацинарной эмфиземы, которая в 35% случаев сочетается с хроническими гнойно-деструктивными изменениями в легочной ткани. **Заключение.** Частота развития необратимых последствий поражений веществами пульмонотоксического действия составила: 60% случаев при отравлении паракватом, 40 и 20% при поражении фосгеном и диоксидом азота, соответственно.

Ключевые слова: пульмонотоксикант; эмфизема легких; фиброз; фосген; диоксид азота.

Для цитирования: Юдин М.А., Коньшаков Ю.О., Венгерович Н.Г., Владимирова О.О., Алексеева И.И., Шербашов К.А., Быков В.Н. Изучение последствий острых поражений веществами пульмонотоксического действия. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 71–76. DOI:

Для корреспонденции: Венгерович Николай Григорьевич, канд. мед. наук, заместитель начальника научно-исследовательского испытательного отдела e-mail: nickolai@vengerovich.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.03.2017

Yudin M.A.¹, Kon`shakov Yu.O.², Vengerovich N.G.¹, Vladimirova O.O.¹,
Aleksееva I.I.¹, Sherbashov K.A.², Bykov V.N.¹

The study of consequences of acute injuries by agents of pulmonotoxic action

¹ State Scientific Research Test Institute of Military Medicine (The Russian Federation Department of Defense);

4, ul. Lesoparkovaya, 195043, St. Petersburg, Russia

² Medical Military Academy named after S.M. Kirov (The Russian Federation Department of Defense),

6, ul. Akademika Lebedeva, 194044, St. Petersburg, Russia

The purpose is to study features of an acute injury progression in case of poisoning by agents of pulmonotoxic action. Experimental work was done in a model of 160 white non-linear male rats weighing 180—220 g. For the assessment of an acute injury development after poisoning by agents of pulmonotoxic action the models of phosgene, nitrogen dioxide and paraquat poisoning were used. The assessment of gravimetric characteristics of lung tissue and changes of physical activity tolerance according to the rate of swimming duration to the full with 7%-load of body mass was carried out. The morphological assessment of severity of lung tissue injury was carried out as well. **Results.** It was found out that a single exposure of rats with pulmonotoxicants in $1LC_{50}$ during its acute period was accompanied by the development of a range of morphological and functional changes which were typical for the course of toxic pulmonary edema. As a consequence of poisoning in a half of animals an evident decrease of functional abilities was observed. Pathologicoanatomic substrate of these abilities was the abnormality of lung parenchyma with destruction and bronchial tube and vessel fibrosis, that in 35% of cases matched with

chronical purulent-destructive changes in lung tissue. **Conclusion.** The rate of consequences development after pulmonotoxic agents exposure was the following: 60% cases after paraquate exposure, 40% and 20% after phosgene and nitrogen dioxide respectively.

Keywords: pulmonotoxic agent, pulmonary emphysema, fibrosis, phosgene, nitrogen dioxide.

For citation: Yudin M.A., Kon'shakov Yu.O., Vengerovich N.G., Vladimirova O.O., Alekseeva I.I., Sherbashov K.A., Bykov V.N. The study of consequences of acute injuries by agents of pulmonotoxic action. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(1): 71–76. (in Russian). DOI:

For correspondence: Nickolai G. Vengerovich, PhD, Deputy Head of Department of State Scientific Research Test Institute of Military Medicine (The Russian Federation Department of Defense); 4, ul. Lesoparkovaya, St. Petersburg, 195043, Russian Federation, e-mail: nickolai@vengerovich.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Vengerovich N.G., <http://orcid.org/0000-0003-3219-341X>

Kon'shakov Yu.O., <http://orcid.org/0000-0001-8596-6469>

Received 23.03.2017

Введение

Среди сильно действующих и ядовитых веществ наибольшую угрозу представляют вещества пульмотоксического действия (ВПД). Доля этих веществ, в частности фосгена и окислов азота, в процессах технологического производства составляет до 60% от всего объема аварийно-опасных соединений [1, 6]. Выбросы ВПД в окружающую атмосферу при крупных авариях и катастрофах на объектах по их производству или хранению характеризуются массовыми отравлениями, которые сопровождаются тяжелыми поражениями органов дыхания, развитием токсического отека легких нередко с летальным исходом [2]. Схемы лечения поражений фосгеном и окислами азота характеризуются низкой эффективностью. Отравления, вызванные ВПД средней и тяжелой степени, практически всегда сопровождаются в отдаленном периоде нарушением функций внешнего дыхания, газообмена и развитием хронической дыхательной недостаточности [3]. Исследованиям характера повреждений легочной ткани при поражении ВПД посвящено значительное количество работ, однако противоречивость данных и различные подходы к моделированию таких поражений в эксперименте затрудняют интерпретацию полученных результатов. Изучение частоты и особенностей развития последствий отравлений веществами пульмотоксического действия со стороны дыхательной системы позволит определить основные направления их медикаментозной профилактики.

Цель исследования — изучение особенностей развития последствий острого поражения веществами пульмотоксического действия.

Методика

Эксперименты выполнены на 160 белых нелинейных крысах самцах массой 180—220 г. (питомник «Рапполово», Ленинградская обл.). На проведение исследований получено специальное разрешение Комитета.

В качестве модельных ВПД использовали фосген (дихлорангидрид угольной кислоты) и диоксид азота. Ингаляцию веществ проводили методом «статической заправки» в герметичной камере общим объемом 0,25 м³, оснащенной системой рециркуляции воздушно-газового потока. Экспозицию веществ пульмотоксического действия в токсодозах, соответствующих 1 LCt₅₀, осуществляли однократно в течение 30 мин. При исследовании частоты и особенностей развития последствий отравлений пульмотоксикантами в качестве токсиканта сравнения с доказанным пульмонотропным действием использовали паракват (1,1'-диметил-4,4' дипиридилий дихлорид) [4]. Водный раствор параквата вводили однократно внутривенно в дозе 1 LD₅₀.

Через 1 ч, а также на 1-е, 14-е и 30-е сут. после отравления веществами пульмотоксического действия проводили оценку гравиметрических показателей легочной ткани. Рассчитывали легочный коэффициент, характеризующий отношение массы влажных легких к массе тела животного X 1000, и значение сухого остатка легких по отношению массы высушенных легких к массе влажных легких этого же животного (%). В динамике на 1-е, 7-е, 14-е, 21-е и 30-е сут. регистрировали изменение толерантности к физической нагрузке по показателю длительности плавания до отказа с грузом 7% от массы тела жи-

вотного. Макро- и микроскопическая оценка поражения легких проводилась на 30-е сут. с использованием микроскопа Olympus (CX41), Япония. Микропрепараты окрашивали гематоксилин-эозином и по методу Ван-Гизон.

Статистическую обработку результатов проводили с применением программы Statistica 10. Расчет мер центральных тенденций и мер рассеяния проводили общепринятыми статистическими методами. Проверку на нормальность распределения фактических данных проводили с использованием критерия Шапиро—Уилка. Для сравнения средних величин и установления значимых различий использовали непараметрические критерии Манна—Уитни, Вилкоксона и Краскела—Уоллиса. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05. В случае превышения достигнутого уровня значимости статистического критерия этой величины принималась нулевая гипотеза. Оценку выживаемости проводили с использованием процедуры Каплан—Майера.

Результаты и обсуждение

Динамика выживаемости крыс после поражения ВПД (токсодоза 1 LCt₅₀) представлена на рис. 1.

Как видно из графика, максимальное число летальных исходов отмечено в 1-е сут. после отравления диоксидом азота, а также на 2-е — 3-и и — 4-е сут. после отравления фосгеном и паракватом, соответственно. Динамика гибели после поражения указанными токсикантами соответствует результатам других исследователей [6]. Необходимо отметить случаи гибели животных через 7 и 14 сут. при изучении у жи-

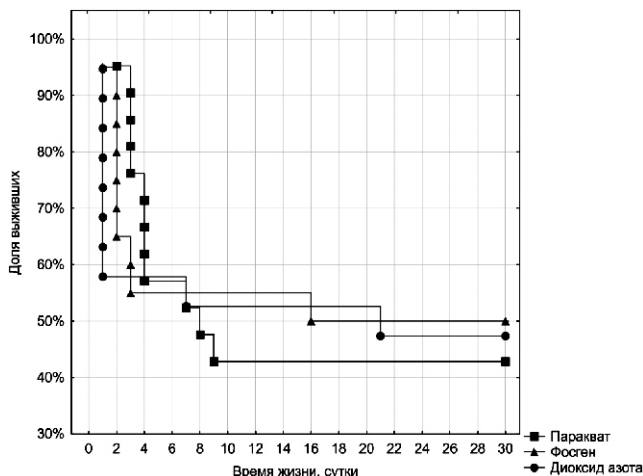


Рис. 1. Срок наступления гибели крыс после ингаляционного отравления диоксидом азота и фосгеном в токсодозе 1 LCt₅₀, внутрибрюшинного введения параквата в дозе 1 LD₅₀.

вотных физической работоспособности в тесте плавание с грузом до отказа. Причиной гибели отравленных крыс после тестирования могла быть декомпенсация функции дыхательной системы.

При морфологической оценке органов дыхания у животных, погибших через 1 сут. после отравления фосгеном и диоксидом азота, в просвете трахеи и бронхов отмечали скопление пенистой жидкости. Слизистая оболочка бронхов была блестящей, гладкой, бледной с мелкими очагами поверхностных кровоизлияний. Выявленные в легких изменения свидетельствовали о формировании токсического отека легких.

Для подтверждения этого предположения в другой серии экспериментов исследовали динамику коле-

Таблица 1

Динамика изменений легочного коэффициента после ингаляционного отравления крыс диоксидом азота, фосгеном и внутрибрюшинного введения параквата, (Med[Q25;Q75], n = 10)

Токсикант 1 LCt ₅₀	Интактные	1 ч	24 ч	14 сут.	30 сут.
Фосген	6,41 [5,82;6,86]	6,3 [5,93;6,67]	13,82 [12,41;15,23] *	6,61 [6,38;6,84]	6,56 [6,18;7,02]
Диоксид азота		8,9 [7,97;9,21] *	9,45 [7,28;11,63] *	6,38 [5,97;6,8]	7,14 [6,82;9,26]
Паракват		6,18 [5,77;6,6]	5,44 [4,52;6,57]	8,5 [5,6;11,4]	7,93 [5,9;9,5]

Примечание. * — различия с показателями интактной группы статистически значимы при p<0,05.

Таблица 2

Динамика показателей сухого остатка легких после ингаляционного отравления крыс диоксидом азота, фосгеном и внутрибрюшинного введения параквата, (Med[Q25;Q75] n = 10)

Токсикант 1 LCt ₅₀	Интактные	1 ч	24 ч	14 сут.	30 сут.
Фосген	19,73 [18,79;20,21]	20,03 [19,44;20,63]	16,46 [14,43;18,49] *	17,85 [16,54;19,16]	19,54 [18,78;20,32]
Диоксид азота		15,73 [14,38;17,07] *	16,48 [15,7;17,02] *	19,33 [18,94;19,73]	19,1 [18,9;19,88]
Паракват		18,92 [17,82;19,02]	19,21 [18,06;20,36]	18,7 [18,69;18,73]	18,87 [18,67;18,94]

Примечание. * — различия с показателями интактной группы статистически значимы при p<0,05

баний гравиметрических показателей легких. Динамика изменений гравиметрических показателей легких крыс после поражения ВПД представлена в табл. 1 и 2.

Для каждого пульмонотоксиканта отмечали различную динамику развития токсического отека легких. Через 1 сут. после отравления животных фосгеном регистрировали увеличение легочного коэффициента в 2-2,5 раза относительно интактной группы, которое обусловлено накоплением интерстициальной жидкости и клеточных элементов крови в ткани легкого. На прогрессирование токсического отека легких указывало увеличение массы органа и, как следствие, снижение сухого остатка легких. В дальнейшем (14-е и 30-е сут.) показатели гравиметрии соответствовали значениям интактной группы.

Диоксид азота, в отличие от фосгена, вызывал изменения гравиметрических показателей уже через 1 ч после окончания экспозиции, с последующим прогрессированием в течение 1-х сут. Различия во времени развития признаков токсического отека легких связаны с прямым цитотоксическим действием диоксида азота на альвеолоциты в то время, как у фосгена токсическое действие реализуется за счет вторичного повреждения клеток избытком активных форм кислорода [7].

После отравления крыс паракватом в дозе 1 LD₅₀ в исследуемые сроки наблюдения изменений гравиметрических показателей легких не регистрировали. По данным некоторых авторов изменение легочного коэффициента после тяжелых поражений паракватом происходит не ранее чем через 48 ч [8].

Через 30 сут. после поражения пульмонотоксикантами данные гравиметрии легочной ткани между группами статистически значимо не отличались и соответствовали значениям близким к интактным, несмотря на отклонения показателей у отдельных животных.

В легких животных, погибших через 6—9 сут. после поражения веществами пульмонотоксического действия, выявляли множественные гнойные очаги в различной стадии их развития и разрешения. В ряде случаев они занимали значительную часть легкого,

что могло обуславливать гибель животных от инфекционных осложнений после разрешения токсического отека легких.

Убедительные данные, указывающие на различную степень компенсации нарушений дыхания после поражения фосгеном, диоксидом азота и паракватом, были получены при оценке физической работоспособности крыс в тесте плавания с 7% «грузом до отказа» (табл. 3).

Как видно из данных табл. 3, имело место статистически значимое снижение физической работоспособности в 1-е сут. после отравления, независимо от использованного токсиканта, что напрямую отражало признаки острого периода отравлений. В отличие от других пульмонотоксикантов, через 7 сут. после поражения паракватом у крыс сохранялось снижение показателя физической работоспособности, что могло быть обусловлено его длительным резорбтивным эффектом [9]. К 14-м сут. после поражения ВПД физическая работоспособность крыс восстанавливалась до уровня контрольной группы. Через 30 сут. от момента экспозиции модельных пульмонотоксикантов, в частности фосгена и параквата, отмечали снижение длительности плавания у крыс. Максимум снижения показателя регистрировали после введения параквата, тогда как диоксид азота не оказывал значимого влияния на физическую работоспособность на данном сроке наблюдения. Для уточнения данного показателя определяли долю животных в каждой экспериментальной группе, время плавания которых на 30-е сут. было статистически значимо ниже показателей интактной группы. Доля таких крыс после введения параквата, где наблюдалось наиболее выраженное нарушение работоспособности, составляла 60%, после введения фосгена — 40%, диоксида азота — 20%.

Для изучения особенностей повреждения легочной ткани животных со сниженной работоспособностью проводили патоморфологическое исследование. Для сравнения использовали животных контрольной группы.

У животных с незначительным снижением толерантности к физической нагрузке легочный коэффициент и сухой остаток легких, как правило, соответствовал

Таблица 3

Динамика плавания крыс (секунды) «до отказа с грузом» в различные сроки после ингаляционного отравления диоксидом азота, фосгеном и внутрибрюшинного введения параквата, (Med[Q25;Q75])

Токсикант 1LCt ₅₀	1 сут.	7 сут.	14 сут.	21 сут.	30 сут.
Интактные	397,5 [250;535] n = 10	430 [385;745] n = 10	480 [390;900] n = 10	395 [355;900] n = 9	595 [520;725] n = 9
Фосген	210 [175;390] * n = 19	410 [315;900] n = 11	680 [405;900] n = 11	510 [480;650] n = 10	460 [280;540] * n = 10
Диоксид азота	245 [195;340] * n = 13	525 [375;900] n = 8	870 [400;900] n = 8	610 [370;650] n = 7	550 [490;900] n = 7
Паракват	270 [160;350] * n = 20	280 [105;340] * n = 9	482 [325;900] n = 6	260 [230;405] n = 6	372 [275;525] * n = 6
Примечание. * — различия с показателями интактной группы статистически значимы при p<0,05.					

контрольным значениям. В ткани легких выявлялись участки краевой эмфиземы в сочетании с участками дистелектаза, утолщенные межальвеолярные перегородки (рис. 2, А), умеренный отек подслизистой ткани мелких бронхов со слущиванием эпителия слизистой оболочки. Поражение легочных сосудов характеризовалось мукозным пропитыванием их стенки, паравазальной клеточной инфильтрацией и утолщением межальвеолярных перегородок (рис. 2, Б, В).

У животных со значительным снижением времени плавания отмечали выраженные нарушения структуры легочной ткани. При гистологическом исследовании у 35% животных наблюдали единичные или множественные хронические абсцессы легких, окруженные плотной соединительнотканной капсулой (рис. 2, Г). Ткань легких была представлена преимущественно эмфизематозными участками с мелкими зонами дистелектаза (рис. 2, Д). На гистологических срезах отмечали множественную деструкцию мелких бронхов с разрастанием коллагеновых волокон по периферии (рис. 2, Е).

Выявленные морфологические изменения, проявляющиеся диффузной эмфиземой и выраженными нарушениями структуры легочной паренхимы, были характерны для поражений всеми использованными в работе веществами пульмонотоксического действия.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сформулировать следующие выводы:

1. Острые отравления фосгеном, диоксидом азота и паракватом в одной среднелетальной дозе сопровождаются развитием отдаленных последствий интоксикации с выраженными нарушениями структуры легочной паренхимы и снижением толерантности к физической нагрузке через 30 сут. после отравления.

2. Частота встречаемости последствий поражений веществами пульмонотоксического действия по данным исследования физической работоспособности достигает: 60% случаев при отравлении паракватом, 40 и 20% при поражении фосгеном и диоксидом азота, соответственно.

3. Морфологическая картина повреждений ткани легких через 30 сут. после ингаляционной заправки веществами пульмонотоксического действия характеризуется развитием панацинарной эмфиземы, сопровождающейся деструкцией мелких бронхов, спадением и разрушением стенок легочных сосудов.

4. Развитие последствий острых поражений пульмонотоксикантами не зависит от типа используемых в эксперименте веществ и в 35% случаев сочетается с развитием множественных хронических абсцессов.

5. Модель однократного отравления крыс фосгеном и паракватом в одной среднелетальной дозе может быть использована для обоснования направлений фармакологической коррекции эмфизематозных и фиброзирующих изменений со стороны легочной паренхимы.

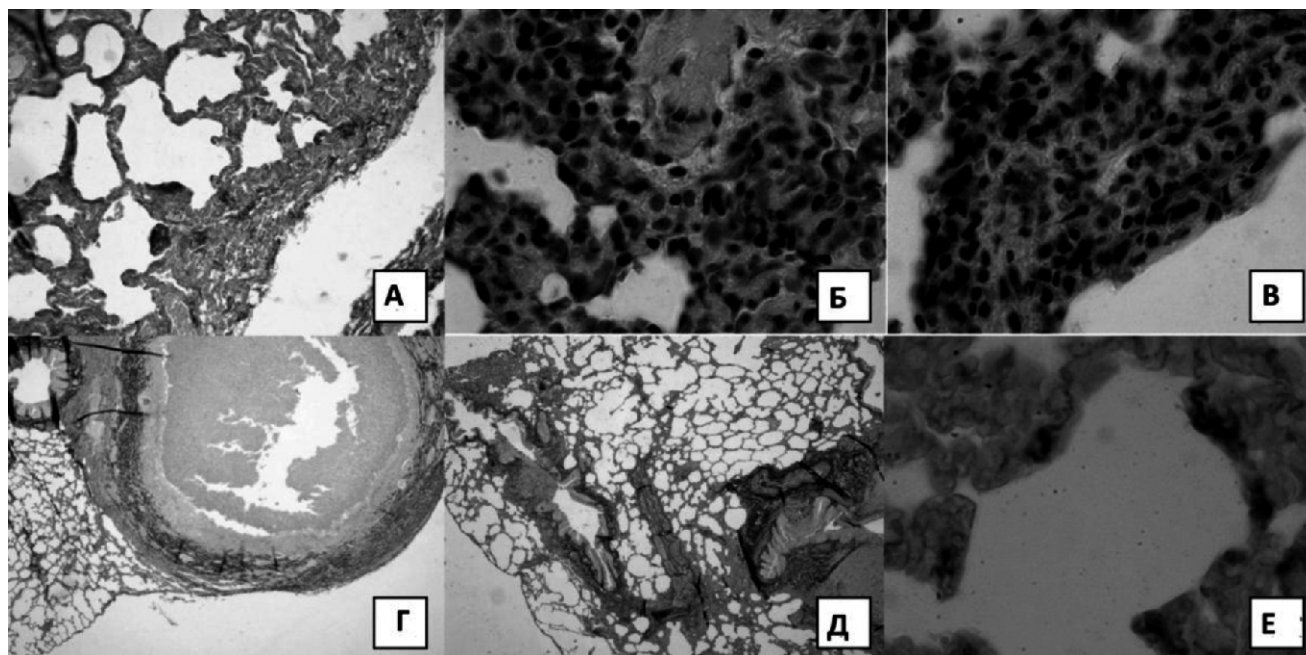


Рис. 2. Гистологическая картина ткани легкого через 30 сут. после ингаляционного отравления диоксидом азота и фосгеном в токсодозе 1 LD_{50} , внутрибрюшинного введения параквата в дозе 1 LD_{50} . А — Отравление паракватом. Окраска по Ван Гизон. Ув. $\times 40$; Б, В — Отравление диоксидом азота. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. $\times 1000$; Г — Отравление фосгеном. Окраска по Ван Гизон. Ув. $\times 40$; Д — Отравление диоксидом азота. Окраска по Ван Гизон. Ув. $\times 40$; Е — Отравление паракватом. Окраска по Ван Гизон. Ув. $\times 200$

References

1. Isaev B.C., Vladimirov V.A. Emergency chemical hazardous substances. *Strategiya grazhdanskoy zashchity: problemy i issledovaniya*. 2012; 2(1): 618-55. (in Russian)
3. Torkunov P.A., Shabanov P.D. *The pathogenesis of toxic pulmonary edema. [Patogenez toksicheskogo oteka legkikh]*. Saint Petersburg; Elbi-SPb; 2007. (in Russian)
2. Mikhno E.P. *Dealing with the consequences of accidents and natural disasters. [Likvidatsiya posledstviy avariyy i stihiynykh bedstviy]*. Moscow; Atomizdat; 1979. (in Russian)
4. Pauluhn J., Carson A., Costa D.L., Gordon T., Kodavanti U., Last J.A. et al. Workshop summary: phosgene-induced pulmonary toxicity revisited: appraisal of early and late markers of pulmonary injury from animal models with emphasis on human significance. *Inhalation toxicology*. 2007; 19(10): 789-810.
5. Smith P., Heath D., Kay J.M. The pathogenesis and structure of paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats. *The Journal of pathology*. 1974; 114(2): 57-67.
6. Ruzanova E.A., Drachkova I.M., Tolkach P.G. *Comparative study of effectiveness of inhaled antioxidants and sodium cromoglycate in rat model of asphyxiant-induced acute lung injury*. 2013. [Sравnitel'nyy analiz effektivnosti ingalyatsionnogo vvedeniya antioksidantov i kromoglikata natriya pri otravlenii kryis pul'monotoksikantami]. Available at: <http://www.medline.ru/public/art/tom14/art23.html> (Accessed 20 March 2013). (in Russian)
7. Holmes W.W., Keyser B.M., Paradiso D.C., Ray R., Andres D.K., Benton B.J. et al. Conceptual approaches for treatment of phosgene inhalation-induced lung injury. *Toxicology letters*. 2015; 224: 8-20.
8. Giri S.N., Hollinger M.A., Schiedt M.J. The effects of paraquat and superoxide dismutase on pulmonary vascular permeability and edema in mice. *Archives of Environmental Health: An International Journal*. 1981; 36(4): 149-54.
9. Dinis-Oliveira R.J., Duarte J.A., Sanchez-Navarro A., Remiao F., Bastos M.L., Carvalho F. Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment. *Critical reviews in toxicology*. 2008; 38(1): 13-71.

Сведения об авторах:

Юдин Михаил Анатольевич, доктор мед. наук доцент, начальник отдела ФГБУ «ГНИ испытательный институт военной медицины» Министерства обороны России;

Коньшаков Юрий Олегович, клинический ординатор ФГБВОУ ВПО ВМА им. С.М. Кирова Министерства обороны России;

Венгерович Николай Григорьевич, канд. мед. наук, заместитель начальника отдела ФГБУ «ГНИ испытательный институт военной медицины» Министерства обороны России, e-mail: nickolai@vengerovich.ru;

Владимирова Ольга Олеговна, канд. биол. наук, науч. сотр. отдела ФГБУ «ГНИ испытательный институт военной медицины» Министерства обороны России;

Алексеева Ирина Ивановна, науч. сотр. отдела ФГБУ «ГНИ испытательный институт военной медицины» Министерства обороны России;

Шербашов Константин Анатольевич, адъюнкт каф. токсикологии ФГБВОУ ВПО ВМА им. С.М. Кирова Министерства обороны России;

Быков Владимир Николаевич, доктор мед. наук, проф., заместитель начальника по научной работе ФГБУ «ГНИ испытательный институт военной медицины» Министерства обороны России.

© Пирожков С.В., Литвицкий П.Ф., 2017
УДК 616-092

Пирожков С.В., Литвицкий П.Ф.

Роль инфламмасом в патогенезе социально-значимых заболеваний человека

ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет» им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Инфламмасома — важный компонент нативного иммунитета. Она представляет собой макромолекулярный комплекс, включающий сенсорные элементы, адапторные белки и зимоген каспазы-1. Под действием продуктов распада тканей и патогенных микроорганизмов инфламмасома активируется и превращает про-IL-1 β и про-IL-18 в активные интерлейкины. Активация инфламмасом отмечена при многих воспалительных заболеваниях и служит мишенью для терапевтических воздействий. В настоящем обзоре обсуждается вклад инфламмасом в патогенез социально-значимых заболеваний человека, таких, как атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет, артриты, болезни легких, печени и почек. Результаты клинических исследований и модельных экспериментов на линиях мышей с нокаутированными генами компонентов инфламмасы говорят о существенной роли этих структур в прогрессировании патологии, связанной с воспалительным повреждением тканей.

Ключевые слова: инфламмасома; NLRP3; IL-1 β ; атеросклероз; ишемическая болезнь сердца; сахарный диабет; болезни легких; гепатит; нефропатия.

Для цитирования: Пирожков С.В., Литвицкий П.Ф. Роль инфламмасом в патогенезе социально-значимых заболеваний человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 77–89. DOI:

Для корреспонденции: Пирожков Сергей Викторович, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии, e-mail: arnhem-domain@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 30.08.2017

Pirozhkov S.V., Litvitskiy P.F.

Role of inflammasomes in pathogenesis of diseases with a high impact on public health

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Bld. 2, Moscow 119991, Russia

An inflammasome becomes activated under the action of tissue decay products or pathogenic microorganisms and converts pro-IL-1 and pro-IL-18 to their active forms. Activation of inflammasomes has been reported in many inflammatory diseases and serves as a target for therapeutic interventions. The present review discusses the contribution of inflammasomes to pathogenesis of diseases with a high impact on public health, such as atherosclerosis, ischemic heart disease, diabetes mellitus, arthritis, diseases of lungs and kidneys. Results of clinical studies and animal experiments on knockout mouse strains with a deficit of inflammasome components suggest a significant role of these structures in progression of pathology associated with inflammatory damage to tissues.

Keywords: inflammasome; NLRP3; IL-1 β ; atherosclerosis; ischemic heart disease; diabetes mellitus, lung diseases; hepatitis; nephropathy.

For citation: Pirozhkov S.V., Litvitskiy P.F. Role of inflammasomes in pathogenesis of diseases with a high impact on public health. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2017; 61(4): 77–89. (in Russian). DOI:

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

For correspondence: Pirozhkov S.V., Dr. Sci., Professor, e-mail: arnhem-domain@yandex.ru

Received 30.08.2017

Инфламмосомы — это крупные белковые комплексы, которые образуются в цитозоле клетки в ответ на сигналы об опасности или наличии патогенных микроорганизмов. Сенсорная молекула (паттерн-распознающий рецептор, или PRR) в составе инфламмосом реагирует на биомолекулы, имеющие определенные структурные компоненты: DAMP (связанные с повреждением молекулярные конфигурации) или PAMP (патоген-ассоциированные молекулярные конфигурации), после чего происходит сборка инфламмосомной частицы, которая служит платформой для активации каспазы-1 — цистеиновой протеазы, опосредующей протеолитический процессинг и активацию цитокинов IL-1 и IL-18. Большинство видов инфламмосом содержат три основных компонента: один из белков семейства NLR (NOD-подобного рецептора), белок ASC (белок-адаптер с доменом активации каспазы) и молекулы каспазы-1 [1]. Инфламмосомные комплексы обозначают по типу NLR белка, входящего в их состав. Таким образом, выделяют инфламмосомы NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12 и NLRC4. Описаны еще два типа инфламмосом, которые включают белки семейства PYHIN (пирин и белок, содержащий домен HIN): инфламмосома AIM2 (аббревиатура от «отсутствует при меланоме» — absent in melanoma), способная узнавать цитоплазматическую двухцепочечную ДНК (dsDNA) [2], и инфламмосома IFI16 (аббревиатура от «IFN γ -индуцируемый протеин 16»). Из всех упомянутых типов инфламмосом, наибольшее внимание исследователей привлекает NLRP3, которая распознает сигналы опасности и опосредует развитие стерильной воспалительной реакции при различных заболеваниях [3]. В молекуле NLRP3 выделяют три домена: LRR (С-концевой, содержащий обогащенные лейцином повторы), центральный домен NACHT (обладает АТФ-азной активностью и обеспечивает олигомеризацию протеинов) и N-концевой эффекторный (пириновый) домен — PD. ASC состоит из N-терминального PD и С-терминального домена рекрутирования каспазы (CARD). Каспаза-1 включает домен CARD и домен с каспазной активностью. Домен LRR в составе NLRP3 служит для распознавания сигналов, запускающих процесс сборки активной инфламмосомы, в ходе которой компоненты инфламмосомы реагируют между собой аналогичными участками путем гомофильных PYD-PYD и CARD-CARD взаимодействий.

