

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 диссертаци-
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 .
Подписано в печать

ISSN 0031-2991
Пат. физиол. и экспер. тер.
2018. Том 62. № 2. 1–154

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, 2018.

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, № 2, 2018

апрель—июнь

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)

Редационный 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: <http://pfiet.ru>
e-mail: path.physiol@yandex.ru

Pathological physiology
and experimental therapy
2018. Vol. 62. № 2. 1–154

ISSN 0031-2991

Publisher: Irishkin Dmitry
e-mail: genius-media@mail.ru

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, № 2, 2018

April—June

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)

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Невидимова Т.И., Давыдова Т.В., Савочкина Д.Н., Мастерова Е.И., Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Бохан Н.А.** Анализ сопряженности иммунорегуляторных, нейромедиаторных и вегетативных параметров при формировании зависимости от психоактивных веществ 4
- Лисина О.Ю., Московцев А.А., Кубатиев А.А., Сурин А.М.** Динамика изменений морфологии нейрональной сети и развития митохондрий в механически поврежденной первичной культуре нейронов 11
- Карпова М.Н., Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю., Ветрилэ Л.А.** Влияние сочетанного применения цитиколина и антител к глутамату на развитие острых генерализованных судорог, вызванных пентилентетразолом у мышей 24
- Степанов А.С., Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Степанов С.С.** Структурно-функциональные изменения нейронов неокортекса белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий 30
- Шакова Ф.М., Калинина Т.И., Гуляев М.В., Романова Г.А.** Нейропротективный и антиамнестический эффекты комбинированной терапии при ишемическом повреждении префронтальной коры в эксперименте 39
- Кузник Б.И., Давыдов С.О., Степанов А.В., Смоляков Ю.Н., Гусева Е.С.** Значение «белка молодости» — GDF11 и «белков старости» — GDF15, CCL11, JAM-A в регуляции кровяного давления у здоровых и страдающих гипертонической болезнью женщин 46
- Клабуков И.Д., Баясин М.В., Ляндуп А.В., Крашенинников М.Е., Титов А.С., Мудряк Д.Л., Шепелев А.Д., Тенчурин Т.Х., Чвалун С.Н., Дюжева Т.Г.** Ангиогенная витализация биосовместимого и биодеградируемого матрикса (экспериментальное исследование *in vivo*) 53
- Сахаров В.Н., Литвицкий П.Ф., Алексеева Е.И., Маянский Н.А., Закиров Р.Ш.** Изменения экспрессии IL-4 и IFN- γ в моноцитах и Т-лимфоцитах-хелперах при моделировании системного ювенильного идиопатического артрита у крыс линии Wistar 61
- Выхванец Е.П., Сакулин Н.В., Лунева С.Н., Накоскина Н.В., Климов О.В.** Факторы роста семейства TGF- β в крови больных ахондроплазией на этапах ортопедического лечения 70
- Мусалаева И.О., Тарасенко Е.В., Азова М.М., Галина Т.В., Мяндина Г.И., Оленев А.С.** Роль полиморфного варианта G-105A гена *SEPS1* в инициации преждевременных родов 77
- Федорова Т.В., Торкова А.А., Лисицкая К.В., Алчинова И.Б.** Гипогликемические свойства пектина из тыквы (*Cucurbita maxima* d.) при аллоксан-индуцированном сахарном диабете 82
- Каплиева И.В., Франциянц Е.М., Трепитакки Л.К., Черярина Н.Д.** Экспериментальная оценка функционирования основных регуляторных систем организма (надпочечниковой, тиреоидной и гонадной) на этапах метастазирования саркомы 45 в печень 90
- Фоменко О.Ю., Шельгин Ю.А., Порядин Г.В., Титов А.Ю., Козлов В.А., Белоусова С.В.** Первый опыт применения экстракорпоральной магнитной стимуляции в лечении недостаточности анального сфинктера 98
- Мичурин С.В., Васендин Д.В., Ищенко И.Ю.** Влияние мелатонина на клеточный состав печени крыс Wistar при алиментарном ожирении 107

ОБЗОРЫ

- Пальцын А.А.** Саркопения 113
- Артеменков А.А.** Этиопатогенетические механизмы возникновения дезадаптивных расстройств у человека в процессе обучения 121

МЕТОДИКА

- Островский Д.С., Борзенко С.А., Сабурин И.Н., Малугин Б.Э., Мушкова И.А., Репин В.С.** Модель культуры кератоцитов человека в изучении биосовместимости полимерных материалов для роговичных имплантатов и биоискусственной роговицы 129
- Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Ионова Е.О., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Барчуков В.В., Мирошкина И.А., Сорокина А.В., Козhevnikova Л.М., Дурнев А.Д.** Трансляционная модель хронической сердечной недостаточности у крыс 136

ИНФОРМАЦИЯ

- Школа «2-я Академия аутоиммунитета»,
СПбГУ 21–23 сентября 2018 г. 149

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Nevidimova T.I., Davydova T.V., Savochkina D.N., Masterova E.I., Vetrile L.A., Zakharova I.A., Bokhan N.A.** Analysis of connection of immunoregulatory, neuromediator and vegetative parameters at formation of dependence of psychoactive substances 4
- Lisina O.Yu., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A., Surin A.M.** Dynamics of changes in neuronal network morphology and development of mitochondria in mechanically damaged primary neuronal culture 11
- Karpova M.N., Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu., Vetrile L.A.** The influence of citicoline and antibodies to glutamate in their joint application on acute generalized convulsions caused by pentilentetrazole in mice 24
- Stepanov A.S., Avdeev D.B., Akulinin V.A., Stepanov S.S.** Structural and functional changes in the neurons of the neocortex of white rats after a 20-minute occlusion of the common carotid arteries 30
- Shakova F.M., Kalinina T.I., Gulyaev M.V., Romanova G.A.** Neuroprotective and anti-amnestic effects of a combination therapy in a model of photochemical ischemic damage in the prefrontal cortex 39
- Kuznik B.I., Davydov S.O., Stepanov A.V., Smolyakov Y.N., Guseva E.S.** Significance of the « youth protein» — GDF11 and «aging proteins» — CCL11, GDF15, JAM-A in regulation of blood pressure in healthy and hypertensive women 46
- Klabukov I.D., Balyasin M.V., Lyundup A.V., Krashennnikov M.E., Titov A.S., Mudryak D.L., Shepelev A.D., Tenchurin T.Kh., Chvalun S.N., Dyuzheva T.G.** Angiogenic vitalization of biocompatible and biodegradable scaffold (*in vivo* experimental study) 53
- Sakharov V.N., Litvitskiy P.F., Alekseeva E.I., Mayansky N.A., Zakirov R.Sh.** Changes of IL-4 and IFN- γ expression in monocytes and T-helper lymphocytes while modeling of systemic juvenile idiopathic arthritis in Wistar rats 61
- Vykhovanets E.P., Sakulin N.V., Luneva S.N., Nakoskina N.V., Klimov O.V.** Growth factors of TGF- β family in the blood of achondroplasia patients at the stages of orthopaedic treatment 70
- Musalaeva I.O., Tarasenko E.V., Azova M.M., Galina T.V., Myandina G.I., Olenov A.S.** The role of *SEPS1* G-105A gene polymorphism in the initiation of pretermature birth 77
- Fedorova T.B., Torkova A.A., Lisitskaya K.V., Alchinova I.B.** Hypoglycemic properties of pectine from pumpkin (*Cucurbita maxima* d.) *in vivo* on the model of alloxan-induced diabete mellitus type 1 82
- Kaplieva I.V., Frantsiyants E.M., Trepitaki L.K., Cheryarina N.D.** Experimental assessment of main regulatory systems of the body (adrenal, thyroid and gonadal) at liver metastases from S45 sarcoma 90
- Fomenko O.Yu., Shelygin Yu.A., Poryadin G.V., Titov A.Yu., Kozlov V.A., Belousova S.V.** The first experience of application of extracorporeal magnetic stimulation in the treatment of anal sphincter insufficiency 98
- Michurina S.V., Vasendin D.V., Ishchenko I.Yu.** The effect of Melatonin on cellular composition of the liver Wistar rats with alimentary obesity 107

REVIEWS

- Paltsyn A.A.** Sarkopenia 113
- Artemenkov A.A.** Etiopathogenetic mechanisms of disadapptive disorders of humans during education 121

METHODS

- Ostrovskiy D.S., Borzenok S.A., Saburina I.N., Malyugin B.E., Mushkova I.A., Repin V.S.** The study of the biocompatibility of the cornea implants from polymeric materials and the bio-artificial cornea in the model of the human keratocytes cells culture 129
- Kryzhanovskii S.A., Tsorin I.B., Ionova E.O., Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., Barchukov V.V., Miroshkina I.A., Sorokina A.V., Kozhevnikova L.M., Durnev A.D.** Translational model of chronic cardiac failure in rats 136

INFORMATION

- 2nd Academy of autoimmunity,
21–23 September 2018, Saint Petersburg State University

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616-092

Невидимова Т.И.¹, Давыдова Т.В.², Савочкина Д.Н.¹, Мастерова Е.И.¹,
Ветрилэ Л.А.², Захарова И.А.², Бохан Н.А.¹

Анализ сопряженности иммунорегуляторных, нейромедиаторных и вегетативных параметров при формировании зависимости от психоактивных веществ

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт психического здоровья» Томского НИМЦ РАН, 634014, г. Томск, Россия, ул. Алеутская, д. 4

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

Цель исследования — изучение взаимосвязи психофизиологических и иммунорегуляторных показателей лиц, находящихся на разных этапах формирования зависимости от психоактивных веществ (ПАВ). **Методика.** В обследовании приняли участие 347 человек: пациенты с психическими и поведенческими расстройствами, вызванными употреблением ПАВ (233 чел.), эпизодические потребители ПАВ (28 человек), условно здоровые лица (84 чел.). Иммуноглобулины, кортизол, нейромедиаторы и антитела к нейромедиаторам определяли методом иммуноферментного анализа. Субпопуляционный состав иммунокомпетентных клеток определяли с помощью проточной цитометрии. При помощи программно-аппаратного комплекса БОСЛАБ Профессиональный регистрировались электрокардиограмма, фотоплетизмограмма, параметры электрической активности кожи. Исследованы степень тревожности и агрессивности с помощью тестов Спилбергера—Ханина и Басс—Дарки соответственно. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы «Statistica». Межгрупповые сравнения проводились с применением критерия Манна—Уитни. Для построения факторных моделей использовался метод главных компонент. В них включались стандартизированные нормально распределенные признаки. Нормальность распределения проверялась с использованием критериев Колмогорова—Смирнова и Шапиро—Уилка. **Результаты.** Наиболее выраженные изменения нейромедиаторных, иммунных, психологических характеристик и параметров симпатoadренальной системы наблюдаются у лиц с синдромом зависимости от ПАВ. Для них характерны повышенная продукция всех исследованных антител к нейромедиаторам на фоне сниженного уровня дофамина крови, типичный иммунный дисбаланс с дефицитом клеточного звена и стимуляцией гуморального, разнонаправленные сдвиги со стороны симпатoadренальной системы при возрастании тревожности и показателей агрессии. У потребителей ПАВ с вредными последствиями на фоне тенденции к возрастанию уровня серотонина крови наблюдается возрастание относительного количества лимфоцитов при сдвиге вегетативного баланса в сторону парасимпатической активности. **Заключение.** Построенные факторные модели для всех обследованных групп свидетельствуют о том, что изменения продукции антител к нейромедиаторам вносят наибольший вклад в разброс представленных в моделях параметров. У пациентов параметры иммунорегуляции, вегетативных и психологических реакций изменяются независимо друг от друга, тогда как у условно здоровых лиц и, особенно, у эпизодических потребителей ПАВ наблюдается их большая взаимозависимость.

Ключевые слова: антитела к нейромедиаторам; антитела к глутамату; вегетативные реакции; агрессивность; тревожность; психоактивные вещества; формирование зависимости.

Для цитирования: Невидимова Т.И., Давыдова Т.В., Савочкина Д.Н., Мастерова Е.И., Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Бохан Н.А. Анализ сопряженности иммунорегуляторных, нейромедиаторных и вегетативных параметров при формировании зависимости от психоактивных веществ. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 4—10.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.4-10

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке отделения гуманитарных и общественных наук РФФИ, грант № 16-06-00617.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Невидимова Татьяна Ивановна, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН, e-mail: nevidimova@yandex.ru

Поступила 10.09.2017

Nevidimova T.I.¹, Davydova T.V.², Savochkina D.N.¹, Masterova E.I.¹,
Vetrile L.A.², Zakharova I.A.², Bokhan N.A.¹

Analysis of interrelation between immunoregulatory, neuromediator, and autonomic parameters during formation of psychoactive substance dependence

¹ Mental Health Research Institute at the Tomsk NRC RAS, Aleutskaya Str. 4, Tomsk 634014, Russia

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

Aim. To investigate the relationship between psychophysiological and immunoregulatory indexes at different stages of forming psychoactive substance dependence. **Methods.** The study involved 347 subjects, including patients with psychiatric and behavioral disorders caused by psychoactive substances (233 subjects); occasional users of psychoactive substances (28 subjects); and subjects without apparent disease (84 subjects). Immunoglobulins, cortisol, neurotransmitters, and antibodies to neurotransmitters were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Subpopulations of immunocompetent cells were identified by flow cytometry. Electrocardiogram, photoplethysmogram, and parameters of skin electrical activity were recorded using the BOSLAB Professional software and hardware complex. Anxiety and aggressiveness were evaluated using the Spielberger-Khanin and Buss-Durkee tests, respectively. Statistical analyses were performed using the Statistica software. The Mann-Whitney test was used for intergroup comparisons. Factorial models were constructed using the principal component method. The models included standardized, normally distributed characteristics. Distribution normality was verified by Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk criteria. **Results.** The most pronounced changes in neurotransmitter, immune, psychological characteristics, and parameters of the sympathoadrenal system were observed in patients with the psychoactive substance dependence syndrome. Such patients were characterized by increased production of all neurotransmitter antibodies associated with reduced blood levels of dopamine. This is a typical immune imbalance with deficiency of the cell component and stimulation of the humoral component, multidirectional shifts in the sympathoadrenal system, and progressive anxiety and aggression. Consumers of psychoactive substances with adverse consequences associated with a tendency to increase blood levels of serotonin showed an increased relative count of lymphocytes with a shift in the autonomic balance toward the parasympathetic activity. **Conclusions.** Factorial models indicated that the contribution of changes in the production of neurotransmitter antibodies to the dispersion of model parameters was the greatest. In patients, immunoregulatory, autonomic and psychological reactions changed independently of each other whereas in individuals without apparent disease and occasional users, tighter interrelations of these reactions were observed.

Keywords: antibodies to neurotransmitters; autonomic reactions; aggression; anxiety; psychoactive substance dependence.

For citation: Nevidimova T.I., Davydova T.V., Savochkina D.N., Masterova E.I., Vetrile L.A., Zakharova I.A., Bokhan N.A. Analysis of connection of immunoregulatory, neuromediator and vegetative parameters at formation of dependence of psychoactive substances. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy. Russian Journal)*. 2018; 62(2): 4–10. (in Russian).
DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.4-10

For correspondence: Nevidimova Tatiana I., leader researcher FSBSI Mental Health Research Institute Tomsk NRC RAS, e-mail: nevidimova@yandex.ru

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

Funding. The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research Department of Humanities and Social Sciences Grant № 16-06-00617.

Information about authors:

Nevidimova T.I., <http://orcid.org/0000-0002-5084-9200>

Bokhan N.A., <http://orcid.org/0000-0002-1052-855X>

Davydova T.V., <http://orcid.org/0000-0002-3176-1035>

Received 10.09.2017

Введение

При формировании болезней зависимости меняются нейромедиаторно-опосредованные характеристики: уровень агрессии и тревоги, вегетативная и иммунная регуляция [1–3]. Для ослабления влечения к психоактивным веществам в клинике и эксперименте, предпринимаются попытки воздействия на нейротрансмиттерный статус с помощью вегетоактивных

и иных препаратов [4]. Естественными регуляторами нейротрансмиссии являются антитела к нейромедиаторам [5–7]. Предполагается оценить прогностическую роль этого класса аутоантител при формировании наркотической зависимости. В качестве биомаркеров для диагностики стадийности наркотической зависимости использовали антитела к дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату и ГАМК —

нейромедиаторам, которые играют важную роль в развитии наркотической зависимости.

Нами осуществляется поиск комплексных информативных паттернов, основанных на вышеуказанных параметрах [8—9]. Цель исследования — факторный анализ психофизиологических и иммунорегуляторных показателей лиц, находящихся на разных этапах формирования зависимости от психоактивных веществ.

Методика

В обследовании приняли участие 347 человек: 245 мужчин и 102 женщины. У всех пациентов получено письменное информированное согласие на участие в исследовании, протокол этического комитета № 99. Работа проводилась с соблюдением этических принципов проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования, разработанных и изложенных в Хельсинской декларации Всемирной Ассоциации Врачей «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования», принятой 18-й Генеральной Ассамблеей Всемирной Медицинской Ассоциации в г. Хельсинки (Финляндия, июнь 1964 г.), с дополнениями в последней версии, принятой 64-й Генеральной Ассамблеей Всемирной Ассоциации Врачей, 2013 г.).

Пациенты с психическими и поведенческими расстройствами, вызванными употреблением ПАВ (233 чел.) были разделены на потребителей ПАВ с вредными последствиями (58 чел., диагнозы F19.1, F12.1, F11.1, F18.1, F10.1) и лиц с синдромом зависимости от ПАВ (175 чел., диагнозы F19.2, F11.2, F18.1, F11.3). К эпизодическим потребителям ПАВ были отнесены лица, употребляющие алкоголь чаще одного раза в неделю и/или имеющие единичные наркотические пробы (28 чел.). Контрольную группу составили условно здоровые лица, употребляющие алкоголь один раз в неделю или реже и не имеющие наркотических проб (84 чел.).

Имуноглобулины, кортизол, нейромедиаторы и антитела к нейромедиаторам определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). В качестве тест-антигенов использовали конъюгаты нейромедиаторов с бычьим сывороточным альбумином (БСА), подготовка которых детально представлена ранее [5—7]. Исследовался также субпопуляционный состав иммунокомпетентных клеток, который определяли с помощью проточной цитометрии.

Запись электрофизиологических сигналов производилась при помощи программно-аппаратного комплекса БОСЛАБ Профессиональный с усилителем физиологических сигналов БИ-012-2 (ООО

«Компьютерные системы биоуправления», г. Новосибирск). Регистрировались электрокардиограмма, фотоплетизмограмма, параметры электрической активности кожи, а также время появления розового дерматографизма.

Исследовали уровень тревожности и агрессивности с помощью тестов Спилбергера—Ханина и Басс—Дарки соответственно.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы «Statistica». Межгрупповые сравнения проводились с применением критерия Манна—Уитни. Для построения факторных моделей использовался метод главных компонент. В них включались стандартизированные нормально распределенные признаки. Нормальность распределения проверялась с использованием критериев Колмогорова—Смирнова и Шапиро—Уилка.

Результаты и обсуждение

Максимальные отклонения от контрольных показателей наблюдаются у лиц с синдромом зависимости от ПАВ (табл. 1). Повышенный уровень агрессивности и тревожности регистрируется на фоне разнонаправленных вегетативных реакций. На преобладание симпатических влияний указывает склонность к тахикардии. На снижение уровня симпатoadренальной регуляции и/или симптомы периферической нейропатии могут указывать снижение кожной проводимости, тенденция уменьшению времени появления розового дерматографизма, снижение уровня кортизола, дофамина и серотонина. Снижение уровня определяемых нейромедиаторов сочетается с ростом содержания антител к дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату, ГАМК. Иммуный статус в целом характеризуется стимуляцией гуморального и угнетением клеточного звена.

Стадии эпизодического и систематического употребления ПАВ без синдрома зависимости различаются психометрическими характеристиками. Систематическое употребление ПАВ с вредными последствиями характеризуется высоким уровнем тревожности и агрессивности, аналогичным таковым при формировании синдрома зависимости. Но по лабораторным параметрам группа лиц, употребляющих ПАВ с вредными последствиями (злоупотребляющих), имеет более выраженное сходство с группой эпизодических потребителей, чем с группой зависимых потребителей ПАВ. Немногочисленные лабораторные различия приобретают особую ценность для диагностики стадии формирования зависимости, в частности, обращают на себя внимание минимальные уровни антител к норадреналину и глутамату при эпизодическом употреблении и злоупотреблении ПАВ соответственно.

Таблица 1

Психонейроиммунные характеристики обследованных групп
(медианы параметров, в скобках — нижний и верхний квартили)

Параметры	Контрольная группа (n = 84)	Эпизодические потре- бители ПАВ (n = 28)	Употребление ПАВ с вредными последствиями (n = 58)	Сидром зависимости от ПАВ (n = 175)
Характеристики симпатoadренальной системы				
Кпр, мкСм	7,1(3,9;9,9)	10,3(7,6;13,8)	7,3(4,4;14,5)	2,6(1,2;4,3)**###++
LnКпр, мкСм	2,0(1,4;2,4)	2,3(2,0;2,6)	2,0(1,5;2,7)	1,0(0,3;1,5) **###++
ЧР, ср/мин	6,0(3,0;9,0)	9,0(8,0;11,0)	6,0(0,0;10,0)	1,0(0,0;4,0) **##+
RR, мс	820,9(718,3;916,4)	789,5(751,9;844,1)	779,5(684,9;832,8)	738,3(575,9;772,7)*
ЧСС, уд./мин	73,5(67,2;84,3)	76,4(71,6;80,0)	77,1(72,3;87,9)	81,3(78,5;104,2)*
ДГ, с	15,0(10,5;18,0)	11,0(10,0;18,0)	10,0(7,0;17,0)*	12,0(8,0;18,0)
Кортизол, нмоль/л	808,5(517,4;1175,7)	312,2(294,2;1195,6)	646,4(395,8;1367,4)	637,7(407,7;873,3)**
Показатели иммунного статуса				
Лимфоциты, %	37,0(30,0;40,0)	40,0(31,0;43,0)*	40,0(29,0;47,0)*	37,0(28,0;45,0)
Моноциты, %	5,0(4,0;7,0)	6,0(5,0;8,0)*	3,0(1,0;7,0)** ##	5,0(2,0;7,0) #
CD3 ⁺ , %	71,5(64,0;76,0)	70,5(65,0;78,0)	71,0(67,0;82,0)	64,0(57,0;73,0) **###++
CD4 ⁺ , %	40,5(36,0;45,5)	41,0(36,5;47,5)	43,0(38,0;50,0)	40,0(32,0;46,0)+
HLADR ⁺ , %	13,0(9,0;16,0)	12,0(7,0;19,0)	17,5(5,5;29,5)	22,5(14,5;29,5) **##
CD16 ⁺ , %	13,0(8,5;18,0)	10,5(7,0;17,5)	11,0(7,0;13,0)	10,0(5,0;15,0)**
Ig M, г/л	1,7(1,19;2,4)	1,9(1,1;2,7)	1,2(0,8;2,0) *#	1,9(1,3;2,6)++
Ig G, г/л	16,5(12,9;20,3)	19,8(12,4;26,7)	17,4(15,0;24,0)	17,1(14,6;21,3)+
Ig A, г/л	1,4(1,0;2,4)	1,8(1,1;2,5)	1,5(1,2;2,2)	1,8(1,4;2,5)**+
ЦИК, усл.ед.	58,0(36,0;75,0)	59,5(38,0;79,0)	49,0(35,0;62,0)	87,0(63,0;123,0) **###+
ФЧ, усл.ед.	5,9(4,9;7,5)	4,9(3,9;6,3)*	6,0(4,8;7,2)	7,8(6,0;9,4) **###+
Нейромедиаторные и иммунорегуляторные параметры				
Дофамин, пг/мл	0,057(0,028;0,105)	0,040(0,033;0,052)	0,031(0,031;0,033)	0,029(0,026;0,037)*
Серотонин, пг/мл	324,3(243,5;404,0)	331,7(263,0543,4)	474,4(361,7;930,0)	303,0(232,5;394,9)
АТ ДА, усл.ед.	0,94(0,79;1,28)	0,94(0,82;1,30)	0,89(0,75;1,19)	1,17(0,95;1,50) **###++
АТ НА, усл.ед.	0,91(0,71;1,23)	0,86(0,69;1,21)	1,04(0,69;1,26)	1,15(0,89;1,45) **###+
АТ СЕР, усл.ед.	0,96(0,81;1,17)	0,89(0,69;1,15)	0,96(0,78;1,14)	1,25(0,95;1,49) **###++
АТ ГЛУ, усл.ед.	1,04(0,82;1,2)	1,09(0,91;1,27)	0,89(0,76;1,11)	1,31(0,94;1,52) **++
АТ ГАМК, усл.ед.	1,05(0,72;1,23)	1,10(0,83;1,27)	0,93(0,72;1,17)	1,23(0,88;1,5) **++
Психологические характеристики				
ИВ, баллы	9,0(6,0;11,0)	9,0(7,0;13,0)	12,0(9,0;13,0)**	12,0(10,0;14,0) **#
ИА, баллы	14,0(12,0;18,0)	19,0(12,0;23,0)*	18,0(15,0;23,0)**	22,0(18,0;25,0) **###++
СТ, баллы	34,5(27,0;38,5)	35,0(27,0;44,0)	37,0(32,0;44,0)*	45,0(35,0;52,0) **###++
ЛТ, баллы	44,0(40,0;49,0)	46,0(40,0;57,0)	41,0(34,5;47,0) *#	46,0(39,0;51,0)++
Примечание. Кпр — кожная проводимость; LnКпр — натуральный логарифм кожной проводимости; ЧР — частота спонтанных реакций кожной проводимости; RR, мс — длительность интервалов RR на электрокардиограмме; ЧСС — частота сердечных сокращений; ДГ — розовый дерматографизм; CD — кластеры дифференцировки лимфоцитов; Ig — иммуноглобулины; ЦИК — циркулирующие иммунные комплексы; ФЧ — фагоцитарное число; АТ ДА, НА, СЕР, ГЛУ — антитела к дофамину, норадреналину, серотонину, глутамату; ИВ и ИА — индексы враждебности и агрессивности; СТ и ЛТ — ситуационная и личностная тревожность; * — p<0,05 при сравнении с контрольной группой; ** — p<0,01 при сравнении с контрольной группой; # — p<0,05 при сравнении с эпизодическими потребителями ПАВ; ## — p<0,01 при сравнении с эпизодическими потребителями ПАВ; + — p<0,05 при сравнении с потребителями ПАВ с вредными последствиями; ++ — p<0,01 при сравнении с потребителями ПАВ с вредными последствиями.				

Таблица 2

Факторная модель психонейроиммунных параметров лиц из контрольной группы

	1 фактор	2 фактор	3 фактор
Логарифм кожной проводимости, мкСм	0,052228	-0,216805	0,875513
Частота сердечных сокращений, уд./мин	-0,250500	0,343638	0,667053
Иммуноглобулины М, г/л	0,065915	0,613333	-0,320670
Иммуноглобулины А, г/л	0,427433	0,730894	0,023150
Антитела к дофамину, г/л	0,900230	0,289608	-0,126781
Антитела к норадреналину, г/л	0,916722	-0,002431	0,046476
Антитела к серотонину, г/л	0,951281	0,115024	-0,063964
Антитела к глутамату, г/л	0,986430	-0,039986	-0,024767
Антитела к ГАМК, г/л	0,974148	-0,055063	0,080737
Дерматографизм, с	0,158803	-0,301614	0,318992
Ситуационная тревожность, баллы	0,024477	0,711324	-0,102144
Личностная тревожность, баллы	-0,027820	0,794507	0,230685
Собственные значения	4,86	2,33	1,48
Совокупный процент объясненной дисперсии	40,52	59,97	72,27

Таблица 3

Факторная модель психонейроиммунных параметров эпизодических потребителей ПАВ

	1 фактор	2 фактор
Кожная проводимость, мкСм	-0,779885	0,526644
Иммуноглобулины М, г/л	0,705358	0,456959
Иммуноглобулины G, г/л	0,103895	0,859101
Антитела к глутамату, усл.ед.	0,978815	0,024532
Антитела к ГАМК, усл.ед.	0,948448	0,162516
Ситуационная тревожность, баллы	-0,090255	0,813503
Личностная тревожность, баллы	0,707994	-0,383127
Собственные значения	3,48	2,06
Совокупный процент объясненной дисперсии	50,00	79,19

Таблица 4

Факторная модель психонейроиммунных параметров пациентов с психическими и поведенческими расстройствами, вызванными употреблением ПАВ

	1 фактор	2 фактор	3 фактор
Логарифм кожной проводимости, мкСм	0,000853	-0,139697	-0,893711
Циркулирующие иммунные комплексы, усл.ед.	-0,000698	-0,536709	0,428501
Антитела к дофамину, усл.ед.	0,818595	-0,161781	-0,202915
Антитела к норадреналину, усл.ед.	0,875637	0,087469	0,092241
Антитела к серотонину, усл.ед.	0,921132	0,002613	-0,097806
Антитела к глутамату, усл.ед.	0,912968	0,205646	0,076776
Антитела к ГАМК, усл.ед.	0,787827	0,235339	0,128918
Ситуационная тревожность, баллы	0,058346	0,853876	0,190337
Личностная тревожность, баллы	0,138636	0,854675	0,063121
Собственные значения	3,88	1,83	1,05
Совокупный процент объясненной дисперсии	43,15	63,46	75,17

Для понимания внутренних взаимосвязей были построены факторные модели психонейроиммунных характеристик (табл. 2—4). При анализе в один фактор объединяются сильно коррелирующие между собой признаки. Признаки из разных факторов слабо связаны между собой. Для анализа наиболее информативны первые 2—3 фактора, собственные значения которых больше единицы и которые определяют 70—80% дисперсии. Метод позволяет сократить количество исходных переменных, укрупнить их. Выделение факторов позволяет также определить взаиморасположение групп сравнения, в контексте настоящей работы — групп с разным отношением к употреблению ПАВ.

Свойства фактора определяются весовыми коэффициентами входящих в него признаков: максимальные нагрузки в таблицах подчеркнуты. Логическая интерпретация факторов позволяет дать им обобщенное название согласно входящим в них максимально нагруженным признакам: «фактор антител к нейромедиаторам», «иммунопсихологический фактор», «вегетативный фактор». Именно эти факторы объясняют дисперсию признаков в группах аддиктов и контрольных лиц.

В контрольной группе модель состоит из трех факторов, в 1-й из которых с наибольшей нагрузкой вошли антитела к нейромедиаторам, во 2-й — показатели уровня тревожности, коррелирующие с уровнем иммуноглобулинов, в 3-й — вегетативные параметры, коррелирующие между собой. Для наркологических пациентов получена модель из трех факторов с более бедными корреляциями: в 1-й с наибольшей факторной нагрузкой вошли аутоантитела к нейромедиаторам, во 2-й — тревожность, среднекоррелирующая с уровнем иммунных комплексов, в 3-й — параметры кожной проводимости. У эпизодических потребителей наблюдается максимальная взаимозависимость психонейроиммунных параметров. Модель состоит из двух факторов, в 1-й из которых с наибольшей нагрузкой вошли антитела к избранным нейромедиаторам (глутамату и ГАМК), и отдельные иммунопсихологические признаки (личностная тревожность, иммуноглобулины М), и вегетативный признак (кожная проводимость). Во 2-й «иммунопсихологический» фактор вошли иммуноглобулины G и ситуационная тревожность.

Заключение

Наиболее выраженные изменения нейромедиаторных, иммунных, психологических характеристик и параметров симпатoadренальной системы наблюдаются у лиц с синдромом зависимости от ПАВ. Для них характерны повышенная продукция всех исследованных антител к нейромедиаторам на фоне сниженного уровня дофамина крови, типичный иммунный дисбаланс с дефицитом клеточного

звена и стимуляцией гуморального, разнонаправленные сдвиги со стороны симпатoadренальной системы при возрастании уровня тревожности и показателей агрессии. У потребителей ПАВ с вредными последствиями на фоне тенденции к возрастанию уровня серотонина крови наблюдается возрастание относительного количества лимфоцитов при сдвиге вегетативного баланса в сторону парасимпатической активности.

Построенные факторные модели для всех обследованных групп свидетельствуют о том, что изменения продукции антител к нейромедиаторам вносят наибольший вклад в разброс представленных в моделях параметров. У пациентов параметры иммунорегуляции, вегетативных и психологических реакций изменяются независимо друг от друга, тогда как у условно здоровых лиц и, особенно, у эпизодических потребителей ПАВ наблюдается их большая взаимозависимость.

References

1. Henry B.L., Minassian A., Perry W. Effect of methamphetamine dependence on heart rate variability. *Addict Biol.* 2012; 3: 648-58.
2. Hahn C., Kim D.J. Is there a shared neurobiology between aggression and Internet addiction disorder? *J Behav Addict.* 2014; 1: 12-20.
3. Simonovska N, Zafirova-Ivanovska B, Babulovska A, Pereska Z, Jurukov I, Trenchevska-Siljanovska L. Influence of Duration of Heroin Dependence on Humoral Immunologic Indicators. *J Addict Med.* 2016; 10: 448-52.
4. Patkar O.L., Belmer A., Holgate J.Y., Tarren J.R., Shariff M.R., Morgan M. et al. The antihypertensive drug pindolol attenuates long-term but not short-term binge-like ethanol consumption in mice. *Addict Biol.* 2017; 3: 679-91.
5. Davydova T.V., Vetrilje L.A., Nevidimova T.I., Vetlugina T.P., Fomina V.G., Zaharova I.A. et al. The ratio of antibodies to neurotransmitters in the blood serum of students who occasionally used psychoactive substances. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2014; 3: 309-11. (in Russian)
6. Davydova T.V., Vetrilje L.A., Nevidimova T.I., Fomina V.G., Masterova E.I., Bohan N.A. et al. Antibodies to dopamine and glutamate as predisposing factors to addictive disorders. *Sibirskiy vestnik psikiatrii i narkologii.* 2016; 2: 39-41. (in Russian)
7. Vetrilje L.A., Nevidimova T.I., Masterova E.I., Bohan N.A., Zaharova I.A., Savochkina D.N. et al. Antibodies to neurotransmitters are neuroimmune markers in the personalized prevention of dependence diseases. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2017; 1: 31-7. (in Russian)
8. Bohan N.A., Masterova E.I., Nevidimova T.I., Savochkina D.N. Regularities of psychoneuroimmunological response in individuals at different stages of the formation of dependence on psychoactive substances. *Voprosy narkologii.* 2017; 2-3: 117-27. (in Russian)
9. Masterova E., Bokhan N., Nevidimova T., Savochkina D., Nikitina V., Lobacheva O., Vetlugina T. Role of olfactory reactions, nociception, and immunoendocrine shifts in addictive disorders. *American Journal on Addictions.* 2017; 6: 640-8.

Сведения об авторах:

Невидимова Татьяна Ивановна, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН, e-mail: nevidimova@yandex.ru

Давыдова Татьяна Викторовна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Савочкина Дарья Николаевна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. клинической психонейроиммунологии и нейробиологии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН

Мастерова Елена Ивановна, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. отд-ния аддиктивных состояний НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН

Ветрилэ Лучия Александровна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Захарова Ирина Александровна, канд. биол. наук, ведущий науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Бохан Николай Александрович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, директор НИИ психического здоровья Томского НИМЦ РАН, руководитель отд. аддиктивных состояний

© Коллектив авторов, 2018
УДК 576.535.5 + 57.085.23

Лисина О.Ю.^{1,2}, Московцев А.А.^{1,3}, Кубатиев А.А.^{1,3}, Сурин А.М.^{1,4,5}

Динамика изменений морфологии нейрональной сети и развития митохондрий в механически поврежденной первичной культуре нейронов

¹ ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАН,
125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

² ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет» Министерства образования и науки РФ,
119454, г. Москва, Россия, просп. Вернадского, д. 78

³ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России,
125993, г. Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

⁴ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России,
119991, г. Москва, Россия, Ломоносовский просп., д. 2, стр. 1

⁵ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России,
117997, г. Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1

Цель исследования. На модели первичной культуры нейронов изучить влияние повреждения (механическая травма) на: 1 — морфологию нейрональной сети и 2 — динамику образования митохондрий в процессе развития культуры. **Методика.** Развитие первичной культуры нейронов из мозжечка 7-дневных крыс регистрировали с интервалом 20 мин в течение 2,5 нед. со дня посева клеток с помощью системы прижизненной визуализации и анализа IncuCyte ZOOM, снабженной 20x объективом. Изображения сомы индивидуальных нейронов и развитие нейритов¹ записывали в проходящем свете. Образование митохондрий и генерацию в них электрического трансмембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) отслеживали с помощью потенциал-чувствительного флуоресцентного зонда TMRM (20 нМ), который непрерывно присутствовал в культуре с момента посадки. Механическую травму мозга моделировали нанесением царапины шириной ~1 мм по монослою клеток спустя 23 ч после посадки. **Результаты.** Морфологические изменения развивающейся первичной культуры нейронов (суммарная длина нейритов, относительная площадь сомы) характеризуются тремя фазами, отличающимися по кинетике и продолжительности. TMRM влиял на продолжительность и амплитуду фаз, не изменяя их количества. Митохондрии начинали развиваться на 4-е сут. после посадки культуры и увеличение их числа и рост $\Delta\Psi_m$ завершались после 10—14-х сут. развития культуры. **Заключение:** Фазы развития митохондрий соотносятся с тремя фазами морфологических изменений культуры в целом. Первые 2—3 сут. после посадки энергообеспечение нейрональной сети происходит, вероятно, за счет гликолиза, поскольку митохондрии не генерируют $\Delta\Psi_m$, достаточный для синтеза АТФ. Аксоны из неповрежденной области прорастают в поврежденную зону преимущественно в направлении нейронов, сохранившихся в зоне царапины.

Ключевые слова: первичная культура нейронов; мозжечок; митохондрии; митохондриальный потенциал; механическая травма; цейтраферная микроскопия.

Для цитирования: Лисина О.Ю., Московцев А.А., Кубатиев А.А., Сурин А.М. Динамика изменений морфологии нейрональной сети и развития митохондрий в механически поврежденной первичной культуре нейронов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 11—23.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.11-23

Финансирование. Исследование поддержано грантами РФФИ 16-04-00792, РФФИ 15-04-01869, РФФИ 17-00-00106; РНФ 17-15-01487.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Авторы выражают искреннюю благодарность Н.В. Кошелевой и Э.Р. Муслихову за ценные советы, полученные при подготовке статьи.

Поступила 12.12.2017

Для корреспонденции: Сурин Александр Михайлович, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли НИИОПП, e-mail: surin_am@mail.ru

¹ Нейриты — обобщенное название аксонов и дендритов; данный термин используется при описании незрелых и/или развивающихся нейронов, особенно нейронов в культуре, так как на раннем этапе невозможно отличить аксон от дендрита [1, 2].

Lisina O.Yu.^{1,2}, Moskovtsev A.A.^{1,3}, Kubatiev A.A.^{1,3}, Surin A.M.^{1,4,5}

Dynamics of changes in neuronal network morphology and development of mitochondria in mechanically damaged primary neuronal culture

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

² MIREA — Russian Technological University, Prospekt Vernadskogo 78, Moscow 119454, Russia

³ Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Barrikadnaya Str. 2/1, Moscow 123995, Russia

⁴ National Medical Research Center of Children's Health, Lomonosovskiy Prospekt 2/1, Moscow 119991, Russia

⁵ Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovityanova Str. 1, Moscow 117997, Russia

The aim of the study was (1) to trace morphological changes in a primary neuronal culture during its development and compare these changes with morphological changes in a mechanically damaged culture, and (2) to elucidate the dynamics of mitochondrial formation in normal and damaged cultures. **Methods.** The development of a primary culture of neurons from the cerebellum of 7-day old rats was recorded at 20-min intervals for 2.5 weeks starting from the cell seeding day with a IncuCyte ZOOM's intravital imaging and analysis system equipped with 20x objective lenses. Images of individual neuronal soma and neurite development were recorded in transmitted light. Mitochondrial formation and generation of electrical transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) were monitored with a potential-sensitive fluorescent probe TMRM (20 nM), which was continuously present in the culture from the moment of seeding. Mechanical brain injury was modeled by applying an approximately one-mm wide scratch to the cell monolayer at 23 hours after plating. **Results.** Morphological changes in the developing primary neuronal culture (total length of neurites, relative area of soma) were characterized by three phases with different kinetics and duration. TMRM influenced the phase duration and amplitude without changing the number of phases. Mitochondria began developing on the fourth day after plating. Increases in their number and $\Delta\Psi_m$ were complete at 10—14 days of culture development. **Conclusion.** Phases of mitochondrial development were consistent with three phases of morphological changes in the entire culture. During the first 2—3 days following cell plating, the energy supply to the neuronal network was apparently provided by glycolysis since mitochondria did not generate an adequate $\Delta\Psi_m$ for ATP synthesis. Axons grow from the intact area into the injured zone mainly in the direction of survived neurons in the scratch zone.

Keywords: primary neuronal culture; cerebellum; mitochondria; mitochondrial potential; mechanical trauma; time-lapse microscopy.

For citation: Lisina O.Yu., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A., Surin A.M. Dynamics of changes in neuronal network morphology and development of mitochondria in mechanically damaged primary neuronal culture. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 11—23. (in Russian).
DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.11-23

For correspondence: Alexander M. Surin, Doctor of Biological Sciences, Major scientific researcher of the Laboratory of fundamental and applied problems of pain Institute of General pathology and pathophysiology Russian Academy of Sciences; Baltiyskaya str., 8, Moscow, 125315, Russia, e-mail: surin_am@mail.ru

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

Acknowledgments. The work was supported by grants of RFBR 17-00-00106, 16-04-00792, 15-04-01869 and grant of RSF 17-15-01487.

Information about authors:

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

Received 12.12.2017

Введение

Исследование механизмов гибели клеток в поврежденных участках первичных нейрональных культур давно и успешно применяется в качестве модели *in vitro* при изучении процессов, протекающих при хирургических операциях на мозге и механической травме головного или спинного мозга [1, 2]. Механическое повреждение первичных глиальных и нейро-глиальных культур вызывало гораздо большую гибель нейронов, чем глиальных клеток [3, 4], причем антагонист ионо-

тропных глутаматных рецепторов NMDA-типа МК-801 и ингибитор метаботропных глутаматных рецепторов MCPG оказывали нейропротекторное действие [3]. Аналогичный эффект вызывало ингибирование синтеза NMDA-рецепторов [4], свидетельствуя о значительном вкладе гиперстимуляции глутаматных рецепторов в гибель нейронов при механическом повреждении нейрональной сети.

Нанесение механической травмы использовали не только для выяснения механизмов гибели нейронов, оказавшихся в зоне повреждения, но также для изу-

чения репарации культуры после повреждения [5, 6]. В работе [5], выполненной с применением флуоресцентной и трансмиссионной оптической микроскопии, было показано, что положительно заряженные наночастицы могут служить средством доставки внутрь клеток химических веществ, влияющих на регенерацию поврежденной первичной культуры. Для исследования механизма репарации поврежденного мозга получали трансгенных мышей, экспрессирующих в нейронах фактор апоптоза *Paq-4*, первоначально обнаруженный в раковых клетках простаты и содержащий в своей структуре домен смерти [6]. По сравнению с культурами клеток из мышей дикого типа в нейро-глиальных культурах из трансгенных мышей наблюдалось более сильное падение митохондриального потенциала, большее образование свободных радикалов, а также более ранняя активация каспазы-3.

При механических травмах спинного и головного мозга часто наблюдают бактериальное заражение зоны поражения [7]. В работе [7] было проверено может ли прекондиционирование нейро-глиальных культур фрагментами стенки бактерии *E.coli*, основным компонентом которых является липополисахарид (ЛПС), повлиять на выживаемость клеток мозга. Прекондиционирование механически травмированных культур с ЛПС значительно увеличивало уровень интерлейкина-10 и снижало гибель клеток по сравнению с поврежденными культурами, обработанными средой без ЛПС.

Механическое повреждение первичной культуры астроцитов из кортекса новорожденных крыс приводило к гиперпластичности, повышенной подвижности и увеличенному содержанию глиального фибриллярного кислого белка (glial fibrillary acidic protein, GFAP) [8]. В поврежденной культуре астроциты приобретали реактивность и находились в состоянии, напоминающем процесс рубцевания, причем блокирование синтеза GFAP подавляло образование рубца [9]. Ингибирование с помощью антисмысловых олигонуклеотидов или лентивирусных конструкций синтеза GFAP или виментина в культурах, поврежденных царапиной, снижало реактивность астроцитов и скорость рубцевания [9]. Механическая травма (нанесение царапины) первичной культуры астроцитов зарастала медленнее, если ингибировали циклинзависимую киназу 5 [10]. Причиной более медленной репарации повреждения служит ингибирование реорганизации тубулина, локализации GFAP и уменьшение длины дендритов реактивных астроцитов в сторону царапины.

В цитированных выше исследованиях измерения интересующих параметров проводили не более чем в 3—4 временных точках, причем через несколько суток после посева культуры и нанесения механиче-

ского повреждения. В данной работе мы изучали динамику развития нейрональной сети в течение 2,5 нед., начиная с момента посева культуры.

Цель исследования. На модели первичной культуры нейронов изучить влияние повреждения (нанесение механической травмы) на: 1 — морфологию нейрональной сети и 2 — динамику образования митохондрий в процессе развития культуры

Методика

Эксперименты с животными выполняли в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. 2010), а также в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016 г.

Первичные нейрональные культуры готовили из мозжечка самцов крыс Вистар (возраст 6—7 сут.), как описано в работе [11]. Суспензию клеток в нейро-базальной среде с добавлением 20 мМ KCl, 2% Supplement B-27 и 0,5 мМ L-глутамин, раскапывали в 24-луночный планшет, каждая лунка которого была предварительно покрыта полиэтиленгликолем и содержала 1,8 мл нейробазальной среды с указанными выше дополнительными компонентами. В лунки вносили по 0,2 мл суспензии — плотность посадки 3×10^5 клеток/лунку. Нейроны росли при 37°C в атмосфере 5% CO₂/95% воздуха и 100% влажности в течение ~2,5 нед. Механическую травму (царапина) наносили через 23 ч после посева культуры, когда образование нейритов находилось в самой начальной стадии. Выбор культуры нейронов мозжечка крысы, способной развиваться при низком содержании глины, и нанесение царапины в момент, когда нейрональная сеть еще не сформировалась, позволило выявить различные фазы развития нейрональной сети, стадии развития митохондрий в соме нейронов и особенности прорастания аксонов в зону механического повреждения.

Цейтраферную съемку нейрональной культуры в фазово-контрастном и флуоресцентном режимах осуществляли с интервалом 20 мин при помощи системы прижизненной визуализации и анализа IncuCyte ZOOM (Essen BioScience, США), оптический блок которой постоянно находился в CO₂-инкубаторе. При съемке использовали объектив 20x/NA = 0,7.

Для отслеживания изменений трансмембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий ($\Delta\Psi_m$) использовали флуоресцентный зонд TMRM (метилловый эфир тетраметилродамина, Invitrogen, США). В каждой

лунке велась запись изображений с интервалом 20 мин в четырех участках размером 0,63 X 0,85 мм, равноудаленных от центра и краев лунки.

Для анализа данных использовали следующие параметры:

1. Средняя суммарная длина нейритов в пересчете на единицу поверхности (Average Neurite Length, NL, мм/мм²); нейритами программа считает все объекты, поперечный размер которых равен 1 мкм;
2. Доля поверхности, занимаемая сомой индивидуальных нейронов или их кластеров, если программный модуль прибора не позволяет различить тела соседних нейронов как индивидуальные объекты (Cell-Body Cluster Area, CBA, мм²/мм²);
3. Число флуоресцирующих объектов на единицу поверхности (Average Object Count, OC, 1/мм²);
4. Средняя площадь флуоресцирующих объектов (Average Object Area, OA, мкм²).

Параметры NL и CBA подсчитывали при помощи программного модуля IncuCyte® NeuroTrack Software Module, а параметры OA и OC — при помощи Fluorescent Processing Software Module.

Результаты и обсуждение

Изменения морфологии неповрежденной нейрональной культуры

В изменениях морфологии нейрональной культуры по мере ее роста и развития обращает на себя внимание наличие четко различающихся фаз. Наиболее быстрая фаза роста нейритов начинается почти сразу после прикрепления клеток к дну лунки (рис. 1, А). В начальные 40—50 ч быстрый рост суммарной длины нейритов (NL) происходит практически линейно (рис. 1, Е). Затем наступает значительное замедление роста нейритов, которое проявляется в 4,4-крат-

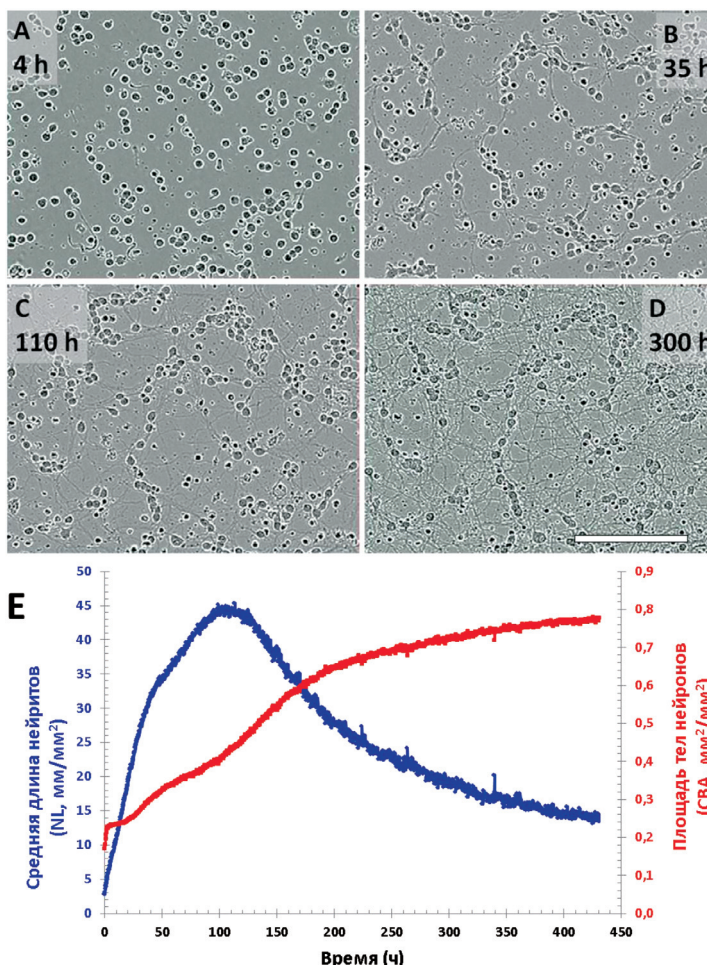


Рис. 1. Динамика изменений морфологии нейрональной сети по мере развития первичной культуры. Фазово-контрастные изображения (A-D) первичной культуры гранулярных нейронов мозжечка в разные сроки после посадки и графики (E) изменений суммарной длины нейритов (NL, синяя кривая, левая шкала ординат, мм/мм²) и относительной площади (CBA, красная кривая, правая шкала ординат, мм²/мм²), занимаемой телами нейронов и их кластерами. На панелях (A-D) числами указан возраст культуры (часы). Масштабная полоска соответствует 100 мкм.

ном снижении наклона кривой (участки 4—32 ч и 42—100 ч считали линейными). Сопоставление изображений, полученных на 30-м и 100-м ч, показывает, что в этом интервале NL увеличивается за счет развития коротких нейритов (возможно, дендритов) между телами нейронов (рис. 1, В, С). Максимальная NL достигается к 120—150 ч, после чего неожиданно наступает снижение длины нейритов (рис. 1, Е). Из сопоставления изображений на 150-м и 300-м ч (рис. 1, С, D) видно, что заметного разрушения нейритов не происходит, а снижение NL после 140—150-го ч наступает в результате объединения отдельных нейритов в пучки.

Таким образом, снижение длины нейритов является кажущимся и уменьшение параметра NL вызвано не фрагментацией нейритов, а тем, что программа анализа изображений считает нейритами только те объекты, поперечный размер которых равен 1 мкм. Объекты, чей диаметр превышает 1 мкм, рассматриваются уже не как нейриты, а как тела нейронов и/или их кластеров и учитываются в параметре СВА (рис. 1, Е).

Второй измеряемый параметр — относительная площадь, занимаемая сомой нейронов (СВА), как и суммарная длина нейритов, также характеризуется несколькими фазами, возникающими по мере роста и развития культуры. После завершения осаднения клеток и прикрепления к дну лунок (первые 4 ч) параметр СВА стабилизируется и остается постоянным до ~20 ч (рис. 1, Е). Наступающая затем фаза быстрого роста СВА отражает увеличение размера сомы нейронов. Отчасти это увеличение обусловлено ростом нейритов, размер которых возле места отхождения от сомы значительно больше 1 мкм и поэтому эти участки нейритов включены в параметр СВА. Вероятно, поэтому фаза быстрого увеличения суммарной площади сомы завершается практически тогда, когда завершается фаза быстрого роста суммарной длины нейритов (рис. 1, Е). Фаза медленного увеличения СВА наблюдается в интервале 60—120 ч, тогда же происходит и медленный рост параметра NL (рис. 1, Е). Такое совпадение времени медленных фаз роста NL и СВА согласуется с предположением о том, что рост СВА отражает процесс формирования нейритов на соме клеток.

В тот момент, когда график NL проходит через максимум (~120 ч), начинается завершающая фаза роста СВА (рис. 1, Е). Причина этого финального роста, очевидно, в том, что программа перестает распознавать объекты диаметром более 1 мкм как нейриты, и считает их телами нейронов или их кластерами. По этой же причине СВА достигает значения, которое при взгляде на изображение (рис. 1, D) представляется завышенным, поскольку суммарная пло-

щадь тел нейронов явно не занимает 80% от общей площади изображения. Однако, если в параметр СВА включены не только сома нейронов, но и собирающиеся в пучки нейриты, тогда такое высокое значение СВА становится допустимым. Собираению нейритов в пучки способствует небольшое перемещение нейронов и объединение их в кластеры, которое прослеживается по мере старения культуры.

Развитие митохондриальной сети в неповрежденной нейрональной культуре

В культивируемых нейронах, полученных из мозга новорожденных крыс, основными производителями АТФ для энергообеспечения внутриклеточных процессов считаются митохондрии [12—14]. Поэтому параллельно с измерениями изменений морфологии развивающейся культуры был выполнен мониторинг основной интегральной характеристики функционального состояния митохондрий — $\Delta\Psi_m$. Для этого использовали потенциал-чувствительный флуоресцентный зонд TMRM [15, 16].

В течение первых 3 сут. (до ~70-го ч) происходило накопление TMRM в клетках и в митохондриях. Сопоставление изображений, полученных в этот период, показывает, что паттерн распределения зонда немного меняется (рис. 2, А, В), что согласуется с отмеченным выше феноменом взаимного перемещения тел клеток. Эта подвижность тел не отражается на суммарной интенсивности флуоресценции и площади, занимаемой флуоресцирующими объектами на изображении (рис. 2, Е). По-видимому, в течение первых 3 сут. роста и развития культуры трансмембранный электрический потенциал как плазмалеммы, так и митохондрий, почти не изменяются, оставаясь низкими. На это указывает суммарная флуоресценция TMRM, которая не превышает 5% от максимальной интенсивности в конце 17-суточного периода наблюдения за культурой (рис. 2, Е). Почти постоянной и тоже низкой в течение первых 3 сут. остается также и площадь флуоресцирующих объектов (рис. 2, Е).

В интервале от 70 до 140 ч происходит быстрый рост интенсивности флуоресценции и начинается увеличение площади флуоресцирующих объектов (рис. 2, Е). Начало быстрого роста интенсивности сигнала TMRM примерно соответствует завершению фаз быстрого формирования нейритов и увеличения СВА (рис. 1, Е). Совмещение фазово-контрастных изображений с соответствующими флуоресцентными показывает, что в период 70—120 ч происходит быстрый захват TMRM митохондриями. Очевидно, между 3-ми и 5-ми сут. митохондрии начинают заметно наращивать $\Delta\Psi_m$. Не исключено, что также происходит значительное увеличение количества митохондрий в соме нейронов.

Быстрый рост интенсивности флуоресценции TMRM после 120-го ч замедлился, по-видимому, потому, что замедлился рост $\Delta\Psi_m$ и/или количества митохондрий в соме нейронов (рис. 2, E). Особенностью этой фазы является то, что митохондрии располагаются в цитозоле нейронов преимущественно вокруг ядра и возле мест отхождения нейритов от сомы, что является типичным для зрелой культуры [17].