Инфламмосома NLRP3 участвует в иммунном ответе против бактерий, таких, как золотистый стафилококк и гонококк, вирусов Vaccinia и Influenza, грибка Candida albicans, гемозоина (малярийного пигмента) [4], но особенностью NLRP3 является ответ на сигналы повреждения клетки (DAMP), такие,

как АТФ и урат, а также на повышенную генерацию активных форм кислорода [5]. Кроме того, инфламмосома NLRP3 активируется частицами кристаллов (квасцов, кремниевой кислоты, мочевой кислоты, асбеста), химическими раздражителями, УФ светом диапазона В, амилоидом β и амилоидным полипептидом (амилином) островков поджелудочной железы [6]. В исследованиях на изолированных макрофагах и экспериментальных моделях установлено, что активацию NLRP3 инфламмосомы вызывают окисленные ЛНП (oxLDL) и кристаллы холестерина [7, 8].

Активная инфламмосома NLRP3 образуется в ответ на флоготенный раздражитель прежде всего в клетках системы иммунобиологического надзора: макрофаги, моноциты, дендритные клетки, нейтрофилы селезенки [9, 10]. Сам процесс активации NLRP3 протекает в два этапа [11, 12]. На первом этапе различные молекулы, содержащие PAMP и DAMP, стимулируют Toll-подобные рецепторы, что приводит к активации сигнального пути ядерного фактора NF- κ B. В результате этого усиливается транскрипция компонентов инфламмосомы, таких, как неактивный белок NLRP3, про-IL-1 β и про-IL-18 [13]. На втором этапе активации инфламмосомы NLRP3 происходит олигомеризация NLRP3 и последующее объединение NLRP3, ASC, и про-каспазы-1 в мультимолекулярный комплекс, который трансформирует прокаспазу-1 в каспазу-1. Последняя расщепляет незрелые формы интерлейкинов до активных IL-1 β и IL-18, в свою очередь, инициирующих и усиливающих воспалительный ответ.

Иммунный ответ, опосредованный инфламмосомами играет важную роль в защите организма от инфекций, однако неадекватная активация инфламмосом является определяющим фактором или вносит существенный вклад в патогенез ряда сердечно-сосудистых, легочных, метаболических заболеваний, артритов, а также болезней печени и почек.

Атеросклероз

При атеросклеротическом поражении сосудов кристаллы холестерина и лейкоциты накапливаются в интима артерий, ограничивая приток крови к органам. С помощью микроскопии в эксперименте на животных показано, что в зоне атеросклеротического поражения сосуда имеются мельчайшие кристаллы холестерина, причем их появление совпадает с началом миграции в интиму воспалительных клеток [14]. В той же работе подтверждается, что кристаллы холестерина активируют NLRP3 инфламмосому в фагоцитах *in vitro* в процессе фаго-лизосомального повреждения. Аналогично, при интраперитонеальной инъекции кристаллы холестерина инициируют острую воспалительную реакцию, которая слабо развивалась

у мышей, дефицитных по компонентам NLRP3 инфламмосомы, катепсинам В и L, а также IL-1. Более того, когда дефицитным по ЛНП-рецептору мышам пересаживали клетки костного мозга с нокаутированными генами NLRP3, ASC, IL-1 α / β и скормливали насыщенный холестерином рацион, ранние атеросклеротические изменения в артериальных сосудах были слабо выражены, а содержание в крови IL-18 — снижено [14].

Аналогичные результаты были получены на другой модели атеросклероза — мышцах, нокаутированных по гену апо-Е. Дефицит каспазы-1 у линии мышей апо-Е⁻/апо-Е⁻ сопровождался уменьшением инфильтрации стенки артерий макрофагами и выраженности атеросклеротического поражения [15].

Минимально модифицированные ЛНП служат пусковым фактором для активации в клетках NLRP3 инфламмосомы. Имеются данные, что этот процесс опосредован гомодимером TLR4/6 и рецептором CD36 [16]. Это, наряду со склонностью минимально модифицированных ЛНП образовывать кристаллы и разрушать мембрану лизосом, может быть достаточным для передачи сигналов, вызывающих усиление секреции IL-1 β . В экспериментах с клеточной линией моноцитов человека Thp-1 показано, что окисленные фракции липопротеинов низкой и высокой плотности ox-LDL и ox-HDL не только усиливают экспрессию гена NLRP3, но и секрецию IL-1 β и IL-18 [AMS-12-28012]. Экспрессия NLRP3 и провоспалительных цитокинов уменьшалась в присутствии нативной фракции липопротеинов высокой плотности.

В ходе экспериментального атеросклероза у мышей в очаге поражения артерии были обнаружены не только макрофаги и дендритные клетки, но и нейтрофилы [14]. IL-1 β играет ключевую роль в привлечении нейтрофилов, а зависимое от IL-1 накопление нейтрофилов в брюшной полости часто используют как *in vivo* маркер активации NLRP3 инфламмосомы и продукции IL-1 [17, 18]. Кристаллы холестерина провоцируют интенсивное накопление нейтрофилов в брюшной полости. Эта реакция слабо проявляется у мышей, имеющих дефицит IL-1, рецептора для IL-1 (IL-1R), компонентов NLRP3 инфламмосомы, а также катепсинов В и L [14].

У пациентов, переживших инфаркт миокарда, в атеросклеротических бляшках сонных артерий выявили значительное увеличение содержания мРНК NLRP3, ASC, каспазы-1, IL-1 β и IL-18 по сравнению со стенкой артерий здоровых лиц [19]. При этом концентрация мРНК NLRP3 была выше в бляшках пациентов с клиническими проявлениями атеросклероза по сравнению с теми, у кого симптомов не было. Скопление CD68⁺ макрофагов (носителей скэвенджер-рецептора) наблюдалось в тех же участках ате-

росклеротического повреждения артерий, где была высокая экспрессия генов NLRP3 и ASC. Последнее отмечено и в некоторых гладкомышечных клетках.

В связи с тем, что активные формы кислорода (АФК), генерируемые в митохондриях, имеют важное значение для активации NLRP3 в ответ на различные стимулы, удаление поврежденных митохондрий путем аутофагии (митофагия) ослабляет эту активацию [20]. Установлено, что в процессе аутофагии происходит захват и деградация самого комплекса NLRP3-инфламмосомы путем убиквитинации и таким образом регулируется его активность [21]. У мышей линии Atg 5⁻/- с дефектом аутофагии отмечено ускоренное развитие атеросклероза, что сопровождалось усиленной активацией NLRP3-инфламмосомы [22]. Более того, с учетом ключевой роли лизосомы в образовании аутолизосомы и деградации веществ в виде твердых частиц, активация биогенеза лизосом в макрофагах за счет гиперэкспрессии фактора транскрипции EB (TFEB) ингибирует активацию NLRP3-инфламмосомы под действием кристаллов холестерина и этим ослабляет прогрессирование атеросклероза [23].

Повреждение миокарда при инфаркте и ишемии-реперфузии

Воспаление — ключевой процесс, опосредующий повреждение и регенерацию ткани сердца при инфаркте миокарда [24]. Среди множества медиаторов, регулирующих этот процесс в миокарде, заметная роль принадлежит IL-1 β . В экспериментах на животных показано, что нейтрализующие антитела против IL-1 β и препарат анакина — антагонист рецептора для IL-1 β (IL-1RA), ограничивают повреждение при остром инфаркте миокарда [25]. В одном из исследований использовали две генно-модифицированные линии мышей: нокаутную по гену ASC (ASC-KO) и нокаутную по гену каспазы-1 (caspase-1 KO) [26]. У животных моделировали ишемию-реперфузию миокарда путем окклюзии левой передней нисходящей коронарной артерии. В условиях ишемии-реперфузии экспрессию гена ASC обнаружили в нейтрофилах, инфильтрирующих миокард, и макрофагах, а также в сосудистых клетках и резидентных фибробластах сердца. В миокарде мышей обеих линий наблюдалось существенное уменьшение воспалительной реакции, то есть инфильтрации ткани воспалительными клетками и экспрессии цитокинов/хемокинов, по сравнению с диким генотипом. Кроме того, у трансгенных мышей значительно сокращалась зона инфаркта, фиброза сердца и величина левожелудочковой дисфункции.

Полученные результаты указывают на важность инфламмасом не только в воспалительных клетках костномозгового происхождения, но и в резидентных клетках сердца, таких, как кардиомиоциты и фибробласты [26]. Дальнейшие эксперименты показали, что именно фибробласты, а не кардиомиоциты ответственны за активацию инфламماسом, хотя ген *ASC* экспрессируется в обоих типах клеток. При этом активация инфламмасом при инфаркте миокарда может, предположительно, опосредоваться образованием активных форм кислорода или выходящим током K^+ .

Для того, чтобы секреция $IL-1\beta$ при ишемии-реперфузии многократно возрастала, фибробласты сердца должны получить два сигнала. Первый — для усиления транскрипции про- $IL-1\beta$, что достигается активацией $NF-\kappa B$ через пути, опосредованные Toll-подобным рецептором (TLR). Второй — для процессинга про- $IL-1\beta$ в зрелую форму с помощью инфламмасом. Выделенный фибробластами сердца $IL-1\beta$ инициирует воспалительную реакцию и синтез цитокинов/хемокинов, которые активируют и привлекают клетки воспаления — моноциты/макрофаги и нейтрофилы, в очаг ишемии, что, в свою очередь, приводит к дальнейшему повреждению миокарда.

В эксперименте ингибирование *NLRP3* и рецептора *P2X7* с помощью коротких интерферирующих молекул РНК или фармакологического ингибитора предотвращало активацию инфламмасом и гибель кардиомиоцитов при инфаркте миокарда, а также оптимизировало ремоделирование [27]. *P2X7* представляет собой пуринергический рецепторный канал, который активируется внеклеточным АТФ, выделяемым из поврежденных клеток. В результате усиливается выходящий ток K^+ с последующей активацией инфламмасом [28].

Таким образом, было показано, что в кардиомиоцитах образуются *NLRP3* инфламмасомы, но их активация приводит не к секреции $IL-1\beta$, а к зависимой от каспазы-1 клеточной смерти, которая получила название пироптоз [28].

Сахарный диабет

Факторы нативного иммунитета и *NLRP3*-инфламмасомы могут играть существенную роль в патогенезе сахарного диабета типа II. Показано, что высокие концентрации глюкозы стимулируют секрецию $IL-1\beta$ β -клетками поджелудочной железы, что в последующем приводит к их дисфункции и клеточной смерти.

Действуя на изолированные клетки, $IL-1\beta$ понижал чувствительность к инсулину, усиливая JNK -зависимое фосфорилирование серина в составе субстрата-1 инсулинового рецептора (*IRS-1*), что нарушало

индуцируемую инсулином передачу сигнала по *PI3K-Akt* пути [29]. В то же время, $IL-1\beta$ стимулирует экспрессию $TNF-\alpha$, который может независимо подавлять сигнал от инсулинового рецептора [30]. Вместе с избытком свободных жирных кислот в крови $IL-1\beta$ провоцирует метаболические стрессорные реакции, такие как стресс эндоплазматического ретикулула и окислительный стресс. Обе эти реакции вызывают развитие воспаления и гибель β -клеток поджелудочной железы, внося вклад в патогенез диабета типа II [31].

В свою очередь, потеря β -клеток усугубляет гипергликемию, запуская порочный круг воспалительной реакции в островковой части поджелудочной железы. На изолированных макрофагах и экспериментальных моделях сахарного диабета типа II показано, что гипергликемия и свободные жирные кислоты активируют *NLRP3*-инфламмасому, приводя к нарушению метаболизма глюкозы и нарастанию резистентности к инсулину [32, 33]. Глюкоза при высоких концентрациях усиливает инфламмасо-опосредованный синтез $IL-1\beta$ в β -клетках поджелудочной железы при участии белка *TXNIP* (тиоредоксин-связывающего белка) [34]. Под действием глюкозы в β -клетках у больных сахарным диабетом типа II развивается окислительный стресс, сопровождающийся повышенной продукцией активных форм кислорода (*ROS*). Последние вызывают конформационные изменения в молекуле *TXNIP*, ускоряют диссоциацию ее комплекса с тиоредоксином и образование комплекса с *NLRP3*, что приводит к сборке активной инфламмасомы [34].

В ряде исследований обнаружено, что у мышей, которых кормили рационом с избытком жиров и которые имели дефицит *NLRP3*, *ASC* и/или каспазы-1, толерантность к глюкозе и чувствительность к инсулину были выше, чем у мышей дикого фенотипа [29, 34, 35]. Это сопровождалось пониженным содержанием провоспалительных цитокинов в сыворотке крови, печени и жировой ткани, а также большей эффективностью инсулин-*PI3K-Akt* сигнального пути у животных первой из этих групп. Данные исследования указывают на прямую связь *NLRP3*-инфламмасомы, хронического воспаления и резистентности к инсулину.

Островковый амилоидный полипептид (*IAPP*) представляет собой пептидный гормон, секретруемый β -клетками вместе с инсулином. У больных сахарным диабетом типа II *IAPP* служит источником синтеза амилоида в островках поджелудочной железы. *In vitro* *IAPP* вызывает активацию *NLRP3*-инфламмасомы в изолированных макрофагах и дендритных клетках посредством механизма «пертурбации фаголизосом» и при участии катепсинов *B* и *L* [36].

Получены данные, что пальмитиновая кислота и церамид — компоненты насыщенного жирами рациона, который способствует сахарному диабету типа II, могут активировать NLRP3-инфламмасому. В макрофагах мышей пальмитат ингибировал АМР-активируемую протеинкиназу (АМРК), вызывая нарушения аутофагии и усиленную генерацию ROS в митохондриях, что является одним из гипотетических механизмов активации инфламмасы NLRP3 [29].

Роль NLRP3-инфламмасы также подтверждается положительным эффектом анакинры у пациентов с сахарным диабетом типа II. Применение этого препарата способствовало улучшению секреторной функции β -клеток и снижению концентрации глюкозы в крови [37]. Также было обнаружено, что сахаропонижающий препарат глибурид снижает активацию NLRP3-инфламмасы под действием различных стимулов и предотвращает образование IL-1 β [38].

Имеются данные о роли инфламмасы NLRP3 и в патогенезе инсулин-зависимого сахарного диабета. Исследования демонстрируют сильную корреляцию между полиморфизмом гена NLRP3 и предрасположенностью к сахарному диабету типа I [39]. На модели стрептозотоцинового диабета у мышей показана усиленная экспрессия NLRP3, ASC и про-IL-1 β в лимфатических узлах поджелудочной железы [40]. Кроме того, у трансгенных мышей, дефицитных по NLRP3 или рецептору для IL-1 (IL-1R), но не ASC, по сравнению с диким фенотипом, гораздо реже развивается сахарный диабет после инъекций стрептозотоцина, меньше выраженность инсулита в поджелудочной железе, ниже концентрация глюкозы в крови, а в лимфузах меньше количество IL-17- и IFN- γ -продуцирующих Т-лимфоцитов (Th17 и Th1).

Болезни легких

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ)

ХОБЛ клинически проявляется хроническим бронхитом, который периодически обостряется на фоне вторичных инфекций, и эмфиземой. Основными факторами патогенеза ХОБЛ считают дисбаланс между активностью протеаз нейтрофилов и содержанием ингибиторов протеаз в плазме крови, интенсивность воспаления в слизистой оболочке дыхательных путей, оксидативный стресс и усиленный апоптоз. Важным причинным фактором ХОБЛ является табачный дым, который действует, прежде всего, на эпителий дыхательных путей, но активирует также воспалительные клетки легочной ткани. В эксперименте табачный дым вызывал накопление нейтрофилов в бронхоальвеолярном пространстве и паренхиме легких. Эта нейтрофильная реакция слабо выражена у трансгенных мышей, имеющих дефицит рецепторов

TLR4 и IL-1R1, а также при низкой экспрессии «гена первичного ответа при миелоидной дифференциации-88» (myeloid differentiation primary response gene 88) [41]. Макрофаги, активированные табачным дымом *in vitro*, генерировали повышенное количество про-IL-1 β , но усиление секреции IL-1 β возникало только при дополнительной стимуляции активатором инфламмасы АТФ. Целенаправленная гиперэкспрессия IL-18, регулируемого инфламмасой, вызывала распространенное воспаление легочной ткани, ремоделирование воздухоносных путей и изменения, подобные эмфиземе [42]. Этот факт указывает на роль IL-18 в патогенезе ХОБЛ.

У нокаутных по гену NLRP3 линии мышей (Nlrp3-/-), подвергнутых действию табачного дыма, в бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БЛЖ) была снижена активность каспазы-1, содержание IL-18 и IL-1 β , а также концентрация нейтрофилов по сравнению с мышами дикого фенотипа [43]. Выключение гена пуринергического рецептора P2X7, передающего сигнал АТФ, снижало величину активации каспазы-1, секреции IL-1 β и накопления нейтрофилов в стенке бронхов под действием табачного дыма [44].

Вдыхание дыма сигарет здоровыми людьми усиливает продукцию провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF) в ткани легких [45]. В то же время, у пациентов с ХОБЛ, по сравнению с некурящими, в легких увеличено содержание IL-1 β , который стимулирует секрецию мокроты [46]. Концентрация IL-18 в мокроте страдающих ХОБЛ лиц выше по сравнению со здоровыми курящими и некурящими людьми, а значения концентрации IL-18 коррелируют с величиной снижения дыхательной функции [47]. Кроме того, у пациентов с ХОБЛ в БЛЖ повышено содержание внеклеточной АТФ, а концентрация мочевой кислоты в сыворотке крови, при обострении заболевания, коррелирует с уровнем смертности в течение 30 сут. [48].

Вместе с тем, исследование компонентов инфламмасы NLRP3 в ткани слизистой бронхов и БЛЖ у пациентов со стабильной ХОБЛ различной степени тяжести не выявило различий в активации каспазы-1, а также содержания IL-1 β и IL-18 при сравнении с группами здоровых курящих и некурящих [49]. В связи с противоречивыми результатами, роль NLRP3-инфламмасы в развитии ХОБЛ требует дальнейшего изучения.

Бронхиальная астма

В основе патогенеза аллергической формы бронхиальной астмы (БА) лежит неадекватная реакция Th2-лимфоцитов на распространенные антигены, что сопровождается выбросом биологически активных веществ, вызывающих спазм бронхов и гиперсекрецию

слизи с обструкцией дыхательных путей. Повышенное содержание IL-1 β выявлено в сыворотке крови, мокроте и БЛЖ пациентов с БА [50]. Контакт с аллергеном сопровождается увеличением концентрации внеклеточной АТФ в БЛЖ сенсibilизированных людей и мышей [51].

При моделировании БА установлено, что воспаление слизистой оболочки дыхательных путей связано с дисфункцией митохондрий и генерацией АФК. Угнетение образования АФК с помощью антиоксиданта НесроХ-5 ослабляло аллергическое воспаление в слизистой бронхов мышей, а также снижало активацию NLRP3-инфламмосомы и продукцию IL-1 β [52]. При оценке выраженности аллергической реакции на введение яичного альбумина сенсibilизированным мышам нокаутных линий по генам компонентов инфламмосомы NLRP3: Nlrp3-/-, Asc-/- и Casp1-/- [53], обнаружено, что у нокаутных линий, по сравнению с диким фенотипом, снижена продукция цитокинов Th2-профиля и ограничена эозинофильная инфильтрация слизистой оболочки дыхательных путей. Кроме того, у мышей, имеющих дефицит рецептора IL-1R1, а также интерлейкинов IL-1 β и IL-1 α , снижена интенсивность иммунного ответа Th2-типа, что указывает на ключевую роль сигнала, идущего от IL-1R1, в аллергическом воспалении. Имеются и противоречащие данные об отсутствии различий в выраженности воспаления дыхательных путей и исходе аллергической реакции у мышей линии Nlrp3-/- и контрольной группы [54]. В более поздних исследованиях NLRP3 идентифицирован как важный регулятор транскрипции генов при дифференциации Th2. Экспрессия NLRP3 в CD4+ T-лимфоцитах способствовала реализации программы транскрипции, которая не требовала участия ASC и каспазы-1 [55]. Содержание цитокинов Th2-профиля, таких, как IL-5 и IL-4, снижено в ткани легких мышей линии Nlrp3-/-, сенсibilизированных к яичному альбумину, после контакта с этим аллергеном [55].

Инфекционные заболевания легких

Вирус гриппа А типа запускает синтез белка NLRP3 с помощью сигнала от TLR7 рецептора, который стимулирует одноцепочечная вирусная РНК, а M2 белок вируса способствует сборке инфламмосомы за счет усиления выходящего тока K⁺ [56]. При этом NLRP3-инфламмосома обеспечивает противовирусный иммунитет, так как мыши нокаутных линий Nlrp3-/-, Casp1-/- и Asc-/- чувствительны к инфекции и отличаются слабой воспалительной реакцией на вирус гриппа А [57]. Кроме того, NLRP3 важен для защиты от респираторной инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae*, фактор вирулентности ко-

торого — пневмолизин — идентифицирован как новый активатор инфламмосом [58]. Сообщается, что при хламидийной пневмонии активация NLRP3-инфламмосомы обусловлена митохондриальной дисфункцией, связанной с потерей мембранного потенциала митохондрий, а не с усиленной генерацией АФК [59]. Белок ESAT-6, выделяемый *Mycobacterium tuberculosis*, активирует NLRP3-инфламмосому и стимулирует продукцию IL-1 β [60]. Однако, мыши линии Nlrp3-/- не проявляют повышенной чувствительности к туберкулезу, благодаря компенсаторному миелоид-специфическому и независимому от NLRP3-инфламмосомы увеличению синтеза IL-1 β [60]. Напротив, мыши линии Asc-/-, не синтезирующие компонент NLRP3-инфламмосомы Asc, подвержены туберкулезной инфекции [61].

Фиброз легких

Идиопатический фиброз легких — тяжелое заболевание нижних дыхательных путей неизвестной этиологии. Для него характерно хроническое воспаление интерстициального пространства легких с развитием фиброза и нарушением структуры альвеол. При моделировании блеомицин-индуцированного фиброза легких на мышах линии Nlrp3-/- обнаружено снижение притока нейтрофилов и снижение содержания IL-1 β в ткани. В аналогичных условиях уменьшалась инфильтрация легких нейтрофилами у мышей, имеющих генетически-обусловленный дефицит ASC или каспазы-1, а также у животных, которым вводили ингибитор каспазы-1 Z-yvad-fmk [62]. При этом повреждение легких и воспаление, вызываемые блеомицином, сопровождались повышенным содержанием мочевой кислоты и внеклеточной АТФ в БЛЖ [62, 63]. У пациентов, страдающих идиопатическим фиброзом легких, в БЛЖ также увеличено содержание внеклеточной АТФ [63]. Введение мышам препарата статинов, признанного потенциальным фактором риска для развития фиброза легких, усиливает опосредованное блеомицином повреждение легочной ткани и активацию каспазы-1 [64]. Таким образом, активация NLRP3-инфламмосомы имеет существенное значение в патогенезе фиброза легких и, следовательно, может служить мишенью для терапевтических воздействий.

Муковисцидоз

В основе этого тяжелого наследственного заболевания лежит мутация гена CFTR, кодирующего белок-регулятор хлоридного канала. Муковисцидоз характеризуется образованием густого слизистого секрета, который блокирует дыхательные пути и способствует развитию инфекции. В эксперименте на моделях муковисцидоза подтверждена повышенная эксп-

рессия ASC и активацию каспазы-1 в ткани легких [64]. Активация NLRP3-инфламмосомы в легочной ткани мышей с муковисцидозом связана с высоким содержанием сигнального липидного медиатора церамида. В эпителиальных клетках, носителях мутации муковисцидоза, инфекция *Pseudomonas aeruginosa* вызывает дисфункцию митохондрий с избыточным накоплением в них Ca^{2+} , что является гипотетическим механизмом опосредованной NLRP3 активации каспазы-1 [65].

Легочная артериальная гипертензия

При этой патологии происходит ремоделирование стенки легочных артериол, приводящее к стойкому высокому сосудистому сопротивлению в системе малого круга кровообращения и правожелудочковой сердечной недостаточности. Моделирование легочной артериальной гипертензии у мышей посредством экзогенной гипоксии сопровождается активацией NLRP3-инфламмосомы и каспазы-1, а также повышенной секрецией IL-1 β [66]. Мыши линии Asc-/- резистентны к опосредованной гипоксией легочной гипертензии, что проявляется более низким систолическим давлением в правом желудочке и меньшей выраженностью сосудистого ремоделирования по сравнению с мышами дикого фенотипа [67]. Феномен резистентности к гипоксии не проявлялся у мышей линии Nlrp3-/-, указывая на возможное участие альтернативных инфламмосомных комплексов, содержащих ASC.

Острое повреждение легких

Для лечения тяжелой дыхательной недостаточности часто используют ингаляцию кислородом. Однако, длительная гипероксия вызывает развитие острого повреждения легких (ОПЛ) и, в последующем, респираторного дистресс-синдрома. В условиях гипероксии у мышей линии Nlrp3-/- наблюдалась повышенная летальность по сравнению с мышами дикого фенотипа, хотя между этими группами не было различий в содержании IL-1 β в БЛЖ [68]. При этом у мышей Nlrp3-/- линии был менее выражен воспалительный ответ на гипероксию и инфильтрация тканей легких нейтрофилами, а также снижена экспрессия и активация сигнального пути Stat3. Введение мышам Nlrp3-/- нейтрофилов от животных дикого фенотипа снижало смертность от гипоксии, предположительно, за счет активации Stat3. Результаты данной работы свидетельствуют о важности NLRP3 в регуляции сигнального пути Stat3 в клетках альвеолярного эпителия. Этот процесс не зависит от продукции IL-1 β и реализуется путем влияния на функцию макрофагов и нейтрофилов. Кроме того, подчеркивается важность

воспаления как процесса, имеющего позитивное значение для выживания организма в условиях повреждения.

Изучение роли инфламмосом в развитии ОПЛ при механической вентиляции показало, что разрушение ткани сопровождается изменением функции нескольких связанных с инфламмосомой генов, включая IL-1 α , Card-10, IL-1R1 и IL-1R2 [69]. Экспрессия гена Asc ап-регулируется после механической вентиляции, а делеция генов IL-18 или каспазы-1 уменьшает выраженность воспаления и повреждения легких. Последнее связано с ограничением дисфункции альвеоло-капиллярного барьера и отека ткани. Таким образом, инфламмосомы дают существенный вклад в патогенез экспериментального ОПЛ.

Силикоз и асбестоз

Пневмокониоз при вдыхании частиц оксида кремния или асбеста относят к фиброзирующим заболеваниям легких. В их патогенезе основную роль играют альвеолярные макрофаги, которые запускают воспалительную реакцию в ответ на осаждение частиц неорганического вещества на поверхности альвеол. В экспериментах с макрофагами мыши показана увеличенная секреция IL-1 β NLRP3-зависимого типа при контакте с частицами оксида кремния и асбеста [70].

Микрористаллические артриты

Обнаружение факта активации NLRP3-инфламмосомы под действием эндогенного «сигнала тревоги» в виде скопления в ткани кристаллов веществ стимулировало исследования NLRP3 при микрористаллических артритах. Острый артрит при подагре вызывается отложением в суставной и околосуставной тканях кристаллов мочевой кислоты. Аналогично, воспаление суставов при псевдоподагре обусловлено депозитами кристаллов пирофосфата кальция. Представления о патогенезе уратного и кальций пирофосфатного артрита были расширены, когда получили данные об активации NLRP3-инфламмосомы и усиленного образования IL-1 при этих патологиях [17]. Используя экспериментальную модель гиперурикемии, а также изолированные макрофаги, подтвердили активацию NLRP3-инфламмосомы при контакте клеток с кристаллами урата натрия [71].

Болезни печени

Инфламмосомы играют важную роль в патогенезе воспалительных заболеваний печени. Заражение изолированных клеток гепатомы человека вирусом гепатита С сопровождается активацией и сборкой NLRP3-инфламмосомного комплекса, что приводит

к выделению значительного количества IL-1 β во внешнюю среду [72].