Влияние TMRM на развитие нейрональной сети

Митохондриальный флуоресцентный зонд TMRM является положительно заряженной липофильной молекулой, способной диффундировать сквозь внутреннюю мембрану митохондрий и накапливаться в мат-

рикс пропорционально величине $\Delta\Psi_m$ и количеству митохондрий [15, 16, 18]. Необходимо отметить, что любой катион, проникающий сквозь мембрану, способен снижать $\Delta\Psi_m$ [19]. При продолжительной инкубации клеток с TMRM снижение $\Delta\Psi_m$ могло сказаться на развитии культуры, поэтому мы проверили влияние зонда на морфологию нейрональной сети. Добавка TMRM (20 нМ) не оказывала заметного влияния на NL в течение первых 2 сут. развития культуры (рис. 3, A). Дальнейшие изменения NL в лунках с добавлением TMRM напоминали изменения NL в контрольной культуре, но с задержкой по времени на 20—50 ч, вплоть до ~300-го ч. Далее кривые практически совпали (рис. 3, A). Многофазный характер параметра СВА также не изменился.

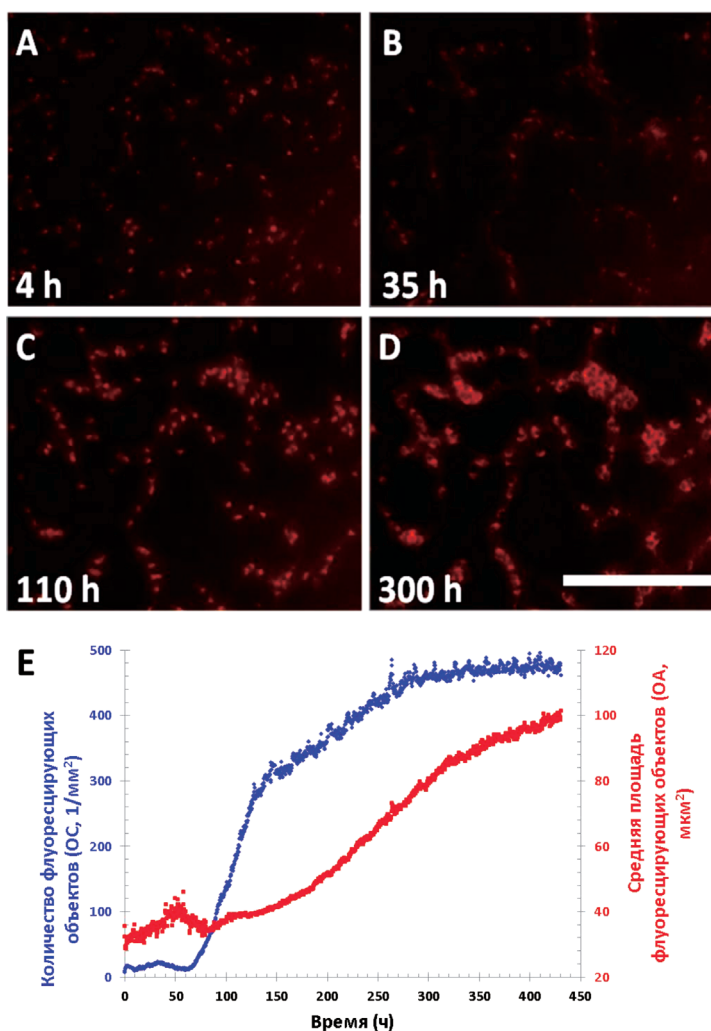


Рис. 2. Динамика накопления митохондриального зонда TMRM в первичной культуре гранулярных нейронов мозжечка. (A-D) Флуоресцентные изображения тех же самых участков культуры в те же моменты времени, которые представлены на рис. 1A-1D. (E) Графики изменения общего количества флуоресцирующих объектов на единицу поверхности (ОС, 1/мм², синяя кривая, левая ось ординат), и средняя площадь, занимаемая флуоресцирующими объектами (ОА, мкм², красная кривая, правая ось ординат). TMRM (20нМ) был добавлен одновременно с посадкой клеток в лунки. Объектив 20х/NA = 0,70; длины волн возбуждения и эмиссии соответственно 550 и 590 нм. Кривые являются средними значениями по 3 лункам 24-луночного планшета (12 изображений, n = 1000–2000 клеток). Масштабная полоска соответствует 100 мкм.

*Изменения морфологии нейрональной сети
и развития митохондрий
после механического повреждения культуры*

Царапина была проведена через 23 ч после посадки культуры, когда нейриты еще не сформировались или имели небольшую длину, достаточную для образования контактов только с ближайшими клетками. Прорастание длинных нейритов в зону царапины из неповрежденной области начиналось сразу после нанесения царапины и продолжалось в течение всего времени наблюдения.

Царапина, как и следовало ожидать, скачкообразно снижала параметры NL (рис. 4, А) и СВА (рис. 4, В). Кривая изменения СВА в травмированной культуре по очертанию повторяла изменения СВА в контрольной культуре, но проходила немного ниже (рис. 4, В). В травмированных культурах участок кривой, соответствующий объединению нейритов в пучки (6 и более суток со дня посадки), имел мень-

ший наклон, чем в контрольных культурах. Интересно, что присутствие TMRM в травмированной культуре дополнительно замедляло снижение NL после 160—180-го ч (рис. 4, С). Возможно, вызванное TMRM небольшое снижение $\Delta\Psi_m$ препятствовало объединению нейритов в пучки.

Из сопоставления флуоресцентных изображений контрольной и травмированной культур видно, что распределение митохондрий в сомах индивидуальных нейронов одинаково в обеих культурах (рис. 5, А; 5, В). Кривые изменения интенсивности сигналов TMRM, которые отражают изменения среднего размера флуоресцирующего объекта, практически совпадают в контрольной и поврежденной культурах (рис. 5, D, параметр OA). Эти данные показывают, что средний размер той части цитоплазмы, которую занимают митохондрии в теле нейронов, практически не отличается в нейронах контрольной и поврежденной культур.

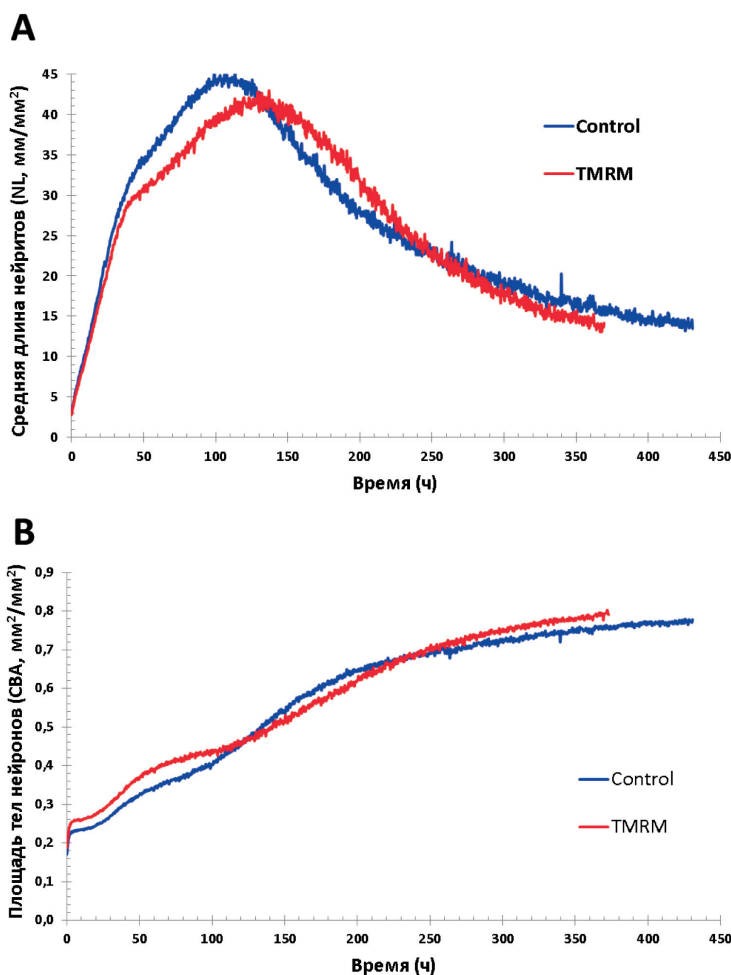


Рис. 3. Влияние TMRM на изменения морфологии нейрональной сети по мере развития первичной культуры. Обозначения осей и условия регистрации — как на рис. 1, Е.

Кривая среднего количества флуоресцирующих объектов на единицу поверхности (параметр ОС) в травмированной культуре повторяет по форме ОС контрольной культуры, но имеет меньшие значения (рис. 5, С). Более низкие значения параметра ОС поврежденной культуры обусловлены тем, что в зоне царапины мало уцелевших клеток (рис. 6), а митохондрии, находящиеся в нейритах, не учитываются из-за очень низкой интенсивности сигнала TMRM.

В зоне царапины удается обнаружить нейроны, которые не погибли и даже сохранили способность образовать нейриты. Некоторые из подобных нейронов обозначены наконечниками стрелок на рис. 6. Анализ цейтраферной съемки показывает, что нейриты таких «островных» нейронов формируются довольно быстро, но остаются относительно короткими, не достигая длины, достаточной для установления

контактов с другими нейронами в зоне царапины или с нейронами из неповрежденной области. Нейриты этой области (рис. 6), судя по длине, являются аксонами. Анализ записи царапин в различных лунках показывает, что в течение 300—400 ч эти аксоны могут полностью пересекать зону царапины, ширина которой $0,7 \pm 0,2$ мм ($n = 7$). Видеозапись также демонстрирует, что аксоны нейронов из неповрежденной области росли преимущественно в сторону тех нейронов в зоне царапины, которые имели собственные нейриты.

Анализ большого объема данных с использованием оптической микроскопии объектов, так называемый «high-content screening» [20, 21], все шире входит в практику, в том числе и для анализа нейрональных культур [22]. Для исследования динамики поведения культур клеток после повреждающего воздей-

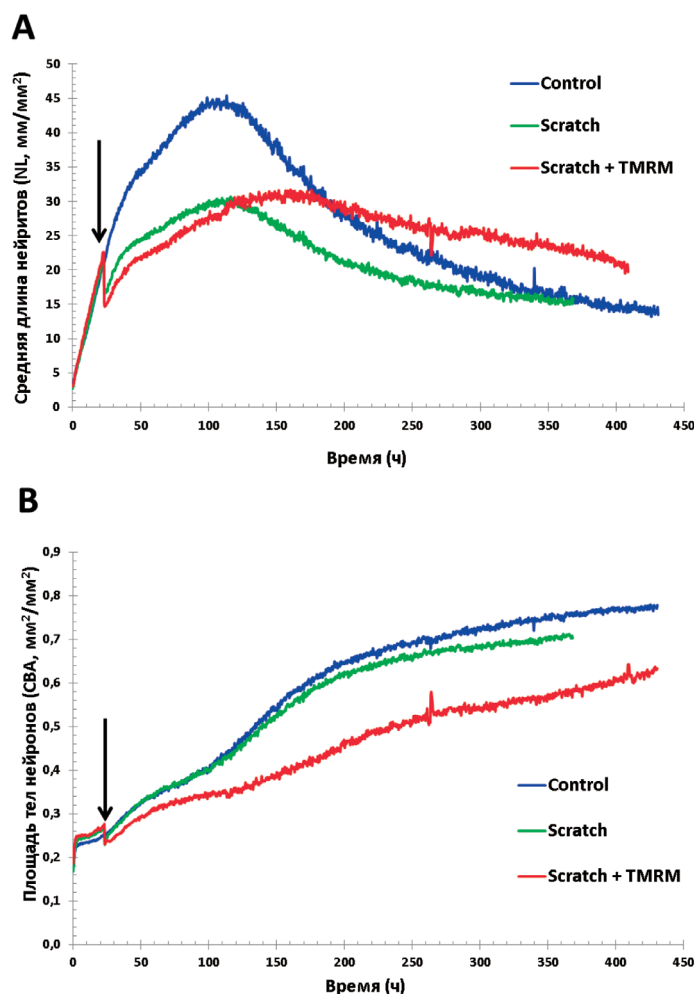


Рис. 4. Влияние царапины и митохондриального зонда TMRM на суммарную длину нейритов и относительную площадь сомы нейронов в механически поврежденной культуре по сравнению с контрольной. (А) Изменения суммарной длины нейритов в 1 мм^2 поверхности (NL) и (В) относительной площади сомы (CBA). Графики представляют данные, усредненные по 4 изображениям в 3—4 лунках. Стрелками отмечен момент нанесения царапины. Площадь царапины занимала 20—30% суммарной площади 4-х изображений. Условия регистрации те же, что на рис. 1.

ствия богатую информацию предоставляет цейтраферная (time-lapse) микроскопия [23, 24]. Однако этот подход не был использован, насколько нам известно, для исследования динамики роста и развития первичной нейрональной культуры. Наиболее интересными феноменами, обнаруженными в данной работе, являются:

1) многофазный характер изменения морфологии нейрональной сети в развивающейся первичной культуре;

2) динамика развития митохондрий в соме нейронов;

3) особенности заполнения зоны механического повреждения (царапины) аксонами.

Для исследования была выбрана первичная культура гранулярных клеток мозжечка, которая отличается высоким содержанием однотипных нейронов и низкой долей астроцитов (не более 10% от общего количества клеток; [25]). Благодаря этому, можно было получить фазово-контрастные изображения

нейронов и нейритов достаточно высокого качества и проследить развитие нейрональной сети.

В процессе роста нейритов можно выделить три фазы (рис. 1): фазу быстрого роста, которая длится первые 3 сут. развития культуры и является, очевидно, первой стадией установления межнейронных контактов. Не исключено, что именно эти нейриты становятся аксонами. На подобную возможность указывает то, что в это же время начинается распространение из неповрежденной зоны в направлении царапины нейритов, которые, судя по их длине, являются аксонами (рис. 6). Быстрая фаза роста нейритов сменяется фазой медленного роста и обусловлена, по-видимому, образованием более коротких, но многочисленных дендритов. Эта фаза завершается в культуре гранулярных нейронов мозжечка крысы на 6—8 сут. после посадки.

Неожиданным оказалось снижение NL, которое начиналось в это время (рис. 1). Сопоставление изображений показало, что во время этой 3-й фазы сни-

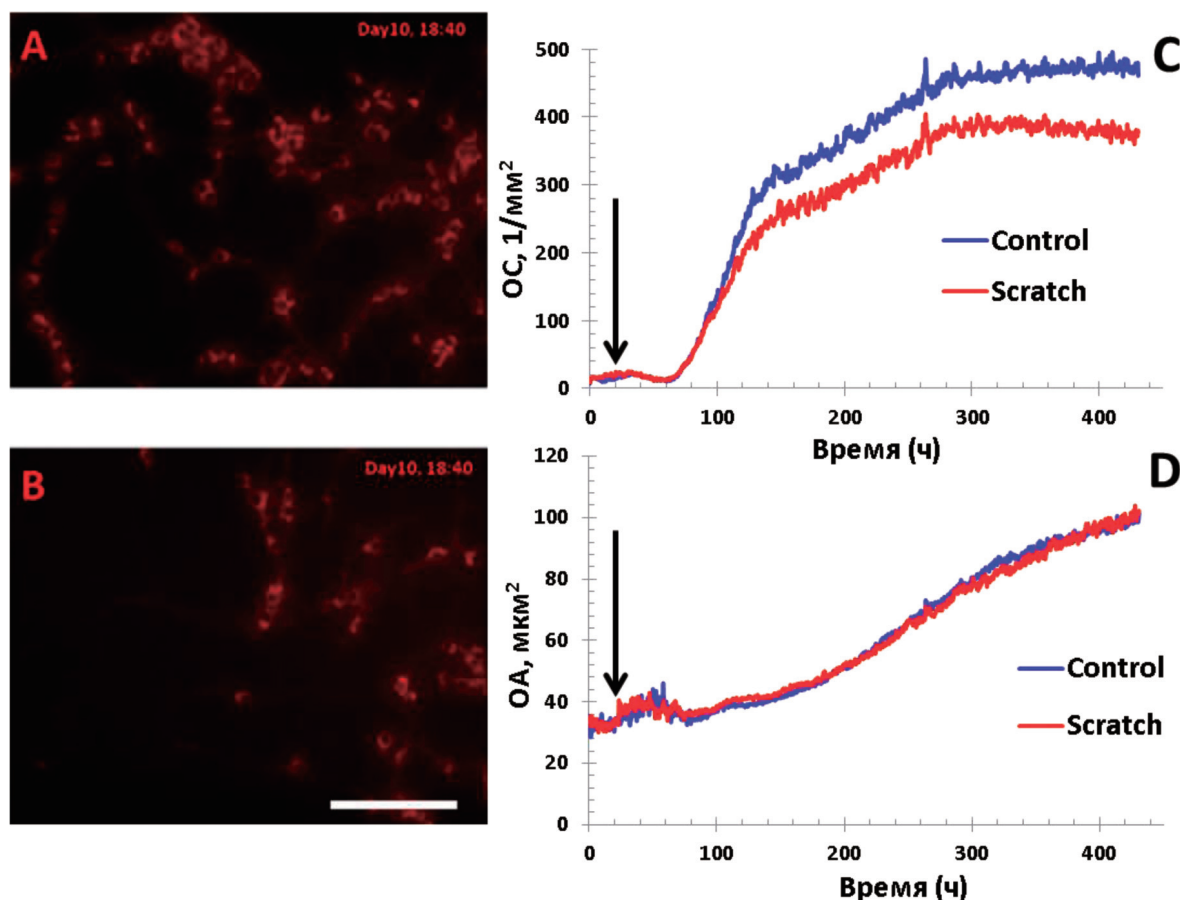


Рис. 5. Сигналы флуоресцентного потенциал-чувствительного зонда TMRM в контрольной и механически поврежденной культурах. (А) Изображения контрольной и (В) поврежденной культуры. (С) Общее количество флуоресцирующих объектов на единицу поверхности (ОС, $1/\text{мм}^2$) и (D) средняя площадь флуоресцирующего объекта (ОА, $\mu\text{м}^2$). Кривые контрольных культур представлены синими линиями; кривые культур, механически поврежденных через 23 часа после посадки, представлены красными линиями. Момент нанесения царапины отмечен стрелками. Условия регистрации, те же что на рис. 2. Масштабная полоска соответствует 50 $\mu\text{м}$.

жение NL происходило не в результате уменьшения суммарной длины нейритов, а их объединения в пучки. Диаметр пучков превышал 1 мкм, и поэтому программа анализа изображений удаляла их из параметра NL, присоединяя к параметру СВА, который отражает площадь тел нейронов и их кластеров. Объединение нейритов в пучки наблюдали уже в ранних исследованиях первичных нейрональных культур с применением оптической микроскопии [26, 27].

Изменения СВА также имели 3-фазный характер, но были более монотонными по сравнению с изменениями NL и возрастали в течение всего времени наблюдения (рис. 1). Интервалы времени, когда происходила смена фаз, практически совпадали для кривых NL и СВА (рис. 1, E), указывая на тесную взаимосвязь длины нейритов с размерами и взаимным расположением тел нейронов. Сопоставление взаимного расположения сомы нейронов в разное время показывает, что тела нейронов заметно перемещались, особенно в первую неделю, когда нейриты активно росли (рис. 1, 2 и 5).

Развитие культуры требует высоких затрат энергии на синтез компонентов клетки и поддержание ионного гомеостаза. В нейронах основным производителем АТФ являются митохондрии, поэтому одновременно с изменением морфологических признаков нейронов, отслеживался рост $\Delta\Psi_m$, путем измерения накопления в нейронах митохондриального зонда TMRM [15, 16, 18].

Первые 3 сут. интенсивность флуоресценции TMRM составляла лишь ~5% от максимальной (рис. 2, E). Совмещение флуоресцентных и фазово-контрастных изображений показывает, что к ~70-му ч светится ~50% сомы. Вероятно, количество митохондрий в теле нейронов еще значительно ниже того, которое достигается в зрелой культуре (10 сут. и более). Очевидно, в первые 70 ч в клетке мало митохондрий и $\Delta\Psi_m$ еще недостаточно высок, чтобы обеспечить синтез АТФ на уровне, необходимом для развития нейрональной сети. Снабжение энергией этой фазы развития нейрональной сети по-

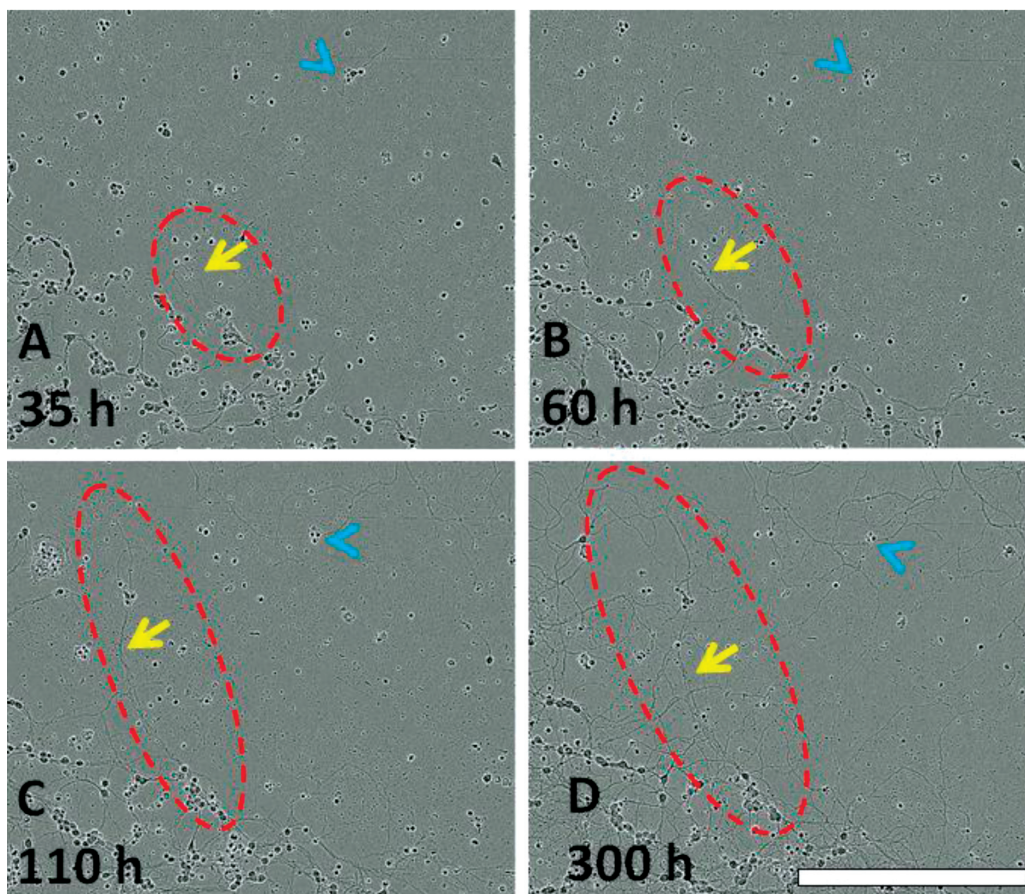


Рис. 6. Развитие нейритов (вероятнее всего, аксонов) в зоне царапины. Числа на изображениях указывают время регистрации изображения с момента посадки культуры. Наконечник стрелок (голубого цвета) указывает на нейроны в зоне царапины, которые сохранились при нанесении царапины и смогли образовать короткие нейриты. Стрелки (желтого цвета) указывают на растущие аксоны, принадлежащие нейронам на границе царапины. Масштабная полоска соответствует 100 мкм.

крявается, вероятно, за счет гликолиза. Обеспечение АТФ за счет гликолиза наблюдали в первичной нейрональной культуре, приготовленной из гиппокампа эмбрионов крысы [13].

Интенсивность сигнала TMRM начинала увеличиваться на 4-е сут., когда уже завершилась первая фаза роста СВА (рис. 1, Е). Несмотря на быстрый рост интенсивности флуоресценции TMRM, средняя площадь флуоресцирующих объектов увеличивалась незначительно (рис. 2, Е). Вероятно, в этот временной интервал (70—140 ч) происходил быстрый рост $\Delta\Psi_m$ без существенного увеличения количества митохондрий в соме нейронов. Затем в интервале 140—300 ч ситуация изменилась на противоположную — потенциал стал расти медленнее, а образование новых митохондрий и/или увеличение их среднего относительного размера (параметр ОА) ускорялось (рис. 2, Е). Начиная с ~300-го ч и до окончания эксперимента, интенсивность сигнала TMRM (параметр ОС) стабилизировалась на максимальном уровне, а ОА продолжал расти. Органеллы сосредоточивались в перинуклеарной зоне, а также в аксональных холмиках и возле мест отхождения дендритов от сомы (рис. 2, А — D), завершая формирование типичной локализации митохондрий внутри тела нейрона [17, 28, 29].

Данные флуоресцентной микроскопии показывают, что низкие концентрации TMRM (20 нМ) позволяют получить новую информацию о развитии митохондрий в течение сотен часов непрерывного наблюдения за культурой. Однако необходимо учитывать, что все митохондриальные потенциал-чувствительные зонды являются положительно заряженными молекулами и, диффундируя из цитозоля в матрикс сквозь внутреннюю мембрану митохондрий, способны понижать $\Delta\Psi_m$ [19]. Поэтому мы проверили влияние TMRM на развитие нейрональной сети, сопоставив морфологию контрольных и окрашенных TMRM культур. Оказалось, что TMRM не влиял на 3-фазный характер кривых NL и СВА, но замедлял развитие сети нейритов, начиная с ~70-го ч (рис. 3, А). Эти данные свидетельствуют о том, что медленная фаза роста нейритов и объединение их в пучки может тормозиться даже при небольшом снижении $\Delta\Psi_m$, если оно длительное.

Первичные культуры нейронов неоднократно использовали в качестве модели при исследовании молекулярно-клеточных механизмов, развивающихся при травме нейрональной сети. Однако во всех известных нам случаях механическое повреждение наносили тогда, когда:

- 1) сеть уже полностью развилась;
- 2) динамику изменений регистрировали в 3—4 временных точках через несколько суток после травмы.

В данном исследовании царапина была нанесена через 23 ч после посева культуры, когда формирование сети нейритов было в самой начальной стадии и динамику развития контрольной и травмированной культур записывали с интервалом 20 мин в течение 2,5 нед. Выбор столь раннего этапа развития культуры для нанесения царапины обусловлен тем, что нас интересовало:

- 1) чувствительны ли выжившие клетки к последствиям гибели своих соседей на самых ранних этапах развития культуры, когда нейрональная сеть еще не сформировалась;
- 2) могут ли нейроны из неповрежденной области, еще не образовавшие синапсов с другими нейронами, перемещаться в поврежденную зону и формировать там нейрональную сеть.

Хотя кривая СВА травмированной культуры расположена ниже контрольной кривой, общий профиль кривых идентичен (рис. 4, В). Это указывает на то, что в неповрежденной зоне травмированной культуры нейроны развивались так же, как и в контрольной культуре. Об этом же свидетельствует и сопоставление флуоресцентных изображений и графиков контрольной и механически поврежденной культур (рис. 5). Средний размер флуоресцирующих объектов в контрольной и травмированной культурах не отличались на протяжении всего эксперимента (рис. 5, D).

В зоне царапины удается обнаружить нейроны, которые не только не погибли, но и не утратили способность образовывать нейриты (рис. 6). Цейтраферная съемка демонстрирует, что некоторые из этих нейронов способны перемещаться на расстояния, в разы превышающие размер их сомы. Примечательно, что аксоны нейронов из пограничной с царапиной зоны устанавливают контакты прежде всего с теми нейронами в зоне царапины, которые имели собственные нейриты, пусть даже короткие. Возможно, что уцелевшие в зоне царапины нейроны или их нейриты выделяли «аттрактанты», которые привлекали аксоны из неповрежденной области. Таким «аттрактантом» может быть трансформирующий фактор роста TGF- β 1, авто- и паракринное влияние которого на регенерацию нейритов в механически травмированной первичной культуре нейронов было продемонстрировано в [30, 31].

В заключение отметим, что непрерывный оптический мониторинг позволяет получить уникальную информацию о разных стадиях развития нейрональной культуры. В настоящей работе отслеживали морфологические изменения культуры с помощью фазово-контрастных изображений и флуоресцентные сигналы потенциал-чувствительного митохондриального зонда TMRM. Это позволило связать различные фазы изменения морфологии нейрональной сети с накоплением митохондрий в соме нейронов и ростом $\Delta\Psi_m$.

References

1. Flynn K.C. The cytoskeleton and neurite initiation. *Bioarchitecture*. 2013; 3(4): 86-109.
2. Valtorta F. and Leoni C. Molecular mechanisms of neurite extension. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1999; 354 (1381): 387-94.
3. Mukhin A.G., Ivanova S.A., Knoblach S.M. and Faden A.I. New in vitro model of traumatic neuronal injury: evaluation of secondary injury and glutamate receptor-mediated neurotoxicity. *J. Neurotrauma*. 1997; 14(9): 651-63.
4. Mukhin A.G., Ivanova S.A., Allen J.W. and Faden A.I. Mechanical injury to neuronal/glial cultures in microplates: Role of NMDA receptors and pH in secondary neuronal cell death. *J. Neurosci. Res.* 1998; 51(6): 748-58.
5. Cui X., Liu R., Liu Z., Shen X., Wang Q. and Tan X. Cationic Poly-L-Lysine-Fe₂O₃/SiO₂ nanoparticles loaded with small interference RNA: Application to silencing gene expression in primary rat neurons. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2014; 14(4): 2810-5.
6. Payette D.J., Xie J., Shirwany N. and Guo Q. Exacerbation of Apoptosis of Cortical Neurons Following Traumatic Brain Injury in Par-4 Transgenic Mice. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2008; 1(1): 44-56.
7. Bingham D., John C.M., Panter S.S. and Jarvis G.A. Post-injury treatment with lipopolysaccharide or lipooligosaccharide protects rat neuronal and glial cell cultures. *Brain Res. Bull.* 2011; 85(6): 403-9.
8. Yu A.C., Lee Y.L. and Eng L.F. Astrogliosis in culture: I. The model and the effect of antisense oligonucleotides on glial fibrillary acidic protein synthesis. *J. Neurosci. Res.* 1993; 34(3): 295-303.
9. Desclaux M., Teigell M., Amar L., Vogel R., Gimenez y Ribotta M., Privat A. et al. A novel and efficient gene transfer strategy reduces glial reactivity and improves neuronal survival and axonal growth in vitro. *PLoS One*. 2009; 4(7): e6227.
10. He Y., Li H.L., Xie W.Y., Yang C.Z., Yu A.C.H. and Wang Y. The presence of active Cdk5 associated with p35 in astrocytes and its important role in process elongation of scratched astrocyte. *Glia*. 2007; 55(6): 573-83.
11. Khodorov B.I., Storozhevych T.P., Surin A.M., Yuryavichyus A.I., Sorokina E.G., Borodin A.V. et al. The leading role of mitochondrial depolarization in the mechanism of glutamate-induced disruptions in Ca²⁺ homeostasis. *Neurosci. Behav. Physiol.* 2002; 32(5): 541-7.
12. Khodorov B.I., Mikhailova M.M., Bolshakov A.P., Surin A.M., Sorokina E.G., Rozhnev S.A. et al. Dramatic effect of glycolysis inhibition on the cerebellar granule cells bioenergetics. *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.* 2012; 6(2): 186-97.
13. Surin A.M., Khiroug S., Gorbacheva L.R., Khodorov B.I., Pinelis V.G. and Khiroug L. Comparative analysis of cytosolic and mitochondrial ATP synthesis in embryonic and postnatal hippocampal neuronal cultures. *Front. Mol. Neurosci.* 2013; 5: 1-15.
14. Dumollard R., Carroll J., Duchen M.R., Campbell K. and Swann K. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2009; 20(3): 346-53.
15. Nicholls D.G. and Ward M.W. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: Mortality and millivolts. *Trends in Neurosciences*. 2000; 23(4): 166-74.
16. Duchen M.R., Surin A. and Jacobson J. Imaging mitochondrial function in intact cells. *Methods Enzymol.* 2003; 361: 353-89.
17. Surin A.M., Sharipov R.R., Krasilnikova I.A., Boyarkin D.P., Lisina O.Yu., Gorbacheva L.R. et al. Disruption of functional activity of mitochondria during MTT assay of viability of cultured neurons. *Biokhimiya*. 2017; 82(6): 970-984. (in Russian)
18. Gereencser A.A., Chinopoulos C., Birket M.J., Jastroch M., Vitelli C., Nicholls D.G. et al. Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells: calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria. *J. Physiol.* 2012; 590 (12): 2845-71.
19. Trendeleva T.A., Rogov A.G., Cherepanov D.A., Sukhanova E.I., Il'yasova T.M., Severina I.I. et al. Interaction of tetraphenylphosphonium and dodecyltriphenylphosphonium with lipid membranes and mitochondria. *Biochem.* 2012; 77(9): 1021-8.
20. Dragunow M. High-content analysis in neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*. 2008; 9(10): 779-88.
21. Mattiazzi Usaj M., Styles E.B., Verster A.J., Friesen H., Boone C. and Andrews B.J. High-Content Screening for Quantitative Cell Biology. *Trends in Cell Biology*. 2016; 26(8): 598-611.
22. Daub A., Sharma P. and Finkbeiner S. High-content screening of primary neurons: ready for prime time. *Current Opinion in Neurobiology*. 2009; 19(5): 537-43.
23. Repin V.S., Saburina I.N., Kosheleva N.V., Gorkun A.A., Zurina I.M., Kubatiev A.A. 3D-technology of the formation and maintenance of single dormant microspheres from 2000 human somatic cells and their reactivation in vitro. *Kletochnyye tekhnologii v biologii i meditsine*. 2014; 3: 161-9. (in Russian)
24. Kosheleva N.V., Saburina I.N., Zurina I.M., Gorkun A.A., Borzenok S.A., Nikishin D.A. et al. The technology of obtaining multipotent spheroids from limbal mesenchymal stromal cells for reparation of injured eye tissues. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(4): 160-7. (in Russian)
25. Thangnipon W., Kingsbury A., Webb M. and Balazs R. Observations on rat cerebellar cells in vitro: influence of substratum, potassium concentration and relationship between neurones and astrocytes. *Dev. Brain Res.* 1983; 11(2): 177-89.
26. Gallo V., Kingsbury A., Balazs R. and Jorgensen O.S. The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J. Neurosci.* 1987; 7(7): 2203-13.
27. Budd S.L. and Nicholls D.G. A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal Ca²⁺ homeostasis. *J. Neurochem.* 1996; 66(1): 403-11.
28. Sasaki S., Warita H., Abe K. and Iwata M. Impairment of axonal transport in the axon hillock and the initial segment of anterior horn neurons in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Acta Neuropathol.* 2005; 110(1): 48-56.
29. Popov V., Medvedev N.I., Davies H.A. and Stewart M.G. Mitochondria form a filamentous reticular network in hippocampal dendrites but are present as discrete bodies in axons: A three-dimensional ultrastructural study. *J. Comp. Neurol.* 2005; 492(1): 50-65.
30. Knoferle J., Ramljak S., Koch J.C., Tonges L., Asif A.R., Michel U. et al. TGF-β 1 enhances neurite outgrowth via regulation of proteasome function and EFABP. *Neurobiol. Dis.* 2010; 38(3): 395-404.
31. Tonges L., Planchamp V., Koch J.C., Herdegen T., Bahr M. and Lingor P. JNK isoforms differentially regulate neurite growth and regeneration in dopaminergic neurons in vitro. *J. Mol. Neurosci.* 2011; 45(2): 284-93.

Сведения об авторах:

Лисина Оксана Юрьевна, аспирант МИРЭА — Российского технологического университета, науч. сотр. НИИОПП;

Московцев Алексей Александрович, кан. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. регуляции агрегатного состояния крови НИИОПП, доцент каф. общей патологии и патофизиологии РМАНПО;

Кубатиев Аслан Амирханович, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, науч. руководитель НИИ общей патологии и патофизиологии, зав. каф. общей патологии и патофизиологии РМАНПО;

Сурин Александр Михайлович, доктор биол. наук, и. о. зав. лаб. нейробиологии и фундаментальных основ развития мозга «НМИЦ здоровья детей», гл. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли НИИОПП, e-mail: surin_am@mail.ru

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616:[615.214.31+615.213]

Карпова М.Н., Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю., Ветрилэ Л.А.

Влияние сочетанного применения цитиколина и антител к глутамату на развитие острых генерализованных судорог, вызванных пентилентетразолом у мышей

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

Цель исследования. На 2 моделях острых генерализованных судорог (ОГС), вызванных конвульсантом пентилентетразолом (ПТЗ), изучить эффективность сочетанного применения ноотропа цитиколина — препарата с противосудорожным действием, нейрорегенеративной, нейропротекторной активностью и антител (АТ) к глутамату, обладающих противосудорожной активностью. **Методика.** Эксперименты выполнены на мышцах-самцах линии C57Bl/6 ($n = 87$) массой 22—28 г. Эффективность сочетанного применения цитиколина и АТ к глутамату изучали на двух моделях ОГС. Выполнено 2 серии экспериментов. В 1-й серии ОГС вызывали внутривенным введением 1% раствора ПТЗ со скоростью 0,01 мл/с. Для изучения эффективности сочетанного применения препаратов определяли минимальное противосудорожное действие цитиколина (Цераксон, «Nicomed Ferrer Internacional, S.A.») и АТ к глутамату при их внутрибрюшинном введении. С этой целью цитиколин вводили в дозах 500 и 300 мг/кг за 1 ч до введения ПТЗ, АТ к глутамату — в дозах 5 и 2,5 мг/кг за 1 ч 30 мин до введения ПТЗ. АТ к глутамату получали путем гипериммунизации кроликов соответствующим конъюгированным антигеном. Во 2-й серии ОГС вызывали подкожным введением ПТЗ в дозе 85 мг/кг. Для изучения эффективности сочетанного действия изучаемых препаратов последние вводили в минимально действующих дозах, установленных в 1-й серии экспериментов. Контролем во всех сериях опытов служили животные, которым вводили в аналогичных условиях и в том же объеме физиологический раствор. **Результаты.** Показано, что сочетанное применение цитиколина и АТ к глутамату в минимально действующих дозах (300 и 2,5 мг/кг соответственно) при моделировании ОГС не вызывало повышения судорожной активности мозга и усиления противосудорожных свойств препаратов. **Заключение.** Сочетанное применение цитиколина и АТ к глутамату в минимально действующих дозах не вызывало повышения судорожной активности мозга, что свидетельствует о безопасности совместного применения препаратов. Проведенное исследование может служить также экспериментальным обоснованием возможности использования сочетанного применения данных препаратов при судорогах с целью замедления прогрессирования нейродегенеративных процессов и благоприятного влияния на когнитивные функции.

Ключевые слова: эпилепсия; судороги; цитиколин; антитела к глутамату; ноотропы.

Для цитирования: Карпова М.Н., Кузнецова Л.В., Клишина Н.Ю., Ветрилэ Л.А. Влияние сочетанного применения цитиколина и антител к глутамату на развитие острых генерализованных судорог, вызванных пентилентетразолом у мышей. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 24—29.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.24-29

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Карпова М.Н., доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП, e-mail: karpovamn@gmail.com

Поступила 17.12.2017

Karpova M.N., Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu., Vetrile L.A.

Effect of combined citicoline and glutamate antibodies on acute, generalized convulsions induced by pentylentetrazole in mice

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

Aim. To study the effectivity of a combination of citicoline, a nootropic substance with neuroregenerative, neuroprotective, and anticonvulsant actions, and glutamate antibodies (AB) with an anticonvulsant action in two models of acute generalized convulsions (AGC) caused by the convulsant pentylentetrazole (PTZ). **Methods.** Experiments were conducted on C57Bl/6 mice ($n = 87$) weighing 22—28 g. Effects of combined citicoline and glutamate AB were studied on two models of AGC. In the first series of experiments, AGC was induced by intravenous infusion of a 1% PTZ solution at 0.01 ml/sec. In the second series, AGC was induced by a subcutaneous injection of PTZ 85 mg/kg. To evaluate effi-

cacy of the drug combination minimum intraperitoneal anticonvulsant doses of citicoline (Tserakson, Nicomed Ferrer Internacional, S.A.) and glutamate AB were determined. To this purpose, citicoline was administered at 500 and 300 mg/kg 1 h prior to PTZ, and glutamate AB was administered at 5 and 2.5 mg/kg 90 min prior to PTZ. Glutamate AB was obtained by hyperimmunization of rabbits with a respective conjugated antigen. In the second series of experiments, AGC was induced by a subcutaneous injection of PTZ 85 mg/kg. To evaluate the effect of the drug combination, the drugs were administered at the minimum effective doses determined in the first series of experiment. Control animals were injected with the same volume of saline in the same experimental conditions. **Results.** The combination of citicoline and glutamate AB used at minimum effective doses of 300 and 2.5 mg/kg, respectively, did not increase the seizure activity in the brain and enhanced anticonvulsant properties of the drugs in two models of AGC. **Conclusion.** The combination of citicoline and glutamate AT at minimum effective doses did not increase the convulsive activity in the brain, which supported safety of the drug combination. Besides, this study can serve as an experimental justification for using the drug combination in convulsions to favorably influence cognitive functions and slow progression of neurodegenerative processes.

Keywords: epilepsy; convulsions, citicoline; glutamate antibodies; nootropics.

For citation: Karpova M.N., Kuznetsova L.V., Klishina N.Yu., Vetrile L.A. The influence of citicoline and antibodies to glutamate in their joint application on acute generalized convulsions caused by pentiltenethazole in mice. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62 (2): 24—29. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.24-29

For correspondence: Karpova M.N., Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher, Laboratory of fundamental and applied problems of pain FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», e-mail: karpovamn@gmail.com

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

Funding. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Kuznetsova L.V., <http://orcid.org/0000-0002-0691-3690>

Karpova M.N., <http://orcid.org/0000-0002-4338-5567>

Klishina N.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-1348-1857>

Received 17.12.2017

Введение

Отражением современных тенденций в эпилептологии является разработка новых подходов к лечению больных эпилепсией, позволяющих достичь более выраженного терапевтического эффекта, снижения дозы применяемых средств и снижение степени риска развития побочных эффектов. Используемые для купирования повышенной судорожной активности мозга антиэпилептические лекарственные средства вызывают ряд побочных эффектов, к числу которых можно отнести нарушение основных когнитивных функций (внимания, памяти, восприятия и др.) [1—3], и превентивных защитных свойств в отношении развития нейродегенеративных процессов. Проблема предотвращения повреждений головного мозга при судорожном синдроме остается нерешенной. Одним из направлений терапии указанных нарушений является поиск и изучение механизма действия новых и уже имеющихся ноотропных лекарственных средств, обладающих поликомпонентным спектром фармакологических эффектов и многофакторным механизмом действия [4—8]. Ноотроп цитиколин широко применяется в лечении когнитивных, чувствительных, двигательных неврологических нарушений дегенеративной и сосудистой этиологии. Ранее на модели ОГС

нами было показано, что цитиколин оказывает противосудорожное действие и его сочетанное введение с антиэпилептическими препаратами — вальпроатом, а также с диазепамом в минимально действующих дозах, усиливает противосудорожные свойства обоих препаратов [5, 6]. Результаты этих исследований были защищены патентами. Противосудорожный эффект цитиколина связан с его нейропротективным и нейрогенеративным действием [9—14]. Экзогенно введенный цитиколин активирует механизмы защиты от действия повреждающих факторов, восстанавливая поврежденные цитоплазматические и митохондриальные мембраны нейронов, что способствует улучшению функционирования таких мембранных структур, как ионные насосы и рецепторы, без регуляции которых невозможно нормальное проведение нервных импульсов. Цитиколин предотвращает гибель клеток путём ингибирования механизмов включения апоптоза и подавления экспрессии проапоптотических белков, снижения интенсивности выброса возбуждающего нейротрансмиттера глутамата, что препятствует избыточному образованию свободных радикалов, сохранению метаболизма мозга и др.

Согласно современным представлениям об эпилептогенезе, иммунным процессам отводится особая

роль в дебюте заболевания, стадии его доклинического и клинического течения [15]. Ранее нами было показано, что АТ к глутамату при активной иммунизации и их системном (внутрибрюшинном и интраназальном) введении на разных моделях эпилептической активности оказывают выраженное противосудорожное действие [16—21].

Цель исследования — изучение эффективности сочетанного применения ноотропа цитиколина — препарата с противосудорожным действием, нейрорегенеративной, нейропротекторной активностью и антител (АТ) к глутамату, обладающих противосудорожной активностью на развитие острых генерализованных судорог (ОГС), вызванных конвульсантом пентилентетразолом (ПТЗ).

Методика

Эксперименты выполнены на мышах-самцах линии С57Bl/6 ($n = 87$) массой 22—28 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 г.

Эффективность сочетанного применения цитиколина и АТ к глутамату изучали на 2 моделях ОГС. Проведено 2 серии экспериментов.

В 1-й серии опытов ОГС вызывали внутривенным введением 1% раствора ПТЗ со скоростью 0,01 мл/с. Для изучения эффективности совместного применения препаратов определяли минимальное противосудорожное действие цитиколина (Цераксон, «Nicomed Ferrer Internacional, S.A.») и АТ к глутамату при их внутрибрюшинном введении. АТ к глутамату получали путем гипериммунизации кроликов соответствующим конъюгированным антигеном [18]. С этой целью цитиколин вводили в дозах 500 и 300 мг/кг за 1 ч до ПТЗ, а АТ к глутамату — в дозах 5 и 2,5 мг/кг за 1 ч 30 мин до введения ПТЗ. Определяли пороги клонических судорог и тонической фазы судорог с летальным исходом. Пороговую дозу ПТЗ, необходимую для наступления указанных судорог, вычисляли для каждого животного в мг/кг.

Во 2-й серии опытов ОГС вызывали подкожным введением ПТЗ в дозе 85 мг/кг. Для изучения эффективности сочетанного применения препаратов, последние вводили в минимально действующих дозах, установленных в 1-й серии. На протяжении 30 мин визуально определяли латентные периоды первых судорожных проявлений, клонической и тонической фаз генерализованной судорожной реакции, длительность

этих фаз, тяжесть судорожной реакции, продолжительность жизни и процент летальных исходов. Тяжесть судорожной реакции оценивали в баллах: 1 — миоклонические вздрагивания; 2 — клонические судороги передних конечностей; 3 — повторные клонические судороги; 4 — тонико-клонические судороги с падением животного на бок; 5 — повторные тонико-клонические судороги и/или гибель животного. Контролем во всех сериях опытов служили животные, которым вводили физиологический раствор том же объеме и в аналогичных условиях опыта.

Статистическую обработку данных осуществляли по алгоритмам программы «IBM SPSS Statistic 20». Проводили предварительную проверку предположения о нормальном характере распределения эмпирических данных в каждой экспериментальной группе по тестам Колмогорова—Смирнова. Оценку значимости различий рассматриваемых выборок проводили по t -критерию Стьюдента. Частоту встречаемости признака оценивали с помощью точного метода Фишера. Для всех количественных признаков в сравниваемых группах производилась оценка среднеарифметических и стандартных ошибок среднего. Статистически значимыми считали различия между группами при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

1 серия. Дозы ПТЗ, необходимые для появления клонических судорог и тонической фазы судорог с летальным исходом у контрольных животных с введением физиологического раствора представлены в табл. 1.

1. Эффекты цитиколина

Введение цитиколина в дозе 500 мг/кг вызывало повышение на 27,50% судорожного порога, необходимого для появления клонических судорог, и на 25% — для развития тонической фазы судорог с летальным исходом по сравнению с группой контрольных животных с введением физиологического раствора, что свидетельствует противосудорожном действии препарата (табл. 1). Введение цитиколина в дозе 300 мг/кг вызывало менее значительное противосудорожное действие препарата, которое выражалось только в повышении на 22,40% порога, необходимого для развития тонической фазы судорог с летальным исходом. Порог клонической фазы судорог не отличался от такового по сравнению с контрольными животными с введением физиологического раствора.

Таким образом, наименее выраженный противосудорожный эффект цитиколина наблюдали в дозе 300 мг/кг, которую и применяли в наших дальнейших исследованиях.

2. Эффекты АТ к глутамату

Введение АТ к глутамату в дозе 5 мг/кг вызывало повышение на 43,21% судорожного порога, необходимого для появления клонических судорог, и на 45,58% — для развития тонической фазы судорог с летальным исходом по сравнению с группой контрольных животных с введением физиологического раствора, что свидетельствует противосудорожном действии препарата (табл. 1). Введение АТ к глутамату в дозе 2,5 мг/кг вызывало менее значительное противосудорожное действие препарата, которое выражалось только в повышении на 10,89% порога, необходимого для развития клонических судорог. Порог тонической фазы судорог с летальным исходом не отличался от такового по сравнению с контрольными животными с введением физиологического раствора.

3. Эффекты сочетанного применения АТ к глутамату и цитиколина в минимально действующих дозах

Сочетанное применение цитиколина и АТ к глутамату в минимально действующих дозах — 300 и 2,5 мг/кг соответственно — приводило к повышению судорожного порога, необходимого для появления клонических судорог на 21,06% и не влияло на тоническую фазу судорог. Таким образом, сочетанное применение препаратов не вызывало повышения судорожной активности мозга.

2 серия. Во 2-й серии для изучения эффективности сочетанного применения цитиколина и АТ к глутамату использовали минимально действующие дозы, подобранные в 1-й серии экспериментов.

У контрольных животных подкожное введение ПТЗ приводило к развитию генерализованной эпи-

Таблица 1

Влияние совместного применения цитиколина и АТ к глутамату на острые генерализованные судороги, вызванные внутривенным введением ПТЗ (M ± m)

№ п/п	Группа и число (n) животных	Доза ПТЗ, вызывающая			
		клонические судороги		тонические судороги	
		мг/кг	%	мг/кг	%
1	Контроль, физ. р-р (n = 11)	26,73 ± 0,69	100,00 ± 2,58	48,88 ± 1,96	100,00 ± 4,01
2	Цитиколин 500 мг/кг (n = 10)	34,08 ± 0,57 P ₁₋₂ < 0,001 P ₂₋₄ = 0,006 P ₂₋₅ = 0,004	127,50 ± 2,13	61,10 ± 1,97 P ₁₋₂ < 0,001 P ₂₋₆ < 0,001	125,00 ± 4,03
3	Цитиколин 300 мг/кг (n = 10)	28,55 ± 1,25	106,91 ± 4,68	59,83 ± 4,57 P ₁₋₃ = 0,03	122,40 ± 9,35
4	АТ к глутамату 5 мг/кг (n = 14)	38,28 ± 1,08 P ₁₋₄ < 0,001 P ₄₋₅ < 0,001	143,21 ± 4,04	71,16 ± 3,65 P ₁₋₄ < 0,001 P ₄₋₆ < 0,001	145,58 ± 7,47
5	АТ к глутамату 2,5 мг/кг (n = 13)	29,64 ± 1,06 P ₁₋₅ = 0,003	110,89 ± 3,96	52,25 ± 1,93	106,89 ± 3,95
6	Цитиколин 300 мг/кг + АТ к глутамату 2,5 мг/кг (n = 9)	32,36 ± 1,28 P ₁₋₆ = 0,003 P ₃₋₆ = 0,05	121,06 ± 4,79	53,50 ± 1,95	97,18 ± 3,99

Таблица 2

Влияние совместного применения цитиколина и АТ к глутамату на острые генерализованные судороги, вызванные подкожным введением ПТЗ (M ± m)

Группа и число (n) животных	ЛП первых судорожных проявлений, с	Клонические судороги		Тонические судороги	
		ЛП 2, с	Длительность, с	ЛП 3, с	Длительность, с
Контроль, n = 12	171,67 ± 11,16	336,67 ± 48,53	26,14 ± 5,76	1191,00 ± 63,69	36,00 ± 5,20
Цитиколин 300 мг/кг + АТ к глутамату 2,5 мг/кг, n = 12	202,83 ± 21,77	395,5 ± 50,18	18,44 ± 3,20	1597,00 ± 105,68 p < 0,01	26,20 ± 6,72

Примечание. ЛП 2 — латентный период появления клонических судорог; ЛП 3 — латентный период появления тонических судорог.

лептической активности: через 160—180 с появлялись первые судорожные проявления в виде вздрагивания головы или отдельных мышц туловища, которые через 300—370 с переходили в клонические судороги (табл. 2). Завершались судороги тонико-клоническим припадком с падением животного на бок и фазой постприступной депрессии. Тяжесть судорог у животных составила 5 баллов, а летальность — 100%.

Как следует из табл. 2, совместное применение цитиколина и АТ к глутамату в минимально действующих дозах — 300 и 2,5 мг/кг соответственно, на модели ОГС, вызванных подкожным введением ПТЗ у мышей C57Bl/6, приводило к увеличению латентного периода появления тонической фазы судорог с летальным исходом и не вызывало повышения судорожной активности мозга.

Таким образом, в результате исследования установлено, что совместное применение цитиколина, обладающего нейрорегенеративной и нейропротекторной активностью, а также противосудорожным действием, и АТ к глутамату, обладающих противосудорожной активностью, в минимально действующих дозах на двух моделях ОГС не вызывало повышения судорожной активности мозга, что свидетельствует о безопасности сочетанного применения препаратов. Кроме того, проведенное исследование может служить экспериментальным обоснованием сочетанного применения препаратов при судорогах с целью благоприятного влияния на когнитивные функции и замедления прогрессирования нейродегенеративных процессов.

References

1. Fritz N., Glogau S., Hoffmann J. et al. Efficacy and cognitive side effects of tiagabine and topiramate in patients with epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2005; 6(3): 373-81.
2. Meador K.J., Loring D.W., Moore E.E. et al. Comparative cognitive effects of phenobarbital, phenytoin, and valproate in healthy adults. *Neurology.* 1995; 45(8): 1494-9.
3. Sung-Pa P., Soon-Hak K. Cognitive Effects of Antiepileptic Drugs. *J. Clin. Neurol.* 2008; 4: 99-106.
4. Karpova M.N., Kuznecova L.V., Zin'kovskij K.A., Klishina N.Ju. Increase of the seizure threshold in C57BL/6 mice after citicoline administration. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny.* 2014; 158(9): 296-8. (in Russian)
5. Karpova M.N., Zin'kovskij K.A., Kuznecova L.V., Klishina N.Ju. Anticonvulsant effects of combined treatment with citicoline and valproate on the model of acute generalized convulsions induced by pentylenetetrazole in wistar rats. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny.* 2015; 160(10): 425-8. (in Russian)
6. Kuznecova L.V., Karpova M.N., Zin'kovskij K.A., Klishina N.Ju. Anticonvulsant effects of combined treatment with citicoline and diazepam at their combined application on model of the acute generalized convulsions induced by

pentylenetetrazole in Wistar rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2016; 60(4): 20-3. (in Russian)

7. Kuznecova L.V., Karpova M.N., Zin'kovskij K.A., Klishina N.Ju. Effect of citicoline on the development of chronic epileptization of the brain (pentylenetetrazole kindling) and acute seizures reaction of kindled mice C57Bl/6J. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2014; 58(3): 4-8. (in Russian)

8. Kravchenko E.V., Ponteleeva I.V., Trofimov S.S. et al. The original nootropic and neuroprotective drug noopept potentiates the anticonvulsant activity of valproate in mice. *Eksper. i klin. farmakol.* 2009; 72(6): 15-7. (in Russian)

9. Adibhatla R.M., Hatcher J.F. Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res.* 2003; 73(3): 308-15.

10. Alvarez-Sabin J., Roman G.C. The Role of Citicoline in Neuroprotection and Neurorepair in Ischemic Stroke. *Brain Sci.* 2013; 3(3): 1395-414.

11. Hurtado O., Lizasoain I., Moro M.A. Neuroprotection and recovery: recent data at the bench on citicoline. *Stroke.* 2011; 42(Suppl. 1): 33-5.

12. Hurtado O., Moro M.A., Cardenas A. et al. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol. Dis.* 2005; 18(2): 336-45.

13. Saver J.L. Citicoline: update on a promising and widely available agent for neuroprotection and neurorepair. *Rev. Neurol. Dis.* 2008; 5(4): 167-77.

14. Secades J.J. Probably role of citicoline in stroke rehabilitation: review of literature. *Rev. Neurol.* 2012; 54(3): 173-9.

15. Kuznecova L.V., Vetrilje L.A., Karpova M.N. Neuro-immunological aspects of the pathogenesis of epilepsy. *Uspehi fiziologicheskikh nauk.* 2014; 45(3): 3-22. (in Russian)

16. Evseev V.A., Karpova M.N., Vetrilje L.A., Klishina N.Ju., Kuznecova L.V., Trekova N.A. Antibodies to glutamate in systemic administration increase the thresholds of convulsive reaction to pentylenetetrazole. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny.* 2005; 140(9): 276-8. (in Russian)

17. Karpova M.N., Vetrilje L.A., Klishina N.Ju., Trekova N.A., Kuznecova L.V., Evseev V.A. Elevation of corazol-induced seizure threshold after active immunization of mice of various genetic strains with glutamate-bovine serum albumin conjugate. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny.* 2003; 136 (9): 287-9. (in Russian)

18. Karpova M.N., Vetrilje L.A., Kuznecova L.V., Klishina N.Ju. Increasing the thresholds of convulsive reaction after active immunization glutamate-BSA conjugates in mice and at systemic administration of antibodies to glutamate. *Patogenez.* 2011; 9(1): 21-6. (in Russian)

19. Karpova M.N., Vetrilje L.A., Kuznecova L.V., Klishina N.Ju., Trekova N.A. Effect of systemic treatment with antibodies against glutamate on the seizure response of C57Bl/6 mice after pentylenetetrazole kindling. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny.* 2007; 143(6): 611-3. (in Russian)

20. Karpova M.N., Kuznecova L.V., Vetrilje L.A., Klishina N.Ju. Elevation of seizure threshold after intranasal administration of anti-glutamate antibodies to C57Bl/6 mice. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny.* 2013; 155(3): 282-5. (in Russian)

21. Kuznecova L.V., Karpova M.N., Vetrilje L.A., Klishina N.Ju. Effects of antibodies to glutamate on focal penicillin-induced epileptic activity. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny.* 2013; 155(5): 555-8.