В настоящее время наиболее распространенной формой хронической болезни печени является неалкогольный липидоз, поражающий до 20-30% лиц в общей популяции и до 75-100% людей, страдающих ожирением [73]. Спектр неалкогольного ожирения печени варьирует от непрогрессирующего стеатоза до прогрессирующего стеатогепатита и гепатоцеллюлярной карциномы. Согласно одной из гипотез, в основе неалкогольного стеатогепатита лежит стресс эндоплазматического ретикулума (ЭР), который запускает в клетке адаптивный ответ — «реакцию на белки с аномальной конфигурацией» (unfolded protein response — UPR) для восстановления гомеостаза. UPR реализуется с помощью трех трансмембранных сенсорных белков: IRE1 α , PKR-подобной киназы ЭР (PERK) и активирующего фактора транскрипции ATF6 [74]. Неэффективный ответ UPR приводит к апоптозу клетки, опосредованному проапоптотическим фактором транскрипции CHOP [75]. Введение LPS мышам с ожирением вызывало активацию IRE1 α и PERK, что сопровождалось гиперэкспрессией CHOP и активацией NLRP3-инфламмосомы. Последнее, в свою очередь, инициировало пироптоз и апоптоз гепатоцитов [76]. Кроме того, стеатоз печени, связанный со стрессом ЭР, гораздо меньше проявлялся у мышей, нокаутированных по гену каспазы-1, по сравнению с диким фенотипом [77]. В другой модели неалкогольного стеатоза печени микровезикулы, выделяемые насыщенными липидами гепатоцитами, активировали NLRP3 инфламмосому после их интернализации другими гепатоцитами или макрофагами [78].

Хронический вирусный гепатит В и С, алкогольная болезнь печени, неалкогольный стеатоз и другие метаболические гепатопатии прогрессируют в цирроз. Декомпенсация цирроза печени часто связана с системным воспалительным ответом, характеризующимся активацией клеток нативного иммунитета и усилением продукции провоспалительных цитокинов (TNF, IL-1, IL-6) в асцитической жидкости. В основе этой системной воспалительной реакции часто лежит массивная транслокация бактерий из просвета кишечника в мезентериальные лимфоузлы, асцитическую жидкость и другие внутренние пространства. В этих условиях активация инфламмосом становится важным защитным механизмом. Показано, что макрофаги, выделенные из асцитической жидкости пациентов с циррозом печени, отличаются более высокой экспрессией мРНК про-IL-1 α и про-IL-1 β , белка AIM2 и конституционной активацией каспазы-1 по сравнению с макрофагами из крови тех же пациентов [79]. Более того, в отличие от макрофагов крови, ак-

тивация AIM2-инфламмосомы в асцитных макрофагах не нуждалась в прайминге, что говорило об их преактивированном состоянии, связанном с наличием фрагментов ДНК бактерий в перитонеальной жидкости. При этом высокие концентрации IL-18 в асцитической жидкости коррелировали с наличием спонтанного бактериального перитонита.

Инфламмосомы могут играть существенную роль в патогенезе алкогольной болезни печени (АБП). Согласно высказанной гипотезе, злоупотребление алкоголем создает условия для активации инфламмосом в купфферовских клетках печени и усиленной секреции IL-1 β , что, в свою очередь, приводит к активации натуральных киллеров и развитию воспаления с инфильтрацией ткани нейтрофилами [80]. Показано, что содержание IL-1 β в крови последовательно возрастает по мере прогрессирования АБП — сначала на 56% у больных алкогольным гепатитом, затем в 2,8 раза у больных циррозом по сравнению со здоровыми лицами [81].

При моделировании алкогольного гепатита обнаружили повышенную экспрессию каспазы-1, IL-18, TNF- α и белка NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein) — NOD-подобного рецептора, который способствует сборке и активации NLRP3-инфламмосомы [82]. При этом содержание NLRP3, ASC, каспазы-1 и IL-18 в гепатоцитах мышей, подвергнутых алкоголизации, коррелировало с количеством телец Мэллори. Это позволило высказать идею, что при алкогольном гепатите тельца Мэллори могут служить индикатором активации инфламмосом.

В другом исследовании с использованием нокаутных линий мышей, дефицитных по каспазе-1, белку ASC или по рецептору к IL-1 β — IL-1R1, подтверждена важность сигнального пути IL-1 для развития алкогольного стеатоза, воспаления и повреждения печени [83]. По мнению исследователей, основную патогенную роль в алкогольной гепатопатии играет активация инфламмосомы в купфферовских фагоцитах.

Стимуляция мононуклеарных клеток печени LPS сопровождалась умеренной секрецией IL-1 β , которая значительно возросла после добавления среды, в которой инкубировали поврежденные алкоголем гепатоциты [84]. Этот эффект частично нивелировался после обработки указанной среды ферментами апиразой и уриказой, которые разрушали АТФ и мочевую кислоту. Отсюда сделано заключение, что АТФ и урат, выделяемые из поврежденных алкоголем гепатоцитов, генерируют сигнал для активации NLRP3-инфламмосомы в мононуклеарных клетках. В то же время, дефицит NLRP3 — сенсора АТФ и урата — ограничивал выраженность алкогольного стеатоза и гепатита у нокаутных мышей по сравнению с диким фенотипом.

Болезни почек

Активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы вызывает повышение системного артериального давления, которое, в свою очередь, приводит к прогрессирующему повреждению почек. Действие блокаторов ангиотензинового рецептора АТ1, сохраняющих функцию почек, связано не только с уменьшением артериального давления, но и с подавлением ангиотензин II-зависимого воспаления [85]. Исследования демонстрируют, что ангиотензин II (АТ-II) стимулирует пролиферацию гладких миоцитов стенки сосудов, активирует экспрессию NF-κB и генерацию провоспалительных цитокинов [86]. Взаимодействуя с рецептором АТ1, но не АТ2, АТ-II также инициировал активацию инфламмосомы NLRP3 [87]. Этот эффект АТ-II отменял митохондриальный антиоксидант mitoTEMPO за счет ингибирования образования АФК. Постоянная инфузия мышам раствора с АТ-II в течение 28 сут. вызывала повреждение почечных канальцев, структурные нарушения в митохондриях эпителия канальцев и альбуминурию. Выключение гена NLRP3 с помощью миРНК (малой интерферирующей РНК) защищало клетки эпителия почечных канальцев от опосредованного АТ-II повреждения митохондрий и блокировало активацию NLRP3-инфламмосомы [87]. Аналогичные результаты получены на модели острого повреждения почек контрастным веществом [88]. Инъекции последнего существенно увеличивали экспрессию ASC и NLRP3 в эпителии почечных канальцев, а также апоптоз. Эти изменения были значительно менее выражены у мышей линии NLRP3-/-.

Диабетическая нефропатия (ДН) характеризуется признаками стерильного воспаления в ткани почек. У взрослых людей ДН является ведущей причиной конечной стадии хронической почечной недостаточности. Исследование маркеров активации NLRP3-инфламмосомы у больных сахарным диабетом типа II выявило существенное увеличение концентрации IL-1β в сыворотке крови у пациентов с альбуминурией по сравнению с теми, у кого альбумин в моче отсутствовал [89]. В первой из этих групп пациентов наблюдали выраженную экспрессию NLRP3 в клубочках почек. В модельных экспериментах на мышах со стрептозоцин-индуцированным сахарным диабетом величина альбуминурии и накопление матрикса во влеклочном пространстве клубочков были существенно меньше у животных нокаутных линий по генам NLRP3 и каспазы-1 (Nlrp3-/- и caspase-1-/-) [89]. Аналогичный эффект давало применение антагониста рецептора для IL-1 анакирина, что также указывало на роль NLRP3-инфламмосомы в патогенезе ДН. В том же исследовании установлено, что моделируемая ДН связана с активацией инфламмосомы в рези-

дентных клетках почки, а не в миелоидных клетках костного мозга. Примечательно, что интерлейкин IL-22 предотвращал активацию NLRP3, расщепление прокаспазы-1 и созревание IL-1β при ДН [90]. Кроме того, введение IL-22 вызывало дозо-зависимую даун-регуляцию NLRP3-инфламмосомы, которая активируется в мезангиальных клетках под действием гипергликемии.

Показана также роль активации NLRC4-инфламмосомы в развитии диабетической нефропатии (ДН) [91]. NLRC4 усиленно экспрессируется в почках при ДН и представляет собой параллельный NLRP3 механизм процессинга и активации pro-IL-1β. Дефицит NLRC4 защищает почки от структурных изменений, характерных для ДН, таких как признаки гиперфилтрации в клубочках, гипертрофия их и канальцев, утолщение базальной мембраны капилляров, накопление компонентов мезангиального матрикса и протеинурия. При этом у мышей NLRC4-дефицитной линии Nlrc4-/- по сравнению с диким фенотипом при моделировании сахарного диабета менее выражены инфильтрация ткани почек F4/80+ макрофагами, усиление продукции IL-1β, активация NF-κB- и MAP-киназного путей, патогенетически связанных с почечной патологией.

IgA-нефропатия представляет собой наиболее часто встречающуюся форму первичного гломерулонефрита. Патогенез ее включает отложение IgA-содержащих иммунных комплексов в мезангиальном пространстве почечных клубочков, активацию комплемента по альтернативному пути и развитие воспаления. Моделирование IgA-нефропатии на мышах позволило установить роль IL-1β-зависимых механизмов, а также выявить усиленную экспрессию NLRP3 и каспазы-1 в клетках клубочков почек [92, 93]. Показано, что иммунные комплексы, содержащие IgA, активируют NLRP3-инфламмосомы в макрофагах, дендритных клетках костномозгового происхождения и клетках интерстиция почек (мезангиальные клетки) и эпителии канальцев [94]. В эксперименте повреждение структуры почек и функциональная недостаточность при IgA-нефропатии значительно менее выражены у нокаутной по гену NLRP3 линии мышей, а также у мышей дикого фенотипа, получавших инъекции shRNA, нейтрализующей NLRP3 [94].

Моделирование хронической болезни почек посредством односторонней обструкции мочеточника часто используют для изучения механизмов фиброза почечной ткани. При этом блокада образования IL-18 предотвращает повреждение почек и развитие фиброза [95]. У мышей линии Nlrp3-/-, выключение гена NLRP3 уменьшает выраженность воспаления и фиброза тубуло-интерстициального пространства на 14-е сут. после односторонней обструкции мочеточ-

ника [96]. Защитный эффект дефицита NLRP3 в данной модели почечной патологии обусловлен уменьшением синтеза коллагена типа I и фибронектина в сочетании с подавлением апоптоза и фенотипической трансформации клеток интерстициального пространства [97]. Кроме того, делеция гена NLRP3 препятствует нарушению функции почек в условиях односторонней обструкции мочеточника за счет уменьшения дисфункции митохондрий, которая проявляется их менее выраженным набуханием, а также поддержанием нормального количества mtDNA и активности митохондриальных АТФ-синтазы и НАДН-дегидрогеназы I. Полученные данные свидетельствуют, что активация инфламмосомы NLRP3 предшествует развитию дисфункции митохондрий и может играть в этом существенную роль [97].

Дисбаланс оксалата в организме приводит к гипероксалатемии, осаждению кристаллов щавелевой кислоты в ткани почек и развитию оксалатной нефропатии. У мышей, рацион которых был обогащен оксалатом, в почечных канальцах наблюдали отложение кристаллов оксалата кальция, а в окружающем интерстициальном пространстве — воспалительную реакцию. При этом в ткани почек обнаружили повышенную экспрессию NLRP3 [98]. Высокое содержание оксалата в рационе у мышей линии Nlrp3^{-/-} не вызывало прогрессирующей почечной недостаточности и летального исхода, как у животных дикого фенотипа.

Кристаллы оксалата кальция активируют NLRP3 в дендритных клетках почек, предположительно, с помощью следующих механизмов:

- 1) фагоцитоза частиц вещества;
- 2) индукции выходящего тока калия под действием кристаллов;
- 3) внеклеточной АТФ, которая выделяется из некритизированных клеток эпителия почечных канальцев [99].

В заключение надо отметить возрастающее число фактов, указывающих на значение NLRP3 и других типов инфламмосом в патогенезе социально-значимых заболеваний человека. Терапия, нацеленная на NLRP3 и IL-1 β -зависимую сигнальную систему, представляет собой перспективную и потенциально эффективную стратегию лечения таких болезней. В настоящее время отсутствуют препараты, способные специфически ингибировать активацию NLRP3-инфламмосомы, но разработаны блокаторы IL-1, такие, как анакинра — рекомбинантный антагонист рецептора для IL-1(IL-1Ra), рилонацепт — рекомбинантный гибридный белок, состоящий из фрагментов рецептора IL-1 и Fc фрагмента IgG1, канакинумаб — гуманизованное анти-IL-1 β моноклональное антитело [100, 101]. Дальнейшие исследования негативных регуляторов инфламмосом и механизмов

их эффектов позволят создать новые средства для управления воспалительным процессом и лечения многих форм патологии человека.

References

1. Latz E., Xiao T.S., Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13: 397-411.
2. Sharma D., Kanneganti T.D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J. Cell Biol.* 2016; 213: 617-29.
3. Chen G.Y., Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10: 826-37.
4. Martinon F., Burns K., Tschopp J.: The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* 2002; 10: 417-426.
5. Martinon F., Mayor A., Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27: 229-65.
6. Dinarello C.A. A clinical perspective of IL-1beta as the gatekeeper of inflammation. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41: 1203-17.
7. Embry C.A., Franchi L., Nunez G., Mitchell T.C. Mechanism of impaired NLRP3 inflammasome priming by monophosphoryl lipid A. *Sci Signal* 2011; 4: ra28.
8. van de Veerdonk F.L., Netea M.G., Dinarello C.A., Joosten L.A. Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol.* 2011; 32: 110-6.
9. Guarda G., Zenger M., Yazdi A.S., Schroder K., Ferrero I., Menu P. et al. Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J. Immunol.* 2011; 186: 2529-34. doi:10.4049/jimmunol.1002720.
10. Zhong Y., Kinio A., Saleh M. Functions of NOD-like receptors in human diseases. *Front. Immunol.* 2013; 4: 333. doi:10.3389/fimmu.2013. 00333.
11. Sutterwala F.S., Haasken S., Cassel S.L. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2014; 1319: 82-95. doi: 10.1111/nyas.12458.
12. Ozaki E., Campbell M., Doyle S.L. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. *J. Inflamm. Res.* 2015; 8: 15-27. doi:10.2147/JIR.S51250.
13. Franchi L., Munoz-Planillo R., Nunez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat. Immunol.* 2012; 13: 325-332. doi: 10.1038/ni.2231.
14. Duewell P., Kono H., Rayner K.J., Sirois C.M., Vladimer G. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals that form early in disease. *Nature* 2010; 464: 1357-61.
15. Karasawa T., Takahashi M. Role of NLRP3 inflammasomes in atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* 2017; 24: 1-9.
16. Stewart C.R., Stuart L.M., Wilkinson K., van Gils J.M., Denq J. et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. Immunol.* 2010; 11: 155-61.
17. Martinon F., Petrilli V., Mayor A., Tardivel A., Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440: 237-41.

18. Chen C.J. et al. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat. Med.* 2007; 13: 851-6.
19. Varghese G.P., Folkersen L., Strawbridge R.J., Halvorsen B., Yndestad A. et al. NLRP3 inflammasome expression and activation in human atherosclerosis. *J Am Heart Assoc.* 2016; 5:e003031 doi: 10.1161/JAHA.115.003031
20. Zhou R., Yazdi A.S., Menu P., Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2011; 469: 221-5.
21. Shi C.S., Shenderov K., Huang N.N., Kabat J., Abu-Asab M., Fitzgerald K.A., Sher A., Kehrl J.H. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat. Immunol.* 2012; 13: 255-63.
22. Razani B., Feng C., Coleman T., Emanuel R., Wen H. et al. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression. *Cell Metab.* 2012; 15: 534-544.
23. Emanuel R., Sergin I., Bhattacharya S., Turner J.N., Epelman S., Settembre C., Diwan A., Ballabio A., Razani B. Induction of lysosomal biogenesis in atherosclerotic macrophages can rescue lipid-induced lysosomal dysfunction and downstream sequelae. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014; 34: 1942-52.
24. Marchant D.J., Boyd J.H., Lin D.C., Granville D.J., Garmaroudi F.S., McManus B.M. Inflammation in myocardial diseases. *Circ. Res.* 2012; 110: 126-44.
25. Abbate A., Salloum F.N., Vecile E. et al. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. *Circulation* 2008; 117: 2670-83.
26. Kawaguchi M., Takahashi M., Hata T. et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2011; 123: 594-604.
27. Mezzaroma E., Toldo S., Farkas D. et al. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011; 108: 19725-30.
28. Mariathasan S., Weiss D.S., Newton K. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006; 440: 228-32.
29. Wen H. et al. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat. Immunol.* 2011; 12: 408-15.
30. Hotamisligil G.S., Shargill N.S., Spiegelman B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993; 259: 87-91.
31. Legrand-Poels S. et al. Free fatty acids as modulators of the NLRP3 inflammasome in obesity/type 2 diabetes. *Biochem. Pharmacol.* 2014; 92: 131-41.
32. Legrand-Poels S., Esser N., L'homme L., Scheen A., Paquot N., Piette J. Free fatty acids as modulators of the NLRP3 inflammasome in obesity/type 2 diabetes. *Biochem. Pharmacol.* 2014; 92: 131-41.
33. Ruscitti P., Cipriani P., DiBenedetto P., Liakouli V., Berardicurti O., Carubbi F. et al. Monocytes from patients with rheumatoid arthritis and type 2 diabetes mellitus display an increased production of interleukin(IL)-1 β via the nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing family pyrin 3(NLRP3)-inflammasome activation: a possible implication for therapeutic decision in these patients. *Clin. Exp. Immunol.* 2015; 182: 35-44.
34. Zhou R., Tardivel A., Thorens B., Choi I., Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat. Immunol.* 2010; 11: 136-40.
35. Stienstra R. et al. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011; 108: 15324-29.
36. Masters S.L. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes. *Nat. Immunol.* 2010; 11: 897-904.
37. Larsen C.M., Faulenbach M., Vaag A., Volund A., Ehses J.A., et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356: 1517-26.
38. Lamkanfi M., Mueller J.L., Vitari A.C., Misaghi S., Fedorova A. et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J. Cell Biol.* 2009; 187: 61-70.
39. Pontillo A., Brandao L., Guimaraes R., Segat L., Araujo J., Crovella S. Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil. *Autoimmunity.* 2010; 43: 583-9. doi:10.3109/08916930903540432
40. Carlos D., Costal F.R.C., Pereira C.A., Rocha F.A., Yaochite J.N.U., Oliveira G.G. et al. Mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome and predisposes to type 1 diabetes in murine model. *Front. Immunol.* 2017; 8: 164. doi: 10.3389/fimmu.2017.00164.
41. Doz E., Noulin N., Boichot E., Gue`non I., Fick L. et al. Cigarette smoke-induced pulmonary inflammation is TLR4/MyD88 and IL-1R1/MyD88 signaling dependent. *J. Immunol.* 2008; 180: 1169-78.
42. Kang M.J., Choi J.M., Kim B.H., Lee C.M., Cho W.K. et al. IL-18 induces emphysema and airway and vascular remodeling via IFN- γ , IL-17A, and IL-13. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 185: 1205-17.
43. Eltom S., Belvisi M.G., Stevenson C.S., Maher S.A., Dubuis E., Fitzgerald K.A., Birrell M.A. Role of the inflammasome-caspase1/11-IL-1/18 axis in cigarette smoke driven airway inflammation: an insight into the pathogenesis of COPD. *PLoS One.* 2014; 9: e112829.
44. Eltom S., Stevenson C.S., Rastrick J., Dale N., Ramdonck K. et al. P2X7 receptor and caspase 1 activation are central to airway inflammation observed after exposure to tobacco smoke. *PLoS One.* 2011; 6: e24097.
45. Kuschner W.G., D'Alessandro A., Wong H., Blanc P.D. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *Eur. Respir. J.* 1996; 9: 1989-94.
46. Pauwels N.S., Bracke K.R., Dupont L.L., Van Pottelberge G.R., Provoost S. et al. Role of IL-1 α and the Nlrp3/caspase-1/IL-1 β axis in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and COPD. *Eur. Respir. J.* 2011; 38: 1019-28.
47. Rovina N., Dima E., Gerassimou C., Kollintza A., Gratiou C., Roussos C. Interleukin-18 in induced sputum: association with lung function in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir. Med.* 2009; 103: 1056-62.
48. Bartziokas K., Papaioannou A.I., Loukides S., Papadopoulos A., Haniotou A., Papiris S., Kostikas K. Serum uric acid as a predictor of mortality and future exacerbations of COPD. *Eur. Respir. J.* 2014; 43: 43-53.
49. Di Stefano A., Caramori G., Barczyk A., Vicari C., Brun P., Zanini A. et al. Innate immunity but not NLRP3 inflammasome activation correlates with severity of stable COPD. *Thorax* 2014; 69: 516-24.

50. Brusselle G.G., Provoost S., Bracke K.R., Kuchmiy A., Lamkanfi M. Inflammasomes in respiratory disease: from bench to bedside. *Chest* 2014; 145: 1121-33.
51. Idzko M., Hammad H., van Nimwegen M., Kool M., Willart M.A. et al. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat. Med.* 2007; 13: 913-9.
52. Kim S.R., Kim D.I., Kim S.H., Lee H., Lee K.S. et al. NLRP3 inflammasome activation by mitochondrial ROS in bronchial epithelial cells is required for allergic inflammation. *Cell Death Dis.* 2014; 5: e1498.
53. Besnard A.G., Guillou N., Tschopp J., Erard F., Couillin I. et al. NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant. *Allergy* 2011; 66: 1047-1057.
54. Allen I.C., Jania C.M., Wilson J.E., Tekeppe E.M., Hua X. et al. Analysis of NLRP3 in the development of allergic airway disease in mice. *J. Immunol.* 2012; 188: 2884-93.
55. Bruchard M., Rebe` C., Derange`re V., Togbe` D., Ryffel B. et al. The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nat. Immunol.* 2015; 16: 859-70.
56. Thomas P.G., Dash P., Aldridge J.R.Jr., Ellebedy A.H., Reynolds C. et al. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. *Immunity.* 2009; 30: 566-75.
57. Allen I.C., Scull M.A., Moore C.B., Holl E.K., McElvania-TeKippe E. et al. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity.* 2009; 30: 556-65.
58. McNeela E.A., Burke A., Neill D.R., Baxter C., Fernandes V.E. et al. Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS Pathog.* 2010; 6: e1001191.
59. Shimada K., Crother T.R., Karlin J., Chen S., Chiba N. et al. Caspase-1 dependent IL-1b secretion is critical for host defense in a mouse model of Chlamydia pneumoniae lung infection. *PLoS One.* 2011; 6: e21477.
60. Mishra B.B., Moura-Alves P., Sonawane A., Hachen N., Griffiths G. et al. Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell Microbiol.* 2010; 12: 1046-63.
61. McElvania Tekippe E., Allen I.C., Hulseberg P.D., Sullivan J.T., McCann J.R. et al. Granuloma formation and host defense in chronic Mycobacterium tuberculosis infection requires PYCARD/ASC but not NLRP3 or caspase-1. *PLoS One* 2010; 5: e12320.
62. Gasse P., Riteau N., Charron S., Girre S., Fick L. et al. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009; 179: 903-13.
63. Riteau N., Gasse P., Fauconnier L., Gombault A., Couegnat M. et al. Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 182: 774-83.
64. Xu J.F., Washko G.R., Nakahira K., Hatabu H., Patel A.S. et al. COPD Gene Investigators. Statins and pulmonary fibrosis: the potential role of NLRP3 inflammasome activation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 185: 547-556.
65. Rimessi A., Bezzerri V., Patergnani S., Marchi S., Cabrini G., Pinton P. Mitochondrial Ca²⁺-dependent NLRP3 activation exacerbates the Pseudomonas aeruginosa-driven inflammatory response in cystic fibrosis. *Nat. Commun.* 2015; 6: 6201.
66. Villegas L.R., Kluck D., Field C., Oberley-Deegan R.E., Woods C. et al. Superoxide dismutase mimetic, MnTE-2-PyP, attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, pulmonary vascular remodeling, and activation of the NALP3 inflammasome. *Antioxid. Redox Signal* 2013; 18: 1753-64.
67. Cero F.T., Hillestad V., Sjaastad I., Yndestad A., Aukrust P. et al. Absence of the inflammasome adaptor ASC reduces hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2015; 309: L378-L387.
68. Mizushima Y., Shirasuna K., Usui F., Karasawa T., Kawashima A. et al. NLRP3 protein deficiency exacerbates hyperoxia-induced lethality through Stat3 protein signaling independent of interleukin-1b. *J. Biol. Chem.* 2015; 290: 5065-77.
69. Dolinay T., Kim Y.S., Howrylak J., Hunninghake G.M., An C.H. et al. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 185: 1225-34.
70. Dostert C., Petrilli V., Van Bruggen R., Steele C., Mossman B.T. et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science.* 2008; 320: 674-7.
71. Hari A., Zhang Y., Tu Z., Detampel P., Stenner M., Ganguly A. et al. (2014). Activation of NLRP3 inflammasome by crystalline structures via cell surface contact. *Sci. Rep.* 2014; 4: 7281.
72. Burdette D., Haskett A., Presser L., McRae S., Iqbal J., Waris G. Hepatitis C virus activates interleukin-1b via caspase-1-inflammasome complex. *J. Gen. Virol.* 2012; 93: 235-246.
73. Henao-Mejia J., Elinav E., Jin C., Hao L., Mehal W.Z., Strowig T. et al. Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 2012; 482: 179-185.
74. Xu C., Bailly-Maitre B., Reed J.C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 2656-64.
75. McCullough K.D., Martindale J.L., Klotz L.O., Aw T.Y., Holbrook N.J. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell Biol.* 2001; 21: 1249-59.
76. Rousseau D., Bonnafous S. et al. ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death. *Cell Death and Disease.* 2015; 6: e1879; doi:10.1038/cddis.2015.248.
77. Zhang J., Zhang K., Li Z., Guo B. ER Stress-induced inflammasome activation contributes to hepatic inflammation and steatosis. *J. Clin. Cell Immunol.* 2016; 7: doi:10.4172/2155-9899.1000457.
78. Cannito C., Morello E., Bocca C., Foglia B., Benetti E. et al. Microvesicles released from fat-laden cells promote activation of hepatocellular NLRP3 inflammasome: A pro-inflammatory link between lipotoxicity and non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS ONE.* 2017; 12(3): e0172575. doi:10.1371/journal.pone.0172575.
79. Gonzalez-Navajas J.M. Inflammasome activation in decompensated liver cirrhosis. *World J. Hepatol.* 2016; 8: 207-10.
80. Cui K., Yan G., Xu C., Chen Y., Wang J. et al. Invariant NKT cells promote alcohol-induced steatohepatitis through interleukin-1b in mice. *J. Hepatol.* 2015; 62: 1311-8.
81. Panchenko L.F., Pirozhkov S.V., Terebilina N.N., Baronets V.Yu., Peregud D.I., Alyabeva T.N., Fedorov I.G.,

Totolyan G.G. Endotoxemia, generation of cytokines and lipid peroxidation activity in alcoholic subjects with different severity of liver injury. *Вопросы наркологии* 2009; 2: 39-48.

82. Peng Y., French B.A., Tillman B., Morgan T., French S.W. The inflammasome in alcoholic hepatitis: its relationship with Mallory-Denk body formation. *Exp. Mol. Pathol.* 2014; 97: 305-13.

83. Petrasek J., Bala S., Csak T., Lippai D., Kodys K. et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J. Clin. Invest.* 2012; 122: 3476-89.

84. Petrasek J., Iracheta-Vellve A., Saha B., Satishchandran A., Kodys K. et al. Metabolic danger signals, uric acid and ATP, mediate inflammatory cross-talk between hepatocytes and immune cells in alcoholic liver disease. *J. Leukoc. Biol.* 2015; 98: 249-56.

85. Brenner B.M., Cooper M.E., de Zeeuw D., Keane W.F., Mitch W.E. et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345: 861-9.

86. Ruiz-Ortega M., Lorenzo O., Ruperez M., Konig S., Wittig B., Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ. Res.* 2000; 86: 1266-72.

87. Wen Y., Liu Y., Tang T., Lv L., Liu H., Ma K., Liu B. NLRP3 inflammasome activation is involved in Ang II-induced kidney damage via mitochondrial dysfunction. *Oncotarget* 2016; 7: 54290-302.

88. Shen J., Wang L., Jiang N., Mou S., Zhang M. et al. NLRP3 inflammasome mediates contrast media-induced acute kidney injury by regulating cell apoptosis. *Scientific Reports.* 2016; 6: 34682 DOI: 10.1038/srep34682.

89. Shahzad K., Bock F., Dong W., Wang H., Kopf S. et al. Nlrp3-inflammasome activation in non-myeloid-derived cells aggravates diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2015; 87: 74-84.

90. Wang S., Li Y., Fan J., Zhang X., Luan J. et al. Interleukin-22 ameliorated renal injury and fibrosis in diabetic nephropathy through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Death and Disease.* 2017; 8: e2937; doi:10.1038/cddis.2017.292.

91. Yuan F., Kolb R., Pandey G., Li W., Sun L. et al. Involvement of the NLRC4-inflammasome in diabetic nephropathy. *PLoS ONE* 2016; 11: e0164135. doi:10.1371/journal.pone.0164135

92. Zhu J., Wang H., Yang D. IgA nephropathy with pathologic features of membranoproliferative glomerulonephritis following burn injury. *Case Rep. Nephrol. Urol.* 2014; 4:31-6.

93. Silva G. E. et al. Renal macrophage infiltration is associated with a poor outcome in IgA nephropathy. *Clinics (Sao Paulo)* 2012; 67: 697-703.

94. Tsai Y.-L., Hua K.-F., Chen A., Wei C.-W., Chen W.-S. et al. NLRP3 inflammasome: Pathogenic role and potential therapeutic target for IgA nephropathy. *Scientific Reports.* 2017; 7: 41123 DOI: 10.1038/srep41123.

95. Bani-Hani A.H., Leslie J.A., Asanuma H. et al. IL-18 neutralization ameliorates obstruction-induced epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *Kidney Int.* 2009; 76: 500-11.

96. Vilaysane A., Chun J., Seamone M.E. et al. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 21: 1732-44.

97. Guo H., Bi X., Zhou P., Zhu S., Ding W. NLRP3 deficiency attenuates renal fibrosis and ameliorates mitochondrial dysfunction in a mouse unilateral ureteral obstruction model of chronic kidney disease. *Mediators of Inflammation.* 2017; 2017: Article ID 8316560.

98. Felix Knauf F., Asplin J.R., Granja I., Schmidt I.M., Moeckel G. et al. NALP3-mediated inflammation is a principal cause of progressive renal failure in oxalate nephropathy. *Kidney Int.* 2013; 84: 895-901.

99. Mulay S.R., Kulkarni O.P., Rupanagudi K.V. et al. Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by Nlrp3-mediated IL-1 β secretion. *J. Clin. Invest.* 2013; 123: 236-46.

100. Van Tassell B.W., Toldo S., Mezzaroma E., Abbate A. Targeting interleukin-1 in heart disease. *Circulation* 2013; 128: 1910-23.

101. Abbate A., Van Tassell B.W., Biondi-Zoccai G.G. Blocking interleukin-1 as a novel therapeutic strategy for secondary prevention of cardiovascular events. *BioDrugs.* 2012; 26: 217-33.

Сведения об авторах:

Литвицкий Петр Францевич, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, зав. каф. патофизиологии ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

© Коллектив авторов, 2018
УДК 612.822.1:616-006.6

Бочаров Е.В.¹, Кучеряну В.Г.², Бочарова О.А.¹

Функциональные грани дофаминергической системы и рак (часть 2)

¹ ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 24

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

В современном мире мы постоянно подвержены стрессу. В то время как острый стресс может иметь положительное воздействие на организм, хроническое стрессирование как правило наносит вред здоровью и приводит к серьезным заболеваниям, в том числе к раку, который считают болезнью старения. Показано, что стресс может усиливать опухолевый рост, метастазирование, ослабляет противоопухолевый иммунитет и эффективность химиотерапии. Вместе с тем, исследования показали, что дофамин, недостаток которого играет ключевую роль при старении и стрессе, ограничивает развитие опухолей. Роль центральных нейрональных процессов с участием дофаминергической системы в стрессорных механизмах контроля злокачественного роста обсуждается в представленном обзоре.

Ключевые слова: дофаминергическая система, дофаминовые рецепторы, серотонин, серотониновые рецепторы, старение, стресс, рак.

Для корреспонденции: Бочаров Евгений Валериянович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. иммунофармакологии, e-mail: imufarm@rambler.ru

Для цитирования: Бочаров Е.В., Кучеряну В.Г., Бочарова О.А. Функциональные грани дофаминергической системы и рак. Часть 2. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018;62(1): 90–96. DOI:

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Авторы признательны профессору, д.м.н. В.М. Бухману, заведующему лабораторией фармакологии и токсикологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, за критическое прочтение рукописи и ценные замечания.

Поступила 10.01.2017

Bocharov E.V.¹, Kucheryanu V.G.², Bocharova O.A.¹

Functional facets of dopaminergic system and cancer. Part 2

¹ Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 24, Kashirskoye sh., Moscow, 115478, Russia

² The Institute of general pathology and pathophysiology. 8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315, Russia

Stress as a modern civilization factor significantly affects our lives. While acute stress might have positive effect on the organism, chronic stress is usually detrimental and might lead to serious health complications as well as cancer considered to be age-disease. It is also known that stress can significantly impair the efficacy of cytotoxic chemotherapies and anti-tumour immune response, up-regulate tumour growth and metastasis spreading. Meanwhile dopamine known to be antiaging and antistress agent is able to down-regulate tumourgenesis. Therefore central neuronal that is dopaminergic system complicity in stress control mechanisms of tumour development we discuss in the review.

Keywords: dopaminergic system; dopamine receptors; serotonin; serotonin receptors; aging; stress; cancer.

For citation: Bocharov E.V., Kucheryanu V.G., Bocharova O.A. Functional facets of dopaminergic system and cancer. Part 2. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2018;62(1): 90–96 (in Russian). DOI:

For correspondence: Bocharov E.V., Senior Researcher Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation, 24, Kashirskoye sh., Moscow, 115478, Russia, E-mail: imufarm@rambler.ru

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Bocharov E.V., <http://orcid.org/0000-0003-2342-9881>

Kucheryanu V.G., <http://orcid.org/0000-0002-5071-3581>

Bocharova O.A., <http://orcid.org/0000-0002-6365-2888>

Received 10.01.2017

Список сокращений

ДА — дофамин
 ЖКТ — желудочно-кишечный тракт
 МАО — моноаминоксидаза
 D — дофаминовый рецептор
 eNOS — эндотелиальная синтаза оксида азота
 5-НТ — серотонин
 5-НTRs — рецепторы серотонина
 FOXO3A — фактор транскрипции, усиливающий экспрессию белков Bcl-2
 VEGF — фактор роста эндотелия сосудов
 VTA — вентрально-теgmentальная область

Дофамин как противоопухолевый агент и фактор противоопухолевой резистентности

Дофамин и серотонин синтезируются в центральной нервной системе (ЦНС) и желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), где они участвуют в различных процессах [1—3]. Дофамин (ДА) и серотонин также вовлечены в опухолевый процесс, благодаря влиянию на пролиферацию клеток опухоли и ангиогенез. Вместе с тем, выявлено, что ДА может играть роль в дифференцировке цитотоксических Т-клеток, контролировать их киллерную активность и участвовать в активной фазе иммунного ответа против опухоли [4, 5].

Дофамин. ДА продуцируется в цитоплазме из аминокислоты тирозина с помощью тирозингидроксилазы. В крови ~99% дофамина запасается в тромбоцитах, в плазме ~1% ДА циркулирует в свободной форме и в виде неактивного дофаминсульфата [6, 7]. В ЦНС дофамин вовлечен в привилегированные центральные механизмы, о чем было сказано ранее. К тому же после транспортировки симпатическими нервами и тромбоцитами он также имеет периферические эффекты во всем организме, например, в регуляции тонуса сосудов [2]. Помимо этого дофамин является предшественником адреналина и норадреналина в ЦНС и надпочечниках. Дофамин проявляет свои функции, связываясь с дофаминовыми рецепторами. Последние располагаются на клеточных мембранах мозга, сердца, почек, коры надпочечников, кровеносных сосудах, окончаний симпатических нервов. Существует несколько типов дофаминовых рецепторов — D1-5. Например, D1 стимулирует накопление клеточного цАМФ, тогда как активация D2 подавляет его [2]. Дофаминовые транспортеры располагаются на плазматической мембране. Они активно транспортируют дофамин из синаптической щели или крови в клетки, где он накапливается или распадается. Эти транспортеры образуются в черной субстанции и вентрально-теgmentальной области (VTA) мозга, в желудке, почках, протоке поджелудочной железы и тромбоцитах. Дофа-

мин разрушается в печени, мозге, почках путем сульфоконъюгации, окислительного дезаминирования и O-метилирования [8].

Серотонин. Серотонин также известен как 5-гидрокситриптамин (5-НТ), производится в ЦНС и энтерохромафинных клетках ЖКТ. Серотонин образуется из одной аминокислоты L-триптофана с помощью триптофангидроксилазы. Меньше чем 1% 5-НТ циркулирует в свободной форме в крови. Остальной серотонин запасается в тромбоцитах, пресинаптических нейронах и энтерохромафинных клетках [1].

Серотонин играет роль во многих физиологических процессах. Он модулирует сокращение (двигательную активность) сердца [9], сокращение кишечника, тонус сосудов и агрегацию тромбоцитов [1]. Рецепторы серотонина (5-НTRs) располагаются на клеточной мембране и находятся в ЦНС, сердце, ЖКТ, в сосудах крови и на тромбоцитах. Существуют семь типов 5-НTRs (5-НTR1-7), некоторые из которых подразделяются на 5-НTR1A, 5-НTR1B и т.д. Активация 5-НTR1 и 5-НTR5 подавляет внутриклеточную аккумуляцию цАМФ. Активация 5-НTR4 и -7 стимулирует её. Активация 5-НTR2 индуцирует высвобождение внутриклеточного кальция. Активация 5-НTR3 стимулирует Na⁺/K⁺ катионные каналы, приводя к мембранной деполяризации. Переносчики серотонина располагаются на плазматической мембране. Они активно переносят серотонин, например, из просвета кишечника и крови внутрь клеток [1]. Переносчики серотонина находятся в мозге, в сердце, ЖКТ, надпочечниках, в кровеносных сосудах и на тромбоцитах [10]. Серотонин разрушается в клетках мозга, ЖКТ, печени, легких и тромбоцитах с помощью МАО и выделяется затем почками в виде 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-НIAA) [1].

Тромбоциты. Тромбоциты запасают дофамин и серотонин в плотных гранулах и являются их главными циркулирующими резервуарами [6]. Активация тромбоцитов и высвобождение содержимого играют критическую роль при гемостазе, тромбозе и ангиогенезе [11]. При раке тромбоциты контактируют с активированной стенкой сосудов опухоли и высвобождают свое содержимое, состоящее из дофамина и серотонина, а также кальция, фактора V, фибриногена и VEGF-A, который запасается в альфа-гранулах [6, 11, 12].

Дофамин и рак. Несколько экспериментов *in vitro* показали, что дофамин прямо может воздействовать на опухолевые клетки. При раке яичников дофамин (12,5—50 мкМ) снижал способность к инвазии и усиливал апоптоз раковых клеток [5]. Дофамин (5 мкМ) так же снижал пролиферацию клеток неход-

жнинской лимфомы. Этот эффект может быть нейтрализован свободными радикалами натрия метабисульфита. Предполагают, что дофамин при окислении индуцирует оксидативный стресс [13]. Различные типы опухолевых клеток экспрессируют рецепторы и транспортеры дофамина [5, 14—16]. На поведение опухолевых клеток могут влиять агонисты дофаминовых рецепторов D2. Например, рост клонов человеческого мелкоклеточного рака легкого подавлялся агонистом D2 бромокриптином (0,1 нМ) [16].

Роль ДА при раке была изучена в различных экспериментах на животных. У мышей концентрация дофамина в костном мозге уменьшилась в 7 раз после трансплантации саркомы [17]. На другой мышшиной модели инъекции 6-гидроксидофамина элиминировали периферические дофаминергические нейроны и таким образом индуцировали истощение дофамина. У этих мышей развивается большая по объему подкожная меланома и саркома, чем у мышей с интактными периферическими дофаминергическими нервами. Мыши с «истощенным» дофамином имеют так же увеличенную плотность опухолевых микрососудов и проницаемость, так же как и усиление фосфорилирования R2 рецепторов VEGF в опухолевых эндотелиальных клетках [18, 19]. В отличие от мышей с «истощенным» дофамином, мыши с нокаутированным транспортером ДА имеют гипердофаминергическую систему, что выражается в повышенном системном уровне дофамина. Когда клетки мелкоклеточного рака легкого имплантируются подкожно, эти мыши имеют меньшие размеры опухоли с более низкой плотностью микрососудов в сравнении с диким типом мышей [20]. Крысы, чувствительные к апоморфину (селекция из популяции крыс Wistar), имеют гиперреактивную дофаминергическую систему с более высоким количеством церебральной мРНК и дофаминового рецептора D2 белка тирозингидроксилазы [21]. Через 7 сут. после подкожной имплантации опухолевых клеток опухоли в молочной железе были меньшего размера и с более низкой плотностью микрососудов у крыс, чувствительных к апоморфину. Более того, у чувствительных к апоморфину крыс отмечено меньшее количество метастазов в легких [22].

Результатом воздействия ДА *in vivo* на разных моделях явилось подавление опухолевого роста и снижение плотности сети микрососудов опухоли. ДА также снижал сосудистую проницаемость в ксеногraftах рака прямой кишки, молочной железы и яичников (человека) и реже сопровождался развитием асцита у мышей *nude*. У опухолевых клеток под воздействием ДА снижался процесс фосфорилирования VEGF-R2 и других мишеней, например, фокальной адгезионной киназы (ФАК) и митоген-активированной протеинкиназы (МАРК) [5, 23, 24].

В исследованиях на стрессированных мышях *nude* с ксеногraftами рака яичников человека было показано, что лечение дофамином повышает степень покрытия перицитами сосудистой сети опухоли [23]. Между тем, усиленное покрытие перицитами считается признаком нормализации сосудов при антиангиогенной терапии [25].

Эффект дофамина в комбинированной терапии был изучен у мышей с подкожно перевитой опухолью молочной железы. Мыши получали только ДА, только доксорубин, или ДА + доксорубин в комбинации, а также растворитель. ДА, доксорубин и их комбинация тормозили рост опухоли (171%, 133% и 63% соответственно от начального размера опухоли) в сравнении с лечением одним растворителем (413% от начального размера) и увеличивали продолжительность жизни (на 24%, 38% и 90% соответственно) в сравнении с контрольными мышами. Похожие результаты наблюдали у мышей *nude* с привитым раком прямой кишки человека, леченых только дофамином, только цисплатином, только 5-фторурацилом или их комбинацией и растворителем [24]. У стрессированных мышей с раком яичников ДА в комбинации с цисплатином повышал концентрацию цисплатина в опухоли при увеличенном опухоль-почка и опухоль-печень соотношении цисплатина. Эта комбинация показала шестикратное уменьшение массы опухоли в сравнении с лечением одним цисплатином [23].

Роль дофаминового рецептора D2 была также изучена в экспериментах на животных. У мышей, нокаутированных по D2 рецептору, с привитой мышшиной саркомой или меланомой отмечен увеличенный размер опухоли, большая плотность микрососудов и их большая проницаемость в сравнении с мышами дикого типа. Предполагается, что D2 рецепторы необходимы для проявления функций дофамина [17, 18].

Агонисты D2 рецепторов (бромокриптин и квинпирол, 10 мг на кг) подавляют ангиогенез в опухоли у мышей с раком яичников. Антагонисты D2 рецепторов (этиклоприд или домперидон, 10 мг/кг/сут.), введенные перед началом лечения дофамином, нейтрализуют дофаминовый эффект подавления роста рака желудка и яичников у мышей и крыс. Действие антагонистов дофаминовых рецепторов D2 (этиклопридом, 10 мг/кг/сут.) [5, 23] не влияло на индуцированное дофамином покрытие перицитами сосудов. Наряду с этим имеются данные, показывающие, что активация дофаминовых рецепторов D2 может подавлять пролиферацию клеток опухоли, как показано в экспериментах с таргетной siРНК к D2. Учитывая опыты на стрессированных мышях с перевивкой рака человека, можно заключить, что дофамин подавляет опухолевый ангиогенез и, следовательно, опухолевый рост через активацию D2 рецепторов. В опухолях

яичников (SKOV3ip1 или HeuA8) эффект подавления дофамином пролиферации был нейтрализован инъекцией наночастиц, содержащих таргетную siРНК к мышинным дофаминовым рецепторам D2. Поскольку жизнеспособность клеток HeuA8 *in vitro* также подвержена воздействию дофамина, можно полагать, что D2, присутствующие на опухолевых клетках, вовлечены в механизм опухолевого роста. Также выявлен эффект ограничения опухолевого роста при раке желудка и поджелудочной железы человека при активации D2 рецепторов [26—28].

Однако данные об активации дофаминового рецептора D1 на опухолевый ангиогенез противоречивы. В одних исследованиях показано, что мыши, накаутированные по D1, с мышинной карциномой легких имеют меньшие размеры опухоли, чем дикий тип этих мышей. У дикого типа мышей антагонист D1 siH 23390 (0,3 мг/кг/сут.) подавляет опухолевый рост и снижает плотность сосудистой микросети [20]. Однако на мышях с раком яичников ни антагонист D1 siH 23390 (10,0 мг/кг/день), ни агонист D1 SKF38390 (10,0 мг/кг/день) не влияют на васкуляризацию опухоли и развитие асцита. Вместе с тем, у стрессированных мышей с человеческой опухолью яичников SKOV3ip1 или HeuA8 антагонист D1 бутакламола (1,5 мг/кг/сут.) не влиял на дофамин-индуцированное подавление ангиогенеза и опухолевый рост. Наряду с этим бутакламола не подавлял процесс усиленного покрытия перицитами опухолевых сосудов, вызванное воздействием дофамина на этих моделях, а введение агониста D1 SKF382958 (1,0 мг/кг/сут.) выражалось в увеличении покрытия перицитами опухолевых сосудов. Комбинированное лечение цисплатином с агонистом D1 SKF382958 приводило к двукратному увеличению концентрации цисплатина непосредственно в опухоли, по сравнению с тканями печени и почек, и 5-кратному снижению опухолевого роста в сравнении с контролем, который лечили только цисплатином [23]. Таким образом, можно полагать, что индуцированная дофамином активация D1 приводит к нормализации сосудов. Выявлено также, что дофамин и агонисты дофаминового рецептора D1 через сигнальные пути протеинкиназы G индуцируют апоптоз, подавляют инвазию и снижают выживаемость ксенографтов рака молочной железы (разных линий). Фенолдопам, агонист D1-рецепторов, подавлял рост клеток рака молочной железы, усиливая их апоптоз и некроз [29].

Вместе с тем, недавние эксперименты на мышях *nude* свидетельствуют о подавлении пролиферации и жизнеспособности клеток глиобластомы человека антагонистами D4-рецепторов [30].

Концентрация дофамина была также изучена у онкологических больных. В опухолевой ткани рака

прямой кишки у 36 пациентов уровень дофамина был в 3—10 раз ниже, чем в здоровой ткани [31]. Дофамин и тирозингидроксилаза не выявлялись с помощью ВЭЖХ в ткани рака желудка 22 пациентов, в то время как присутствие того и другого было продемонстрировано в здоровой ткани желудка у 22 пациентов с аденоматозными полипами желудка [28].

Для достижения системного уровня дофамина, который, вероятно, мог бы затормозить опухолевый рост, было проведено клиническое исследование. Четыре пациента с метастатической меланомой получали инфузии дофамина в максимальной дозе 20 мкг/кг/мин в течение 48—120 ч, при этом уровень дофамина в плазме составлял от 1 до 10 мкМ. Однако исследование было остановлено из-за тяжелых кардиоваскулярных побочных эффектов после проведения только одного цикла лечения. Тест на пролиферацию в биопсийном материале, взятом до и сразу после цикла лечения, показал 10-кратное снижение (от 1—3 до 0,1—0,2) H3-тимидиновой метки в опухолевых клетках [32].

D2 дофаминовый рецептор был экспрессирован в ткани рака желудка 65 пациентов, однако был ниже в опухолях, чем в доброкачественных полипах и нормальной ткани желудка у 83% контрольных пациентов [33].

Суммируя вышесказанное, следует считать, что дофамин и тирозингидроксилаза присутствуют в меньшей концентрации в опухолях, чем в доброкачественных тканях. Увеличение уровня дофамина, вызываемое его введением, подавляет пролиферацию опухолевой ткани у пациентов, например с меланомой. Однако применение такого лечения пока не представляется возможным из-за токсичности данного катехоламина.

Серотонин и рак. *In vitro* в некоторых опухолевых линиях серотонин стимулировал пролиферацию и предотвращал гибель опухолевых клеток [34—38]. В противоположность этому, серотонин (500 мкМ) подавлял пролиферацию клеток меланомы человека [39]. В клеточной линии холангиокарциномы человека активность мРНК триптофангидроксилазы была в 2,5—50 раз выше, а мРНК MAO-A — в 2 раза ниже в сравнении с доброкачественными холангиоцитами. В результате продукция серотонина этими опухолевыми клетками была повышена [34]. Серотонин стимулировал пролиферацию клеточной линии человеческой гепатоцеллюлярной карциномы Huh7 в сывороточной среде, индуцируя фосфорилирование FOXO3A. Этот эффект не наблюдается в двух других линиях человеческой гепатоцеллюлярной карциномы — HepG2 и Hep3b [36].

Эксперименты *in vitro* показали, что различные 5HT₁ рецепторы могут присутствовать на несколь-

ких типах опухолевых клеток. Опухолевый рост может быть подавлен антагонистами 5НТ₂, экспрессированными на опухолевых клетках. В клетках мелко-клеточной карциномы легкого 5-НТ₁А и 5-НТ₁В могут быть мишенями антагонистов (500 нМ спиперона, GR127935) для максимального подавления клеточного роста, индуцированного серотонином. Вероятно, блокирование одного 5НТ₂ ведет к увеличенной чувствительности серотонин-индуцированной активации другого. Воздействие антагонистом 5НТ₂В — SB204741 (20 мг/кг) снижало опухолевый рост и плотность сети микрососудов у мышей при раке легкого и меланоме [20].

В экспериментах на животных изучено влияние «насыщения и истощения» серотонина на течение опухолевого процесса. Ксенографты гепатоцеллюлярной карциномы не способны расти на мышцах, дефицитных по триптофангидроксилазе (и, следовательно, при истощении серотонина) [38]. Карцинома кишки и легкого у мышей, дефицитных по триптофангидроксилазе, была соответственно в 3 и 1,5 раза меньше, чем у мышей дикого типа. Плотность сосудистой сети при раке кишечника была также снижена у мышей, дефицитных по триптофангидроксилазе. Рост карциномы кишечника и легкого может быть восстановлен, если гидрокситриптофан (50 мг/кг/дважды в день) вводили подкожно за 2 дня до инокуляции опухоли. Мыши, дефицитные по триптофангидроксилазе, имели концентрации VEGF и VEGFR2 такие же, как у дикого типа мышей, но более высокие концентрации MMP-12 (матриксной металлопротеиназы -12) и ангиостатина. MMP-12 превращает плазминоген в ангиостатин, эндогенный ингибитор ангиогенеза. Таким образом, вероятно, серотонин воздействует на метаболический путь ангиостатина, а не — VEGF [6].

Отсутствие транспортера серотонина индуцирует низкий уровень последнего в плазме и опухоли, что приводит к уменьшению размера опухолей мышшиной карциномы и меланомы (дефицитных по транспортеру серотонина) по сравнению с диким типом мышей. Однако на плотности сети микрососудов опухоли это не отражалось. При торможении роста опухоли был снижен уровень эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) у мышей, дефицитных по транспортеру серотонина. Поскольку eNOS может вызывать вазодилатацию, полагают, что уменьшенный поток крови может приводить к торможению роста опухоли у таких мышей. Ограничение роста человеческой холангиокарциномы у мышей после воздействия ингибитором триптофангидроксилазы CPA (150 мг/кг трижды в неделю) в течение 2 мес. может служить основанием для предположения, что отсутствие серотони-

на влияет на опухолевый процесс сдерживая рост опухоли [34].

У онкологических пациентов были использованы маркеры хромогранин А и серотонин, позволяющие идентифицировать нейроэндокринные очаги при раке простаты. Наличие серотонин-позитивных клеток сочеталось с высокой плотностью микрососудов [40] и VEGF экспрессией [41]. 5-НТ₂ присутствовал в нескольких опухолевых образцах. У 109 пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой экспрессия 5-НТ₁А и 5-НТ₁В в опухолевой ткани была повышена по сравнению с окружающей здоровой тканью печени, в то время как экспрессия 5-НТ₂В и 5-НТ₂Г была одинаковой как в опухолевой, так и в здоровой ткани. У 176 пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой экспрессия 5-НТ₁А, 5-НТ₁В и 5-НТ₂В сопровождалась высоким индексом пролиферации в опухолях. Кроме того, уровень экспрессии 5-НТ₁В коррелировал с размером опухоли у этих пациентов [38]. Вместе с тем, в 159 случаях метастазов в кости при карциноме и саркоме выявлено, что экспрессия серотонина в комбинации с рецептором 1 фактора некроза опухоли ФНО ассоциирована с низкой выживаемостью [42].

Таким образом, основываясь на данных литературы, можно сделать вывод о том, что дофамин ингибирует рост опухоли, в то время как серотонин его стимулирует [43]. Однако использование дофамина для лечения весьма проблематично из-за его токсичности [2].

Роль серотонина в развитии опухоли менее изучена, и имеющиеся данные получены преимущественно на моделях *in vitro*. Эти эксперименты показали способность серотонина стимулировать эндотелиальные клетки сосудов через активацию 5-НТ₁ и 5-НТ₂ рецепторов. Пролиферация опухолевых клеток может быть подавлена подобранными антагонистами 5НТ₂ в зависимости от типа опухоли. Ингибиторы триптофан-гидроксилазы используются в настоящее время в клинических исследованиях у пациентов с синдромом раздраженного кишечника и у пациентов с серотонин-продуцирующими карциноидными опухолями [44, 45].

Дальнейшие исследования механизмов действия дофамина в отношении опухолевого процесса весьма перспективны.

Выводы

Учитывая вышеизложенное, можно представить себе следующую картину функционирования дофаминергической системы. При определенном содержании дофамина и его рецепторов в ЦНС и на периферии поддерживается соответствующий уровень двигатель-

ной активности организма, внутренних органов, тонуса сосудов, а также когнитивных возможностей головного мозга. При этом сохраняются мотивационная, эмоциональная функции, хорошее настроение, жизнелюбие, способность гибко реагировать на изменения окружающей обстановки с комплексной регулирующей сложного поведения. Иными словами, чем дольше поддерживается соответствующий уровень жизнеспособных дофаминергических нейронов, тем менее активны механизмы старения и более продолжителен жизненный процесс.

Наряду с этим, определенный уровень дофамина на периферии, основные запасы которого содержатся в тромбоцитах крови, может служить гарантом, противоопухолевой защиты организма, поскольку обладает способностью подавлять пролиферацию опухолевых клеток и ангиогенез в опухоли. Игровая роль в дифференцировке цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов и контроле их киллерной активности при усилении образования конъюгатов иммунных эффекторов и клеток-мишеней, дофамин может участвовать в активной фазе противоопухолевых иммунных реакций организма. В данном случае катехоламин дофамин можно расценивать в качестве эндогенного токсического агента для опухолевых клеток. Последнее также вносит свой вклад в защиту организма от нарушений, связанных с ускоренным старением, которые, очевидно, ограничивают срок жизни.

Таким образом, вышеизложенное подтверждает мнение исследователей, что дофаминергические нейроны участвуют в «интриге», ограничивающей жизнь, поскольку их полагают главными биомаркерами старения, а дофамин обладает антистрессорной и противоопухолевой активностью. Поэтому на основании приведенных данных можно выдвинуть гипотезу о центральных нейрональных механизмах опухолевого процесса, что, вероятно, послужит предпосылкой более глубокого изучения этого вопроса и возможности включения геропротекторов и антидепрессантов (антистрессоров) в потенциал профилактики и терапии злокачественных новообразований.

References

1. Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2011; 63(1): 182-217.
2. Abdel-Hamid N.M., Shehata D.E., Abdel-Ghany A.A., Ragaа A., Wahid A. Serum serotonin as unexpected potential marker for staging of experimental hepatocellular carcinoma. *Biomed. Pharmacother.* 2016; 83:407-11.
3. Chakroborty D., Sarkar C., Basu B., Dasgupta P.S., Basu S. Catecholamines regulate tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2009; 69(9): 3727-30.
4. Moreno-Smith M., Lu C., Shahzad M.M., Pena G.N., Allen J.K., Stone R.L., Mangala L.S., Han H.D., Kim H.S.,

Farley D., Berestein G.L., Cole S.W., Lutgendorf S.K., Sod A.K. Dopamine blocks stress-mediated ovarian carcinoma growth. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17(11): 3649-59.

5. Magnini F., Sabbatini M., Capacchietti M., Amantini C., Bianchi E., Artico M., Tammara A., T-cell subpopulations express a different pattern of dopaminergic markers in intra- and extra-thymic compartments. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 2013; 27 (2): 463-75.

6. Da Prada, M., Picotti, G.B. Content and subcellular localization of catecholamines and 5-hydroxytryptamine in human and animal blood platelets: monoamine distribution between platelets and plasma. *Br. J. Pharmacol.* 1979; 65: 653-62.

7. Eisenhofer G., Coughtrie M.W., Goldstein D.S. Dopamine sulphate: an enigma resolved. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1999; 26: S41-53.

8. Frankhauser P., Grimmer Y., Bugert P., Deuschle M., Schmidt M., Schloss P. Characterization of the neuronal dopamine transporter DAT in human blood platelets. *Neurosci. Lett.* 2006; 399(3): 197-201.

9. Nebigil C.G., Launay J.M., Hickel P., Tournois C., Maroteaux L. 5-hydroxytryptamine 2B receptor regulates cell-cycle progression: cross-talk with tyrosine kinase pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97(6): 2591-6.