Сведения об авторах:

Карпова М.Н., доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП

Кузнецова Лада Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП

Клишина Наталья Юрьевна, науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП

Ветрилэ Люция Александровна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616.831-005.4

Степанов А.С., Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Степанов С.С.

Структурно-функциональные изменения нейронов неокортекса белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий

ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, 644099, г. Омск, Россия, ул. Ленина, д. 12

Цель исследования — изучение структурно-функциональных изменений нейронов сенсомоторной коры головного мозга белых крыс в норме и после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. **Методика.** С помощью световой (окраска гематоксилином и эозином, по Нисслю), флуоресцентной (окраска DAPI), иммунофлуоресцентной (нейрон-специфическая енолаза — NSE) и электронной микроскопии была изучена нейроцитоархитектоника сенсомоторной коры (СМК) головного мозга белых крыс в норме ($n=5$) и в динамике — 1, 3, 7, 14, 21 и 30 сут.; после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий ($n=30$). Согласно рекомендациям Nomenclature Committee on Cell Death (2009), проведено детальное описание и сравнение всех морфотипов измененных пирамидных нейронов СМК мозга белых крыс после острой ишемии. Морфометрический анализ проведен с помощью программы ImageJ 1.46. **Результаты.** Использование комплекса морфологических методов позволило классифицировать нейроны на основании четких структурных маркеров и доказать возможность апоптоза гиперхромных нейронов СМК после воспроизведения ишемии. Показано, что через 3 сут. в слое III 6—12% гиперхромных нейронов подверглось апоптозу, 13,4—24,6% — коагуляционному некрозу, а остальные выходили из патологического состояния в отдаленном восстановительном периоде. Необратимо измененные клетки-тени составляли 11,5% (95% ДИ: 7,4—16,8%). Общая численная плотность пирамидных нейронов в течение 30 сут. постишемического периода в слое III СМК снижалась на 30,5% (95% ДИ: 24,2—38,7%), а в слое V — на 14,4% (95% ДИ: 9,9—20,0%). **Заключение.** Показана смешанная природа гибели нейронов — одновременное сочетание процессов некроза и апоптоза (параптоз). Однако основную роль в гибели нейронов играли процессы быстрого и отдаленного ишемического некроза.

Ключевые слова: острая ишемия; белая крыса; неокортекс; нейроны; световая, флуоресцентная, электронная микроскопия; морфометрия; некроз; апоптоз.

Для цитирования: Степанов А.С., Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Степанов С.С. Структурно-функциональные изменения нейронов неокортекса белых крыс после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 30—38.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.30-38

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Акулинин Виктор Александрович, доктор мед. наук, зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, e-mail: akulinin@omsk-osma.ru

Поступила 27.09.2017

Stepanov A.S., Avdeev D.B., Akulinin V.A., Stepanov S.S.

Structural and functional changes in neocortical neurons of white rats following a 20-minute occlusion of common carotid arteries

Omsk State Medical University; Lenina Str. 12, Omsk 644099, Russia

Aim. To study sensorimotor cortical neurons of white rats in the control conditions and after a 20-minute occlusion of common carotid arteries. **Methods.** Neuronal cytoarchitectonics of rat sensorimotor cortex (SMC) was studied in the control conditions ($n=5$) and at 1, 3, 7, 14, 21, and 30 days ($n=30$) following a 20-minute occlusion of common carotid arteries using light (hematoxylin and eosin; Nissl staining), fluorescent (DAPI staining), immunofluorescence (neuron-specific enolase, NSE), and electron microscopy. All morphotypes of modified pyramidal neurons were described in detail for the SMC of albino rats after acute ischemia according to recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death (2009). The morphometric analysis was performed using the ImageJ 1.46 software. **Results.** Using a set of morphometric methods allowed to classify neurons and demonstrate a possibility of apoptosis in a part of SMC hyperchromic neurons exposed to ischemia based on the presence of clear structural markers (decay of nuclei and cells; phagocytosis). For example, in layer III at 3 days, 6—12% of hyperchromic neurons underwent apoptosis, 13.4—24.6% — coagulation necrosis, and

the remaining neurons came out of the pathological condition during a remote rehabilitation period. The proportion of irreversibly changed shadow cell was 11.5% (95% CI: 7.4—16.8%). During 30 days of the postischemic period, the numerical density of pyramidal neurons reduced by 30.5% (95% CI: 24.2—38.7%) in SMC layer III and by 14.4% (95% CI: 9.9—20.0%) in SMC layer V. **Conclusion.** The study demonstrated a mixed nature of neuronal death, a simultaneous combination of necrosis and apoptosis (parapoptosis). However, processes of immediate and remote ischemic necrosis played the major role in neuronal death.

Keywords: acute ischemia; white rat; neocortex; neurons, light microscopy; fluorescent microscopy; electron microscopy; morphometry; necrosis; apoptosis.

For citation: Stepanov A.S., Avdeev D.B., Akulinin V.A., Stepanov S.S. Structural and functional changes in the neurons of the neocortex of white rats after a 20-minute occlusion of the common carotid arteries. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimentalnaya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 30—38. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.30-38

For correspondence: Akulinin Viktor Aleksandrovich, Doctor of Medical Science, Head of the Department of Histology, Cytology and Embryology FSBEI HE «Omsk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; 12, ul. Lenina, Omsk, 644099, Russian Federation, e-mail: akulinin@omsk-osma.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Stepanov A.S., <https://orcid.org/0000-0002-8392-9514>

Avdeev D.B., <https://orcid.org/0000-0003-4976-7539>

Akulinin V.A., <https://orcid.org/0000-0001-6097-7970>

Stepanov S.S., <https://orcid.org/0000-0003-0741-3337>

Received 27.09.2017

Введение

Необратимые изменения нейронных сетей коры головного мозга (КГМ) после острой ишемии являются причиной многих неврологических нарушений, которые по своему медико-социальному значению остаются одной из актуальных проблем современной медицины [1 — 3]. Особое значение при этом уделяется заболеваниям, связанным с повреждением магистральных артерий головного мозга [4]. В связи с этим представляет интерес изучение структурно-функционального состояния нейронов КГМ после острой дозированной по времени ишемии, вызванной окклюзией общих сонных артерий в эксперименте.

Имеются исследования, в которых изучалось структурно-функциональное состояние нервных структур КГМ на различных экспериментальных моделях локальной, тотальной транзиторной, полной и неполной ишемии головного мозга [1, 5—7], а также у человека на аутопсийном и биопсийном материале [8—11].

В этих работах охарактеризованы основные реакции нейронов на ишемию и реперфузию. Гибель нейронов происходит путем некроза (острого, отсроченного, отдаленного) и апоптоза [12, 13], а также сочетания обоих процессов — парапоза [14, 15]. Есть работы, посвященные изучению коры головного мозга белых крыс после окклюзии общих сонных артерий [1, 16]. Однако структурные механизмы реорганиза-

ции нервной ткани неокортекса в период реперфузии во многом остаются неясными [12, 15, 17].

Особое значение для понимания механизмов повреждения и структурно-функционального восстановления высших отделов головного мозга млекопитающих при ишемии и реперфузии имеет изучение ультраструктуры различных поврежденных нейронов, так как это позволяет понять механизм гибели конкретной клетки (некроз или апоптоз) [15]. Флуоресцентные (окраска DAPI), иммунофлуоресцентные (NSE) методы дают дополнительную информацию о пространственном распределении ДНК в ядре и степени ее конденсации, используется для выявления различных этапов постишемической некротической и апоптозной трансформации ядра [18, 19].

Цель исследования — изучение с помощью световой, флуоресцентной (окраска DAPI), иммунофлуоресцентной (NSE) и электронной микроскопии морфофункционального состояния нейронов сенсомоторной коры головного мозга белых крыс в норме и в динамике после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий.

Методика

Исследования проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.77

№ 755) и с рекомендациями Международного комитета по науке о лабораторных животных, поддержанных ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.10 «О защите животных, используемых для научных целей» и одобрена этическим комитетом ГБОУ ВПО Омского государственного медицинского университета.

Эксперименты выполнены на самцах белых беспородных крыс массой 180—200 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария.

Моделирование острой ишемии мозга проводили путем 20-минутной окклюзии общих сонных артерий (сосудистая модель неполной глобальной ишемии без гипотонии) на фоне премедикации (сульфат атропина 0,1 мг/кг, подкожно) и общей анестезии (Zoletil 100, 10 мг/кг). Материал для морфологического исследования нейронов брали через 1, 3, 7, 14, 21 и 30 сут. после окклюзии по 5 животных на каждый срок. Контролем служили интактные крысы (n = 5).

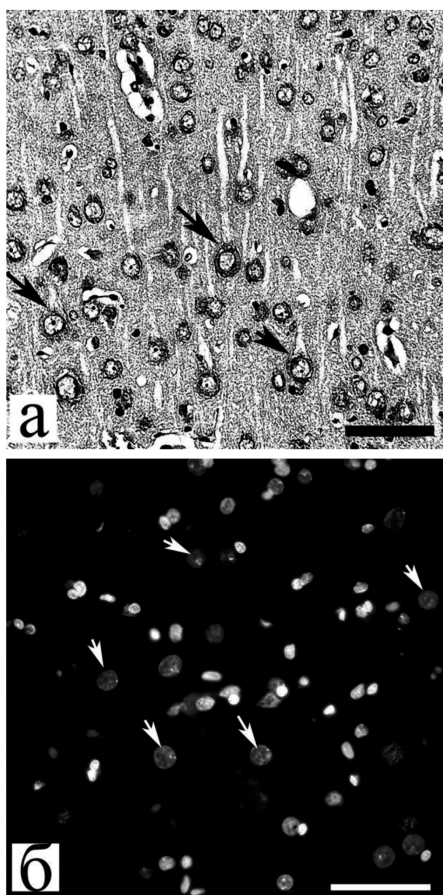


Рис. 1. Слой V моторной коры головного мозга белой крысы в норме: а — при окраске по Нисслю пирамидные нейроны (черные стрелки) имели большие округлые ядра с ядрышком и незначительным количеством конденсированного хроматина; б — при окраске DAPI ядра нейронов (белые стрелки) имели слабое свечение, а ядра глиальных клеток (овальные) — яркое свечение. Объектив x40, шкалы — 60 мкм.

Головной мозг фиксировали путем перфузии смеси 1% раствора глутарового альдегида, 4% раствора параформа на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) и 5% раствора сахарозы через восходящую часть дуги аорты под давлением 90—100 мм рт. ст. и путем погружения в аналогичный раствор. Затем часть материала заключали в парафин, готовили фронтальные срезы (5 мкм) на уровне сенсомоторной коры (СМК) [20]. Эти срезы окрашивали по Нисслю и DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Для иммуногистохимической окраски использовали антитела к нейронспецифической енолазе (NSE), визуализацию иммунной реакции осуществляли с помощью козьих поликлональных вторичных антител, ассоциированных с флуоресцентным красителем TexasRed® Sulfonyl Chloride. Применялась двухканальная флуоресценция для одновременного выявления в нейронах ядер (DAPI — различные оттенки синего) и цитоплазмы нейронов (NSE — красная) [8].

Цифровые изображения получали с помощью камеры AxioCam MRc и объектива EC Plan-Neofluar x40 (апертура 0.9). Применялись 2 фильтра производства Karl Zeiss: для Texas Red® и DAPI. С помощью программы AxioVision формировались двухслойные графические файлы [8]. Нейроны легко верифицировались, их цитоплазма окрашена в красный цвет (NSE).

Для ультраструктурного исследования выделяли СМК, рассекали на пирамидные блоки, контрастировали 1—2 ч в 1% незабуференном растворе четырехоксида осмия, промывали, обезвоживали и заключали в смесь эпона и аралдита. Ультратонкие (70—100 нм) срезы готовили на ультрамикротоме LKB-8800 (Швеция), окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали и фотографировали на микроскопе Hitachi-600H (Япония). На каждый срок фотографировали по 50 полей зрения при увеличении x12 000. На оцифрованных электронограммах проводили качественную оценку ультраструктуры клеток.

Статистический анализ осуществлялся с помощью программ MedCalc® и StatSoft Statistica 8.0. Проверку статистических гипотез проводили при помощи непараметрических критериев. В ходе проведения статистического анализа нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 показаны два поля зрения СМК головного мозга белой крысы в норме, окрашенные по Нисслю (а) и DAPI (б). При окраске по Нисслю можно было оценить общую численную плотность (ОЧП) перикарионов. Например, на рисунке 1, а, по данным морфометрического анализа, она составила 315/1 мм². Глиальные клетки трудно различались среди других структур СМК, что затрудняло оценку

их количества и размеров (рис. 1, а). Флуоресцентная окраска с помощью DAPI позволила надежно верифицировать нейроны (большие, круглые ядра темно-синего цвета с небольшим количеством конденсированного хроматина — яркое свечение) и астроциты (небольшие овальные, яркие светло-синие ядра) (рис. 2 и 3). Например, на рисунке 1, б ОЧП ядер нейронов составила 290, а глиальных клеток — 435 на 1 мм².

Таким образом, при использовании окраски по Нисслю и DAPI в одинаковых слоях СМК нами были получены близкие значения ОЧП нейронов. Однако окраска DAPI точно верифицировала ещё и ядра других клеток.

По данным светооптического исследования, после острой ишемии в СМК выявлены: различные проявления гидропической дистрофии нервных клеток, очаговый и тотальный хроматолиз, эктопия ядер, гиперхроматоз, гомогенизация ядер и цитоплазмы, распад ядер и ядрышка, кариоцитолитизис (клетки-тени), гиперхромные сморщенные клетки (пикноморфные) и нейронафагия. Превалировали гиперхромные ишемические изменения без сморщивания нейронов.

Морфометрический анализ (для каждого срока оценивалось по 250 нейронов в произвольно взятых полях зрения) показал, что содержание наиболее типичных для острой ишемии гиперхромных нейронов (всех типов) статистически значимо изменялось в течение 30 сут. постшемического периода: в слое III (ANOVA, H-критерий Краскела—Уоллиса =15,5, $\rho=0,001$) и слое V (14,7, $\rho=0,002$). На 3-и сут. после ишемии выявлено максимальное содержание гиперхромных нейронов в слое III — 62,5% (95% ДИ: 56,2—68,5%) и слое V — 58,5% (95% ДИ: 52,1—64,7%). В этот же срок отмечено максимальное содержание необратимо измененных клеток-теней — 11,5% (95% ДИ: 7,8—16,1%) и пикноморфных клеток — 18,5% (95% ДИ: 13,9—23,9%, слой III), 12,2% (95% ДИ: 8,4—16,9%, слой V). В сравнении с нормой (интактные животные) общая численная плотность пирамидных нейронов в течение 30 сут. постшемического периода в слое III СМК снижалась на 30,5% (95% ДИ: 24,9—36,6%), а в слое V — на 14,4% (95% ДИ: 10,3—19,4%).

Таким образом, по данным светооптического исследования (окраска по Нисслю), после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий установлены диффузно-очаговые реактивные и патологические изменения нейронов СМК. Однако только часть этих нейронов острого периода (1 и 3 сут.) в последующем подвергалась необратимой деструкции и элиминации.

При двойной окраске DAPI и на NSE было установлено, что нормохромные пирамидные нейроны

имели большие округлые ядра с незначительным количеством конденсированного хроматина на фоне равномерного синего свечения окружающего эухроматина. В цитоплазме нейронов четко верифицировались скопления NSE (красные гранулы), что отличало их от ярких ядер глиальных клеток (рис. 2, а). В постшемическом периоде в ядрах гиперхромных нейронов увеличивалось количество конденсированного хроматина (рис. 2, б, в). В цитоплазме несморщенных гиперхромных нейронов выявляли высокое содержание NSE, что, вероятно, свидетельствовало о компенсаторной активации данного фермента гликолиза при ишемии.

После острой ишемии вокруг реактивно измененных темных пирамидных нейронов прогрессивно увеличивалось количество астроцитов, максимально через 7 и 14 сут. Ядра этих клеток были мельче, чем ядра нейронов, содержали существенно больше конденсированного хроматина, что объясняет их очень яркое свечение (рис. 2, б, в).

Среди реактивно измененных темных нейронов отмечали клетки с признаками апоптоза (рис. 2, г, д, е), относительное содержание которых через 1 сут. было на уровне 4% (95% ДИ: 1,9—7,2%), а через 3 сут. достигало максимума — 9% (95% ДИ: 5,8—13,3%). Выявили статистически значимую динамику содержания апоптотических клеток (слой III: $H=12,2$, $\rho=0,01$; слой V: $H=11,4$,

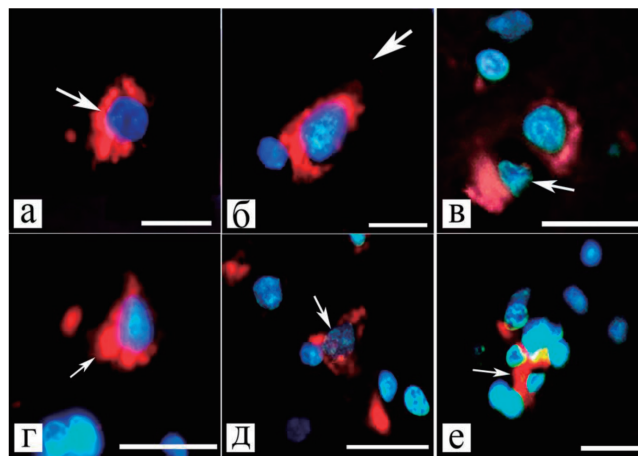


Рис. 2. Пирамидные нейроны слоя III соматосенсорной (а, г) и слоя V моторной коры (б, в) головного мозга белой крысы в норме (а) и через 3 сут. после острой ишемии (б, в, г, д, е): а — пирамидный нейрон, округлое ядро содержит незначительное количество конденсированного хроматина, в цитоплазме скопления NSE (красные гранулы); б, в — пирамидные нейроны, конденсация хроматина, изменение формы ядра (стрелки); г — начальная стадия апоптоза, конденсация хроматина, фрагментация цитоплазмы (стрелка) без разрушения; д — апоптотический распад ядра и цитоплазмы на фрагменты (стрелка); е — фагоцитоз поврежденного нейрона (стрелка) глиальными клетками (овальные с яркой флуоресценцией). Флуоресцентная окраска DAPI и иммунофлуоресцентная окраска на NSE. Объектив х40, шкала — 25 мкм.

$\rho = 0,03$). При окраске ДАР1 фрагментированные апоптозные ядра отчетливо выявлялись в виде типичных групп, близко расположенных плотных флуоресцирующих телец ДНК-содержащего материала, что позволяло их легко идентифицировать (рис. 2, д). Необходимо отметить длительное сохранение в постишемическом периоде реакции на NSE в цитоплазме нейронов с конденсированным ядерным хроматином (гиперхромные и апоптозные клетки) (рис. 2. е).

Проведено сопоставление различных морфотипов нейронов, выявленных при световой, флуоресцентной и электронной микроскопии. Функциональное состояние нейронов в ходе электронно-микроскопического исследования оценивали на основании сравнительного анализа показателей:

- 1) количества и распределения гетеро- и эухроматина, РНП-частиц (транскрипционной активности);
- 2) структурной организации ядрышка (размеры, форма, плотность, состав);
- 3) состояния ядерных мембран (инвагинации, поры, перинуклеолярное пространство);
- 4) белоксинтезирующего аппарата цитоплазмы (гранулярная эндоплазматическая сеть — ГЭС);
- 5) энергетической системы (популяции митохондрий);
- 6) аппарата Гольджи и системы вакуолей.

Перикарион нормохромных нейронов на ультраструктурном уровне представлен крупным округлым ядром, содержащим ядрышко и гомогенную кариоплазму, а также цитоплазмой с клеточными органеллами. Конденсированного хроматина в ядрах было мало, превалировал эухроматин (рис. 3, а). Ультра-

структурная организация нормохромных нейронов была сопоставима с результатами световой и флуоресцентной микроскопии этих клеток (рис. 1, а, 2, а)

В постишемическом периоде в СМК белых крыс были выявлены изменения ультраструктуры всех ее компонентов — нейронов, их отростков (аксонов, дендритов), синапсов, глиальных клеток, а также микрососудов. Характер реактивных, деструктивных и компенсаторно-восстановительных изменений нейронов прежде всего зависел от периода: острый постишемический (1, 3 сут.), ранний восстановительный (7, 14 сут.) и поздний восстановительный период (21, 30 сут.).

В остром постишемическом периоде (1, 3 сут.) прежде всего появлялись структурные изменения, связанные с дисфункцией водно-электролитного и белкового обмена, приводящие к развитию цитотоксического отека-набухания (рис. 3, б, в). В наибольшей степени повреждались отростки фибриллярных астроцитов вокруг микрососудов, протоплазматических астроцитов и других структур нейропиля (синаптические терминалы, мелкие дендриты).

Необратимый распад нейронов сочетался с деструкцией митохондрий и разрушением цитомембран (рис. 3, в). Такие изменения нейронов являлись выражением быстрого фокального или тотального ишемического колликвационного некроза (развитие кардиоцитолитоза, клетки-тени).

Другие нейроны СМК, напротив, превращались в гиперхромные с различной степенью конденсации хроматина (рис. 3, г). Именно эти клетки были наиболее многочисленными, неоднородными по структу-

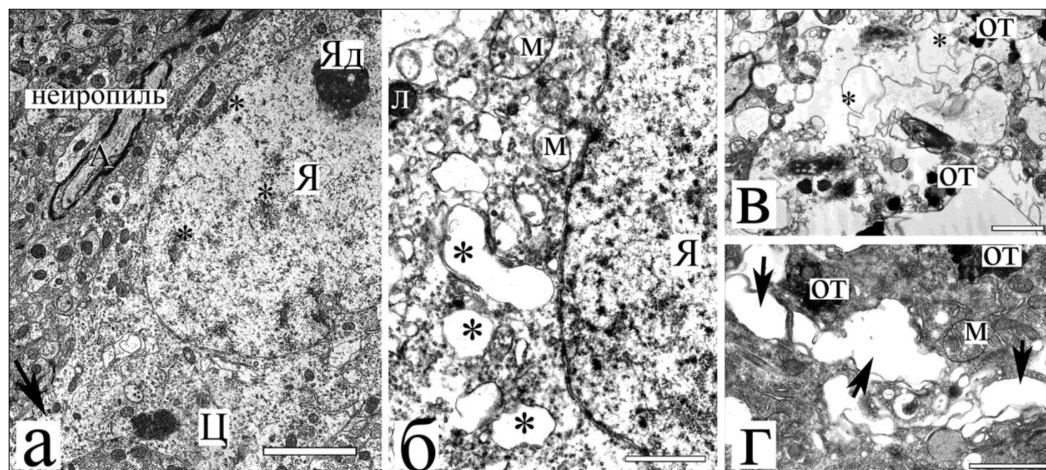


Рис. 3. Пирамидные нейроны слоя III соматосенсорной коры головного мозга белой крысы в норме (а) и через 1 сут. после острой ишемии (б): а — ультраструктура всех составляющих нейрона (ядро, цитоплазма), его отростков (дендрит, аксон) и окружающего нейропиля без признаков повреждения, небольшое количество околомембранного и внутриядерного конденсированного хроматина (*); б — гидропическая дистрофия, появление в клетке вакуолей (*), наполненных цитоплазматической жидкостью; в — необратимый распад (*) структур нейрона; г — формирование «темного нейрона». А — аксон, стрелка — базальный дендрит, От — остаточные тельца, Л — лизосома, М — митохондрия, Ц — цитоплазма, * — небольшие фрагменты околомембранного и внутриядерного конденсированного хроматина, Я — овальное ядро, окруженное двойной мембраной с инвагинацией, Яд — ядрышко. Окраска уранилацетатом и цитратом свинца. Увеличение x15000, шкала — 2 мкм (а, б) и 1 мкм (в, г).

ре и длительно сохранялись в постиншемическом периоде. Общим для них явилось наличие электронно-плотного ядра и цитоплазмы. По ультраструктурным признакам выделяли несколько состояний гиперхромных нейронов: 1 — сниженной активности, 2 — дегенеративных (необратимых) изменений с исходом в коагуляционный некроз (пикноморфные нейроны) (рис. 4, а, б, в) и 3 — с исходом в апоптоз (рис. 4, г, д), а также 4 — с повышенной активностью и функциональным напряжением (рис. 5).

Через 1 и 3 сут. после острой ишемии преобладали гиперхромные нейроны в состоянии сниженной биосинтетической активности, с признаками дегенеративных изменений. Через 7, 14, 21 и 30 сут. после острой ишемии — необратимо поврежденные пикноморфные нейроны, а также нейроны с признаками повышенной активности и функционального напряжения. В отдаленном постиншемическом периоде (в сравне-

нии с острым) в 2—3 раза увеличивалась доля нормохромных нейронов. То есть, тинкториальные свойства части гиперхромных нейронов восстанавливались.

В нейронах с снижением функциональной активности, по сравнению с нормой, уменьшались размеры ядра и ядрышка, увеличивалось содержание гетерохроматина и отсутствовали интерхроматиновые гранулы, отмечалась выраженная осмиофилия кариоплазмы. Плотные ядрышки смещались на периферию ядра, неравномерно расширялись перинуклеарные пространства, появлялись складки поверхности ядра, многочисленные светлые митохондрии с разрушенными кристами, расширялись канальцы эндоплазматической сети (рис. 4, а). При этом эти нейроны сохраняли неповрежденные аксосоматические синапсы (рис. 4, е). Итогом тяжелого ишемического повреждения нейронов были коагуляционный некроз (пикноморфные ней-

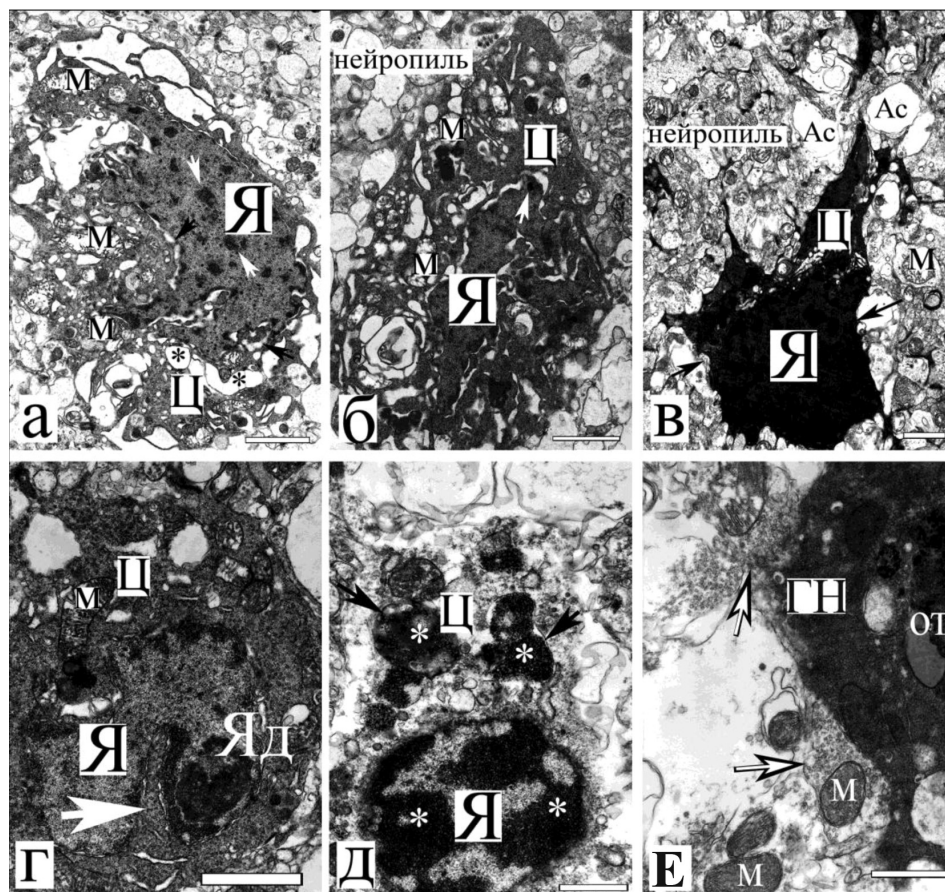


Рис. 4. Пирамидные нейроны в слое III соматосенсорной коры белой крысы в постиншемическом периоде: а — гиперхромный нейрон со сниженной функциональной активностью (описание см. в тексте), конденсированным хроматином (стрелки), через 1 сут.; б — гиперхромный нейрон с неполной дегидратацией и деградацией цитоплазмы, через 3 сут.; в — пикноморфный гиперхромный пирамидный нейрон (полная дегидратация цитоплазмы, выраженная гомогенизация перикариона), через 3 сут.; г — начальная стадия апоптоза, конденсация хроматина и изменение формы ядра, через 1 сут.; д — завершающая стадия апоптоза, появления апоптотических ядерных телец, разрушение цитоплазматической мембраны; е — аксосоматические синапсы (стрелки) на гиперхромном нейроне (ГН). Ас — отечные отростки протоплазматического астроцита, ОТ — остаточные тела, М — митохондрии, Ц — цитоплазма, Я — ядро, * — расширенная эндоплазматическая сеть, белые стрелки; черная стрелка — перинуклеарное пространство. Окраска уранилацетатом и цитратом свинца. Увеличение $\times 10000$, шкала — 3 мкм (а, б, г, д), 2 мкм (в), 0,5 мкм (е).