10. Ni W., Watts S.W. 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2006; 33(7): 575-83.

11. Pinedo H.M., Verheul H.M., D'Amato R.J., Folkman J. Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *Lancet.* 1998; 352: 1775-7.

12. Italiano J.E. Jr., Richardson J.L., Patel-Hett S. et al, Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood.* 2008; 111: 1227-33.

13. Luo Y., Roth G.S. The roles of dopamine oxidative stress and dopamine receptor signaling in aging and age-related neurodegeneration. *Antiox. Redox. Signal.* 2000; 2: 449-60.

14. Ganguly S., Basu B., Shome S. et al, Dopamine, by acting through its D2 receptor, inhibits insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced gastric cancer cell proliferation via up-regulation of Kruppel-like factor 4 through down-regulation of IGF-IR and AKT phosphorylation. *Am. J. Pathol.* 2010; 177: 2701-7.

15. Ishibashi, M., Fujisawa, M., Furue, H., Maeda, Y., Fukuyama, M., Yamaji, T. Inhibition of growth of human small cell lung cancer by bromocriptine. *Cancer Res.* 1994; 54: 3442-6.

16. Senogles S.E. D2 dopamine receptor-mediated antiproliferation in a small cell lung cancer cell line, NCI-H69. *Anticancer. Drugs.* 2007; 18(7): 801-7.

17. Chakroborty D., Chowdhury U.R., Sarkar C., Baral R., Dasgupta P.S., Basu S. Dopamine regulates endothelial progenitor cell mobilization from mouse bone marrow in tumor vascularization. *J. Clin. Invest.* 2008; 118(4): 1380-9.

18. Basu S., Sarkar C., Chakroborty D. et al. Ablation of peripheral dopaminergic nerves stimulates malignant tumor growth by inducing vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Cancer Res.* 2004; 64: 5551-5.

19. Sarkar C., Chakroborty D., Mitra R.B., Banerjee S., Dasgupta P.S., Basu, S. Dopamine in vivo inhibits VEGF-induced phosphorylation of VEGFR-2, MAPK, and focal ad-

hesion kinase in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004; 287:H1554-H1560.

20. Asada, M., Ebihara, S., Numachi, Y. et al. Reduced tumor growth in a mouse model of schizophrenia, lacking the dopamine transporter. *Int. J. Cancer.* 2008; 123: 511-18.

21. Cools A.R., Gingsras M.A. Nijmegen high and low responders to novelty: a new tool in the search after the neurobiology of drug abuse liability. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1998; 60(1): 151-9.

22. Teunis M.A., Kavelaars A., Voest E., Bakker J.M., Ellenbroek B.A., Cools A.R., Heijnen C.J. Reduced tumor growth, experimental metastasis formation, and angiogenesis in rats with a hyperreactive dopaminergic system. *FASEB J.* 2002; 16 (11): 1465-7.

23. Moreno-Smith M., Lee S.J., Lu C., Nagaraja A.S., He G., Rupaimoole R., Han H.D. et al. Biologic effects of dopamine on tumor vasculature in ovarian carcinoma. *Neoplasia.* 2013; 15(5): 502-10.

24. Sarkar C., Chakraborty D., Chowdhury U.R., Dasgupta P.S., Basu, S. Dopamine increases the efficacy of anti-cancer drugs in breast and colon cancer preclinical models. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14: 2502-10.

25. Jain R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 2005; 307(5706): 58-62.

26. Jandaghi P., Najafabadi H.S., Bauer A.S., Papadakis A.I., Fassan M., Hall A., Monast A. et al., Expression of DRD2 is increased in human pancreatic ductal adenocarcinoma and inhibitors slow tumor growth in mice. *Gastroenterology.* 2016; 5085(16): 34982-4.

27. Peverelli E., Giardino E., Treppiedi D., Locatelli M., Vaira V. Ferrero S., Bosari S., Lania A.G., Spada A., Mantovani G. Dopamine receptor type 2 (DRD2) inhibits migration and invasion of human tumorous pituitary cells through ROCK-mediated cofilin inactivation. *Cancer Lett.* 2016; 381(2): 279-86.

28. Huang H., Wu K., Ma J., Du Y., Cao C., Nie Y. Dopamine D2 receptor suppresses gastric cancer cell invasion and migration via inhibition of EGFR/AKT/MMP-13 pathway. *Int. Immunopharmacol.* 2016; 39: 113-20.

29. Borcherding D.C., Tong W., Hugo E.R., Barnard D.F., Fox S., LaSance K., Shaughnessy E., Ben-Jonathan N. Expression and therapeutic targeting of dopamine receptor-1 (D1R) in breast cancer. *Oncogene.* 2016; 35(24): 3103-13.

30. Dolma S., Selvadurai H.J., Lan X., Lee L., Kushida M., Voisin V., Whetstone H., So M., Aviv T., Park N. et al. Inhibition of Dopamine Receptor D4 Impedes Autophagic Flux, Proliferation, and Survival of Glioblastoma Stem Cells. *Cancer Cell.* 2016; 29(6): 859-73.

31. Basu S., Dasgupta P.S. Decreased dopamine receptor expression and its second-messenger AMP in malignant human colon tissue. *Dig. Dis. Sci.* 1999; 44(5): 916-21.

32. Wick M.M. The chemotherapy of malignant melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 1983; 80 (1 Suppl): 61s-2s.

33. Basu S., Dasgupta P.S. Alteration of dopamine D2 receptors in human malignant stomach tissue. *Dig. Dis. Sci.* 1997; 42(6): 1260-4.

34. Alpini G., Invernizzi P., Gaudio E., Venter J., Kopriya S., Bernuzzi F. et al. Serotonin metabolism is dysregulated in cholangiocarcinoma, which has implications for tumor growth. *Cancer. Res.* 2008; 68(22): 9184-93.

35. Drozdov, I., Kidd, M., Gustafsson, B.I. et al. Autoregulatory effects of serotonin on proliferation and signaling pathways in lung and small intestine neuroendocrine tumor cell lines. *Cancer.* 2009; 115: 4934-45.

36. Liang C., Chen W., Zhi X., Ma T., Xia X., Liu H., Zhang Q., Hu Q., Zhang Y., Bai X., Liang T. Serotonin promotes the proliferation of serum-deprived hepatocellular carcinoma cells via upregulation of FOXO3a. *Mol. Cancer.* 2013; 12: 14.

37. Pirozhok I., Meye A., Hakenberg O.W., Fuessel S., Wirth M.P. Serotonin and melatonin do not play a prominent role in the growth of prostate cancer cell lines. *Urol. Int.* 2010; 84(4): 452-60.

38. Soll C., Riener M.O., Oberkofler C.E., Hellerbrand C., Wild P.J., DeOliveira M.L., Clavien P.A. Expression of serotonin receptors in human hepatocellular cancer. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18(21): 5902-10.

39. Muller K., Gilbertz K.P., Meineke V. Serotonin and ionizing radiation synergistically affect proliferation and adhesion molecule expression of malignant melanoma cells. *J. Dermatol. Sci.* 2012; 68(2): 89-98.

40. Heinrich E., Trojan L., Friedrich D. Voss M., Weiss C., Michel M.S., Grobholz R. Neuroendocrine tumor cells in prostate cancer: evaluation of the neurosecretory products serotonin, bombesin, and gastrin-impact on angiogenesis and clinical follow-up. *Prostate.* 2011; 71(16): 1752-8.

41. Chevalier, S., Defoy, I., Lacoste, J. et al. Vascular endothelial growth factor and signaling in the prostate: more than angiogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002; 189: 169-79.

42. Chiechi A., Novello C., Magagnoli G., Petricoin E.F., Deng J., Benassi M.S., Picci P., Vaisman I., Espina V., Liotta L.A. Elevated TNFR1 and serotonin in bone metastasis are correlated with poor survival following bone metastasis diagnosis for both carcinoma and sarcoma primary tumors. *Clin. Cancer. Res.* 2013; 19 (9): 2473-85.

43. Peters M.A., Walenkamp A.M., Kema I.P., Meijer C., de Vries E.G., Oosting S.F. Dopamine and serotonin regulate tumor behavior by affecting angiogenesis. *Drug. Resistance Update.* 2014; 17(4-6): 96-104.

44. Brown P.M., Drossman D.A., Wood A.J.J. et al. The tryptophan hydroxylase inhibitor LX1031 shows clinical benefit in patients with nonconstipating irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2011; 141: 507-16.

45. Brown P.J., Rutherford B.R., Yaffe K., Tandler J.M., Ray J.L., Pott E., Chung S., Roose S.P. The depressed frail phenotype: The clinical manifestation of increased biological aging. *Am. J. Geriatr. Psychiatry.* 2016; 24 (11): 1084-94.

Сведения об авторах:

Кучеряну Валериян Григорьевич, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: vkucheryanu@mail.ru

Бочарова Ольга Алексеевна, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. иммунофармакологии, e-mail: imunofarm@ Rambler.ru

© Коллектив авторов, 2018
УДК 577.125.8:615.217.4+616.12-008.331.1

Белобородова Н.В., Мороз В.В., Бедова А.Ю.

О роли ароматических микробных метаболитов

ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии»,
107031, г. Москва, Россия, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

Интеграция метаболизма макроорганизма и его микробиоты, обеспечивающая в норме симбиоз и саногенез, нарушается при заболеваниях, травме, критическом состоянии, и вектор взаимодействия может изменяться в пользу прокариотов по принципу «метаболиты бактерий — против хозяина». Анализ литературы показал, что, с одной стороны, имеется живой интерес к ароматическим микробным метаболитам, с другой — отсутствует четкое представление об их роли в организме человека. Публикации, касающиеся ряда ароматических микробных метаболитов (фенилкарбоновых кислот, ФКК), как правило, не связаны между собой по тематике и направлены на решение тех или иных прикладных задач в разных областях биологии и медицины. Цель обзора — анализ информации о происхождении, биологических эффектах ФКК в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, и клинических наблюдениях. Обобщая результаты приведенных в обзоре исследований на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях, логично предположить участие ароматических микробных метаболитов в патогенезе полиорганной недостаточности при сепсисе. Наиболее перспективным для раскрытия роли ароматических микробных метаболитов представляется изучение механизмов вторичной почечной недостаточности и септической энцефалопатии. Важным направлением для будущих исследований является изучение влияния продуктов микробной биodeградации ароматических соединений на развитие диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, артериальной гипотензии и септического шока. Результаты дальнейших исследований будут иметь не только фундаментальное значение, но и обогатят практическую медицину новыми диагностическими и лечебными технологиями.

Ключевые слова: критические состояния; метаболомика; фенилкарбоновые кислоты; органная дисфункция; сепсис.

Для цитирования: Белобородова Н.В., Мороз В.В., Бедова А.Ю. О роли ароматических микробных метаболитов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(1): 97–108. DOI:

Для корреспонденции: Белобородова Наталья Владимировна, доктор мед. наук, проф., руководитель лаб. метаболизма при критических состояниях ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», e-mail: nybeloborodova@yandex.ru.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда №15-15-00110.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 28.10.2016

Beloborodova N.V., Moroz V.V., Bedova A.Yu.

The role of aromatic microbial metabolites

Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation, 107031 Russian Federation, Moscow, Petrovka str., 25, bld. 2

Significant increases in blood concentrations of some aromatic metabolites (phenylcarboxylic acids, PhCAs) in patients with sepsis have been previously shown. Enhanced bacterial biodegradation of aromatic compounds has been demonstrated to considerably contribute to this process. Integration of macroorganism metabolism and its microbiota, which provides normal symbiosis and sanogenesis, is disturbed in diseases, trauma, and critical conditions. Direction of this interaction may change in favor of prokaryotes according to the principle, “bacterial metabolites are against the host”. Analysis of literature showed a particular interest of many investigators to aromatic microbial metabolites. However, there is no clear understanding of their role in the human body. Publications on PhCAs are generally not thematically interrelated and usually focus on solving applied tasks in different fields of biology and medicine. The aim of this work was to consolidate existing information about origin and biological effects of PhCAs in *in vitro/in vivo* experiments and some clinical findings. The presented summary of reported data from studies performed at cellular, sub-cellular, and molecular levels suggests participation of aromatic microbial metabolites in the pathogenesis of multiple organ failure in sepsis. Studying mechanisms of secondary renal failure and septic encephalopathy is most promising for discovering the function of aromatic microbial metabolites. Effects of microbial biodegradation products of aromatic substances on development of disseminated intravascular coagulation, hypotension, and septic shock are an important challenge for future studies. Results of further investigations will be not only fundamental, but will also enrich medical practice with new diagnostic and therapeutic technologies.

Keywords: critical condition; metabolomics; phenylcarboxylic acid; organ failure; sepsis.

For citation: Beloborodova N.V., Moroz V.V., Bedova A.Yu. The role of aromatic microbial metabolites. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(1): 97–108. (in Russian). DOI:

For correspondence: Natalia V. Beloborodova, Doctor of Medical Sciences, Leading Researcher Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, 107031 Russian Federation, Moscow, Petrovka str., 25, bld. 2, e-mail: nvbeloborodova@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. This work was supported by Russian Science Foundation № 15-15-00110.

Received 28.10.2016

Введение

В последние два десятилетия стремительное развитие так называемых постгеномных технологий (протеомика, транскриптомика, метаболомика и др.), обогатило биологические и медицинские науки новыми знаниями, которые нередко требуют анализа и переосмысления полученных ранее экспериментальных и клинических данных. В прикладном аспекте наиболее перспективными являются результаты метаболомных исследований, поскольку именно метаболиты отражают степень экспрессии генов, функциональную активность клеточных ферментов и т.д., тем самым с наибольшей вероятностью могут претендовать на роль биомаркеров и участников патологических процессов. Результаты метаболомного анализа позволили обнаружить ароматические микробные метаболиты в крови больных и здоровых людей. Так, ранее в крови больных с сепсисом обнаружено значительное повышение концентраций ряда ароматических метаболитов (фенилкарбоновых кислот — ФКК). Доказан существенный вклад бактерий в этот процесс вследствие усиленной микробной биодegradации ароматических соединений. В крови постоянно присутствуют ФКК в стабильно низких концентрациях (1–2 мкМ), что можно рассматривать в свете интеграции метаболизма человека и его микробиома [1–3].

Взаимодействия метаболитов бактерий с организмом человека, естественные и гармоничные в норме, приобретают искаженный характер при различных заболеваниях, что максимально проявляется при критических состояниях, а усугубление дезинтеграции эндогенных метаболических путей человека и микробиоты ведет к полиорганным нарушениям и фатальному исходу [3–5].

Среди разных групп низкомолекулярных природных соединений, таких, как жирные кислоты, альдегиды, кетоны, спирты и фенилсодержащие метаболиты, наиболее клинически значимыми при инфекции и сепсисе оказались ароматические моноциклические или фенольные метаболиты, а именно — ФКК [1–5].

Цель обзора — анализ информации о происхождении ФКК и их участии в общебиологических и патологических процессах.

О происхождении фенилкарбоновых кислот

ФКК — это вторичные ароматические моноциклические метаболиты, широко распространенные в природе, где они могут быть синтезированы растениями и некоторыми бактериями по так называемому «шикиматному» пути из фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата [6, 7]. У животных и человека данный метаболический путь отсутствует, однако наличие микробиоты в организме млекопитающих компенсирует этот «недостаток»: многовидовое сообщество кишечных бактерий обеспечивает последовательную биодegradацию более сложных соединений — ароматических аминокислот [8, 9], в меньшей степени — полифенолов [10–12], с образованием ФКК [13]. Считается, что фенилуксусная (ФУК), фенилпропионовая (ФПК) и фенилмолочная (ФМК) кислоты являются продуктами метаболизма фенилаланина, а п-гидроксифенилуксусная (п-ГФУК) и п-гидроксифенилмолочная (п-ГФМК) кислоты — тирозина [8, 9, 14]. Микробный путь происхождения ФКК в крови людей подробно исследуется в работе 2009 года [14].

Во второй половине XX столетия публикации о ФКК были связаны с изучением таких заболеваний, как фенилкетонурия [15, 16] и тирозинемия [17, 18], при которых генетически обусловленные нарушения нормального эндогенного метаболизма фенилаланина и тирозина в печени и почках приводят к запуску альтернативных путей катаболизма этих аминокислот. У людей с фенилкетонурией или тирозинемией дефицит соответствующих ферментов (фенилаланин-4-гидроксилазы, фумарилацетоацетат гидроксилазы, тирозинаминотрансферазы) проявляется накоплением ряда ФКК в организме [15]. Так, при исследовании образцов мочи 44 больных фенилкетонурией выявлены метаболиты фенилаланина (в мкг/мкг креатинина): о-ГФУК (0,06–0,28), ФМК (0,6–1,7), фенилпировиноградная кислота (0,6–1,1); и метаболиты тирозина: п-ГФМК (0,01–0,17) и п-гидроксифенилпировиног-

радная кислота (0,01—0,05) [16]. У больных тирозинемией выявлена повышенная экскреция п-гидрокси-фенилпировиноградной кислоты, п-ГФМК и п-ГФУК [17]. Именно с высокими концентрациями перечисленных выше соединений авторы связывают проявление энцефалопатии у этого контингента больных, что не исключает возможного участия ароматических метаболитов в развитии энцефалопатий и другого генеза.

В последние годы интерес к ФКК претерпевает ренессанс, связанный с накоплением фактов об участии этих природных соединений в механизмах развития ряда заболеваний, в том числе жизнеугрожающих патофизиологических состояний [3, 19—23]. Современные технологии позволяют определять уровни ФКК практически во всех биологических средах организма, однако на сегодняшний день в справочниках по лабораторной диагностике нет данных о референсных значениях ФКК. Ряд работ посвящен исследованию их уровня в крови [15, 21, 24], спинномозговой жидкости [25, 26], моче [15, 17] и в фекальных водах [13, 27]. Представляется актуальным сделать срез современных знаний о биологических свойствах ФКК и их значении при различных заболеваниях. В обзоре будут освещены наиболее интересные работы, документирующие присутствие изучаемых ФКК у здоровых людей и существенное изменение их уровня в крови при патологических процессах и некоторых заболеваниях.

Клинические исследования

Сепсис и инфекционный процесс

Доказано, что уровень изучаемых ФКК в крови септических больных значительно отличается от показателей здоровых добровольцев [24, 28]: уровни ФМК, п-ГФУК и п-ГФМК статистически значимо выше среди больных с неблагоприятным исходом по сравнению с показателями выживших септических больных [28]. Установлена прямая тесная корреляционная связь уровня ФКК с показателями тяжести состояния по шкалам APACHE II и SOFA; важно подчеркнуть, что такой эндогенный метаболит, как лактат уступает по своей прогностической значимости в сравнении с ароматическими микробными метаболитами [28]. Результаты наших работ подтверждаются данными североамериканского исследования, опубликованного в 2014 г. С использованием методов газовой и жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием проанализировано более 400 низкомолекулярных веществ плазмы крови больных в критическом состоянии ($n = 239$). Авторы обнаружили наибольший потенциал для прогноза 28-дневной летальности у 7 метаболитов, одним из

которых оказалась п-ГФМК (многофакторный анализ двух выборок: $n_1 = 90$, $\beta_1 1,09$, $\rho_1 = 0,0003$ и $n_2 = 149$, $\beta_2 0,86$, $\rho_2 = 0,00001$) [19]. При поиске механизмов потенциального влияния микробных метаболитов на иммунореактивность обнаружена способность гидроксированных ФКК подавлять фагоцитарную активность нейтрофилов [29], что может служить пусковым моментом в развитии неадекватного иммунного ответа у реанимационных больных при повышенной микробной нагрузке.

Новообразования и онкология

Сегодня активно работает несколько зарубежных проектов по метаболомике злокачественных опухолей, но доступ к результатам этих исследований ограничен. В частности, известно, что с целью поиска ранних маркеров аденокарциномы яичников проведено метаболомическое профилирование экстрактов, полученных из биоптатов ткани яичников пациенток ($n = 30$) Комплексного онкологического центра (Comprehensive Cancer Center) Университета Алабамы в Бирмингеме. По результатам гистологического исследования биоптаты подразделены на три подгруппы: 12 образцов с нормальной тканью яичников, 11 с первичной эпителиальной аденокарциномой яичников I—III стадии и 7 образцов метастатических опухолей в сальнике (III — IV стадия рака). Уровень фенилаланина и его метаболитов в группе с метастатическими опухолями практически не отличался от нормы. В группе с первичной эпителиальной аденокарциномой яичников (стадии I—III) ФУК увеличилась в 2 раза ($p = 0,0203$), ФМК — 195 раз ($p = 0,0023$) по сравнению с нормой, а п-ГФУК практически не отличалась. Авторы предполагают, что ФМК способствует росту онкологических новообразований, и метаболомический путь фенилаланина в опухолях направлен на ее накопление [23].

Высшая нервная деятельность и психиатрия

ФУК является метаболитом фенилэтиламина — предшественника некоторых моноаминовых нейромедиаторов и нейромодуляторов [26]. При измерении концентраций ФУК в спинномозговой жидкости обнаружено, что уровень этого метаболита у больных с первичными депрессивными заболеваниями был статистически значимо ниже, чем у здоровых (20,8 и 28,7 нг/мл соответственно, $p < 0,05$); причем у мужчин это различие было еще более выраженным, $p < 0,005$ [26]. В другом исследовании отмечено статистически значимое снижение экскреции ФУК с мочой у больных с нелечеными депрессивными расстройствами ($n = 48$) по сравнению с нормой ($n = 42$): 103 ± 16 мг/сутки и 141 ± 10 мг/сутки соответственно [30].

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) изучены образцы спинномозговой жидкости ($n = 219$) от 202 пациентов с различными неврологическими и психическими расстройствами на содержание п-ГФУК — основного метаболита п-тирамина [25]. Обследовались больные в широком возрастном диапазоне — от 3 мес. до 77 лет. Результаты статистической обработки выявили, что уровень п-ГФУК в группе пациентов младше 15 лет ($n = 105$) значительно выше, чем в старшей группе ($n = 114$) — 9,9 и 7,2 нг/мл соответственно, $p < 0,001$. В связи с обнаруженным фактом дальнейший анализ различий содержания п-ГФУК в спинномозговой жидкости продолжен в группе обследованных старше 16 лет. Оценка психиатрического статуса проведена в соответствии с «Диагностическим и статистическим руководством по психическим расстройствам» (DSM III). Выявлено значительное снижение уровня п-ГФУК у больных с шизофренией ($n = 26$) по сравнению с подгруппой контроля — пациенты без неврологических нарушений ($n = 17$) — 5,3 и 8,5 нг/мл соответственно, $p < 0,01$. Кроме того, не выявлено различий между средними значениями п-ГФУК в подгруппе больных с эпилепсией по сравнению с контролем, но обнаружено значительное снижение уровня п-ГФУК у больных с тонико-клоническими судорогами в сравнении с контролем, $p < 0,05$. У 14 из 202 обследованных на анализ брали не только первые миллилитры ликвора (с 3-го по 4-й мл), но и последующие — с 8-го по 10-й мл. Во второй пробе уровень п-ГФУК оказался выше в среднем на 1,22 (1,04—1,58) нг/мл, что привлекло внимание авторов и позволило им предположить участие ЦНС в происхождении этого метаболита в ликворе [25]. Однако результаты этого исследования не позволили авторам подтвердить клиническую значимость уровня п-ГФУК в ликворе для дифференциальной диагностики различных психических и неврологических расстройств.

Пищеварение и питание

Существует мнение, что изменение уровня ФКК в биологических жидкостях человека может быть связано с алиментарным фактором — использованием в пищу избыточного количества нативных ФКК или их предшественников — аминокислот и полифенолов, метаболизируемых микробиотой кишечника до монокличных соединений. Исследованию этого вопроса посвящен ряд работ. Так, в клиническом исследовании Henning S.M. с соавт. больные с раком простаты ($n = 69$) пили черный ($n = 22$) и зеленый ($n = 23$) чай, а в группе контроля — пили воду ($n = 24$). Авторы обнаружили, что прием зеленого чая, богатого полифенолами — предшественниками ФКК в мета-

болических путях бактерий, по 6 чашек в день на протяжении 1 мес приводит к повышению уровня п-ГФУК, в сравнении с контролем [31]. В другой работе на 10 здоровых добровольцах продемонстрировано повышение уровня ряда монофенольных кислот в плазме крови через 30 мин и 1 ч после приема пива, содержащего свободные ФКК и полифенолы. Так, например, уровень свободной п-ГФУК повысился более чем в 3 раза через 30 мин после приема напитка [32].

Кишечник является богатым источником ФКК, что подтверждено хроматографическими исследованиями проб его содержимого. В фекальных водах пяти здоровых добровольцев уровень ФПК составил 165 ± 174 мкМ, ФУК 479 ± 391 мкМ, а п-ГФУК 18 ± 9 мкМ [13]. У 10 здоровых мужчин с сохранением привычного питания после 4 дней приема малинового пюре по 200 г/день, содержащего большое количество полифенолов, было отмечено статистически значимое увеличение уровней ФУК в кишечнике у 7 из 10 (70%), а п-ГФУК и ФПК — у 6 из 10 человек (60%). Авторы вынуждены констатировать, что микробиота кишечника обследованных очень вариабельна, что не позволило им выявить общих тенденций в изменении состава бактерий кишечника, или хотя бы объединить индивидуальные показатели ФКК для общей статистической обработки [27]. Изменение качественного и количественного состава ФКК в кишечном содержимом, безусловно, зависит от состава пищи, но, как показано в нашем исследовании на примере 72 здоровых доноров, не придерживающихся каких-либо диет, практически не отражается на уровне ФКК в крови [2]. Этот факт свидетельствует о существовании механизмов, направленных на поддержание стабильно низких концентраций ФКК для сохранения гомеостаза.

При обследовании больных с хронической почечной недостаточностью, нуждающихся в гемодиализе, среди перенесших колэктомию, уровень глютамин-связанной ФУК в крови оказался в 14 раз ниже, чем у больных с сохраненным кишечником, что подтверждает роль микробиоты в образовании ФКК [33]. На микробном происхождении ФМК, п-ГФУК и п-ГФМК акцентировали внимание и другие исследователи, анализируя значительное снижение экскреции этих метаболитов с мочой у больных с синдромом укороченного кишечника [34]. Ситкин С.И. и соавт. обнаружили повышение уровня ФУК и п-ГФУК в сыворотке крови больных с язвенным колитом ($n = 20$) по сравнению с показателями у больных с целиакией ($n = 35$) и в группе контроля ($n = 20$), в то время как уровень ФПК при колите был статистически значимо снижен. Авторы связыва-

ют изменение уровней ФКК с нарушением естественного микробиоценоза ЖКТ [21].

Детоксикация и патология органов выведения

Muting D. и соавт. методом газовой хроматографии измерили п-ГФМК в моче здоровых людей и больных с циррозом печени, осложненным и неосложненным печеночной энцефалопатией. В моче здоровых людей ($n = 20$) и больных с циррозом печени без печеночной энцефалопатии ($n = 50$) п-ГФМК не обнаружена, в то время как у больных с циррозом печени и печеночной энцефалопатией п-ГФМК присутствует, и ее количество нарастает в зависимости от стадии печеночной энцефалопатии. Также авторы подчеркнули, что, на их взгляд, обнаруженная п-ГФМК в первую очередь является продуктом метаболизма кишечных бактерий, и только во вторую очередь результатом некроза клеток печени [35]. При исследовании образцов суточной мочи 7 больных с циррозом печени и 3 здоровых добровольцев отмечено, что при циррозе печени наблюдается повышенная экскреция с мочой п-гидроксифенилпириовиноградной, п-ГФУК, п-ГФМК и п-гидроксibenзойной кислот [36].

В другой работе измеряли уровни фенилаланина, тирозина и 13 ФКК в плазме и моче после приема фенилаланина (100 мг/кг) здоровыми добровольцами (5 человек), больными с хронической почечной недостаточностью (ХПН, 5 больных) и больными нуждающимися в гемодиализе (3). Уровни фенилаланина и тирозина в образцах суточной мочи в группах оказались сопоставимыми, в то время как у больных с ХПН и нуждающихся в гемодиализе наблюдался рост концентраций ФМК, п-ГФУК, п-гидроксibenзойной кислот и глютамин-связанной ФУК в плазме крови [37]. Другие исследователи также отмечают повышение концентраций п-ГФУК [38] и ФУК [20] в крови больных с ХПН и оценивают влияние процедуры гемодиализа на изменение содержания этих веществ в крови. В нашей работе оценены эффекты различных экстракорпоральных методов детоксикации на уровень ФКК в крови 10 больных с системным воспалительным ответом инфекционного или неинфекционного генеза. Выявлено, что ведущее значение в элиминации этих веществ играет диффузия через мембрану диализатора или гемофильтра [39].

Экспериментальная терапия в клинике

Из 5 клинически значимых кислот, рассматриваемых в обзоре, наиболее изученной является ФУК. Один из препаратов на ее основе применяется в клинической практике, а второй прошел несколько стадий клинических испытаний. В комплексе с бензойной кислотой ФУК используется в виде инфузионно-

го препарата для лечения гипераммонемии, вызванной нарушениями орнитинового цикла. Снижение уровня свободного аммиака обусловлено образованием фенилацетилглутамина и гиппуровой кислоты с их последующим выведением [40, 41].

В связи со способностью ФУК тормозить пролиферацию опухолевых клеток проведено клиническое исследование по изучению фармакокинетики ее инфузионного препарата [42]. С этой целью обследовано 17 пациентов (16 мужчин и 1 женщина) с прогрессирующими солидными опухолями, для которых традиционная терапия была неэффективна. Критерии включения: статус Карновского более 60% (когда больной иногда нуждается в помощи, но в основном обслуживает себя сам), нормальный уровень печеночных трансаминаз, общего билирубина, креатинина, уровень лейкоцитов $>3,5 \times 10^9/\text{л}$ и тромбоцитов $>150 \times 10^3/\text{л}$. В исследование включено 9 пациентов с прогрессирующим, метастатическим, гормонорезистентным раком простаты, 6 пациентов с анапластическими астроцитомами или мультиформными (множественными) глиобластомами, 1 пациент с ганглиоглиомой и 1 со злокачественной мезотелиомой плевры. При инфузии 150 мг/кг ФУК практически сразу начинался процесс ее конъюгации с глютамином, который продолжался около 10 ч; при этом 99% препарата выводилось с мочой в виде фенилацетилглутамина. Одновременное исследование образцов сыворотки крови и спинномозговой жидкости 2 больных выявило способность свободной ФУК легко преодолевать гематоэнцефалический барьер, в то время как связанная форма определялась в ликворе в значительно меньших концентрациях [42]. В 3 случаях при передозировке у больных наблюдалось токсическое действие на ЦНС, проявляющееся в виде вялости, спутанности сознания и рвоты [42]. В 3 из 9 случаев у пациентов с раком простаты простатспецифический антиген оставался стабильным в течение более чем 2 мес. У четвертого пациента, принимавшего 180 мг морфина ежедневно, в связи с болями в костях, удалось перейти от наркотической анальгезии к использованию нестероидных противовоспалительных средств. У одного из 6 пациентов с мультиформной (множественной) глиобластомой, рецидивирующей после операций, радио- и химиотерапий, наблюдалось улучшение статуса Карновского, интеллектуальной функции и выраженности афазии на протяжении более чем 9 мес. С помощью магнитно-резонансной томографии показано, что размеры опухоли у этого больного не изменились, однако документировано значительное уменьшение перитуморального отека, а количество стероидных препаратов, используемых в терапии, сохранялось неизменным на протяжении

всего наблюдения [42]. На данном этапе исследования по оценке клинической эффективности ФУК в лечении онкологических заболеваний продолжают-ся [43, 44].

Результаты клинического изучения основных биологических эффектов ФКК обобщены в табл. 1.

Экспериментальные исследования

Экспериментальные исследования на животных

В экспериментальном исследовании на крысах Вистар (масса 300—350 г) изучен эффект трансдуденального введения L и D изомеров ФМК в концентрации 10 и 100 мкг на животное. Оценка актив-

Таблица 1

Исследования фенолкарбоновых кислот в клинике

ФКК	Группы больных vs. Контроль	Материал	Метод	Основной результат по сравнению с контролем	Авторы, год
ФМК, п-ГФУК, п-ГФМК	Больные с острыми хирургическими заболеваниями органов брюшной полости (n = 58) Здоровые (n = 25)	Сыворотка крови	ГХ-ПИД	п-ГФМК, п-ГФУК и ФМК прямо коррелируют с показателями тяжести состояния; динамика суммы трех ФКК тесно связана с прогнозом летальности	Мороз В.В. и др., 2016 [28]
ФУК, ФМК, п-ГФУК, п-ГФМК, ФПК	Сепсис (n = 22) Пневмония (n = 20) Периоперационный период (n = 36) Здоровые (n = 16)	Сыворотка крови	ГХ-МС	При сепсисе п-ГФМК, ФМК, п-ГФУК, ФУК выше, чем при пневмонии. ФМК и п-ГФМК выше у умерших по сравнению с выжившими больными	Белобородова Н.В. и др., 2012 [24]
ФУК, ФМК, п-ГФУК, п-ГФМК	Больные в критическом состоянии (n = 239)	Плазма	ГХ-МС, ВЭЖХ-МС	п-ГФМК и ФМК тесно связаны с прогнозом 28-дневной летальности	Rogers A.J. et al., 2014 [19]
ФУК, ФМК	Первичная аденокарцинома яичников (n = 11) Метастатические опухоли в сальнике (n = 7) Интактные яичники (n = 12)	Ткань яичников	ГХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС	В биоптатах первичной аденокарциномы яичников ФУК и ФМК достоверно выше нормы	Fong M.Y. et al., 2011 [23]
ФУК	Депрессивные расстройства (n = 48) Здоровые (n = 42)	Моча	ГХ-МС	Экскреция ФУК с мочой достоверно ниже нормы	Gusovsky F. et al., 1984 [30]
ФУК	Депрессивные заболевания (n = 24) Психически здоровые (n = 30)	СМЖ*	ГХ-МС	Уровень ФУК достоверно ниже, чем у психически здоровых людей	Sandler M.et al., 1979 [26]
п-ГФУК	Неврологические и психические заболевания (n = 185) Больные без неврологических и психических заболеваний (n = 17)	СМЖ	ВЭЖХ-ЭХ Д	При шизофрении п-ГФУК ниже, чем у пациентов с нормальным психоневрологическим статусом	Kobayashi K, et al., 1984 [25]
ФУК, п-ГФУК, ФПК	Язвенный колит (n = 20) Целиакия (n = 35) Здоровые (n = 20)	Сыворотка крови	ГХ-МС	ФУК и п-ГФУК повышены, а ФПК снижен при язвенном колите по сравнению с нормой и с целиакией	Ситкин С.И. и др., 2013 [21]
п-ГФМК	Цирроз печени без энцефалопатии (n = 50) Цирроз печени с печеночной энцефалопатией (n = 79) Здоровые (n = 20)	Моча	ГХ-ПИД	п-ГФМК в моче — только при циррозе печени, осложненном печеночной энцефалопатией, уровень пропорционален степени тяжести энцефалопатии	Muting D. et al., 1985 [35]
п-ГФУК, п-ГФМК	Цирроз печени (n = 7) Здоровые (n = 3)	Моча	ГХ-МС	При циррозе печени отмечена повышенная экскреция с мочой п-ГФУК и п-ГФМК	Leibich H.M. et al. 1985 [36]
ФМК, п-ГФУК, ФУК	Больные ХПН** (n = 8) Здоровые (n = 5)	Плазма, моча	ГХ-МС	п-ГФУК и ФМК в плазме повышены	Jones M.R. et al., 1978 [37]
ФМК, п-ГФУК, п-ГФМК, ФПК	Сепсис / воспалительная реакция на фоне ХПН / ОПН*** (n = 10)	Сыворотка крови	ГХ-ПИД	Уровни ФМК, п-ГФУК, п-ГФМК достоверно снижались у больных после проведения гемодиализа и гемодиализа-фильтрации	Хорошилов С.Е. и др., 2015 [39]
Внутри-венный препарат ФУК	Солитарные опухоли (n = 17)	Сыворотка крови, моча, СМЖ	ВЭЖХ-УФ	ФУК: выявлен противовоспалительный эффект, способность к преодолению гематоэнцефалического барьера; продукт метаболизма фенилацетилглутамин выводится почками	Thibault A. et al., 1994 [39]

Примечание. * СМЖ — спинномозговая жидкость; ** ХПН — хроническая почечная недостаточность, *** ОПН — острая почечная недостаточность.

ности симпатического нерва почки и блуждающего нерва выполнялась на осциллографе с фиксацией результатов на магнитной ленте. В результате получены данные об изменении показателей электрической активности вегетативной нервной системы и артериального давления при введении обоих изомеров ФМК (табл. 2), в то время как в контрольной группе (трансдуоденальное введение аналогичного объема физиологического раствора) эффектов не наблюдалось. Авторы предлагают использовать ФМК в качестве гипотензивного средства при повышенном артериальном давлении [45]. В то же время, в клинике тенденция к жизнеугрожающей гипотензии при тяжелой инфекции (септический шок) на фоне высоких уровней ФКК (включая ФМК) указывает на потенциально негативный эффект этих метаболитов.

Было показано, что введение ФМК в концентрации 50 мг/кг кроликам перед экспериментальной окклюзией нисходящей ветви коронарной артерии приводит к уменьшению элевации S-T сегмента на ЭКГ в сравнении с контролем [46]. Также под действием ФМК отмечается ингибирование синтеза тромбосана A₂ (двукратное снижение уровня тромбосана A₂ в сравнении с контролем на 5-й мин после окклюзии) и отсутствие влияния на уровень продукции простаглицлина [46]. Добавление ФМК в обогащенную тромбоцитами плазму кроликов способствует снижению агрегации, индуцированной коллагеном, при этом эффект является дозозависимым — снижение агрегации на 45 и 91% при дозировке ФМК 250 мкг/мл и 500 мкг/мл соответственно [47]. Введение ФМК крысам в дозировке 100 мг/кг снижает тромбообразование на 38% по сравнению с группой контроля

[47]. Поскольку у больных с сепсисом регистрируются повышенные уровни ФКК в крови, приведенные данные позволяют предположить участие ФМК в развитии гипокоагуляции и синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, что требует изучения в клинике.

В эксперименте при перфузии почек, печени и задней конечности крыс раствором ФМК выявлено, что только почки участвуют в переходе ФМК в фенилаланин через фенилпируват, при этом только в почках наблюдалось снижение глюконеогенеза из лактата на 28%, а реабсорбция Na и клубочковая фильтрация оставались неизменными [48].

При исследовании бластомогенных свойств ФМК и п-ГФМК в эксперименте на мышах выявлено, что введение 2,5 мг п-ГФМК дважды в неделю подкожно приводит к более частому развитию опухолей в сравнении с контролем, для ФМК такого эффекта не обнаружено [49]. Более того, противоположный эффект ФМК установлен в исследовании на клеточных культурах мышей — выявлена способность ФМК ингибировать рост клеток меланомы и в тех же концентрациях (2 мМ) не подавлять рост здоровых клеток сердца [50].

Эксперименты in vitro на клетках и субклеточных структурах

Экспериментально изучена способность ряда ФКК, субстратов тирозина подавлять активность тирозиназы. Для получения тирозиназы авторы использовали продуцирующую её культуру генетически модифицированных клеток почек эмбриона человека (НЕК293-ТΥR). Под действием ФМК активность

Эффект трансдуоденального введения фенилмолочной кислоты крысам [45]

Таблица 2

Параметр	Изомер	Доза, мкг	Эффект*
Артериальное давление	D	10	—
		100	↓
	L	10	—
		100	↓
Электрическая активность симпатической нервной системы	D	10	↑
		100	↓
	L	10	—
		100	↓
Электрическая активность парасимпатической нервной системы	D	10	—
		100	—
	L	10	—
		100	↓ → ↑

* Примечание. « — » — отсутствие эффекта, ↓, ↑ — уменьшение, увеличение значения показателя, ↓ ↑ — уменьшение с последующим увеличением показателя.

фермента практически не изменялась, однако ее гидроксильная форма — п-ГФМК — оказывала сильный ингибирующий эффект в концентрации 70 мкМ [51]. Нельзя исключить, что гидроксильные ФМК (п-ГФМК) в высоких концентрациях способны ингибировать и другие ферменты вовлеченные в метаболизм тирозина, например, тирозингидроксилазу, то есть влиять на синтез катехоламинов.

В экспериментальных условиях при изучении механизмов токсического действия ФМК показана способность негидроксильных кислот снижать скорость окисления NAD-зависимых субстратов, активируя открытие Ca^{2+} — и менадион-индуцированных циклоспорин-А чувствительных пор, и влиять на продукцию активных форм кислорода митохондриями печени крыс. Механизм этих митохондриальных нарушений аналогичен тому, который обнаруживается у больных с сепсисом [52]. В работе 2012 г. выявлена способность ФМК и п-ГФМК в концентрации 100 мкМ подавлять образование активных форм кислорода в нейтрофилах крыс [53].

Документировано подавление активности Ca^{2+} -АТФазы, изолированной из эритроцитов человека при добавлении ФУК в концентрации 5—375 мкМ. Также этими авторами отмечено ингибирование активности Ca^{2+} -АТФазы функционирующих лимфоцитов, изолированных из крови здоровых доноров, при ФУК равной 10 и 100 мкМ. При этом в обоих случаях эффект являлся дозозависимым [54]. Обнаружено неоднозначное действие ФУК и ФМК на активность Na^+/K^+ -АТФазы синапсом мозга крысы: наблюдался ингибирующий эффект при концентрации кислот 5—10 мкМ и 0,5—1,0 мМ и отсутствие эффекта в диапазоне 50—100 мкМ [55]. Теоретически нельзя исключить, что влияние ФМК на АТФазы может иметь значение в механизмах нарушения функций клеток, однако этой важной области посвящены лишь единичные работы.

Для ФУК в концентрации, превышающей 1000 мкМ, обнаружен ряд интересных эффектов: ингибирование экспрессии индуцибельной синтазы оксида азота мононуклеарными лейкоцитами [56], повышение экспрессии рецепторов CD11b и CD18 на поверхности нейтрофилов [22] и подавление пролиферации и дифференциации остеобластов [57], что, по мнению авторов, свидетельствует об участии ФУК в патогенезе атеросклероза и остеодистрофий, развивающихся у больных ХПН. Однако, столь высокие концентрации ФУК не характерны ни для здоровых людей [2], ни для больных ХПН [37], что затрудняет их клиническую интерпретацию.

Перечень основных биологических эффектов ФМК и краткое описание исследований приведены в табл. 3.

Микробиологические эксперименты

Ряд работ указывает на способность ФМК участвовать в механизмах конкурентного взаимодействия в микробиоценозах. Например, показана противогрибковая и бактерицидная активность ФМК и п-ГФМК, активно продуцируемых лактобактериями [60—62]. Так, на 22 штаммах микроорганизмов, изолированных от пациентов больницы Университета Кан (Caen University hospital), оценена способность ФМК подавлять рост бактерий. При добавлении ФМК в концентрации 20 мг/мл рост 5 из 6 штаммов *Staphylococcus aureus* был подавлен полностью, а 6-й частично; при этом рост трех из них частично подавлялся и при более низкой концентрации ФМК (5 мг/мл). При добавлении 20 мг/мл ФМК наблюдалось также полное ингибирование роста *Staphylococcus epidermidis* и *Listeria monocytogenes* UCMAL205, частичное — *Enterococcus* sp. Group D, *Providencia stuartii*, *Klebsiella oxytoca*, *Aeromonas hydrophila* и *Enterobacter cloacae*. При помощи электронной микроскопии на примере *Listeria monocytogenes* авторы установили, что под действием 1 мг/мл ФМК изменялось поведение и структура бактерий: они агрегировали и секретировали полисахариды, в результате чего клеточные стенки теряли ригидность, клетки набухали, происходило нарушение целостности и гибель бактерий [60]. На 12 штаммах бактерий — представителей комменсалов, пробиотиков и патогенов, изолированных из грудного молока здоровых женщин, козьего сыра и коллекции Merck Culture Collection — изучено влияние ряда фенольных кислот на активность роста культивируемых штаммов. Показана способность ФУК, ФПК и в меньшей степени п-ГФУК ингибировать рост *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, а также способность ФПК подавлять рост *Candida albicans* в концентрациях 1 мкг/мл [63]. Возможно, микростатические и бактерицидные свойства ФМК, обнаруженные в микробиологических экспериментах, участвуют в механизмах симбиоза, являются проявлением аллелопатии в биотопах человека в естественных условиях (слизистая полости рта, кишечника, дыхательных путей и т.д.).

Заключение

Ароматические метаболиты бактерий постоянно присутствуют в крови здоровых и больных людей и обладают собственной биорегуляторной активностью. Эффекты их действия на животных и человека, активно изучаются, работы в данном направлении являются актуальными и перспективными. В экспериментах демонстрируется способность ФМК воздействовать на живые организмы на молекулярном [51], субклеточном [58, 59], клеточном [5, 24, 25, 50, 53, 54] и организменном [45, 49] уровнях. Большое значение

для науки имеют не только результаты экспериментальных исследований, но и данные клинических наблюдений, которые позволяют шире взглянуть на роль этих метаболитов микробного происхождения в саногенезе, а также в развитии патологических состояний и заболеваний человека. На сегодняшний день показано, что профиль ФКК в сыворотке крови может быть использован для объективной оценки тяжести состояния больных и прогноза заболевания

[19, 28, 29, 64], эффективности методов лечения [20, 38, 39], для поиска предикторов полиорганной недостаточности [64]. Мы предполагаем участие ФКК в патогенезе клеточных и органических дисфункций (энцефалопатия, почечная недостаточность), в развитии гипокоагуляции и артериальной гипотензии. Роль ароматических метаболитов в жизнедеятельности организма недооценивается и может оказать более значимой при дальнейшем изучении.

Таблица 3

Экспериментальное изучение биологических эффектов фенолкарбоновых кислот

Биологический эффект	В эксперименте — объект	ФКК, доза	Ссылка
Подавление активности тирозиназы	<i>in vitro</i> — культура модифицированных клеток почек эмбриона человека	ГФМК 70 мкМ	Kim M. 2011 [51]
Снижение скорости продукции АФК* и открытия менадион-индуцированных циклоспорин-А чувствительных пор	<i>in vitro</i> — митохондрии печени крыс	ФМК, п-ГФМК, п-ГФМК 0,01–0,1 мМ	Белобородова, Н.В., 2013 [58]
Ингибирование активности сукцинат- и пируватдегидрогеназ	<i>in vitro</i> — митохондрии печени крыс	ФУК, ФПК 100 мкМ	Федотчева, Н.И. 2015 [59]
Снижение скорости продукции АФК нейтрофилами	<i>in vitro</i> — нейтрофилы крыс	ФМК, п-ГФМК 100 мкМ	Beloborodova N.V. 2012 [53]
Снижение фагоцитарной активности	<i>in vitro</i> — нейтрофилы человека	ФУК, ФМК, п-ГФУК, п-ГФМК 0,5–7 мкМ	Beloborodova N., 2016 [29]
Повышение экспрессии CD11b и CD18 на поверхности нейтрофилов	<i>in vitro</i> — нейтрофилы человека	ФУК 0,5–10 мМ	Cohen, G. 2013 [25]
Подавление активности Ca ²⁺ АТФазы	<i>in vitro</i> Ca ²⁺ АТФаза из эритроцитов человека; Ca ²⁺ АТФазы функционирующих лимфоцитов	ФУК 5–375 мкМ	Jankowski J. 1998 [54]
Ингибирующий эффект на активность Na ⁺ /K ⁺ -АТФазы	<i>in vitro</i> Na ⁺ /K ⁺ -АТФазы синапсом мозга крысы	ФУК и ФМК 5–10 мкМ и 0,5–1,0 мМ	Dwivedy A.K. 1982 [55]
Ингибирование синтеза тромбосана A ₂	<i>in vivo</i> — кролики	ФМК 50 мг/кг	Zhu L. 1986 [46]
Снижение тромбообразования	<i>in vivo</i> — крысы	ФМК 100 мг/кг	Zhu L. 1986 [46]
Снижение агрегации тромбоцитов	<i>in vitro</i> — обогащенная тромбоцитами плазма кроликов	ФМК 250 и 500 мкг/мл	Zhu L. 1988 [47]
Влияние на вегетативную нервную систему, показатели артериального давления	<i>in vivo</i> — крысы	D- и L-ФМК 10, 100 мкг на животное	Beppu Y. 2008 [45]
Снижение глюконеогенеза из лактата	<i>in vitro</i> — ткань почки крысы	Перфузия раствором L-ФМК	Zhu L. 1988 [47]
Ингибирование экспрессии индуцибельной синтазы оксида азота	<i>in vitro</i> — мононуклеарные лейкоциты крови человека	ФУК 0,5–2 мМ	Jankowski J. 2003 [54]
Подавление пролиферации и дифференциации остеобластов	<i>in vitro</i> — культура клеток остеобластов мыши	ФУК 0,5–5 мМ	Yano, S. 2007 [57]
Бластомогенное свойство	<i>in vivo</i> — мыши	п-ГФМК 2,5 мг дважды в неделю подкожно	Rauschenbach, M.O. 1975 [49]
Ингибирование роста клеток меланомы	<i>in vitro</i> — S-91 — клетки меланомы мыши	ФМК 2 мМ	Duke P.S. 1967 [50]

Примечание. * АФК — активные формы кислорода.

References

1. Beloborodova N.V., Osipov G.A. Small molecules originating from microbes (SMOM) and their role in microbes-host relationship. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 2000; 12(1): 12-21
2. Beloborodova N.V., Moroz V.V., Osipov A.A., Bedova A.Yu., Olenin A.Yu., Getsina M.L. et al. Normal level of sepsis-associated phenylcarboxylic acids in human serum. *Biochemistry (Moscow)*. 2015; 80(3) 374-8.
3. Beloborodova N.V. Integration of metabolism in man and his microbiome in critical conditions. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2012; 8(4): 42-54. (in Russian)
4. Beloborodova N.V. Sepsis — a new look at the problem. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2013; 11: 82-90. (in Russian)
5. Beloborodova N., Moroz V., Osipov A., Bedova A., Sarshor Y., Pautova A. et al. Disbalance of microbial metabolites of aromatic acids affects the severity in critically ill patients. *Critical Care*. 2016; 20(Suppl 2):P026
6. Herrmann K.M. The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell*. 1995; 7(7): 907-19.
7. Srinivasan P.R., Katagiri M., Sprinson D.B. The conversion of phosphoenolpyruvic acid and D-erythrose-4-phosphate to 5-de-hydroquinic acid. *J. Biol. Chem*. 1959; 234(4): 713-5.
8. Russell W.R., Duncan S.H., Scobbie L., Duncan G., Cantlay L., Calder A.G. Major phenylpropanoid-derived metabolites in the human gut can arise from microbial fermentation of protein. *Mol. Nutr. Food Res*. 2013; 57(3): 523-35.
9. Valerio F., Lavermicocca P., Pascale M., Visconti A. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiology Letters*. 2004; 233(2): 289-95.
10. Gao K., Xu A., Krul C., Venema K., Liu Y., Niu Y. et al. Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *J Nutr*. 2006; 136(1): 52-7.
11. Gonzalez-Barrio R., Edwards C.A., Crozier A. Colonic Catabolism of Ellagitannins, Ellagic Acid, and Raspberry Anthocyanins: In Vivo and In Vitro Studies. *Drug Metab. Dispos*. 2011; 39(9): 1680-8.
12. Lee H.C., Jenner A.M., Low C.S., Lee Y.K. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Research in Microbiology*. 2006; 157(9): 876-84.
13. Jenner A.M., Rafter J., Halliwell B. Human fecal water content of phenolics: The extent of colonic exposure to phenolic compounds. *Free Radic. Biol. Med*. 2005; 38(6): 763-72.
14. Beloborodova N.V., Khodakova A.S., Bairamov I.T., Olenin A.Y. Microbial origin of phenylcarboxylic acids in the human body. *Biochemistry (Moscow)*. 2009. 74(12): 1350-5.
15. Clemens P.C., Schunemann M.H., Hoffman G.F., Kohlschutter A. Plasma concentrations of phenyllactic acid in phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis*. 1990; 13(2): 227-8.
16. Chalmers R.A., Watts R.W.E. Quantitative studies on the urinary excretion of unconjugated aromatic acids in phenylketonuria. *Clin. Chim. Acta*. 1974; 55(3): 281-94.
17. Crawhall J.C., Mamer O., Tjoa S., Claveau J.C. Urinary phenolic acids in tyrosinemia. identification and quantitation by gas chromatography-mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta*. 1971; 34(1): 47-54.
18. Nakamura K., Tanaka Y., Mitsubuchi H., Endo F. Animal models of tyrosinemia. *J. Nutr*. 2007; 137(6 Suppl 1): 1556S-1560S.
19. Rogers A.J., McGeachie M., Baron R.M., Gazourian L., Haspel J.A., Nakahira K. et al. Metabolomic derangements are associated with mortality in critically ill adult patients. *PLoS One*. 2014; 9(1): e87538.
20. Scholze A., Jankowski V., Henning L., Haass W., Wittstock A., Suvd-Erdene S. et al. Phenylacetic acid and arterial vascular properties in patients with chronic kidney disease stage 5 on hemodialysis therapy. *Nephron Clin. Pract*. 2007; 107(1): 1-6.
21. Sitkin S., Tkachenko E., Vakhitov T., Oreshko L., Zhigalova T. Serum metabolome features in ulcerative colitis and celiac disease based on gas chromatography-mass spectrometry. *Gastroenterologiya Sankt-Peterburga*. 2013; 3-4: 2-10. (in Russian).
22. Cohen G., Raupachova J., Horl W.H. The uraemic toxin phenylacetic acid contributes to inflammation by priming polymorphonuclear leucocytes. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2013; 28(2): 421-9.
23. Fong M.Y., McDunn J., Kakar S.S. Identification of metabolites in the normal ovary and their transformation in primary and metastatic ovarian cancer. *PLoS One*. 2011; 6(5): e19963.
24. Beloborodova N.V., Olenin A.Yu., Khodakova A.S., Chernevskaya E.A., Khabib O.N. Low-molecular phenol metabolites in blood serum: origin and clinical significance. *Anesteziologiya i Reanimatologiya*. 2012; 5: 37-41 (in Russian).
25. Kobayashi K., Imazu Y., Shohmori T. p-Hydroxyphenylacetic Acid Concentration in the CSF of Patients with Neurological and Psychiatric Disorders. In: *Neurobiology of the Trace Amines (eds Boulton A. A. et al.)* 543-8. (Humana Press, 1984).
26. Sandler M., Ruthven C.R., Goodwin B.L., Copen A. Decreased cerebrospinal fluid concentration of free phenylacetic acid in depressive illness. *Clin. Chim. Acta*. 1979; 93(1): 169-71.
27. Gill C.I., McDougall G.J., Glidewell S., Stewart D., Shen Q., Tuohy K. et al. Profiling of Phenols in Human Fecal Water after Raspberry Supplementation. *J. Agric. Food Chem*. 2010; 58(19): 10389-95.
28. Khodakova A., Beloborodova N. Khodakova, A. Microbial metabolites in the blood of patients with sepsis. *Crit. Care*. 2007; 11(Suppl 4): P5.
29. Beloborodova N., Moroz V., Bedova A., Sarshor Y., Osipov A., Chernevskaya K. High levels of phenylcarboxylic acids reflect the severity in ICU patients and affect phagocytic activity of neutrophils. *Critical Care* 2016, 20(Suppl 1): P3. DOI 10.1186/s13054-016-1204-x
30. Gusovsky F., Sabelli H., Fawcett J., Edwards J., Javid J.I. Gas-liquid chromatographic determination of total phenylacetic acid in urine. *Anal. Biochem*. 1984; 136(1): 202-7.
31. Henning S.M., Wang P., Abgaryan N., Vicinanza R., Oliveira D.M., Zhang Y. et al. Phenolic acid concentrations in plasma and urine from men consuming green or black tea and potential chemopreventive properties for colon cancer. *Mol. Nutr. Food Res*. 2013; 57(3): 483-93.
32. Nardini M., Natella F., Scaccini C., Ghiselli A. Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. *J Nutr Biochem*. 2006; 17(1): 14-22.
33. Aronov P.A., Luo F.J., Plummer N.S., Quan Z., Holmes S., Hostetter T.H. et al. Colonic contribution to uremic solutes. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2011; 22(9): 1769-76.