роны) и апоптоз (рис. 4, в, д). Для пикноморфных нейронов характерно: выраженная осмиофилия ядра и цитоплазмы, уменьшение размеров тела клетки за счет сморщивания; деформация клеточного ядра, инвагинации; массивные скопления гетерохроматина под внутренней ядерной мембраной; фрагментация ядрышка и перемещение его частей к внутренней ядерной мембране; суженное перинуклеарное пространство; увеличенные размеры митохондрий, светлый матрикс и разрушение значительной части крист; плохо различимые каналцы эндоплазматической сети. Пикноморфные нейроны были окружены зоной отека-набухания астроцитарных отростков (рис. 4, в).

Начальные проявления коагуляционно-ишемического некроза и апоптоза, из-за сходных ультраструктурных характеристик, очень сложно было отличить даже с помощью электронной микроскопии (рис. 4, б, г). Однако для ишемического коагуляционного некроза нейронов в большей степени были характерны такие ультраструктурные изменения, как набухание митохондрий, локальная коагуляция, гиперосмиофилия протеинов мембран, микротрубочек, крист митохондрий и цистерн эндоплазматической сети, конденсация хроматина ядра в плотные глыбки, увеличение в кариоплазме количества перихроматиновых гранул, уплотнение агрегированного хроматина и дезинтеграция ядрышка. От цистерн гранулярной эндоплазматической сети отделялись рибосомы, значительно расширились цистерны оболочки ядра и эндоплазматической сети, отмечалась необратимая денатурация и коагуляция белков цитозоля, появлялись неструктурированные нерастворимые соединения (рис. 4, а, б, в). При коагуляционно-ишемическом

отсроченном некрозе не выявлено признаков активации лизосом (рис. 4 а, б, в), а утилизация остатков погибших нейронов происходила длительное время с привлечением фагоцитов.

Наиболее надежным дифференциальным критерием, отличающим коагуляционно-ишемический некроз от апоптоза в раннем постишемическом периоде, являлось морфологическое состояние ядра. При апоптозе в пикнотизированном ядре с гофрированными контурами ядрышко сохранялось (рис. 4, г). При коагуляционном некрозе наблюдали глубокий пикноз ядра с разрушением ядрышка (рис. 4, в). Абсолютным признаком программированной клеточной гибели было формирование апоптотических тел и разрушение цитолеммы (рис. 4, д).

Кроме нормохромных и гиперхромных нейронов в отдаленном восстановительном периоде в СМК встречались гипохромные нейроны 7% (ДИ: 4,2—10,9%) с большим содержанием остаточных телец, поврежденными митохондриями, расширенными цистернами эндоплазматической сети, малым содержанием рибонуклеопротеинов в ядре (хроматина) и цитоплазме, неровными краями ядра. Вполне вероятно, что подобные изменения отражали функциональное истощение нейронов. Очень редко 3% (95% ДИ: 1,3—6%) встречались апоптотические клетки (рис. 4, г, д).

Таким образом, после 20-минутной окклюзии обших сонных артерий нами выявлены реактивные тинкториальные, гидропические дистрофические и некробиотические (коликвационные и коагуляционные) изменения, а также структурные признаки апоптоза. Максимальной активности механизмы апоптоза достигали через 3 сут. после острой ишемии. За счет апоптоза ОЧП нейронов СМК уменьшалась на 9—17%.

В отдаленном восстановительном периоде (14, 21 и 30 сут.) часть не сморщенных гиперхромных и нормохромных нейронов имела признаки активного функционирования и напряжения (транскрипционной активности). У этих нейронов отмечалась высокая электронная плотность ядер, неровность их контуров, очаговые скопления интерхроматиновых гранул и перихроматиновых фибрилл на фоне светлого эухроматина. Ядрышки этих нейронов увеличивались в размере, располагались эксцентрично, содержали гранулярные компоненты. Краевой хроматин ядра был представлен небольшими скоплениями под внутренней ядерной мембраной, фрагментарно расширилось перинуклеарное пространство, отмечались складки ядерной мембраны. В перинуклеарной зоне цитоплазмы выявлено большое количество темных неповрежденных митохондрий. В некоторых клетках наблюдалось очаговое расширение каналцев эндоплазматической сети, увеличение плотности свободных рибосом, гипертрофированный комплекс Гольджи, мультивезикулярные и мультиламнарные тела (рис. 5).

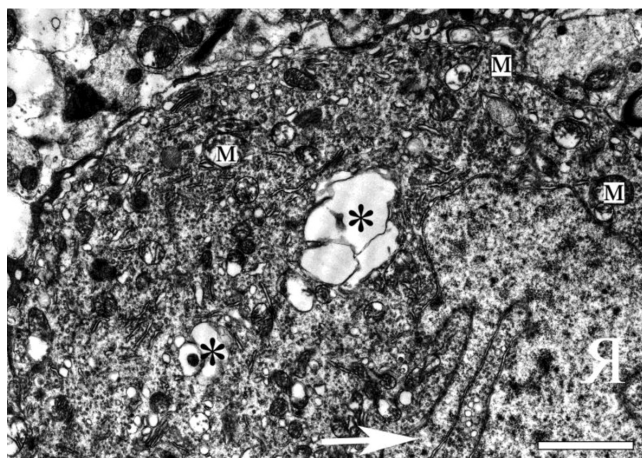


Рис. 5. Ультраструктурные проявления функционального напряжения темного пирамидного нейрона соматосенсорной коры белой крысы в постишемическом периоде, 14 сут.: расширение каналцев эндоплазматической сети (*), большое количество митохондрий (М), складки ядерной мембраны (стрелка), свободные рибосомы. Окраска уранилацетатом и цитратом свинца, увеличение $\times 12000$, шкала — 1 мкм.

Следовательно, структурная организация части нормохромных и гиперхромных нейронов (в состоянии активации и напряжения) указывала на высокую интенсивность протекающих в них транскрипционных процессов (в клеточном ядре) и белоксинтетических процессов (в цитоплазме — внутриклеточная регенерация и компенсаторная гиперплазия). Вероятно, именно за счет подобных нейронов происходило восстановление функций поврежденного головного мозга в отдаленном постишемическом периоде.

По данным литературы, динамика, основные фазы и направления структурно-функциональных изменений нейронов головного мозга белых крыс после острой ишемии остаются актуальными проблемами нейроморфологии [1]. Изучение структурных механизмов повреждения нейронов в постишемическом периоде неизбежно сталкивается с необходимостью верификации некроза и апоптоза. Существует множество различных методов, которые позволяют визуализировать различные признаки постишемической гибели клеток. Однако наиболее надежным методом, способным однозначно различать некроз и апоптоз, является детальный анализ клеточной ультраструктуры с помощью электронной микроскопии [15]. Поэтому в настоящее время многие авторы рекомендуют делать акцент на детальном описании морфологической картины патологически измененных клеток. Наряду с иммуногистохимией, TUNEL- и ISEL-методами это позволяет избежать искажения интерпретации морфометрических результатов и наиболее точно дифференцировать «апоптоз» и «некроз» [15, 21].

Необходимо учитывать, что механизмы, посредством которых нейроны погибают и восстанавливаются при ишемии очень сложны и до конца не изучены [15]. Согласно рекомендациям Nomenclature Committee on Cell Death (2009), смерть клетки может быть классифицирована на основе морфологического внешнего вида (некроз, апоптоз, аутофагия и различные смешанные фенотипы), но только тогда, когда доказаны: 1 — потеря целостности плазматической мембраны, 2 — полный распад клетки, включая ее ядро, или 3 — фагоцитоз фрагментов или клетки в целом. При этом иммуногистохимические маркеры апоптоза играют вспомогательную роль [22].

К сожалению, несмотря на огромный объем информации, «точка невозврата» и направление гибели при оценке состояния конкретных гиперхромных нейронов после острой ишемии до сих пор не определены и нет простых решений этих проблем. В большинстве случаев при анализе морфологических данных можно судить только о вероятности появления некроза или апоптоза для конкретного гиперхромного нейрона [15].

В настоящей работе проведено детальное описание всех морфотипов измененных пирамидных нейронов СМК белых крыс после острой 20-минутной ишемии с помощью световой, флуоресцентной (DAPI) и электронной микроскопии. Сочетанное использование методов позволило классифицировать нейроны и, при наличии четких структурных маркеров (распад ядер, клетки, фагоцитоз) доказать возможность апоптоза гиперхромных нейронов СМК после 20-минутной окклюзии общих сонных артерий. При окраске DAPI фрагментированные апоптозные ядра отчетливо выявлялись в виде типичных групп, близко расположенных плотных флуоресцирующих телец ДНК-содержащего материала, что позволяло их легко идентифицировать. Наиболее надежным критерием, отличающим коагуляционно-ишемический некроз от апоптоза в раннем постишемическом периоде, являлось морфологическое состояние ядра, а абсолютным признаком программированной клеточной гибели является формирование апоптотических тел и разрушение цитолеммы.

Например, на основании подобного подхода, в слое III через 3 сут. показано, что 5,8—13,3% гиперхромных нейронов подверглось апоптозу, 13,9—23,9% — коагуляционному некрозу, а остальные выходили из патологического состояния в отдаленном восстановительном периоде. Необратимо измененные клетки-тени составляли 7,8—16,1%. В результате общая численная плотность пирамидных нейронов в течение 30 сут. постишемического периода в слое III СМК снижалась на 24,9—36,6%, а в слое V — на 10,3—19,4%. Ранее близкие значения показаны в процессе формирования очага ишемического инсульта после полной локальной ишемии в зоне пенумбры [14, 15].

Заключение

Таким образом, при использовании 2-сосудистой модели неполной глобальной ишемии без гипотонии была доказана смешанная природа гибели нейронов в СМК — одновременное сочетание процессов некроза и апоптоза (параапоптоз). Однако основную роль в гибели нейронов все же играли процессы быстрого и отдаленного ишемического некроза. Полученные результаты могут быть полезны при изучении динамики, основных фаз и направлений структурно-функциональных изменений нейронов неокортекса млекопитающих при сравнении разных экспериментальных моделей острой ишемии головного мозга, а также для понимания структурных основ патогенеза постишемической энцефалопатии.

References

1. Semchenko V.V., Stepanov S.S., Bogolepov N.N. *Synaptic plasticity of the brain (fundamental and applied aspects). [Sinapticheskaya plastichnost' golovного mozga (fundamental'nye i prikladnye aspekty)]*. 2nd ed. Moscow; 2014. (in Russian)
2. Wehman J.C., Hanel R.A., Guidot C.A. et al. Atherosclerotic occlusive extracranial vertebral artery disease: indications for intervention, endovascular techniques, short-term and long-term results. *J Interv Cardiol*. 2004; 17(4): 219-32.
3. Nguyen-Huynh M.N., Johnston S.C. Transient ischemic attack: a neurologic emergency. *Current neurology and neuroscience reports*. 2005; 5(1): 13-20.
4. Gusev E. I., Konovalov A. N., Skvortsova V. I. *Neurology and neurosurgery: textbook: in 2 V. [Nevrologiya i neyrokhirurgiya: uchebnik: v 2 t.]*. 2nd ed., correction and additional. V. 3: Neurology. Moscow; GEOTAR-Media; 2013. (in Russian)
5. Shertaev M.M., Ibragimov U.K., Ikramova S.Kh. et al. Morphological changes in brain tissue during experimental ischemia. *Vestnik NGPU*. 2015; 1(23): 72-9. (in Russian)
6. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological reviews*. 1999; 79(4): 1431-568.
7. Back T., Hemmen T., Schuler O.G. Lesion evolution in cerebral ischemia. *J Neurol*. 2004; 251: 388-97.
8. Mytsik A.V., Stepanov S.S., Larionov P.M., Akulinin V.A. Actual problems of studying the structural and functional state of neurons of the human cerebral cortex in the postischemic period. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2012; 1(1): 37-47. (in Russian)
9. Sergeev A.V., Stepanov S.S., Akulinin V.A., Mytsik A.V. Natural mechanisms of protecting the human brain in chronic ischemia. *Obshchaya reanimatologiya*. 2015; 11(1): 22-32. DOI: 10.15360/1813-9779-2015-1-22-32. (in Russian)
10. Akulinin V.A., Stepanov S.S., Mytsik A.V., Stepanov A.S., Razumovskiy V.S. Brain interneurons of human neocortex after clinical death. *Obshchaya reanimatologiya*. 2016; 12(4): 24-36. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-4-24-36. (in Russian)
11. Stepanov A.S., Akulinin V.A., Stepanov S.S., Mytsik A.V. Immunohistochemical characteristics of communication structures of neurons of the human cerebral cortex in norm and after reperfusion. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2016; 5(4): 61-8. (in Russian)
12. Winkelmann E.R., Charcansky A., Faccioni-Heuser M.C., Netto C.A., Achaval M. An ultrastructural analysis of cellular death in the CA1 field in the rat hippocampus after transient forebrain ischemia followed by 2, 4 and 10 days of reperfusion. *Anat Embryol*. 2006; 211: 423-34.
13. Zeng Y.S., Xu Z.C. Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neuroscience research*. 2000; 37: 113-25.
14. Ruan Y.W., Ling G.Y., Zhang J.L., Xu Z.C. Apoptosis in the adult striatum after transient forebrain ischemia and the effects of ischemic severity. *Brain research*. 2003; 982: 228-40.
15. Zille M., Farr T.D., Przesdzing I., Muller J. Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: problems, and perspectives. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2012; 32: 213-31.
16. Nudo R.J. Functional and structural plasticity in motor cortex: implications for stroke recovery. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America*. 2003; 14(1): 57-76.
17. Pagnussat A.S., Faccioni-Heuser M.C., Netto C.A., Achaval M. An ultrastructural study of cell death in the CA1 pyramidal field of the hippocampus in rats submitted to transient global ischemia followed by reperfusion. *J Anat*. 2007; 211: 589-99.
18. Zink D., Sadoni N., Stelzer E. Visualizing chromatin and chromosomes in living cells. *Methods*. 2003; 29(1): 42-50.
19. Ullah I., Ullah N., Naseer M.I., Lee H. Y., Kim M.K. Neuroprotection with metformin and thymoquinone against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat cortical neurons. *BMC neuroscience*. 2012; 13: 1-11. DOI: 10.1186/1471-2202-13-11
20. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego (California): Elsevier Academic Press; 2005.
21. Galluzzi L., Aaronson S.A., Abrams J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell death and differentiation*. 2009; 16: 1093-107.
22. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*. 2009; 16: 3-11.

Сведения об авторах:

Степанов Александр Сергеевич, аспирант каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, Омский государственный медицинский университет; e-mail: ctepan55@yandex.ru;

Авдеев Дмитрий Борисович, канд. ветеринарных наук, доцент каф. безопасности жизнедеятельности, медицины катастроф, Омский государственный медицинский университет, e-mail: avdeev86@inbox.ru;

Акулинин Виктор Александрович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, Омский государственный медицинский университет, e-mail: akulinin@omsk-osma.ru;

Степанов Сергей Степанович, доктор мед. наук, ст. науч. сотр. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, Омский государственный медицинский университет, e-mail: serg_stepanov@mail.ru

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616-092

Шакова Ф.М.¹, Калинина Т.И.², Гуляев М.В.³, Романова Г.А.¹

Нейропротективный и антиамнестический эффекты комбинированной терапии при ишемическом повреждении префронтальной коры в эксперименте

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

² ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов», 117545, г. Москва, Россия, 1-й Дорожный проезд, д. 1

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119192, г. Москва, Россия, Ломоносовский просп., д. 31, к. 5

Цель исследования — изучение влияния комбинированной терапии (мутантные молекулы эритропоэтина (ЕРО) и дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2Н) на воспроизведение условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) и объем поражения коры мозга у крыс с двусторонним ишемическим повреждением префронтальной коры. **Методика.** Мутантные молекулы ЕРО (МЕРО-TR и МЕРО-Fc) с значительно редуцированной эритропоэтической и выраженной цитопротекторной активностью созданы методом генной инженерии. Используемый миметик фактора роста нервов человека, эндогенного регуляторного белка, в экспериментах *in vitro* проявлял отчетливые нейропротективные свойства. Двустороннюю фокальную ишемию префронтальной коры головного мозга крыс создавали методом фотохимического тромбоза. Выработку и оценку УРПИ проводили по стандартной методике. Объем повреждения мозга оценивался при помощи МРТ. МЕРО-TR и МЕРО-Fc (50 мкг/кг) вводили интраназально однократно через 1 ч после фототромбоза, ГК-2Н (1 мг/кг) — внутривенно через 4 ч после фототромбоза и далее в течение 4 послеоперационных суток. **Результаты.** Выявлено статистически значимое сохранение выработанного до ишемии УРПИ, а также значимое снижение объема повреждения коры при комплексной терапии. Полученные данные свидетельствуют об антиамнестическом и нейропротекторном эффектах примененной комбинированной терапии, которые наиболее отчетливо выражены в дозах: МЕРО-Fc (50 мкг/кг) и ГК-2Н (1 мг/кг). **Заключение.** Подтвержден нейропротекторный эффект и усиление антиамнестического эффекта при сочетанном применении мутантных производных эритропоэтина — МЕРО-TR и МЕРО-Fc и дипептидного миметика фактора роста нервов человека ГК-2Н.

Ключевые слова: мутантные молекулы эритропоэтина; дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2Н; фототромбоз; кора; нейропротекция; крысы.

Для цитирования: Шакова Ф.М., Калинина Т.И., Гуляев М.В., Романова Г.А. Нейропротективный и антиамнестический эффекты комбинированной терапии при ишемическом повреждении префронтальной коры в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 39—45.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.39-45

Финансирование. Работа поддержана субсидией Президиума РАН по программе «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» на 2014—2017 гг.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность руководителю отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», доктору биол. наук, профессору, член-корреспонденту РАН, Гудашевой Татьяне Александровне за предоставленный для исследования препарат ГК-2Н.

Для корреспонденции: Шакова Фатима Мухамедовна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: shakova.fatima@yandex.ru

Поступила 24.01.2018

Shakova F.M.¹, Kalinina T.I.², Gulyaev M.V.³, Romanova G.A.¹

Neuroprotective and anti-amnestic effects of a combination therapy in a model of photochemical ischemic damage in the prefrontal cortex

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian

² State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, 1st Dorozhnyi Pr. 1, Moscow 117545, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, School of Fundamental Medicine, Lomonosovsky Prospekt 31-5, Moscow 117192, Russia

The aim of this study was to investigate the effect of combination therapy, including mutant erythropoietin molecules (ЕРО) and a dipeptide mimetic of the nerve growth factor, GK-2H, on the conditioned passive avoidance (PA) reflex and

the volume of injury induced by bilateral ischemia of the prefrontal cortex in rats. Using the method of genetic engineering the mutant molecules of EPO, MERO-TR and MERO-Fc, with strongly reduced erythropoietic and pronounced cytoprotective activity were created. The used human nerve growth factor mimetic, an endogenous regulatory protein based on the β -bend of loop 4, which is a dimeric substituted dipeptide of bis- (N-monosuccinyl-glycyl-lysine) hexamethylenediamine, GK-2H human (GK-2H), has proven neuroprotective in *in vitro* experiments. **Methods.** Bilateral focal ischemic infarction was modeled in the rat prefrontal cortex by photochemically induced thrombosis. The PA test was performed according to a standard method. Volume of brain injury was estimated using MRI. MERO-TR, and MERO-Fc (50 μ g/kg, intranasally) were administered once, one hour after the injury. GK-2H (1 mg/kg, i.p.) was injected four hours after the injury and then for next four days. **Results.** The study showed that the complex therapy provided statistically significant retention of the PA reflex developed prior to ischemia and a significant decrease in the volume of injury. The anti-amnestic and neuroprotective effects of combination therapy were most pronounced at doses of MERO-Fc 50 μ g/kg and GK-2H 1 mg/kg. **Conclusion.** This study has confirmed the neuroprotective effect and enhancement of the anti-amnestic effect exerted by the combination of mutant erythropoietin derivatives, MERO-TR and MERO-Fc, and the dipeptide mimetic of human growth factor GK-2H.

Keywords: erythropoietin mutant molecules; dipeptide mimetic of human nerve growth factor, GK-2H; photothrombosis; prefrontal cortex; neuroprotection, rats.

For citation: Shakova F.M., Kalinina T.I., Gulyaev M.V., Romanova G.A. Neuroprotective and anti-amnestic effects of a combination therapy in a model of photochemical ischemic damage in the prefrontal cortex. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 39—45. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.39-45

For correspondence: Fatima M. Shakova, PhD, MD, Leading Researcher, Institute of General Pathology and Pathophysiology; Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: shakova.fatima@yandex.ru

Acknowledgments. The work was supported by a grant from the Presidium of the Russian Academy of Sciences in the program «Fundamental Research for the Development of Biomedical Technologies» for 2014—2017.

We thank Prof. Tatyana Alexandrovna Gudasheva, Head of the Department of Chemistry of Medicines from the «Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Zakusov Institute of Pharmacology», for the provided of GK-2H

Received 24.01.2018

Введение

По данным Всемирной Организации Здравоохранения, инсульт занимает второе место среди причин смертности населения. Вместе с ишемической болезнью сердца, инсульт в 2015 г. унес в общей сложности 15 млн жизней [1]. Ежегодная смертность от инсульта в РФ оценивается как 374 на 100 тыс. населения [2]. При этом в так называемый острый период инсульта, составляющий в среднем 21 сут. с момента его развития, летальность достигает 35%, а в течение года погибает еще 15% из выживших пациентов [3, 4]. Разработка новых схем патогенетической терапии ишемического инсульта позволит снизить летальность и повысить эффективность функционального восстановления пациентов.

Известно, что основными стратегическими направлениями специфической терапии инсульта являются: реперфузия — восстановление мозгового кровотока, профилактика тромбообразования и нейропротекция — поддержание метаболизма и защита ткани мозга от повреждений [5—7]. Использование препаратов нейрометаболического действия повышает устойчивость нейронов в условиях недостаточности кровоснабжения и кислородного голодания. В связи с этим, поиск новых лекарственных препаратов с воз-

можным нейропротективным эффектом остается одной из важнейших задач современной медицины.

Прогресс в определении механизмов нейродегенерации способствует выявлению новых фармакологических мишеней для разработки эффективных средств патогенетической фармакотерапии. Подходы к созданию таких препаратов базируются на современных представлениях о механизмах эндогенного регулирования функций нейронов и их регенерации. Накоплены обширные сведения о цитокинах — молекулах, являющихся посредниками межклеточных взаимодействий, регулирующих кроветворение, иммунный ответ, клеточный цикл в разных тканях, участвующих во многих физиологических и патологических процессах. Один из них — гемопоэтический ростовой фактор эритропоэтин (ЕРО). Помимо регуляции эритропоэза, ЕРО проявляет широкий спектр защитных функций в организме. Особое внимание уделяется изучению производных эритропоэтина, не стимулирующих эритропоэз, но способных инициировать цитопротекцию. Методом генной инженерии созданы мутантные молекулы ЕРО, несущие замену (R103A), как в виде мономера ЕРО-TR, так и димера в форме рекомбинантного белка с Fc-фрагментом иммуноглобулина, сформированного за счёт ди-

меризации двух Fc-фрагментов. Эритропоэтическая активность полученных мутантных гибридных белков оценена в тестах *in vitro*, где производилось исследование способности очищенных мутантных белков инициировать пролиферацию UT-7еро клеток, чувствительных к ЕРО в сравнении со стандартным препаратом ЕРО. Анализ полученных данных показал, что способность взаимодействовать с рецептором и соответственно вызывать пролиферацию UT-7еро клеток, редуцирована в 1000 и более раз у мутанта, содержащего замену R103E в контексте мономера ЕРО. В случае димерных молекул с молекулой Fc, способность вызывать пролиферацию была снижена в 100 раз. Таким образом, созданы мутантные молекулы эритропоэтина в контексте ЕРО-TR и ЕРО-Fc с сильно редуцированной эритропоэтической активностью [8].

Среди известных эндогенных регуляторных белков особое внимание уделяется факторам роста нервной ткани (ФРНТ), в частности, нейротрофинам и среди них — фактору роста нервов (ФРН, *nerve growth factor*, NGF). ФРН участвует в росте, созревании и поддержании жизнедеятельности нейронов в центральной и периферической нервной системе как в норме, так и в патологии [9]. С момента открытия ФРН способность нейротрофинов предотвращать дегенерацию нейронов, стимулировать их регенерацию, повышать синаптическую пластичность, исследованная на различных моделях *in vitro* и *in vivo*, открыла перспективу их использования в качестве основной или вспомогательной терапии при ряде заболеваний, сопровождающихся нейродегенеративными процессами [10]. В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» сконструирован и синтезирован миметик фактора роста нервов человека (*human*) на основе β -изгиба четвертой петли, представляющий собой димерный замещенный дипептид гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-глицил-лизина) ГК-2 *human* (ГК-2Н). В экспериментах *in vitro* у соединения выявлены нейропротективные свойства [11—12].

Практически важной задачей является изучение влияния комплексной терапии с использованием мутантных молекул эритропоэтина МЕРО-TR, МЕРО-Fc и дипептидного миметика человеческого фактора роста нервов ГК-2Н на нарушения поведения и объем повреждения при ишемическом фотохимическом тромбозе префронтальной коры головного мозга крыс.

Цель исследования — изучение влияния комбинированной терапии, включающей мутантные молекулы эритропоэтина и дипептидный миметик человеческого фактора роста нервов ГК-2Н на воспроизведение условного рефлекса пассивного избегания и объем поражения мозга у крыс с ишемическим повреждением префронтальной коры.

Методика

Работа выполнена на 50 нелинейных крысах-самцах массой 200—220 г, выращенных в виварии ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии». Животные содержались при свободном доступе к пище и воде и 12-часовом световом режиме. Все эксперименты проводились в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденными МЗ РФ №708 от 23.08.2010 г. и одобрены этическим комитетом НИИОПП.

Введение мутантных молекул эритропоэтина — МЕРО-TR и МЕРО-Fc осуществлялось интраназально (и/н) однократно в дозе 50 мкг/кг через 1 ч после воспроизведения фототромбоза префронтальной коры. Дипептидный миметик ГК-2Н вводили внутривентриально (в/в) в дозе 1 мг/кг по схеме: через 4 ч после двустороннего фототромбоза и далее в течение 4-х послеоперационных сут. Все экспериментальные животные были разделены на 5 групп:

1. Фототромбоз + ГК-2Н в дозе 1 мг/кг в/в ($n = 10$);
2. Фототромбоз + МЕРО-TR в дозе 50 мкг/кг и/н + ГК-2Н в дозе 1 мг/кг в/в ($n = 10$);
3. Фототромбоз + МЕРО-Fc в дозе 50 мкг/кг и/н + ГК-2Н в дозе 1 мг/кг в/в по схеме ($n = 10$);
4. Ложнооперированный контроль ($n = 10$);
5. Фототромбоз + 0,9% раствор NaCl в объеме 50 мкл ($n = 10$).