34. Haan E., Brown G., Bankier A., Mitchell D., Hunt S., Blakey J. et al. Severe illness caused by the products of bacterial metabolism in a child with a short gut. *Eur. J. Pediatr.* 1985; 144(1): 63-5.
35. Muting D., Wuzel H., Bucsis L., Flasshoff H.J. Urinary p-hydroxyphenyllactic acid as indicator of hepatic encephalopathy in patients with hepatic cirrhosis. *Lancet.* 1985; 2(8468): 1365-6.
36. Leibich H.M., Pickert A. Gas chromatographic profiling of phenolic acids in urine of patients with cirrhosis of the liver. *Journal of Chromatography.* 1985; 338(1): 25-32.
37. Jones M.R., Kopple J.D., Swendseid M.E. Phenylalanine metabolism in uremic and normal man. *Kidney Int.* 1978; 14(2): 169-79.
38. Niwa T., Ohki T., Maeda K., Saito A., Ohta K., Kobayashi K. A gas chromatographic-mass spectrometric assay for nine hydroxyphenolic acids in uremic serum. *Clin. Chim. Acta.* 1979; 96(3): 247-54.
39. Khoroshilov S.E., Beloborodova N.V., Nikulin A.V., Bedova A.Yu. Impact of extracorporeal detoxification on the serum levels of microbial aromatic acid metabolites in sepsis. *Obshchaya Reanimatologiya.* 2015; 11(5): 6-14.
40. Bunchman T.E., Barletta G.M., Winters J.W., Gardner J.J., Crumb T.L., McBryde K.D. Phenylacetate and benzoate clearance in a hyperammonemic infant on sequential hemodialysis and hemofiltration. *Pediatr. Nephrol.* 2007; 22(7): 1062-5.
41. Shih V.E. Alternative-pathway therapy for hyperammonemia. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356(22): 2321-2.
42. Thibault A., Cooper M.R., Figg W.D., Venzon D.J., Sartor A.O., Tompkins A.C. A phase I and pharmacokinetic study of intravenous phenylacetate in patients with cancer. *Cancer Res.* 1994; 54(7): 1690-4.
43. Chang S.M., Kuhn J.G., Robins H.I., Schold S.C., Spence A.M., Berger M.S. et al. Phase II study of phenylacetate in patients with recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium report. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17(3): 984-90.
44. Chang S.M., Kuhn J.G., Ian Robins H., Clifford Schold S., Spence A.M., Berger M.S. et al. A study of a different dose-intense infusion schedule of phenylacetate in patients with recurrent primary brain tumors consortium report. *Invest. New Drugs.* 2003; 21(4): 429-33.
45. Beppu Y., Tsuruoka N., Komura H., Nagai K. *Medicinal composition, food or drink having effect on enhancing parasympathetic nervous activity.* Patent US 8492442 B2, US; 2008.
46. Zhu L., Shao Y.D., Dai H.J., Dong J.C., Xue F. Effects of sodium beta-3,4-dihydroxyphenyl lactate and beta-phenyl lactic acid on prostacycline and thromboxane A2 contents in the plasma of rabbits after coronary artery occlusion. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1986; 7(6): 533-6.
47. Zhu L., Shao Y.D., Wang J.Y., Lin D.L., Gu C.L., Li Y.H. et al. Effect of beta-phenyl lactic acid on platelet aggregation, thrombosis, and plasma cAMP content. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1988; 9(3): 249-51.
48. Collier V.U., Butler D.O., Mitch W.E. Metabolic effects of L-phenyllactate in perfused kidney, liver, and muscle. *Am. J. Physiol.* 1980; 238(5): E450-7.
49. Rauschenbach M.O., Zharova E.I., Sergeeva T.I., Ivanova V.D., Probatova N.A. Blastomogenic Activity of p-Hydroxyphenyllactic Acid in Mice. *Cancer Res.* 1975; 35(3): 577-85.
50. Duke P.S., Yuen T.G., Demopoulos H.B. In Vitro Growth Inhibition of S-91 Mouse Melanomas by Tyrosinase. *Cancer Res.* 1967; 27(10): 1783-7.
51. Kim M., An S.M., Koh J.S., Jang D.I., Boo Y.C. Use of non-melanocytic HEK293 cells stably expressing human tyrosinase for the screening of anti-melanogenic agents. *J Cosmet Sci.* 2011; 62(5): 515-23.
52. Fedotcheva N.I., Kazakov R.E., Kondrashova M.N., Beloborodova N.V. Toxic effects of microbial phenolic acids on the functions of mitochondria. *Toxicology Letters.* 2008; 180(3): 182-8.
53. Beloborodova N., Bairamov I., Olenin A., Shubina V., Teplova V., Fedotcheva N. Effect of phenolic acids of microbial origin on production of reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils. *Journal of Biomedical Science.* 2012; 19: 89.
54. Jankowski J., Luftmann H., Tepel M., Leibfritz D., Zidek W., Schluter H. Characterization of dimethylguanosi-ne, phenylethylamine, and phenylacetic acid as inhibitors of Ca²⁺ ATPase in end-stage renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1998; 9(7): 1249-57.
55. Dwivedy A.K., Shah S.N. Effects of phenylalanine and its deaminated metabolites on Na⁺,K⁺-ATPase activity in synaptosomes from rat brain. *Neurochem. Res.* 1982; 7(6): 717-25.
56. Jankowski J., van der Giet M., Jankowski V., Schmidt S., Hemeier M. Mahn B. et al. Increased plasma phenylacetic acid in patients with end-stage renal failure inhibits iNOS expression. *J. Clin. Invest.* 2003; 112(2): 256-64.
57. Yano S., Yamaguchi T., Kanazawa I., Ogawa N., Hayashi K., Yamauchi M. et al. The uraemic toxin phenylacetic acid inhibits osteoblastic proliferation and differentiation: an implication for the pathogenesis of low turnover bone in chronic renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2007; 22(11): 3160-5.
58. Beloborodova N., Teplova V., Fedotcheva N. *The role of microbial metabolites in mitochondrial dysfunction in sepsis. [Rol' mikrobykh metabolitov v disfunktsii mitokhondriy pri sepsise].* Lambert Academic Publishing, 2013. (in Russian)
59. Fedotcheva N.I., Litvinova E.G., Ocipov A.A., Olenin A.Ju., Mopoz V.V., Belobopodova N.V. Influence of microbial metabolites of phenolic nature on the activity of mitochondrial enzymes. *Biofizika.* 2015; 60(6): 1118-24. (in Russian)
60. Dieuleveux V., Lemarinier S., Gueguen M. Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid. *Int. J. Food Microbiol.* 1998; 40(3): 177-83.
61. Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobetti M. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66(9): 4084-90.
62. Manu D.K. *Antimicrobial effectiveness of Phenyllactic acid against foodborne pathogenic bacteria and Penicillium and Aspergillus molds:* diss. Animal Science: Iowa; 2012.
63. Cueva C., Moreno-Arribas M.V., Мартнн-Alvarez P.J., Bills G., Vicente M.F., Basilio A. et al. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Res Microbiol.* 2010; 161(5): 372-82.
64. Beloborodova N.V., Moroz V.V., Osipov A.A., Vlasenko A.V., Fateev K.M., Sarshor Y.N. et al. Prognostic value phenylcarboxylic acids in patients with acute abdomen. *Shock.* 2015; 44 (Suppl. 2) 13.

Сведения об авторах:

Мороз Виктор Васильевич, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, директор ФГБНУ «НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского»;

Бедова Александра Юрьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. метаболизма критических состояний ФГБНУ «НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского», e-mail: abedova12@gmail.com

Иванов Ю.Д.¹, Козлов А.Ф.¹, Галиуллин Р.А.¹, Иванова Н.Д.²,
Татур В.Ю.³, Зиборов В.С.⁴, Юшков Е.С.⁵, Плешакова Т.О.¹

Генерация и аккумуляция заряда в проточной системе для выявления белковых маркеров заболеваний

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», 119121, г. Москва, Россия, ул. Погодинская, д. 10

² ФГБОУ ВО «Московская Государственная Академия Ветеринарной Медицины и Биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина», 109472, г. Москва, Россия, ул. Академика Скрябина, д. 23

³ Фонд перспективных технологий и новаций, 115682, г. Москва, Россия

⁴ Объединенный институт высоких температур РАН, 125412, г. Москва, Россия, ул. Ижорская, д. 13, строение 2

⁵ Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, 115409, г. Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 31

Вода является основной компонентой в организме человека, определяющей гемодинамику. В процессе движения воды наблюдается генерация заряда, обусловленная её электрокинетическими свойствами. В работе исследована временная зависимость генерации и аккумуляции заряда в воде, движущейся по проточной системе. Показано, что при определенных условиях, временная зависимость аккумуляции заряда имеет нелинейный характер — наблюдается скачкообразное изменение регистрируемой величины (эффект электрогидродинамического барьера стекания заряда, ЭБСЗ). Появление этих скачков зависит от расстояния (l) между срезом наконечника подающей трубки проточной системы и электродом заземления, вставленным в эту трубку. Эффект наблюдается при расстоянии 1–10 см и более. Этот эффект должен учитываться в фундаментальных исследованиях свойств воды, а также при разработке моделей, описывающих гемодинамику в организме в норме и патологии. Кроме того, полученные результаты следует использовать при разработке высокочувствительных аналитических систем, таких, как нанопроводные, на основе атомно-силового микроскопа (АСМ) и других диагностических систем, предназначенных для повышения эффективности раннего выявления патологического процесса. **Цель исследования:** мониторинг генерации и аккумуляции электрического заряда при движении воды как компоненты организма и основы растворов, используемых в аналитических системах. **Методика.** Исследован процесс генерации и аккумуляции заряда в воде при ее движении в проточной системе. В качестве такой системы использовалась проточная часть АСМ-фишинг системы, с помощью которой показана возможность высокой концентрационной чувствительности анализа при обнаружении белковых маркеров заболеваний. Измерения величины электрического заряда проводились с помощью электрометра, включенного в проточную систему подачи образца системы АСМ-фишинга [1, 2]. Основные элементы системы подачи — перистальтический насос, трубка для подачи воды, полипропиленовый наконечник к трубке и измерительная ячейка. К измерительной ячейке подключен электрометр, разработанный в ИБМХ. В процессе измерений деионизованная вода непрерывно подавалась в ячейку с помощью насоса. Скорость потока (~15 мкл/с) подобрана таким образом, чтобы на наконечнике (внутренний диаметр 0,4 мм) подающей трубки формировались капли. Для поддержания постоянного потенциала в резервуаре с исходной водой, в подающую трубку вставлен электрод заземления. Расстояние от электрода до среза наконечника трубки (l) варьировалось и составляло 5, 10 или 15 см. Эксперименты проводились при t = 35°C и влажности 49%. **Результаты:** показано, что в фишинг-системе, после прохождения деионизованной воды по подающей трубке этой системы, генерируется электрический заряд, который регистрируется при поступлении воды в измерительную ячейку. По результатам измерений наблюдается аккумуляция заряда. При постоянной скорости подачи воды наблюдается как линейное увеличение величины заряда в измерительной ячейке, так и скачкообразное. Появление этого эффекта зависит от расстояния между наконечником и электродом заземления в подающей трубке — эффект обнаруживается при величине этого расстояния, 1–10 см и более. Обнаруженная скачкообразная зависимость названа эффектом электрогидродинамического барьера стекания заряда (ЭБСЗ). **Заключение.** Обнаружено, что при движении воды в проточной системе, в процессе её непрерывной подачи, в измерительной ячейке накапливается заряд, поступающий с водой из наконечника подающей трубки. Установлена линейно-скачкообразная зависимость накопления заряда в ячейке (эффект ЭБСЗ). Величина скачка накопленного заряда (порядка нескольких нКл) зависит от расстояния между наконечником и электродом заземления, вставленного в подающую трубку. Этот эффект должен учитываться при проведении фундаментальных исследований, посвященных изучению физико-химических свойств воды, а также при создании уточненных моделей, описывающих гемодинамику в организме в норме и патологии. Кроме того, полученные результаты следует использовать при разработке высокочувствительных диагностических систем на основе молекулярных детекторов, включающих проточный способ подачи образца, и предназначенных для повышения эффективности раннего выявления патологического процесса.

Ключевые слова: проточная система подачи образца; фишинг белков; генерация заряда.

Для цитирования: Иванов Ю.Д., Козлов А.Ф., Галиуллин Р.А., Иванова Н.Д., Татур В.Ю., Зиборов В.С. Юшков Е.С., Плешакова Т.О. Генерация и аккумуляция заряда в проточной системе для выявления белковых маркеров заболеваний. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 109–116. DOI:

Для корреспонденции: Иванов Юрий Дмитриевич, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. нанобиотехнологии, e-mail: yurii.ivanov@rambler.ru

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект №14-25-00132). Изготовление системы измерения заряда — электрометра, выполнено при поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013—2020 годы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.05.2017

Ivanov Yu.D.¹, Kozlov A.F.¹, Galiullin R.A.¹, Ivanova N.D.²,
Tatur V.Yu.³, Ziborov V.S.⁴, Yushkov E.S.⁵, Pleshakova T.O.¹

Generation and accumulation of charge in a flow system for detecting protein markers of diseases

¹ V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya Str. 10, Moscow, Russia

² K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnologies, Akademika Skryabina Str. 23, Moscow 109472, Russia

³ Foundation for Advanced Technologies and Innovations, Shipilovskaya Str. 64, Bld. 1, Moscow 115682, Russia

⁴ Joint Institute for High Temperatures, Izhorskaya Str. 13, Bld. 2, Moscow 125412, Russia

⁵ National Research Nuclear University, Kashirskoe Shosse 31, Moscow 105409, Russia

Water is the main component of the human body, which determines hemodynamics. Electrokinetic properties of moving water provide generation of a charge. This work focuses on time dependence of charge generation and accumulation in water passing through a flow-based system. It was shown that under certain conditions, the time dependence of charge accumulation was nonlinear; the recorded value changed in a stepwise manner (effect of electrodynamic barrier for the charge run-off, EBCRO). Emergence of these stepwise changes depends on the distance between the tip of the input pipe and the ground electrode inserted in this pipe. This effect was observed at a distance of 1–10 cm and more. The discovered effect should be taken into account in developing flow-based, highly sensitive analytic systems, such as nanowire, atomic-force microscope (AFM) based, and other systems designed to improve early detection of pathological processes. **Aim:** To monitor electric charge generation and accumulation in moving water as a main component of the body and a vehicle of solutions used in analytical systems. **Methods:** The process of charge generation and accumulation was studied in water during its motion in a flow system. In the experiments, the flow-based part of an AFM-based fishing system was used since this system provides a high concentration sensitivity in detecting protein markers of diseases. Electric charge values were measured using an electrometer incorporated in the flow system that feeds samples into the AFM-fishing system. The major elements of the sample feeding system included a peristaltic pump, a pipe for sample delivery from a tapered tip, and a measuring cell connected to an electrometer developed at the Institute of Biomedical Chemistry. During the measurements, deionized water was continuously pumped into the cell. The flow rate (~15 mL/s) was selected so that drops form on the tip nozzle (inner diameter, 0.4 mm) of the inlet pipe. To maintain a constant potential in the stock solution, a ground electrode was inserted into the inlet pipe. The distance between the electrode inside the pipe and the tip varied and was 5, 10, or 15 cm. Experiments were conducted at $t = 35^{\circ}\text{C}$ and 49% humidity. **Results.** In the fishing system, after the deionized water has passed through the feeding pipe of this system through the tip, an electric charge is generated and recorded when the water enters the measuring cell. According to results of measurements charge accumulation is observed. At a constant rate of water supply, accumulation of the charge in the measuring cell can be either linear or stepwise. Emergence of this effect depends on the distance between the tip and the ground electrode in the input pipe: the effect was detected at a distance of 1–10 cm and more. The discovered stepwise dependence was named the effect of electrodynamic barrier for the charge run-off (EBCRO). **Conclusion.** In the process of water motion during its continuous pumping through the flow-based system, a charge accumulates in the measuring cell; this charge is delivered with the water from the tip of the feeding pipe. A linear-stepwise dependence of charge accumulation in the cell (EBCRO effect) is determined. Magnitude of the stepwise change in this charge (approximately several nC) depends on the distance between the tip and the ground electrode inserted into the inlet pipe. This effect should be taken into account in both basic research focusing on physicochemical properties of water and applied research focusing on development of the models describing hemodynamics in the body. In addition, the obtained results might be used in developing highly sensitive diagnostic systems, such as nanowire, AFM-based, and other fishing systems to enhance early detection of pathological process.

Keywords: flow-based system, protein fishing, charge generation.

For citation: Ivanov Yu.D., Kozlov A.F., Galiullin R.A., Ivanova N.D., Tatur V.Yu., Ziborov V.S., Pleshakova T.O. Generation and accumulation of charge in a flow system for detecting protein markers of diseases. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(1): 109–116. (In Russian). DOI:

For correspondence: Yuri D. Ivanov, Doctor of Biological Sciences, Head of Laboratory, Institute of Biomedical Chemistry; 10 Pogodinskaya Str., Moscow, 119121, Russian Federation, e-mail: yurii.ivanov@rambler.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study was supported by Russian Science Foundation (Grant No. 14-25-00132). The fabrication of charge measurement system (electrometer) was carried out in IBMC by Galiullin R.A. with the support of the Program for Basic Research of State Academies of Sciences for 2013—2020.

Information about authors

Ivanov Yu.D., <http://orcid.org/0000-0001-5041-1914>

Pleshakova T.O., <http://orcid.org/0000-0003-3217-9095>

Received 15.05.2017

Введение

Изучение фундаментальных свойств воды является важной задачей, так как она представлена в организме как основной компонент. Физико-химические свойства воды определяют гемодинамику, которая, в свою очередь, определяется электрокинетическими свойствами воды. Поэтому изучение электрокинетических свойств воды необходимы для разработки новых моделей, описывающих гемодинамику в норме и патологии. В то же время, изучение электрокинетических свойств воды важно при проектировании новых сверхвысокочувствительных диагностических и протеомных аналитических систем, в своей основе использующих фишинг-технологии для выявления белковых маркеров заболеваний на ранней стадии патологического процесса [1—6]. Проточные системы, а также системы с импульсным вводом раствора с помощью пипеток получили широкое распространение в нанопроводных биосенсорах [6—9] и системах АСМ-фишинга [2, 4, 5], которые применялись для выявления белковых маркеров, ассоциированных с онкологическими и инфекционными заболеваниями с чувствительностью на уровне концентрации белка 10^{-15} — 10^{-17} М. В связи с развитием таких проточных аналитических систем на основе молекулярных детекторов и новых высокочувствительных систем регистрации заряда, появилась возможность использования их для изучения электрокинетических свойств воды. Поэтому в нашей работе мы использовали проточную часть этих систем для исследования генерации заряда в движущейся воде.

Известно, что при движении жидкости генерируется электрический заряд за счет существования двойного электрического слоя, возникающего на поверхности раздела фаз [<http://www.xumuk.ru/colloidchem/53.html>]. Как показано нами ранее [1], при инъекции жидкости через наконечник пипетки генерируется электрический заряд в капле этой жидкости. Нами также было показано [3], что при непрерывном введении жидкости в измерительную ячейку с помощью перистальтического насоса (проточный режим подачи) и использовании подающей трубки с наконечником от пипетки также генери-

руется электрический заряд, что может приводить к повышению эффективности фишинга белковых маркеров. Этот эффект ранее наблюдался нами в системе для АСМ-фишинга белков при низкой концентрации [1, 3]. Было сделано предположение, что возникновение заряда в растворе облегчает обнаружение белка при сверхнизкой концентрации, вплоть до 10^{-17} М, что важно при разработке систем для ранней диагностики заболеваний [1, 2]. Механизм генерации заряда при движении жидкости, как правило, связывают с трибоэлектрическим эффектом, но до конца он не ясен [10]. В работе [10] обсуждается, что при однократном импульсном вводе в ячейку воды через наконечник пипетки может быть полное, а может быть и частичное вытекание заряда из пипетки и вопрос этот требует пояснения.

В представленной работе рассмотрены генерация заряда и его истечение через наконечник с потоком воды в измерительную ячейку. Исследования проведены в проточной системе подачи образца, которая используется в фишинг-технологии для обнаружения белков в растворах при низкой концентрации [1, 4, 5]. Подробно установка для высокочувствительного АСМ-фишинга белков описана ранее [1, 2]. Коротко, АСМ-фишинг система включает резервуар с раствором белка, проточную часть для подачи раствора к АСМ-чипу, на который происходит вылавливание этого белка для последующего подсчета количества выловленных белковых молекул, с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ). Измерения были проведены при $t = 35^\circ\text{C}$, соответствующей области температур, используемой в экспериментах по высокочувствительному АСМ-фишингу белковых маркеров, ассоциированных с онкологическими и инфекционными заболеваниями. Эта область температур также интересна при мониторинге изменения активности белков в условиях, близких к нативным и в других работах по функциональной протеомике, а также при работах с клеточными культурами. Показано, что при определенных условиях, временная зависимость аккумуляции заряда в водной среде в измерительной системе, использующей фишинг-технологии, имеет нелинейный характер — наблюдается скачкообразное изменение регистрируемой величины. Эффект

появления этих скачков зависит от расстояния (1) между наконечником подающей трубки и электродом заземления, вставленным в эту трубку. Эффект наблюдается при расстоянии 1–10 см и более. Этот эффект следует учитывать при проведении фундаментальных исследований в области электрокинетических свойств воды, при создании современных моделей гемодинамики в норме и патологии, а также при разработке высокочувствительных аналитических систем на основе молекулярных детекторов, таких, как нанопроводные, АСМ и другие фишинг-системы, предназначенные для повышения эффективности раннего выявления патологического процесса.

Методика

Химические реактивы. Деионизованная вода (удельное сопротивление, 18 МОм*см) была получена на установке Millipore Simplicity UV (Франция).

Методика измерения заряда в измерительной ячейке. Схема установки для измерения заряда приведена на рис. 1. Измерения величины электрического заряда проводились [2] с помощью электрометра, включенного в проточную систему подачи образца для АСМ-фишинга. Основные элементы системы подачи образца — перистальтический насос, трубка для подачи воды с наконечником и измерительная ячейка. В процессе измерений вода из полипропиленового резервуара (1) ($V = 50$ мл) через наконечник (5) непрерывно подавалась в ячейку (6) с помощью насоса (3) (Ismatech (IDEX)). Для подачи воды использовалась стерильная силиконовая трубка (4)

(длина 40 см, внутренний диаметр 2 мм) с полипропиленовым наконечником (5) (внутренний диаметр 0,4 мм). В качестве наконечника использовался стандартный одноразовый наконечник к автоматической пипетке (1—10 мкл). Скорость потока (~15 мкл/с) была подобрана таким образом, чтобы на наконечнике подающей трубки формировались капли. Рассчитанный объем капли составил ~15 мкл. Для поддержания потенциала в резервуаре (1) с водой, из которого вода поступала в подающую трубку, на постоянном уровне земли в подающую трубку был вставлен электрод заземления E_g . Расстояние от электрода в трубке до крайней точки выходного отверстия наконечника варьировалось и составляло 5, 10 или 15 см. Ячейка (6) из нержавеющей стали являлась внутренним цилиндром в системе, сопряженной с электрометром (7). В целом, измерительная система была аналогична системе, используемой ранее [3]. Регистрировался заряд в ячейке с помощью электрической системы (7) — электрометра, разработанного в ИБМХ. Точность регистрации заряда составляла 0,1 нКл. Температура воды устанавливалась с помощью шейкера, в который был помещен резервуар (1) для подачи воды. Эксперименты проводились при 35°C. Длительность предварительного выдерживания системы в условиях эксперимента составляла не менее 2 ч, длительность одного измерения — 7 мин. Экспериментальная серия для каждого набора условий состояла не менее чем из 3 повторов.

Схема эксперимента следующая. Система заполняется водой из резервуара (1) и промывается объемом воды ~10 мл. После промывки подающая система остается заполненной водой, из измерительной ячейки вода удаляется с помощью пипетки. Проводятся контрольные измерения базовой линии сигнала для незаполненной ячейки (3 повтора). Далее включается насос, и вода по каплям поступает в ячейку. С момента включения насоса начинается отсчет времени эксперимента и запись показаний измерительной системы с дисплея электрометра. Запись осуществляется каждые 15 с в течение 7 мин. После окончания измерений в рамках одного эксперимента показания сбрасываются. Полученные данные представлены в виде зависимости величины заряда, поступающего в измерительную ячейку, от времени измерений $\Delta q(t)$.

Результаты и обсуждение

Измерения проводились при трех положениях заземляющего электрода, вставленного в подающую трубку системы: на расстоянии 15 см, 10 см и 5 см относительно среза наконечника на конце трубки (см. условия измерений в разделе «Методика»).

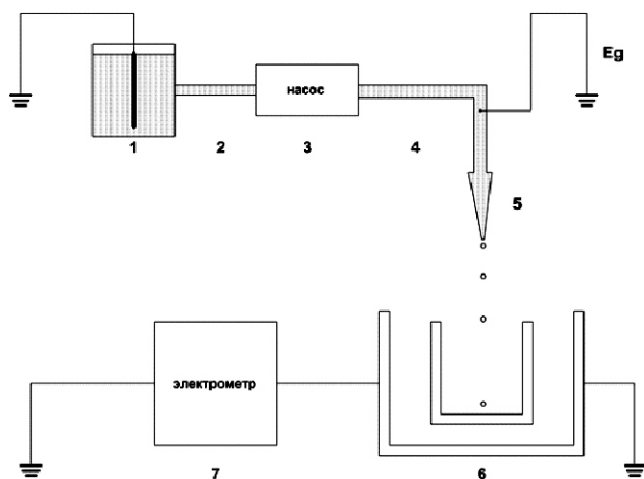


Рис. 1. Схема установки для измерений. 1 — резервуар с исходной водой; 2 — силиконовая трубка (входящий участок); 3 — перистальтический насос; 4 — силиконовая трубка (исходящий участок); 5 — наконечник; 6 — измерительная ячейка с подключенным электрометром; 7 — электрометр, E_g — электрод заземления, устанавливаемый от среза наконечника на расстоянии 5, 10 или 15 см.

На рис. 2 представлены результаты измерений для положения электрода $l = 15$ см — типичные временные зависимости величины заряда $\Delta q(t)$.

Как видно из рисунка, общее изменение величины заряда за время наблюдения (7 мин) составляет порядка 1—2 нКл, т.е. наблюдается аккумуляция заряда. Характер изменения величины заряда различен: (1) линейный рост (рис. 2, кривая 2); (2) линейно-скачкообразный рост, т.е. резкие изменения величины на фоне роста величины заряда (рис. 2, кривые 4—7); (3) незначительные изменения в величине (рис. 2, кривая 1), (4) незначительные изменения в величине с последующим скачком заряда (рис. 2, кривая 3).

На рис. 2 приведены примеры:

- случай (1) — кривая 2 — в диапазоне 0—7 мин измерений наблюдается линейный рост величины в измерительной ячейке с $\Delta q \sim 0,1$ нКл/мин.

- случай (2) — кривая 5 — наблюдается плавный рост величины в диапазоне 0—5 минут измерений с $\Delta q/\Delta t \sim 0,1$ нКл/мин, после чего регистрируется резкий рост величины заряда на 1,3 нКл за 15 с ($\Delta q/\Delta t \sim 5,2$ нКл/мин). Кривые 6 и 7 также являются примерами линейно-скачкообразного роста величины заряда — наблюдается резкое изменение величины с градиентом 1 нКл за 1,5—0,25 мин, т.е. ($\Delta q/\Delta t \sim 0,7—4$ нКл/мин), с дальнейшим снижением скорости накопления заряда более чем в 2 раза.

- случай (3) — кривая 1 — изменения в величине заряда незначительны (рис. 2).

- случай (4) для демонстрации выявленной зависимости рассмотрим кривую 3 (рис. 2). В диапазоне 0—5 мин измерений не наблюдается изменения величины заряда в ячейке, далее регистрируется скачкообразный рост на величину с градиентом $\Delta q \sim 0,9$ нКл за 30 секунд ($\Delta q/\Delta t \sim 1,8$ нКл/мин).

Результаты экспериментов, полученные при условии положения электрода $l = 10$ см, аналогичны результатам, рассмотренным выше для $l = 15$ см (данные не представлены).

Результаты экспериментов, полученные при условии положения электрода $l = 5$ см, отличаются от результатов, полученных при $l = 15$ см и $l = 10$ см (данные не представлены). В этой экспериментальной серии типичным случаем являлось незначительное линейное увеличение величины (Δq) 0—0,3 нКл за 7 минут ($\Delta q/\Delta t = 0,04$ нКл/мин) без проявления скачков величины. Т.е. аккумуляция заряда в измерительной ячейке при $l = 5$ см не наблюдалась.

Ранее в литературе достаточно подробно изучалось движение воды и водных растворов, растворов полимерных сфер и белков относительно полимерных поверхностей. Как правило, в таких системах полимерные поверхности заряжены отрицательно — дзе-

та-потенциал таких поверхностей (полиметилметакрилат, тефлон, полистирол, полиэтилен, полипропилен) отрицательный и составляет (-10) — (-100) мВ. В частности, исследование, проведенное с указанными выше материалами, показало, что генерация заряда при контакте фаз и дзета-потенциал поверхности полимеров связаны между собой преимущественно линейной зависимостью [11]. Отрицательный дзета-потенциал органических полимеров связывают с присутствием гидроксильных ионов в слое Штерна, которые аккумулируются предпочтительно на границе раздела воды и гидрофобной поверхности. Обычно адсорбированный слой воды на поверхности представляется многослойной моделью, где имеются прочно связанные и слабо связанные слои ионов. В слабо связанных слоях предполагается нахождение подвижных протонов. Причина возникновения электрокинетических явлений лежит в нарушении электронейтральности диэлектрического слоя (ДЭС) в электрическом поле. При наложении разности потенциалов происходит разрыв ДЭС по плоскости скольжения. Это подтверждается исследованиями электроосмоса, в которых показано, что в электрическом поле, приложенном вдоль капилляра, наблюдается движение протонов, захваченных из слабо связанного слоя, к отрицательному электроду. Аналогичное движение подвижных протонов предполагается также под влиянием не только электрического поля, но и градиента давления, то есть при гидродинамическом градиенте [<http://www.xumuk.ru/colloidchem/53.html>].

В данной работе обнаруженная нелинейность накопления заряда в ячейке также может быть связана с накоплением образующегося заряда в конечной части подающей системы — узком наконечнике из полимера. Согласно полученным данным, после движения воды в трубке и истечения ее из наконечника, в изме-

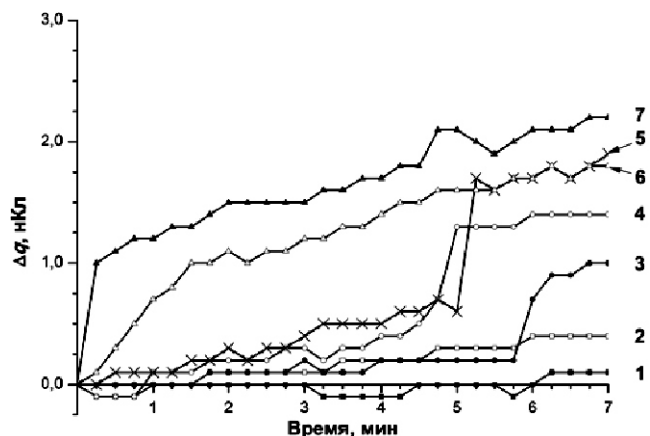


Рис. 2. Типичные зависимости $\Delta q(t)$, полученные для положения электрода $l = 15$ см. Кривые 1—7 — данные, полученные в разных экспериментальных сериях.