Двусторонний фокальный ишемический инфаркт префронтальной коры головного мозга крыс — поля Fr1 и Fr2 создавали методом фотохимически индуцируемого тромбоза [13—14]. Операцию проводили под хлоралгидратным наркозом (300 мг/кг). После введения фотосенсибилизирующего красителя бенгальского розового («Sigma», USA; 40 мг/кг, внутривенно) крысу фиксировали в стереотаксисе, делали продольный разрез кожи и удаляли надкостницу. Для облучения использовали специальную установку, состоящую из источника холодного света — галогеновой лампы мощностью 250 Вт и световода с диаметром внутреннего сечения 3 мм. Световод устанавливали на расстоянии 1 мм от поверхности черепа, на 2 мм ростральнее брегмы и на 2 мм латеральнее сагиттального шва и облучали через кости черепа каждое из полушарий мозга холодным светом длиной волны 560 нм в течение 15 минут с каждой стороны. Ложнооперированные животные подвергались тем же манипуляциям, за исключением введения красителя бенгальского розового.

Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ) вырабатывали по ранее описанной схеме [15]. Определяли латентный период (ЛП) — время, которое проходило от начала тестирования до момента пересече-

чения крысой отверстия, разделяющего освещенный и темный отсеки камеры. В 1-е сут. обучения крысу помещали в освещенный отсек, обследовав который она через некоторое время (ЛП до обучения) переходила в темный отсек, после чего дверь закрывали и оставляли там крысу на 5 мин. Через 1 ч процедуру повторяли, но крысу сразу извлекали из темного отсека. На 2-е сут. эту же процедуру повторяли дважды с интервалом в 1 ч. При повторном заходе крысы в темный отсек камеры дверь в него закрывали и через металлические прутья пола пропускали электрический ток (1,3 мА, 50 Гц, 5 с). УРПИ считали выработанным, если ЛП составлял не менее 300 с. Животных с меньшим ЛП исключали из эксперимента. Оценку ЛП УРПИ проводили на 4-е сут. после фотохимического тромбоза префронтальной коры.

Объем повреждения головного мозга экспериментальных животных оценивали при помощи магнитно-резонансной томографии (МРТ) на 4-е сут. после фототромбоза. Животные были предварительно наркотизированы внутривенным введением хлоралгидрата (300 мг/кг). Сканирование головного мозга производилось на магнитно-резонансном томографе BioSpec 70/30 USR фирмы Bruker (Germany) с постоянным магнитным полем 7Тл и с градиентной системой 105мТл/м. Морфометрический анализ МРТ-изображений проводили в программе ImageJ 1.38x (National Institutes of Health, USA) [16].

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием компьютерной программы Statistica 6.0. Для сравнения показателей латентного периода в тесте УРПИ использовали U-критерий Манна—Уитни для независимых выборок и критерий

Вилкоксона для связанных выборок. Статистическую значимость различий объемов инфаркта оценивали по t-критерию Стьюдента.

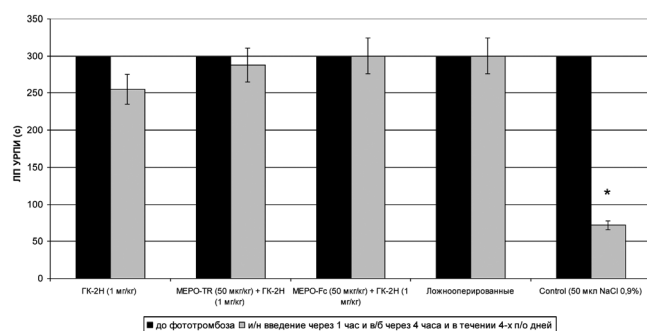
Результаты и обсуждение

В предыдущих работах нами показано, что двусторонний тромбоз кровеносных сосудов префронтальной области коры головного мозга крыс приводит к формированию ишемического очага, который захватывает всю толщу коры и отделен от окружающей неповрежденной ткани четко выраженной границей, такое повреждение коры сопровождается потерей выработанного до ишемии условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) [17]. При однократном интраназальном введении мутантных производных эритропоэтина (50 мкг/кг) через 1 ч после операции совместно с внутривенным введением дипептидного миметика ГК-2Н в дозе (1 мг/кг) и далее по схеме, ЛП УРПИ на 4-е сут. после ишемии составил 300 с в группе, получавшей МЕРО-Fc+ГК-2Н, достигнув дооперационного показателя и 288 с в группе с МЕРО-TR+ГК-2Н. ЛП УРПИ животных, получавших ГК-2Н составил 245 с, у контрольной группы с NaCl 0,9% этот показатель составил 68 с (рисунок).

Стоит отметить, что рассчитанный коэффициент эффективности защиты (табл. 1) оказался самым высоким при введении МЕРО-Fc (50 мкг/кг) + ГК-2Н (1 мг/кг) по схеме и составил 100%, несколько ниже — 94% при введении комплекса МЕРО-TR (50 мкг/кг) + ГК-2Н (1 мг/кг) по схеме, что оказалось статистически значимо выше коэффициента защиты при монотерапии мутантными производными эритропоэтина — по 56% для МЕРО-Fc (50 мкг/кг) и МЕРО-TR (50 мкг/кг) [17] соответственно и существенно выше этого показателя у ГК-2Н — 73%.

Полученные данные показали статистически значимое сохранение выработанного до ишемии УРПИ, как при введении ГК-2Н, что было подтверждено ранее [18], так и при комплексной терапии, что свидетельствует о высокой антиамнестической эффективности этих комбинаций.

МРТ-исследование показало (табл. 2), что суммарный объем поражения мозга крысы при фототромбозе составил 29,1 мм³. Во всех трех опытных группах животных, получавших как ГК-2Н, так и МЕРО-TR + ГК-2Н, МЕРО-Fc + ГК-2Н наблюдалось статистически значимое снижение объема повреждения, что соответствовало значениям при монотерапии МЕРО-Fc и МЕРО-TR в дозе 50 мкг/кг, полученным ранее [17] и указывает на



Влияние комплексной терапии на сохранение УРПИ у крыс с двусторонним фототромбозом префронтальной коры.

По оси абсцисс — группы экспериментальных животных: получавшие ГК-2Н (1 мг/кг), МЕРО-TR (50 мкг/кг) + ГК-2Н (1 мг/кг), МЕРО-Fc (50 мкг/кг) + ГК-2Н (1 мг/кг), ложнооперированные животные, контрольная группа (50 мкл NaCl 0,9%). Темные столбики — показатели группы до фототромбоза, серые — показатели группы после введения веществ на 4-е сут. после фототромбоза. По оси ординат: латентный период условного рефлекса пассивного избегания (ЛП УРПИ, с) соответствующих экспериментальных групп в секундах. * $p < 0,01$ по сравнению с соответствующим значением ЛП до фототромбоза (Критерий Вилкоксона).

нейропротекторный эффект комбинированной терапии.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о выраженном антиамнестическом, а также нейропротекторном эффектах комбинированной терапии, которые наиболее отчетливо выражены при введении комплекса МЕРО-Fc (50 мкг/кг) + ГК-2Н (1 мг/кг) по схеме.

Ряд работ свидетельствует об участии ФРН (NGF) в механизме повреждений при инсультах [19—20]. Показано, что острая ишемия головного мозга сопровождается увеличением экспрессии мРНК NGF, содержания нейротрофина в коре, что может быть связано с его защитной функцией от гибели нейронов [21—23]. Была установлена статистически значимая обратная зависимость между размерами сформированного к 5-м — 7-м сут. инфаркта мозга и уровнем NGF в 1-е сут. Эти факты подтверждают участие NGF в компенсаторных механизмах, противодействующих гибели нейронов. Клинические исследования свидетельствуют о том, что NGF эффективен в 1-е сут. после инсульта, т.к. объем инфаркта и выраженность неврологических нарушений зависят от содержания эндогенного NGF именно в этот период [24]. ЕРО и рецептор к нему экспрессируются в центральной и периферической нервной системе, принимая активное участие в эмбриональном развитии человека, а также в защите мозга взрослых от повреждений [25]. При периферическом введении рекомбинантный ЕРО оказывает выраженное протекторное действие на поврежденную церебральную

ткань через активацию антиапоптотических генов, запуская антиоксидантные и противовоспалительные механизмы в нейронах, глиальных и цереброваскулярных эндотелиальных клетках, стимулируя ангио- и нейрогенез [26—28]. Вместе с тем, в связи с малой способностью ЕРО проникать через гематоэнцефалический барьер эти свойства препарата выявляются только в дозах, в 20—100 раз превышающих терапевтические, что часто приводит к развитию нежелательных эффектов со стороны сердечно-сосудистой системы [26].

В наших предыдущих работах было показано, что мутантные формы эритропоэтина, лишенные эритропоэтической активности, как в контексте мономера, так и в контексте димера (МЕРО-TR, МЕРО-Fc), обладают нейропротекторными свойствами даже при уменьшении дозы введения на модели фокальной церебральной ишемии [17]. ГК-2Н также показал нейропротекторное и антиамнестическое действие на модели экспериментальной ишемии [18]. По мнению ряда авторов, одним из механизмов нейропротекторного действия эритропоэтина является активация генов нейротрофинов, а именно BDNF и NGF [29—30]. Помимо этого было показано, что наносомаляная форма рекомбинантного эритропоэтина значительно увеличивает уровень мРНК BDNF и NGF в фронтальной коре и гиппокампе крыс, что подтверждает эту гипотезу [28]. Установлено, что дипептидный миметик фактора роста нервов, обладая нейропротективной активностью, действует по NGF-подобному механизму [10].

Таблица 1

Сравнение антиамнестического действия ГК-2Н, МЕРО-Fc [15], МЕРО-TR [15], МЕРО-Fc+ГК-2Н, МЕРО-TR+ГК-2Н на модели фотохимического ишемического повреждения

Группы животных	МЕРО-TR (50 мкг/кг)	МЕРО-Fc (50 мкг/кг)	ГК-2 (1 мг/кг)	МЕРО-TR (50 мкг/кг) + ГК-2 (1 мг/кг)	МЕРО-Fc (50 мкг/кг) + ГК-2 (1 мг/кг)
ЛП ложнопериоперированных животных, с	300	300	300	300	300
ЛП контрольных животных с фототромбозом, с	72*	72*	92*	92*	92*
ЛП опытных животных с фототромбозом, с	201	200	245	288	300
Эффективность лечения, А(%)	56^	56^	73	94	100

Примечание. Эффективность рассчитывалась по формуле $A(\%) = 100 * (\text{ЛП (фототромбоз с веществом)} - \text{ЛП (фототромбоз)}) / \text{ЛП (ложнопериоперированные)} - \text{ЛП (фототромбоз)}$. * — $p < 0,05$ — статистически значимое отличие ЛП контрольной группы с фототромбозом без лечения от ложнопериоперированных животных; ^ — $p < 0,05$ — статистически значимое отличие от групп, получавших комбинации МЕРО-TR (50 мкг/кг) + ГК-2 (1 мг/кг) и МЕРО-Fc (50 мкг/кг) + ГК-2 (1 мг/кг).

Таблица 2

MPT исследование суммарного объема очага ишемического повреждения по экспериментальным группам

Группы животных	0.9% раствор NaCl, 0,5 мл	ГК-2Н (1 мг/кг)	МЕРО-Fc (50 мкг/кг) + ГК-2Н (1 мг/кг)	МЕРО-TR (50 мкг/кг) + ГК-2 (1 мг/кг)
Суммарный объем (мм ³) повреждения мозга на крысу при интраназальном введении	29,1	21,7*	20,6*	21,5*

Учитывая полученные нами данные по снижению объема повреждения при комбинированной терапии, сопоставимые с результатами при монотерапии каждым из препаратов, можно предположить, что мутантные производные эритропоэтина и дипептидный миметик человеческого фактора роста нервов действуют односторонне, возможно, активируя одни и те же рецепторы. Выраженный антиамнестический эффект, по-видимому, обусловлен стабилизацией баланса между ингибирующей и активирующей нейрональной активностью в структурах, ответственных за память [31].

Заключение

Результаты данного исследования показали нейропротекторный эффект комбинированной терапии и усиление антиамнестического эффекта при сочетанном применении мутантных производных эритропоэтина — МЕРО-TR и МЕРО-Fc и дипептидного миметика человеческого фактора роста нервов ГК-2H. Можно предположить, что комбинированная терапия в период формирования очага ишемического поражения (первые 4 ч), а также в течении 4-х постоперационных сут. интенсивно противодействует гибели нейронов.

References

1. WHO Newsletter. January 2017. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru/> (accessed 25 October 2017).
2. Starodubtseva O. S., Begichev S. V. Analysis of the incidence of stroke with the use of information technology. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2012; 8(2): 424-7. (in Russian)
3. Vereshchagin N.V. Varakin Y.Y. Stroke registers in Russia: results and methodological basis of the problem. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova* (prilozhenie «Insul't»). 2001; 1: 34-40. (in Russian)
4. Suslina Z.A., Piradov M.A. *Stroke: diagnosis, treatment, prevention. [Insul't: diagnostika, lechenie, profilaktika]*. Moscow; Medpress-inform; 2008. (in Russian)
5. Piradov M.A., Tanashyan M.M., Domashenko M.A., Sergeev D.V., Maksimova M.Y. Neuroprotection in cerebrovascular diseases: the search for life on Mars or perspective of the direction of the treatment? Part 1. Acute disorders of cerebral circulation. *Annals of neurology*. 2015; 9 (1): 41-50.
6. Maslov L.N., Khaliulin I.G., Podoksenov Yu.K. Neuroprotective and cardioprotective effects of hypothermic preconditioning. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2012; 1: 67-72. (in Russian)
7. Tsygan N.V., Trashkov A.P. Brain functional state and cytoprotective potential in model of acute cerebral hypoxia (experimental research). *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2013; 4: 10-6. (in Russian)
8. Kalinina T.I., Cheremnykh A.M., Yurin V.L., Romanov G.A., Shakova F.M. *Neuroprotective effect of carbamoylirovaniem erythropoietin and its derivatives. VIII Moscow international Congress «Biotechnology: state and prospects of development». 17-20 March 2015, Moscow. The book of abstracts. [Neuroprotektivnyy ehffekt karbamilirovannogo ehritropoetina*

i ego proizvodnykh. VIII Moskovskiy mezhdunarodnyy kongress «Biotechnologiya: sostoyanie i perspektivy razvitiya»]. 17-20 marta 2015, Moscow. Sbornik tezisev. 114-6. (in Russian)

9. Mannie L. Rocco, L.M., Bianchi P., Soligo M., S.S.P., Aloe L. nerve growth factor: basic studies and possible therapeutic applications growth factor. 2013; 31 (4): 115-22.
10. Allen S.J., Dawbarn, Allen D. the Clinical significance of neurotrophins and their receptors. *Wedge. Science*. 2006; 110 (2): 175-91.
11. Gudasheva T.A., Antipova T.A. Seredenin B.S. et al. New low molecular weight mimetics of the nerve growth factor. *Reports of the Academy of Sciences*. 2010; 434 (4): 549-52. (in Russian)
12. Gudasheva, T.A., Tarasiuk A.V., Pomogaibo S.V., Logvinov J.O., Povarnina P.Y., Antipova T.A. Seredenin S.B. Design and synthesis of dipeptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2012; 38 (3): 280-90. (in Russian)
13. Paxinos G., Watson S. anatomy Atlas of the rat brain. In: the Rat brain in stereotaxic coordinates. 3rd San Diego, CA. Academic Press; 1997.
14. Watson, D.B., and W.D. Dietrich, R. Busto et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann. Assessment*. 1985; 17 (5): 497-504.
15. Buresh Y., Bureshova O.J., Houston A.P. *Techniques and basic experiments on the brain and behavior. [Metodiki i osnovnye eksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya]*. Moscow: Higher School; 1991. (in Russian)
16. Silachev D.N., Uchevatkin A.A., Pirogov Y.A., Zorov D.B., Isaev N.K. Comparison of MRI detection of brain damage as the research methods of experimental focal ischemia. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2009; 147 (2): 232-7. (In Russian)
17. Shakova F.M., Kalinina T.I., Gulyaev M.V., Cheremnykh A.M., Jurin V.L., Romanova G.A. Neuroprotective and anti-amnestic effects of mutant erythropoietin molecules on the photochemical model of ischaemic damage in prefrontal cortex of rat brain. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2016; 4: 34-8. (in Russian)
18. Seredinin S.B., Gudasheva T.A., Romanova G.A. Neuroprotective and posed anti-amnesic action dipeptides of human mimetic of nerve growth factor GK-2H in experimental ischemic infarction of the cerebral cortex of rats. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2010; 150 (10): 406-9. (in Russian)
19. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Review. Science*. 1987; 237 (4819): 1154-62.
20. Lee T.H., Kato H., Chen S.T., Kogure K., Itoyama Y. Expression of nerve growth factor and trkA after transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 1998; 29: 1687-96.
21. Guegan C., Ceballos-Picot I., Nicole A., Kato H., Onteniente B., Sola B. Recruitment of several neuroprotective pathways after permanent focal ischemia in mice. *Exp Neuro*. 1998; 154: 371-80.
22. Guegan C., Onteniente B., Makiura Y., Merad-Boudia M., Ceballos-Picot I., Sola B. Reduction of cortical infarction and impairment of apoptosis in NGF-transgenic mice subjected to permanent focal ischemia. *Mol. Brain Res*. 1998; 55: 133-40.
23. Lindvall O., Ernfors P., Bengzon J., Kokaia Z., Smith M.L., Siesjo B.K. Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc. Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 648-52.

24. Gusev E.I., Skvortsova V.I. *Cerebral Ischemia. [Ishemiya golovnogo mozga]*. Moscow; Meditsina; 2001. (in Russian)
25. Ehrenreich H, Weissenborn K, Prange H, Schneider D, Weimar C, Wartenberg K. et al. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke. *Stroke*. 2009; 40 (12): 647-56.
26. Belayev L., Khoutorova L., Zhao W., Vigdorichik A., Belayev A., Busto R. et al. Neuroprotective effect of darbepoetin alfa, a novel recombinant erythropoietic protein, in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 2005; 36 (5): 1071-6.
27. Morishita E., Masuda S., Nagao M., et al. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*. 1997; 76 (1): 105-16.
28. Solev I.N., Balabanian V.Y., Volchek I.A., Elizarova O.S., Litvinova S.A., Garibova T.L. Studying the involvement of BDNF and NGF in the mechanism of neuroprotective effect of nanoform of human recombinant erythropoietin. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2013; 155 (2): 210-3.
29. Fumagalli F., Madaschi L., Brenna P., Caino L., Marfia G., Di Giulio A. et al. Single exposure to erythropoietin modulates Nerve Growth Factor expression in the spinal cord following traumatic injury: comparison with methylprednisolone. *Eur J Pharmacol*. 2008; 578(1): 19-27.
30. Villa P., van Beek J., Larsen A.K., Gerwien J., Christensen S., Cerami A. et al. Reduced functional deficits, neuroinflammation and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007; 27: 552-63.
31. Chen H.S., Lipton S.A. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem*. 2006; 97: 1611-26.

Сведения об авторах:

Шакова Фатимат Мухамедовна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: shakova.fatima@yandex.ru (Shakhova F.M.)

Романова Галина Александровна, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: romanovaga@mail.ru (Romanova G.A.)

Калинина Татьяна Игоревна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. иммунологии (Kalinina T.Y.)

Гуляев Михаил Викторович, канд. физ.-матем. наук, ст. науч. сотр. факультета фундаментальной медицины, e-mail: tatyana.i.kalinina@googlemail.com, mihon-epsilon@yandex.ru (Gulyaev M.V.)

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616.12-008.331.1: 616-005

Кузник Б.И.^{1,2}, Давыдов С.О.^{1,2}, Степанов А.В.^{1,2}, Смоляков Ю.Н.¹, Гусева Е.С.^{1,2}

Значение «белка молодости» — GDF11 и «белков старости» — GDF15, CCL11, JAM-A в регуляции кровяного давления у здоровых и страдающих гипертонической болезнью женщин

¹ ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», 672000, г. Чита, Россия, ул. Горького, д. 39а

² Инновационная клиника «Академия здоровья», 672038, г. Чита, Россия, ул. Коханского, д. 13

Цель исследования — изучение взаимосвязи содержания белков GDF11, GDF15, CCL11, JAM-A и кровяного давления у здоровых женщин и женщин, страдающих гипертонической болезнью. **Методика.** В исследовании приняло участие 118 женщин. Содержание белков GDF11, GDF15, JAM-A и CCL11 определялось методом иммуноферментного анализа (ИФА). Вычислялись коэффициенты, характеризующие отношение «белка молодости» к «белкам старости» GDF11/GDF15, GDF11/CCL11 и GDF11/JAM-A. Величину систолического (SBP) и диастолического давления (DBP) определяли методом Короткова. **Результаты.** У женщин, страдающих гипертонической болезнью, значительно снижено содержание «белка молодости» GDF11 и повышена концентрация «белков старости» — GDF15, CCL-11 и адгезивной молекулы JAM-A. Установлены положительные и отрицательные корреляции между отдельными исследуемыми компонентами и уровнем кровяного давления. Показано, что чем выше показатель отношения «белка молодости» GDF11 к «белкам старости» GDF15, CCL-11, JAM-A, тем ниже уровень систолического, диастолического и среднего кровяного давления. **Заключение.** На основании полученных данных сделано заключение, что соотношения уровней «белка молодости» GDF11 и «белков старости» — GDF15, CCL11 и JAM-A играет в регуляции уровня кровяного давления существенно более важную роль, чем каждая из этих молекул в отдельности. Систематическое использование на протяжении 2—3 лет курсов кинезитерапии приводит к восстановлению нормального соотношения «белков молодости» и «белков старости», что сопровождается нормализацией кровяного давления.

Ключевые слова: GDF11, GDF15, CCL-11, JAM-A; гипертоническая болезнь; систолическое; диастолическое и среднее кровяное давление.

Для цитирования: Кузник Б.И., Давыдов С.О., Степанов А.В., Смоляков Ю.Н., Гусева Е.С. Значение «белка молодости» — GDF11 и «белков старости» — GDF15, CCL11, JAM-A в регуляции кровяного давления у здоровых и страдающих гипертонической болезнью женщин. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 46—52.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.46-52

Для корреспонденции: Кузник Борис Ильич, доктор мед. наук, проф. каф. нормальной физиологии, Читинская государственная медицинская академия, e-mail: bi_kuznik@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 26.05.2017

Kuznik B.I.^{1,2}, Davydov S.O.^{1,2}, Stepanov A.V.^{1,2}, Smolyakov Y.N.¹, Guseva E.S.^{1,2}

Significance of the «youth protein», GDF11, and «aging proteins», CCL11, GDF15, and JAM-A, for regulation of blood pressure in healthy and hypertensive women

¹ Chita State Medical Academy, Gorkogo Str. 39a, Chita 672000, Russia

² Innovative Clinic, Health Academy, Kokhanskogo Str. 13, Chita 672038, Russia

The aim of this work was to study the relationship between contents of GDF11, GDF15, CCL11, and JAM-A proteins and blood pressure in healthy women and women with essential hypertension. **Methods.** The study involved 118 women. Contents of GDF11, GDF15, JAM-A, and CCL11 were measured using the enzyme immunoassay (ELISA). Ratios of the «youth protein» to «aging proteins» (GDF11/GDF15, GDF11/CCL11, and GDF11/JAM-A) were computed. Systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure was measured using the Korotkov method. **Results.** In hypertensive women, the content of the «youth protein», GDF11, was significantly reduced, and concentrations of «aging proteins»,

GDF15, CCL-11, and the adhesion molecule JAM-A, were increased. Some «youth and aging proteins» were positively or negatively correlated with blood pressure. The greater was the ratio of the «youth protein», GDF11, to «aging proteins», GDF15, CCL-11, and JAM-A, the lower was systolic, diastolic, and mean blood pressure. Therefore, the relationship between the ratio of the «youth protein», GDF11, to «aging proteins», GDF15, CCL11, and JAM-A, plays a substantially greater role in regulation of blood pressure than each of these molecules alone. **Conclusion.** Systematic use of kinesiotherapeutic courses for 2-3 years restores a normal «youth to aging protein» ratio and improves blood pressure.

Keywords: GDF11, GDF15, CCL-11, JAM-A; essential hypertension; systolic blood pressure; diastolic blood pressure; mean blood pressure.

For citation: Kuznik B.I., Davydov S.O., Stepanov A.V., Smolyakov Y.N., Guseva E.S. Significance of the « youth protein» — GDF11 and «aging proteins» — CCL11, GDF15, JAM-A in regulation of blood pressure in healthy and hypertensive women. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 46—52. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.46-52

For correspondence: Kuznik Boris Ilich, Doctor of Medical Sciences, professor of department of normal physiology, Federal State Budgetary Educational Institution for Higher Education «Chita State Medical academy»; 39a Gorky str., Chita 672000, Russian Federation, e-mail: bi_kuznik@mail.ru.

Information about authors:

Kuznik B.I., <https://orcid.org/0000-0002-2502-9411>.

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

Funding. The study had no sponsorship.

Received 26.05.2017

Введение

В сентябре 2011 г. в журнале «Nature» появилась сенсационная статья, выполненная большим коллективом сотрудников Школы медицины Стэнфордского университета (Stanford University School of Medicine) под руководством профессора Tony Wyss-Coray [1]. В работе сообщалось, что в крови старых мышей находятся соединения, вызывающие в мозге молодых животных изменения, свойственные мозгу старых животных. Эти вещества индуцируют апоптоз нейронов головного мозга.

Оказалось, что «фактором старости» является хемокин CCL11 (эотаксин). Под воздействием CCL11 у молодых животных в зубчатой извилине снижалась численность нейронов. Проведя исследования на людях в возрасте от 20 до 90 лет, авторы обнаружили, что по мере старения концентрация хемокина CCL11 в крови и спинномозговой жидкости повышается [1—3].

А вскоре после открытия «белка старости» — CCL11, появились данные [4], что в крови молодых животных содержится «белок молодости», являющийся дифференцировочным фактором роста-11 (growth differentiation factor-11, GDF11), относящийся к суперсемейству трансформирующего фактора роста β (transforming growth factor- β — TGF- β). С возрастом содержание GDF11 уменьшается. Введение старым мышам крови молодых восстанавливало концентрацию GDF11 и при этом полностью устранялись признаки гипертрофии сердца. Аналогичные результаты получены при интерперитонеальных инъекциях

старым мышам рекомбинантного белка GDF11. Olsson и соавт. [5] определяли концентрацию GDF11 в плазме 928 пациентов с стабильной ишемической болезнью сердца. Наблюдения продолжались на протяжении 8—9 лет. За этот период у 450 больных (48,5%) развились инфаркты миокарда и инсульты, в том числе с летальным исходом. При этом чем выше был уровень GDF11 в крови, тем более благоприятным оказался прогноз заболевания.

Противоположные действия присущи другому фактору суперсемейства TGF- β — дифференцировочному фактору роста 15 (GDF15). В частности, показано [6], что риск возникновения сердечно-сосудистых катастроф напрямую зависит от концентрации GDF15 в плазме крови. Более того, при внезапном увеличении содержания GDF15 было рекомендовано принимать срочные меры для предотвращения серьезных нарушений сердечной деятельности. В дальнейшем было установлено, что чем выше концентрация GDF15 в крови, тем хуже прогноз заболевания, независимо от причин его вызвавших [7—9].

За последние годы особое значение в патогенезе гипертонической болезни придается адгезивной молекуле JAM-A (Junctional adhesion molecules A/1). Так, показано [10], что в плазме пациентов с гипертонией уровень sJAM-A (секреторная JAM-A) был значительно выше, чем у субъектов с нормальным кровяным давлением. Более того, выявлена тесная прямая корреляция между содержанием sJAM-A и уровнем систолического и диастолического давления.

Несмотря на приведенные данные, роль указанных белков в патогенезе заболеваний сердечнососудистой системы, в том числе эссенциальной гипертензии, пока еще не ясна. Более того, исследование всех перечисленных «белков молодости и старости» при тех или иных поражениях сердца и сосудов проводилось изолировано друг от друга. В доступной литературе мы не нашли ни одной работы, в которых бы «белки молодости и старости» при патологии сердечно-сосудистой системы изучались одновременно.

Цель исследования — проследить существуют ли взаимосвязи между содержанием «белка молодости» — GDF11 и «белков старости» — GDF15, CCL11, JAM-A с уровнем кровяного давления у относительно здоровых женщин пожилого возраста и больных гипертонической болезнью. Особое значение мы придавали соотношению «белка молодости» (GDF11) и «белков старости» (GDF15, CCL11, JAM-A).

Методика

Клиническая характеристика больных и методы исследования. В исследовании приняли участие 118 женщин. Все проводимые исследования соответствовали этическим стандартам, разработанным на основе Хельсинкской декларации всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2008 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266. Всеми участниками подписано добровольное информированное согласие.