рительной ячейке накапливается положительный электрический заряд. Наши данные согласуются с данными [10], полученными в условиях инъекции воды с помощью пипетки в однократном режиме инъекции. В [10] также регистрировался положительный заряд ~0,1 нКл и отмечается, что наконечник пипетки заряжается отрицательно при положительном заряде капли воды.

Результаты наших экспериментов по мониторингу генерации заряда в непрерывном режиме подачи воды позволяют сделать следующие выводы: 1 — при движении воды по трубке происходит генерация зарядов и его разделение — положительный заряд с каплей воды поступает в измерительную ячейку (рис. 2); 2 — часть образующегося заряда стекает в противоположном направлении на землю (обратный ток), предположительно, двумя путями: (а) через электрод заземления E_g и (б) в резервуар (1) с водой, из которого вода поступала в подающую трубку, которая заземлена (рис. 1). Первый путь (а) предпочтительней, так как электрод E_g располагается ближе к срезу наконечника, чем заземлённый резервуар (1) с водой, из которого вода поступала в подающую трубку. Поэтому примем условное утверждение, что это обратный ток идет через E_g .

Рассмотрим далее модель накопления заряда на срезе наконечника. Скорость генерации и накопления заряда на срезе наконечника без учета истекания заряда в измерительную ячейку упрощенно можно представить в виде следующего выражения:

$$\frac{dq}{dt} - \frac{dq_1}{dt} = I_1, \tag{1}$$

где первый член в уравнении (1) $\frac{dq_1}{dt}$ определяет генерацию заряда за счет возникающих при движении потока жидкости, со скоростью v , электрокинетических явлений, обусловленных существованием двойного электрического слоя. Второй член уравнения (1) I_1 — «обратный ток», описывающий стекание заряда со среза носика пипетки, под действием разности потенциалов между срезом наконечника и заземляемым электродом E_g , который можно выразить следующим образом:

$$I_1 = \frac{\Delta\phi}{R},$$

где $\Delta\phi$ (q_1) — это разность потенциалов, создаваемая генерируемыми зарядами q_1 , относительно заземленного электрода, а $R = R(l)$ — это электрическое сопротивление воды между срезом наконечника и заземленным электродом, l — это расстояние между срезом наконечника и заземленным электродом.

Как видно из уравнения (1), общий заряд на срезе наконечника, зависит линейно от времени и уменьшается с увеличением сопротивления среды (R). При уменьшении расстояния l , величина R снижается и, следовательно, практически весь генерируемый заряд может стекать на электрод E_g . Это мы наблюдали в случае экспериментов при $l = 5$ см, когда аккумуляции заряда практически не регистрируется ($\Delta q = 0,3$ нКл за 7 мин). При увеличении l до 10 см и 15 см, сопротивление R возрастает в 2 и более раза, что может приводить к тому, что скорость генерации заряда $\frac{dq}{dt}$ приобретает положительный наклон за счет превышения первого члена уравнения (1) над вторым, отличного от нуля. Такой случай наблюдается при регистрации аккумуляции заряда в измерительной ячейке (характер зависимости (1) — линейный рост величины заряда, кривая 2 на рис. 2).

В то же время, в нашей работе получено, что при $l = 10$ см и $l = 15$ см в ряде случаев регистрировалась не только линейная временная зависимость накопления заряда, но наблюдался и линейно-скачкообразный рост величины заряда (кривые 3, 4, 5). Можно предположить, что в таком случае наблюдался макроскопический эффект, обусловленный электрогидродинамическим барьером для стекания заряда в измерительную ячейку, но позже увеличенное количество заряда попадает в ячейку и регистрируется скачок величины. Это может быть связано с тем, что заряд q_1 , образующийся в воде при ее движении, который концентрируется в области среза наконечника, может полностью не стекать в измерительную ячейку, а задерживаться. Согласно полученным экспериментальным данным, можно предположить, что характерный размер такого «облака» заряда составляет ~10—15 см, так как при меньшем расстоянии $l = 5$ см, заряд стекает на электрод заземления и не наблюдается его аккумуляции в измерительной ячейке.

В то же время остается вопрос о причине возникновения скачка в величине регистрируемого в измерительной ячейке заряда. Вероятно, возникновение скачков обусловлено реализацией переходов между орто- и пара-состояниями молекул воды. Известно, что эти состояния определяют сложную гетероструктуру воды и ее аномальные свойства, такие, например, как скачки электропроводности или вязкости, в процессе истечения воды из наконечника [12, 13], эффекты микроволнового излучения при ее возбуждении [14—18]. Удержание заряда вблизи среза наконечника в виде «облака» заряда, а также стекание через электрод заземления («обратный ток»), вероятно, также связаны со сложной гетероструктурной организацией воды. При нарушении этой организа-

ции, например, при гидродинамических воздействиях на воду со стороны перистальтического насоса, возникают изменения структуры воды и, соответственно, проводимости, которые и наблюдаются при регистрации заряда в измерительной ячейке.

Таким образом, в воде при движении по трубке проточной системы генерируется заряд. Далее вода, несущая заряд, попадает в наконечник. В наконечнике на заряд воды оказывают влияние следующие факторы: электростатические силы со стороны поверхности наконечника; электрические силы со стороны заземленных электродов; гидродинамическая сила потока, формируемого перистальтическим насосом и необходимого для движения воды. При превышении электрогидродинамического барьера для истекания заряда за счет гидродинамической силы, способствующей выталкиванию заряда с капель, над электростатической силой, происходит быстрый сброс этого заряда с порцией капель, а далее следует накопление следующей порции заряда в наконечнике. Процесс истекания заряда прерывается из-за ограничения электропропускной способности этой системы (эффект электрогидродинамического барьера стекания заряда (ЭБСЗ)). Эффект ЭБСЗ определяется балансом нескольких факторов, важнейшим из которых является стекание заряда на электрод заземления, что подтверждается тем, что скачкообразное накопление заряда не наблюдается при установке электрода, вставленного в подводящую трубку, на расстоянии 5 см от выходного отверстия наконечника подающей системы. При таком расположении электрода, вероятно, накопление образующегося заряда не происходит из-за высокой вероятности стекания «облака» заряда через электрод заземления.

Как уже отмечалось нами ранее в [1, 3], генерация заряда сопровождает процесс фишинга низкокопийных белков (10^{-15} — 10^{-17} М). В растворах с низкой концентрацией белка, количество образующихся заряженных частиц по порядку величины находится в том же диапазоне, что и количество белковых молекул в растворе. При этом увеличение отношения «количество заряда/количество белковых молекул» коррелирует с вероятностью вылавливания этих молекул с помощью АСМ-чипа, что в конечном итоге влияет на эффективность обнаружения белков. Результаты, полученные в данной работе, показывают нелинейность временной функции величины образующегося заряда в проточной системе, разработанной для АСМ-фишинга белков. Обнаруженный эффект, по-видимому, должен учитываться и в других высокочувствительных аналитических системах, в том числе в диагностических устройствах на основе нанопроводного детектора, а также в других системах, в которых предусмотрено использование инжекторной сис-

темы подачи растворов образцов. Обнаруженный эффект интересен также для развития теории, описывающей электрокинетические свойства воды, которые, в свою очередь, определяют гемодинамику в норме и патологии.

Заключение

Обнаружено, что при движении воды в проточной системе, в процессе её непрерывной подачи, в измерительной ячейке накапливается заряд, поступающий с водой из наконечника подающей трубки. Установлена линейно-скачкообразная зависимость накопления заряда в ячейке (эффект ЭБСЗ). Величина скачка накопленного заряда (порядка нескольких нКл) зависит от расстояния между наконечником и электродом заземления, вставленного в подающую трубку. Этот эффект должен учитываться при проведении фундаментальных исследований, посвященных изучению физико-химических свойств воды, а также при создании уточненных моделей, описывающих гемодинамику в организме в норме и патологии. Кроме того, полученные результаты следует использовать при разработке высокочувствительных диагностических систем на основе молекулярных детекторов, включающих проточный способ подачи образца, и предназначенных для повышения эффективности раннего выявления патологического процесса.

References

1. Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kozlov A.F., Kaysheva A.L., Kopylov A.T., Izotov A.A., Andreeva E.Yu., Kanashenko S.L., Usanov S.A., Archakov A.I. Highly sensitive protein detection by combination of atomic force microscopy fishing with charge generation and mass spectrometry analysis. *The FEBS Journal*. 2014; 281(20): 4705-17.
2. Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kaysheva A.L., Kopylov A.T., Izotov A.A., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Ziborov V.S., Archakov A.I. AFM-based protein fishing in the pulsed electric field. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2015; 9(2): 121-9.
3. Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kozlov A.F., Kanashenko S.L., Ivanova N.D., Sadovskaya T.A., Archakov A.I., Ivanov Yu.D. Highly sensitive AFM-fishing of albumin. *Patogenez*. 2016; 3: 30-6. (in Russian)
4. Archakov A.I., Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. Biospecific irreversible fishing coupled with atomic force microscopy for detection of extremely low-abundant proteins. *Proteomics*. 2009; 9(5): 1326-43.
5. Pleshakova T.O., Shumov I.D., Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Kaysheva A.L., Archakov A.I., AFM-Based Technologies as the Way Towards the Reverse Avogadro Number. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2015; 9(3): 244-57.

6. Patolsky, F., Zheng, G., Hayden, O., Lakadamyali, M., Zhuang, X., Lieber, C. M. Electrical detection of single viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 14017-122.
7. Malsagova K.A., Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Kaysheva A.L., Shumov I.D., Kozlov A.F., Archakov A.I., Popov V.P., Fomin B.I., Latyshev A.V., A SOI-nanowire biosensor for the multiple detection of D-NFATc1 protein in the serum. *Analytical Methods*. 2015; 7(19): 8078-85.
8. Malsagova K.A., Ivanov Y.D., Pleshakova T.O., Kozlov A.F., Krokhin N.V., Kaysheva A.L., Shumov I.D., Popov V.P., Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A. SOI-nanowire biosensor for detection of D-NFATc1 protein. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2014; 8(3): 220-5.
9. Ivanov Yu. D., Pleshakova T. O., Kozlov A. F., Malsagova K.A., Krohin N.V., Shumyantseva V.V., Shumov I.D., Popov V.P., Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A., Aseev A.L., Archakov A.I. SOI nanowire for the high-sensitive detection of HBsAg and α -fetoprotein. *Lab on a Chip*. 2012; 12(23): 5104-11.
10. Dongwhi Choi, Horim Lee, Do Jin Im, In Seok Kang, Geunbae Lim, Dong Sung Kim, Kwan Hyoung Kang. Spontaneous electrical charging of droplets by conventional pipetting. *Scientific Reports*. 2013; 3(2037): 1-7.
11. McCarty L.S., Whitesides G.M. Electrostatic charging due to separation of ions at interfaces: contact electrification of ionic electrets. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008; 47: 2188-207.
12. Pershin, S. Conversion of ortho-para H₂O isomers in water and a jump in erythrocyte fluidity through a microcapillary at a temperature of 36.6 ± 0.3 °C. *Phys. Wave Phenom.* 2009; 17: 241-50.
13. Kholmanskiy A.S. Two types of anomalous thermodynamics of water. Apriori. Series: *Estestvennye I tekhnicheskie nauki*. 2015; 1: 1-17. (in Russian)
14. Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Ziborov V.S. Microwave radiation of water in analytical systems. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2015; 59(4): 78-81. (in Russian)
15. Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Ziborov V.S. Microwave radiation of albumin solution with external excitation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2016; 60(3): 101-4. (in Russian)
16. Ivanov Y.D., Kozlov A.F., Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Vesnin S.G., Tatur V.Yu., Ivanova N.D., Ziborov V.S. Monitoring of microwave emission of HRP system during the enzyme functioning. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2016; 7: 20-5.
17. Ivanov Y.D., Malsagova K.A., Izotov A.A., Pleshakova T.O., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Usanov S.A., Archakov A.I. Detection of microwave radiation of cytochrome CYP102 A1 solution during the enzyme reaction. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2016; (5): 285-9.
18. Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Vesnin S.G., Tatur V.Yu., Yarygin K.N. Monitoring of brightness temperature of suspension of follicular thyroid carcinoma cells in SHF range by radiothermometry. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2017; 61(2): 101-7. (in Russian)

Сведения об авторах:

Козлов Андрей Федорович, ведущий инженер лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ

Галиуллин Р.А., ведущий программист, ИБМХ

Иванова Нина Дмитриевна, преподаватель ФГБОУ ВО МГАВМиБ

Татур Вадим Юрьевич, исполнительный директор, Фонд перспективных технологий и новаций

Зиборов Вадим Серафимович, канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. лаб. ударно-волновых воздействий ОИВТ РАН

Юшков Евгений Семенович, канд. техн. наук, доцент НИЯУ (МИФИ)

Плешакова Татьяна Олеговна, канд. хим. наук, ст. науч. сотр. лаб. нанобиотехнологии ИБМХ

Скуратовская Л.Н., Хевитт М.В.

Удачный пример диалога культур

ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8

Книга для записи состояния здоровья матери и ребенка — одна из ступеней диалога культур. Именно так представляется нам подготовка к изданию адаптированного варианта японской книги «Boshi Techo, Handbook of Mother and Child» на русский язык. Название несколько уточнено — «Дневник здоровья матери и ребенка». «Дневник» — потому что предполагает сохранение персональных сведений о здоровье матери, начиная с первых месяцев беременности и ребенка с момента его рождения до 20-летнего возраста. В книге удачно сочетаются рекомендации врачей, содержится необходимая информация для матери и ребенка, а также для остальных членов семьи.

Идея сохранения истории здоровья матери и ребенка в виде постоянных записей родилась в Японии в 1942 году. Япония была участницей войны, когда в стране катастрофически увеличивалась младенческая и детская смертность и группа врачей с целью привлечения внимания населения к проблеме сохранения здоровья предложила вести записи здоровья матери и ребенка.

Вначале книга называлась «Handbook of Pregnant Women». Затем, после войны название несколько раз изменялось в связи с расширением содержания книги. Важным дополнением было внесение информации по вовлечению отцов в активное участие в воспитании детей (глава «Какова роль отца в воспитании ребенка»). В 2012 году были добавлены новые главы — например, детальная информация о прививках, инфекционных заболеваниях, о цвете стула новорожденных, а также главы, которые содержат психологические подсказки для родителей в трудных ситуациях.

В настоящее время в Японии каждая женщина, ожидающая рождения ребенка, ведет такие записи до достижения им 20-летнего возраста. Затем книга передается уже взрослому человеку и сохраняется в семье для следующих поколений. Она служит источником многих сведений, связанных со здоровьем и очень полезна при обращении за медицинской помощью в случае необходимости. В настоящее время Япония имеет самую низкую младенческую и детскую смертность и книга Boshi Techo, как коротко называют ее японцы, играет свою особую роль.

В 2017 году Parents & Child Health Handbook Promotion Association перевела книгу на английский язык и ее история получила дальнейшее развитие. Мы с академиком Геннадием Тихоновичем Сухих, изучив книгу, пришли к выводу, что внедрение опыта японской культуры будет хорошим дополнением для привлечения граждан России к участию в сохранении здоровья семьи. Конечно, все знают, что граждане России, согласно Конституции, наряду с другими основными правами имеют Право на здоровье. Однако гарантия Прав предполагает также наличие Обязанностей по сохранению каждым из нас своего здоровья и здоровья семьи. Наши коллеги в Японии с большим энтузиазмом приняли наше предложение о публикации и распространении адаптированного к нашим законам и реалиям книги «Дневник здоровья матери и ребенка». Они сами подготовили макет книги на русском языке. Несколько известных японских компаний оказали спонсорскую помощь. Сотрудники Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И.Кулакова проделали большую работу по адаптации текста к нашим законам и культурным традициям.

Книга готова, сдана в печать. Мы уверены, что такое сотрудничество в период глобализации — хороший пример диалога культур России и Японии, тем более что 2018 год объявлен Годом Японии в России и Годом России в Японии.

Dr. Larissa N. Skuratovskaya, Maria W. Hewitt

Good Example of Dialogue of Cultures

Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8, Baltiyskaya Str., Moscow, 125315, Russia

A book that keeps mother and child health records as one way foster the dialogue of cultures.

This is how the preparation for publication of the adopted Russian version of the Japanese book «Boshi Techo, Handbook of Mother and Child» comes across to us.

The name of this book is further specified as the «Diary of health of mother and child» The word «Diary» is used because it involves keeping personal information about mother's health starting from the first months of pregnancy, and for her child from the moment of birth up until twenty years of age. The book usefully combines advice by medical doctors, as well as information necessary for mother and child, and also for the whole family.

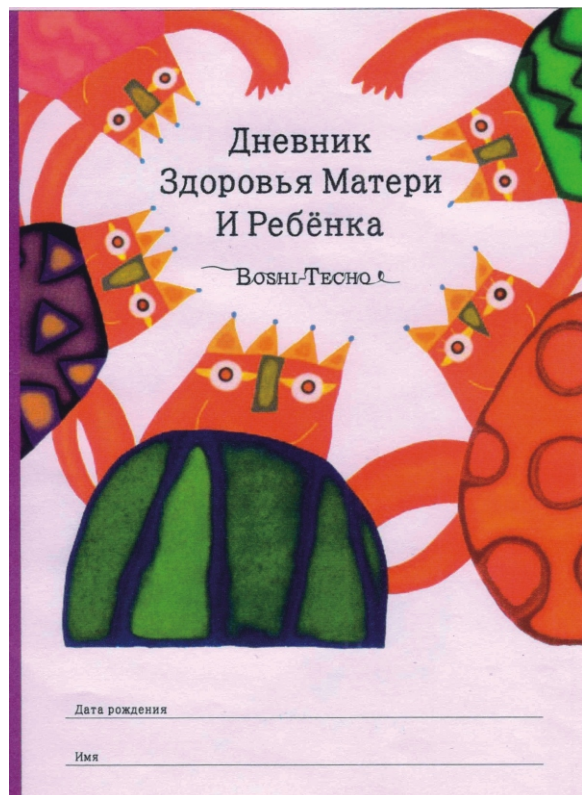
The idea of maintaining health data of future mothers and their children as part of permanent health records first came up in Japan in 1942. Japan had been involved in the war, which dramatically increased infant and child mortality — a group of doctors therefore suggested to start keeping such records with the purpose to involve general population in maintaining good health.

First, the book had the name of «The Handbook of Pregnant Women». During the post-war years, however, the book's name changed several times as its contents expanded to include more information. One such important addition was the introduction of information for fathers-to-be (highlighting the role of fathers in raising children). A significant addition was also the introduction in 2012 of several new pages — e.g. with detailed information about vaccinations, infectious diseases, the colors of stool of newborn babies, as well as new chapters containing useful psychology tips for parents when in difficult situations.

In today's Japan every expectant woman maintains these records until the child reaches 20 years of age and becomes an adult. It is when the book is passed onto them and remains in the family for generations. It is a source of information on many health-related issues and becomes very useful when medical assistance may be necessary. At the moment, Japan has the lowest infant and child mortality rates and Boshi Techo- as the Japanese usually call this book- plays its very special role.

In 2017, the Parents&Child Health Promotion Association translated the book into English and its history has had further development. Having studied the book together with Academician Gennady Sukhikh, I was clear that implementing Japan's cultural experience in public health would be a good addition to attracting Russian citizens to participate in preserving family health. Of course, it is a well known fact that all citizens of Russia have the Right to Health, along with other fundamental rights, according to Russia's Constitution. But the right guaranteed also means having Responsibilities for keeping good personal health and maintaining good health in the family. Our colleagues in Japan accepted with great enthusiasm our proposal to publish and disseminate the book «Diary of health for mother and child», adopted to reflect Russia's legislation and realities. They even prepared the layout of the book in Russian. A number of well-known Japanese companies provided sponsorship. The staff of the Russian Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician Kulakov has done a great job adapting the text to reflect Russian's own Laws and cultural traditions.

The book is ready to go to print. We are sure that such cooperation in the period of Globalization a good example of Dialogue of Cultures of Russia and Japan, and even more so given that 2018 becomes the year of Japan in Russia, and Russia in Japan.



新聞 【新聞定価1ヶ月4,037円(本体価格3,736円+消費税299円)】1部売り(消費税込み)新刊140円 夕刊150円 (第3巻印刷部完成)

BOSHI-TECHO 露へ

日本の「母子健康手帳」がロシア語に翻訳され、来年から政府系団体の主催でロシア国内に配布されることになった。日本生まれの母子手帳は世界30カ国以上に広がっているが、それぞれ国情に合わせて独自の編集がされており、海外の国が日本版を中身ごと「輸入」するのは初めて。表紙にはアルファベットで「BOSHI-TECHO」とも記され、関係者は「母子手帳が国際語になってくれる」と期待する。

翻訳されるのは、一般社団法人「親子健康手帳普及協会(東京都港区)」が2016年に作った「20年をつづる母子健康手帳」。自治体からもらえる母子手帳は通常6歳までしか記入できないが、成人までの病歴記入欄や、児童虐待の防止や発達障害に関する説明なども付き、人気を呼んでいる。

丸ごと翻訳 来年配布

協会理事で管理栄養士の白崎ユミさん(55)は、母子健康に長年携わるロシア人医師のラリス・スクラトフスカヤさん(67)と30年来的親交があった。今年5月、スクラトフスカヤさんは英語に翻訳された手帳を初めて手にし「素晴らしい」と絶賛。仲間とロシア語訳を始め、同時に国立産科・婦人科・周産期医学センターで管理栄養士ナレディ・スティーブさん(70)に普及を働きかけ、10月に関係者間で共同著作権の契約が結ばれた。冊子は冒頭で、母子手帳が日本で半世紀以上に誕生したことを紹介。

医師研究センター長のゲナディ・スウヒヒさん(70)に普及を働きかけ、10月に関係者間で共同著作権の契約が結ばれた。冊子は冒頭で、母子手帳が日本で半世紀以上に誕生したことを紹介。

ロシアで母子健康手帳を巡るスタートアップの母子健康手帳普及協会

ロシアで配布される母子手帳の系統「BOSHI-TECHO」の文字が入っている。親子健康手帳普及協会提供

母子健康手帳 妊婦から乳幼児期までの母子の健康記録をまとめた冊子。母子保健法により市町村にすべての妊婦への交付が義務付けられている。手帳の前半部分は全国共通で、後半部分は全戸籍に関する情報は独自の編集が認められている。海外での母子手帳普及には国際協力機構(JICA)が中心となっており、取組んできたが、民間では親子健康手帳普及協会がアジアやアフリカの大使夫人を招いて勉強会を開催などしている。

母の思い 海越え時超え



**XXI МЕЖДУНАРОДНАЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ
НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ
"ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА. ЧЕЛОВЕК И ЕГО ЗДОРОВЬЕ"**

ИНФОРМАЦИОННОЕ ПИСЬМО

Санкт-Петербургский государственный университет.
Российское физиологическое общество им. И.П. Павлова.
СПб отделение Международного общества патофизиологов.
СПб Хирургическое общество Н.И. Пирогова.
СПб отделение Всероссийского общества анатомов, гистологов и эмбриологов.
СПб Общество естествоиспытателей.
Медицинские научные и профессиональные общества Санкт-Петербурга.

14 апреля 2018 года состоится **XXI Международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье».**

Место проведения – СПбГУ, Здание Двенадцати коллегий (Университетская наб. 7-9), Актовый и Петровский залы. К участию приглашаются школьники, студенты, ординаторы, аспиранты, молодые научные работники (в возрасте до 35 полных лет). Принимаются работы, посвященные широкому кругу проблем всех отраслей клинической и профилактической медицины, а также морфологии, физиологии, патологии, фармакологии, биофизики, биоинформатики, биомедицинской кибернетики, биохимии, генетики. Секции посвящены биомедицине и клинической медицине, предусмотрен специальный семинар.

Цель конференции – привлечение молодых исследователей к решению актуальных задач современной науки, интеграция высшего образования и фундаментальной науки. Из представленных работ будут отобраны *устные и стендовые* доклады. Тезисы докладов конференции *будут опубликованы в продолжающемся издании СПбГУ «Фундаментальная наука и клиническая медицина»* (Fundam. Nauka Klin. Med.), ISSN 2221-5654, том 21.

Тезисы принимаются до **15 марта 2018 года** и могут быть поданы **только** через автоматическую систему регистрации участников и подачи материалов, расположенную по адресу:

https://regforms.spbu.ru/ru/?option=com_rsform&view=rsform&formId=395

Авторами тезисов могут быть **только** исследователи в возрасте до 35 полных лет, научных руководителей старше этого возраста можно отметить благодарностью в конце тезисов.

Предельный размер текста – 2500 знаков включая пробелы. Иллюстрации не предусмотрены. Библиография допустима в счет общего объема тезисов по желанию авторов, до 5 источников. Литературные ссылки указываются в тексте номерами в квадратных скобках: [1] и т.д., в списке идут в столбик в порядке следования, с указанием первого автора, по образцу:

1. Самойлов М.О. и соавт. Патол. физиол. эксперим. терап. 2012; 3: 3 – 10.
2. Abbas A.K. et al. Cellular & Molecular Immunology. Saunders-Elsevier, 2007: 566 p.

В конце тезисов доклада привести номер гранта, если он использовался. В тексте тезисов вместо греческих букв применять их русские названия (например, вместо α использовать "альфа").

Участие в конференции бесплатное.

Тезисы, оформленные с нарушением указанных правил, приняты быть не могут. После рассмотрения тезисов редколлегией авторы получают уведомление об участии в конференции и об устной или стендовой форме доклада.

E-mail: science_conferenceMFSPbGU@mail.ru

NB! Адрес эл. почты указан только для вопросов, тезисы по эл. почте приняты быть не могут.

Организационный комитет конференции «Фундаментальная наука и клиническая медицина»



**XXI INTERNATIONAL CONFERENCE
“FUNDAMENTAL SCIENCE AND CLINICAL MEDICINE”
FOR YOUNG RESEARCHERS**

LETTER OF ANNOUNCEMENT

**SAINT PETERSBURG STATE UNIVERSITY
I.P. PAVLOV RUSSIAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY
INTERNATIONAL SOCIETY FOR PATHOPHYSIOLOGY (ST. PETERSBURG DIVISION)
N.I. PIROGOV SURGICAL SOCIETY
ALL-RUSSIA'S SOCIETY OF ANATOMISTS, HISTOLOGISTS & EMBRYOLOGISTS (ST.
PETERSBURG DIVISION)
ST. PETERSBURG SOCIETY OF NATURAL SCIENTISTS
MEDICAL SCHOLARLY & PROFESSIONAL SOCIETIES OF ST.PETERSBURG**

**Invite you to take part in 21st International Biomedical Conference of Young Researchers
“FUNDAMENTAL SCIENCE AND CLINICAL MEDICINE - HUMAN AND HEALTH”
(author's age up to 35 full years)**

The conference is held in Saint Petersburg, Russia, at [Saint Petersburg State University](https://en.wikipedia.org/wiki/Twelve_Collegia), in the Twelve Collegia building (https://en.wikipedia.org/wiki/Twelve_Collegia), White Hall and Petrovsky Hall (7-9 Universitetskaya emb., an entrance from the Mendeleevskaya line, V.O., St. Petersburg, Russia, 199034).

Date: April 14th, 2018.

The Conference covers both biomedical and clinical fields. Abstract book included in RISC bibliographic database will be published (ISSN: 2221-5654).

Travel arrangements, accommodation, and all other costs related to your travel are at your expense.

Organizers will assist you by means of invitation letter, if necessary.

Free registration and abstract submission (up to 2500 characters with spaces in English or in Russian) exclusively via electronic webpage of conference:

https://regforms.spbu.ru/ru/?option=com_rsform&view=rsform&formId=396

No illustrations, brief bibliography is optional, within the general limit of abstract, up to 5 refs, indicated in text by [#]. Short reference list, no paper titles, only 1st authors mentioned, like in examples:

1. Abbas A.K. et al. Cellular & Molecular Immunology. Saunders-Elsevier. 2007: 566 P.
2. Samoylov M.O. et al. Patol. fiziol. eksperim. terap. 2012; 3: 3 – 10.

No Greek letters, just their English or Russian names. If research was financially supported, indicate source and grant # in the end of the text.

After peer paper review, authors of accepted abstracts will be invited by electronic message for oral or poster presentation. Oral presentations (in ppt format up to 10 min of length) and posters (900 x 1200 mm, vertically formatted) in Russian or English are welcome.

Awards and diplomas for the best presentations and best posters will be conferred.

DEADLINE of abstracts submission: March 15th, 2018.

E-mail of Organizing Committee: science_conferenceMFSPbGU@mail.ru

NB! The e-mail is for questions only; abstract submission is exclusively via electronic registration form.

Organizing Committee