Контрольную группу составили 30 относительно здоровых женщин в возрасте $55,2 \pm 2,9$ года и ин-

дексом массы тела (ИМТ) $24,4 \pm 2,3$. Больные гипертонической болезнью были разделены на 3 группы. В 1-ю группу (ГБ-1) вошли 16 женщин в возрасте $55,2 \pm 3,6$ года и ИМТ $27,3 \pm 2,8$ года, у которых гипертоническая болезнь была выявлена впервые, в связи с чем они не принимали гипотензивной терапии. 2-я группа (ГБ-2) состояла из 37 женщин, страдающих артериальной гипертензией II стадии и имеющих относительно высокий дополнительный риск развития сердечно-сосудистых осложнений. Все пациенты получали гипотензивную терапию. Средний возраст обследуемых этой группы составил $57,8 \pm 4,3$ года, а ИМТ — $28,6 \pm 4,4$ года. В 3-ю группу (ГБ-3) вошло 35 женщин (возраст $56,7 \pm 4,1$ года; ИМТ — $28,2 \pm 4,3$), которые помимо регулярной гипотензивной терапии проходили на протяжении 2—3 лет по 3—4 полуторамесечных курса кинезитерапии. Основной диагноз был верифицирован на основании признаков поражения органов — мишеней, таких, как гипертрофия левого желудочка сердца (по данным ЭХОКГ), локальное сужение артерий сетчатки, ультразвуковые признаки атеросклеротического поражения аорты, сонных и бедренных артерий. Все больные гипертонией получали лечение в виде монотерапии или комбинации двух препаратов.

Критерием исключения из исследования являлось наличие ассоциированных с гипертонической болезнью клинических состояний: врожденных и приобретенных пороков сердца, кардиомиопатии, сахарного диабета, нарушений функции щитовидной железы, злокачественных новообразований, болезней крови, хронической обструктивной болезни легких с тяжелой дыхательной недостаточностью, хронической почечной и печеночной недостаточностью. Исключались также пациенты с воспалительными заболеваниями и ожирением при индексе массы тела более 40,0.

Таблица 1

Характеристика кровяного давления у здоровых и страдающих гипертонической болезнью женщин

Артериальное давление	Контроль, n = 30	ГБ-1 (без лечения), n = 16	ГБ-2 (медикаментозная терапия), n = 37	ГБ-3, (кинезитерапия), n = 35
Систолическое	$124,6 \pm 8,5$	$162,4 \pm 9,6$ $p1 < 0,0001$	$135,0 \pm 11,6$ $p1 = 0,0014$ $p2 < 0,0001$	$125,0 \pm 9,7$ $p1 = 0,866$ $p2 < 0,0001$ $p3 < 0,0001$
Диастолическое	$75,2 \pm 6,8$	$85,8 \pm 5,1$ $p1 < 0,0001$	$79,0 \pm 9,2$ $p1 = 0,212$ $p2 = 0,014$	$73,4 \pm 6,6$ $p1 = 0,199$ $p2 < 0,0001$ $p3 = 0,013$
Среднее	$91,7 \pm 6,7$	$111,4 \pm 4,4$ $p1 < 0,0001$	$97,7 \pm 9,5$ $p1 = 0,018$ $p2 < 0,0001$	$90,6 \pm 6,7$ $p1 = 0,271$ $p2 < 0,0001$ $p3 = 0,001$

Примечание. Сравнение групп по критерию Манна—Уитни. p1 — сравнение с группой контроль; p2 — сравнение с группой ГБ-1; p3 — сравнение с группой ГБ-2.

На момент исследования у 31 больной с гипертонической болезнью, получавшей гипотензивную терапию (ГБ-2)) был достигнут целевой уровень артериального давления (АД), у 6 пациенток — цифры АД были выше, что потребовало дополнительной коррекции доз получаемых препаратов. У женщин, регулярно занимающихся физическими упражнениями (ГБ-3) коррекция АД потребовалась у 1 больной. Показатели артериального давления у всех обследуемых женщин представлены в табл. 1.

У женщин контрольной группы и больных гипертонией методом иммуноферментного анализа (ИФА) определялось содержание «белка молодости» GDF11 и «белков старости» GDF15, JAM-A и CCL11 с применением реактивов фирмы USCN Cloud Clone Corp на аппарате «Chem Well» (США). Кроме того, вычислялись коэффициенты, характеризующие отношение «белка молодости к белкам старости» R1 — GDF11/GDF15, R2 — GDF11/CCL11 и R3 — GDF11/JAM-A.

Величину систолического (SBP) и диастолического (DBP) давления определяли методом Короткова. Среднее кровяное давление (MBP) вычислялось по формуле $MBP = (SBP + DBP) \times 2/3$.

Статистическая обработка выполнена с помощью языка R (<http://cran.r-project.org>) версии 3.4.0 [11]. Для описания характера распределения количественных признаков определялись средние величины (M) и стандартные отклонения (SD). Для сравнения количественных показателей использовали критерий Манна—Уитни. Для оценки взаимосвязи связи между изучаемыми показателями использован метод корреляции Пирсона. Для оценки влияния изучаемых

факторов на артериальное давление применялся метод пошаговой регрессии с включением всех изучаемых показателей. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ и вероятными при $p < 0,1$.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали (табл. 2), что у женщин, страдающих гипертонической болезнью, получавших и не получавших медикаментозную терапию, по сравнению со здоровыми значительно снижено содержание «белка молодости». В то же время, у женщин с ГБ, принимавших кинезитерапию, содержание «белка молодости» — GDF11 приближается к норме ($p < 0,088$).

У больных ГБ 1-й и 2-й групп значительно (более чем в 2,5 раза) возрастает концентрация белка «старости» GDF15, получившего грозное наименование «домена смерти». У больных, принимавших кинезитерапию, показатели приближались к таковым у здоровых женщин.

Мы решили проследить, существуют ли взаимосвязи между исследуемыми белками и уровнем кровяного давления у здоровых женщин (рис. 1).

Оказалось, что в контрольной группе (здоровые) не выявлено взаимосвязи между уровнем «белка молодости» GDF11 и исследуемыми величинами кровяного давления. Вместе с тем, обнаружены прямые взаимосвязи средней силы между содержанием белка — GDF15, а также адгезивной тромбоцитарной молекулы JAM-A и величинами диастолического и среднего кровяного давления. Что касается «белка старости» CCL11, то такие взаимосвязи для систоли-

Таблица 2

Содержание «белков молодости и старости» у здоровых и больных ГБ женщин в зависимости от применяемой терапии

Белки	Контроль, n = 29	ГБ-1 (без лечения), n = 16	ГБ-2 (медикаментозная терапия), n = 37	ГБ-3 (кинезитерапия), n = 35
GDF11 (pg/ml)	31,3 ± 8,6	9,2 ± 3,4 p1 = 0,003	9,3 ± 1,1 p1 < 0,0001 p2 = 0,751	27,1 ± 6,6 p1 = 0,6 p2 = 0,074 p3 = 0,004
GDF15 (pg/ml)	6,1 ± 2,3	14,6 ± 5,9 p1 < 0,0001	13,9 ± 1,9 p1 < 0,0001 p2 = 0,649	9,9 ± 4,4 p1 = 0,306 p2 = 0,546 p3 = 0,132
CCL11 (pg/ml)	187,7 ± 36,8	223,5 ± 48,4 p1 = 0,073	260,9 ± 32,3 p1 = 0,026 p2 = 0,247	207,4 ± 24,1 p1 = 0,339 p2 = 0,209 p3 = 0,213
JAM-A (ng/ml)	2,8 ± 0,6	3,3 ± 0,8 p1 = 0,05	3,5 ± 0,4 p1 = 0,008 p2 = 0,694	2,7 ± 0,4 p1 = 0,823 p2 = 0,091 p3 = 0,026

Примечания те же, что и в табл. 1

ческого и среднего давления лишь вероятны ($\rho < 0,1$). Мы считаем, что большинство обнаруженных взаимосвязей вполне оправдано — чем выше уровень «белков старости», тем выше АД. Исключением из этого правила является выявленная нами отрицательная взаимосвязь между концентрацией белка GDF15

и величиной систолического давления. С большой осторожностью можно предположить, что эта реакция носит приспособительный характер и направлена на нормализацию кровяного давления.

Иные данные обнаружены у больных гипертонией. Среди больных женщин отрицательные корреляционные отношения выявлены лишь в группе, получавших традиционную терапию (ГБ-2). У них выявлена отрицательная связь средней силы между содержанием белка GDF15 и уровнем систолического давления ($r = -0,51, \rho = 0,006$), а также прямая связь между JAM-A и диастолическим кровяным давлением ($r = 0,45, \rho = 0,017$), что частично подтверждает данные литературы [10]. Можно думать, что эти белки способны с помощью пока неизвестного механизма у здоровых людей в большей степени воздействовать на тонус сосудов и в меньшей влиять на деятельность сердца.

Было решено выяснить, существуют ли корреляционные связи между уровнями изучаемых белков в общей группе обследуемых (рис. 2).

К нашему удивлению, в общей группе обследуемых выявлены отрицательные взаимосвязи между уровнем «белка молодости» GDF11, и положительные между GDF15 и всеми видами определяемого кровяного давления (для диастолического давления они лишь вероятны). Следовательно, чем больше белка «молодости» GDF11, тем ниже кровяное давление. И наоборот, чем больше белка «старости» GDF15, тем давление выше. Мы считаем, что подобные реакции вполне целесообразны. Вместе с тем, мы не обнаружили взаимосвязи между молекулами «старости» JAM-A и CCL11 с одной стороны и уровнем кровяного давления — с другой.

Нами установлено (табл. 3), что у больных, по сравнению со здоровыми, резко уменьшается отношение «белка молодости» GDF11 к «белкам старости» GDF15 (R1), CCL11 (R2) и JAM-A (R3). Следует заметить, что у больных ГБ, систематически принимавших курсы кинезитерапии (ГБ-3), это снижение не столь значительно, а отношение R1 и R2 статистически значимо не отличается от соответствующего показателя у здоровых женщин.

В следующей серии исследований предпринята попытка установить, имеется ли взаимосвязь между коэффициентами R1, R2, R3 и уровнем кровяного давления у здоровых женщин (рис. 3).

Как видно из представленных данных, существуют довольно тесные отрицательные связи между коэффициентом R1 и всеми исследуемыми показателями кровяного давления. Мы считаем, что такая реакция чрезвычайно целесообразна и направлена на нормализацию кровяного давления. Вместе с тем, не выявлено взаимосвязи между коэффициентом R2 и

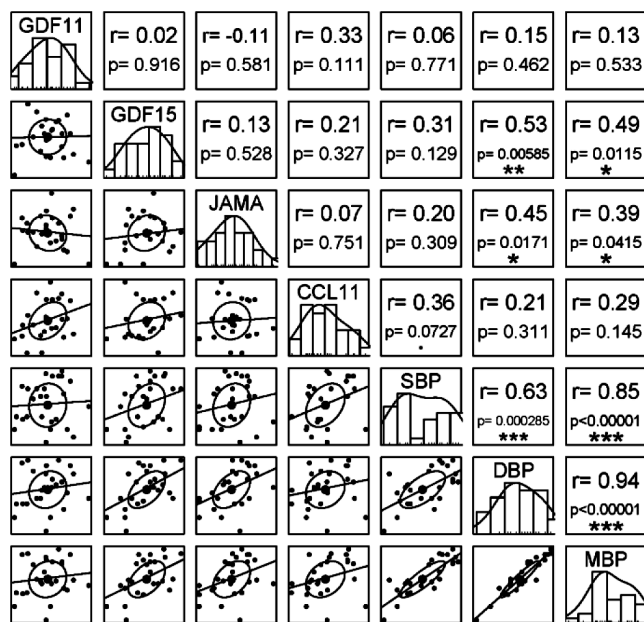


Рис. 1. Матрица корреляционных взаимосвязей между белками и уровнем кровяного давления у здоровых женщин. Значимость коэффициента корреляции r Пирсона: $p < 0,1$ — ‘; $p < 0,05$ — ‘*’, $p < 0,01$ — ‘**’, $p < 0,001$ — ‘***’.

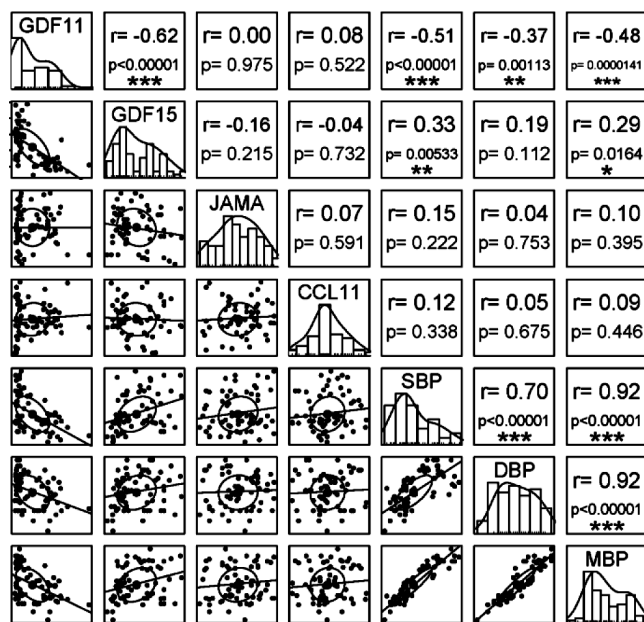


Рис. 2. Матрица корреляционных взаимосвязей между белками и уровнем кровяного давления у всех испытуемых. Условные обозначения те же, что и на рис. 1.

Таблица 3

Соотношение R1, R2, R3 у здоровых и больных ГБ женщин

Отношения белков	Контроль, N = 29	ГБ-1 (без лечения), N = 16	ГБ-2 (медикаментозная терапия), N = 37	ГБ-3, (кинезитерапия), N = 35
GDF11/GDF15 (R1)	6,022 ± 2,469	0,755 ± 0,450 p1 < 0,0001	0,818 ± 0,995 p1 < 0,0001 p2 = 0,344	4,804 ± 5,519 p1 = 0,013 p2 = 0,0002 p3 < 0,0001
GDF11/CCL11 (R2)	0,176 ± 0,059	0,043 ± 0,020 p1 < 0,0001	0,083 ± 0,069 p1 < 0,0001 p2 = 0,049	0,230 ± 0,201 p1 = 0,453 p2 < 0,0001 p3 = 0,0001
GDF11/JAM-A (R3)	13,851 ± 10,88	3,108 ± 1,739 p1 < 0,0001	5,232 ± 4,428 p1 < 0,0001 p2 = 0,753	19,206 ± 26,51 p1 = 0,528 p2 < 0,0001 p3 < 0,0001

Примечания те же, что и в табл. 1.

уровнем кровяного давления. Что касается взаимосвязей коэффициента R3 с уровнем диастолического и среднего давления, то они носят отрицательный вероятностный характер, т.е. чем больше величины рассчитанного коэффициента (преобладание белка молодости над белками старости), тем ниже диастолическое и пульсовое давление.

В отдельных исследуемых группах больных нами не обнаружено значимых существенных связей между показателем, характеризующим отношение белка молодости к белкам старости и показателями кровяного давления. Однако в общей группе больных и здоровых (рис. 4) они оказались весьма существенными и

носили выраженный отрицательный характер с высокими уровнями значимости. Следовательно, чем выше показатель отношения белка молодости GDF11 к белкам старости GDF15, CCL11 и JAM-A, тем ниже уровень систолического, диастолического и пульсового кровяного давления.

Представленные данные свидетельствуют о том, что соотношение белка молодости GDF11 и белков старости — GDF15, CCL11 и JAM-A играет в регуляции уровня кровяного давления значительно большую роль, чем каждая из этих молекул в отдельности. Не исключено, что воздействуя с терапевтической целью непосредственно на содержание «белков

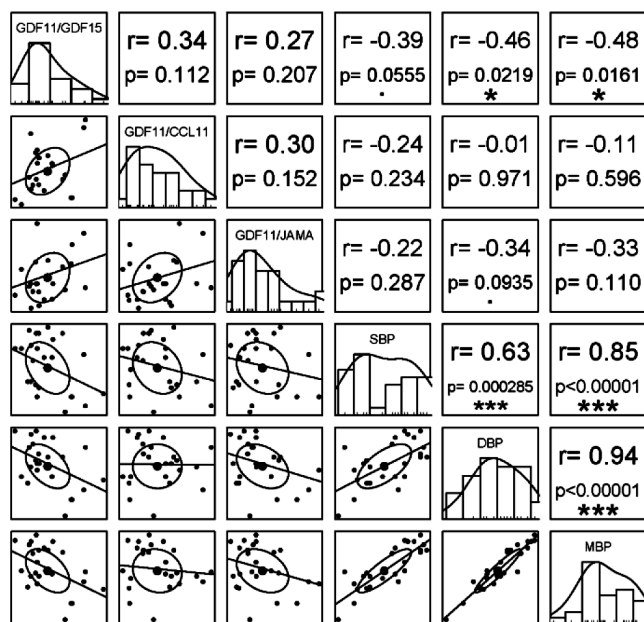


Рис. 3. Матрица корреляционных взаимосвязей между соотношениями белков и уровнем кровяного давления у здоровых женщин. Условные обозначения те же, что и на рис. 1.

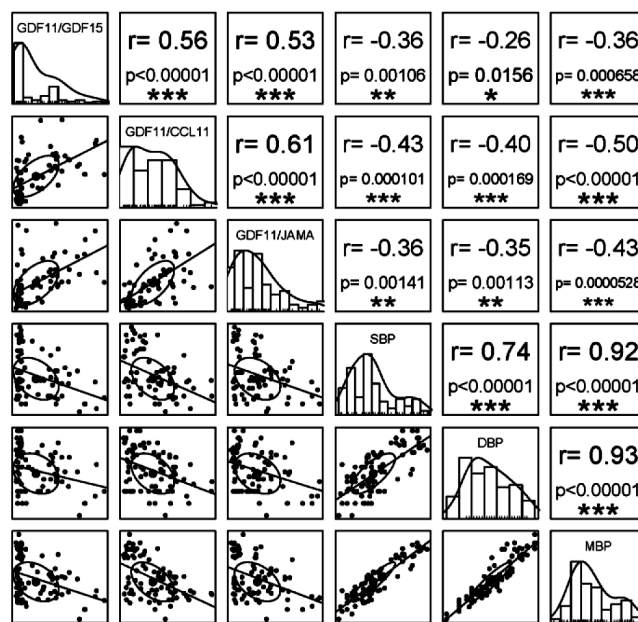


Рис. 4. Матрица корреляционных взаимосвязей между соотношениями белков и уровнем кровяного давления у всех испытуемых. Условные обозначения те же, что и на рис. 1.

молодости и старости» при гипертонической болезни можно добиться стойкой стабилизации кровяного давления. Одним из таких путей является систематическое проведение на протяжении многих лет курсов кинезитерапии, приводящих к восстановлению нормального соотношения «белков молодости и старости» с одной стороны и нормализацией кровяного давления — с другой, благодаря чему у таких больных стала возможной отмена гипотензивной терапии.

Список литературы

1. Villeda S.A., Luo J., Mosher K.I. et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*. 2011; 477: 90-4.
2. Bitto A., Kaeberlein M. Rejuvenation: It's in our blood. *Cell metabolism*. 2014; 20(1): 2-4.
3. Castellano J.M., Kirby E.D., Wyss-Coray T. Blood-Borne Revitalization of the Aged Brain. *JAMA Neurol*. 2015; 72(10): 1191-4.
4. Loffredo F.S., Steinhauser M.L., et al. Growth Differentiation Factor 11 Is a Circulating Factor that Reverses Age-Related Cardiac Hypertrophy. *Cell*. 2013; 153(4): 828-39.
5. Olson K.A., Beatty A.L., Heidecker B. et al. Association of growth differentiation factor 11/8, putative anti-ageing factor, with cardiovascular outcomes and overall mortality in

humans: analysis of the Heart and Soul and HUNT3 cohorts. *Eur Heart J*. 2015; 36(48): 3426-34.

6. Brown D.A., Breit S.N., Buring J. et al. Concentration in plasma of macrophage inhibitory cytokine-1 and risk of cardiovascular events in women: A nested case-control study. *Lancet*. 2002; 359: 2159-63.

7. Wiklund F.E., Bennet A.M., Magnusson P.K., et al. Macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1/GDF15): a new marker of all-cause mortality. *Aging Cell*. 2010; 9(6): 1057-64.

8. Norozi K., Buchhorn R., Yasin A. et al. Growth differentiation factor 15: An additional diagnostic tool for the risk stratification of developing heart failure in patients with operated congenital heart defects. *Am Heart J*. 2011; 162(1): 131-5.

9. Dominguez-Rodriguez A., Abreu-Gonzalez P., Hernandez-Baldomero I.F. et al. Change in growth differentiation factor 15, but not C-reactive protein, independently predicts major cardiac events in patients with non-ST elevation acute coronary syndrome. *Mediators of inflammation*. 2014. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2014/929536> (Accessed 23 may 2017).

10. Ong K.L., Leung R.Y., Babinska A., Salifu M.O., Ehrlich Y.H., Kornecki E. et al. Elevated plasma level of soluble F11 receptor/junctional adhesion molecule-A (F11R/JAM-A) in hypertension *Am J Hypertens*. 2009; 22(5): 500-5

11. R Core Team. R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2017; Available at: <https://www.R-project.org> (Accessed 23 may 2017).

Сведения об авторах:

Кузник Борис Ильич, доктор мед. наук, проф., каф. нормальной физиологии, научный консультант инновационной клиники «Академия Здоровья», e-mail: bi_kuznik@mail.ru

Давыдов Сергей Олегович, доктор мед. наук, проф. каф. травматологии и ортопедии, науч. руководитель инновационной клиники «Академия Здоровья», e-mail: davydov-so@mail.ru

Степанов Александр Валентинович, доктор мед. наук, зав. каф. безопасности жизнедеятельности и медицины катастроф, науч. сотр. инновационной клиники «Академия здоровья», e-mail: avstep@rambler.ru

Смоляков Юрий Николаевич, канд. мед. наук, доцент, зав. каф. медицинской физики и информатики, e-mail: smolyakov@rambler.ru

Гусева Екатерина Сергеевна, канд. мед. наук, ассистент каф. поликлинической терапии, заместитель директора по клинико-экспертной и организационно-методической работе клиники «Академия здоровья», e-mail: guseva81@gmail.com

© Коллектив авторов, 2018
УДК 612.089.61+57.089.67+ 616-77

Клабуков И.Д.¹, Балясин М.В.¹, Люндуп А.В.¹, Крашенинников М.Е.¹, Титов А.С.^{1,2},
Мудряк Д.Л.¹, Шепелев А.Д.³, Тенчурин Т.Х.³, Чвалун С.Н.³, Дюжева Т.Г.¹

Ангиогенная витализация биосовместимого и биodeградируемого матрикса (экспериментальное исследование *in vivo*)

¹ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Институт регенеративной медицины, 119991, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, стр.2

² Городская клиническая больница № 67 ДЗМ, 123423, г. Москва, Россия, ул. Саляма Адила, д. 2/44

³ НИЦ «Курчатовский институт», 123182, г. Москва, Россия, пл. Академика Курчатова, д. 1

Цель исследования — оценка влияния на ангиогенез конструкций из волокнистого поликапролактона, модифицированного плазмидой с геном сосудистого фактора роста, при имплантации крысам. **Методика.** Эксперименты выполнены на 24 крысах-самках Вистар в возрасте 2 мес, массой 180—200 г. В работе исследовали плоские каркасы размером 1 см X 1 см, полученные методом эмульсионного электроспиннинга из раствора поликапролактона. Материал каркасов витализировали плазмидой VEGF-165 (геннотерапевтический препарат Неоваскулген), введенной внутрь двух типов волокнистых материалов в разных концентрациях: низкой — 0,005 мг/мл, и высокой — 0,05 мг/мл. Образец и контроль (материал без витализации) одновременно имплантировали подкожно в два сформированных симметричных кармана в межлопаточной зоне. Окружающие каркас ткани на 7-е, 16-е, 33-и, 46-е и 64-е сутки извлекали, проводили гистологическое исследование: изучали тканевую реакцию с морфометрической оценкой плотности распределения и диаметра сосудов в области имплантации, а также оценивали степень биodeградации волокнистого материала. **Результаты.** Признаков тканевой реакции отторжения при имплантации как контрольного, так и модифицированного материала не выявлено. Показано, что при экспозиции материала *in vivo* наряду с резорбцией материала происходят изменения количества и диаметра сосудов. Выявлен дозозависимый эффект стимуляции ангиогенеза при увеличении концентрации Неоваскулгена в образцах. Для витализированных материалов отмечено увеличение плотности распределения сосудов на 46% (высокая концентрация, 33-и сут) по сравнению с контролем. После прекращения воздействия препарата, плотность распределения сосудов приближалась к значениям в контроле. **Заключение.** Разработанная методика витализации полимерных каркасов с внесением раствора геннотерапевтического препарата Неоваскулген внутрь микроволокон обеспечивает пролонгированный и дозозависимый эффект на рост сосудов в зоне имплантации.

Ключевые слова: ангиогенез; биосовместимые материалы; васкуляризация; витализация; ген-активированный материал; Неоваскулген; поликапролактон; тканевая инженерия; электроспиннинг; функционализация биоматериала.

Для цитирования: Клабуков И.Д., Балясин М.В., Люндуп А.В., Крашенинников М.Е., Титов А.С., Мудряк Д.Л., Шепелев А.Д., Тенчурин Т.Х., Чвалун С.Н., Дюжева Т.Г. Ангиогенная витализация биосовместимого и биodeградируемого матрикса (экспериментальное исследование *in vivo*). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 53—60.
DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.53-60

Финансирование. Работа выполнена при поддержке соглашения о субсидии №14.604.21.0133 Минобрнауки РФ (уникальный идентификатор RFMEFI60414X0133).

Для корреспонденции: Клабуков Илья Дмитриевич, науч. сотр. отдела передовых клеточных технологий, e-mail: ilya.klabukov@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы благодарны сотрудникам лаборатории экспериментальной морфологии (зав. — д.м.н., проф. Шехтер А.Б.) Первого МГМУ им. И.М. Сеченова и лаборатории патологической анатомии (зав. — к.м.н. Калинин Д.В.) Института хирургии им. Вишневского за участие и помощь в проведении исследования.

Поступила 28.11.2017

Klabukov I.D.¹, Balyasin M.V.¹, Lyundup A.V.¹, Krashennnikov M.E.¹, Titov A.S.²,
Mudryak D.L.¹, Shepelev A.D.³, Tenchurin T.Kh.³, Chvalun S.N.³, Dyuzheva T.G.¹

Angiogenic vitalization of biocompatible and biodegradable scaffold (*in vivo* experimental study)

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Institute for Regenerative Medicine, Trubetskaya Str., 8-2, Moscow 119991, Russia

² Municipal Clinical Hospital #67, Salyama Adilya Str. 2/44, 123423 Moscow, Russia

³ National Research Center «Kurchatov Institute», Ploshchad Akademika Kurchatova 1, Moscow 123182, Russia

The aim of the study was to evaluate the effect on angiogenesis of a biocompatible, biodegradable material-derived scaffold implanted into rats and functionalized using a plasmid with a vascular growth factor gene. **Methods.** Experiments were performed on 24 female Wistar rats aged 2 months weighing 180—200 g. We investigated 1 cm x 1 cm flat scaffolds obtained by electrospinning from polycaprolactone functionalized scaffolds with a VEGF-165 plasmid (gene therapy drug, Neovasculgen) incorporated inside the fibers at two concentrations, low (0.005 mg/ml) and high (0.05 mg/ml). The sample and control were simultaneously implanted subcutaneously into two formed symmetrical pockets in the interblade zone. At 7, 16, 33, 46, and 64 days, the scaffolds were removed, and histological examination was performed; the tissue reaction was studied including morphometric evaluation of density and diameter of blood vessels in the implantation area, and the area of the image occupied by the material was measured. **Results.** Tissue rejection was absent after implantation of either control or modified material. When the material was exposed *in vivo*, besides resorption of the material, blood vessel number and diameter changed. As the Neovasculgen concentration in samples increased, a dose-dependent effect of angiogenesis stimulation became evident. Vascular density was increased by 46% (high concentration, 33 days) in functionalized matrices compared to the control. After cessation of the drug treatment, the vascular density approached the control values. **Conclusion.** The developed technique for functionalizing polymeric scaffolds by administration of a solution of the gene therapy drug, Neovasculgen, into microfibers provides a prolonged and dose-dependent effect on growth of blood vessels in the implantation zone.

Keywords: angiogenesis, biocompatible materials, biomaterial functionalization, electrospinning, gene-activated scaffold, Neovasculgen, polycaprolactone, tissue engineering, vascularization, vitalization.

For citation: Klabukov I.D., Balyasin M.V., Lyundup A.V., Krashennnikov M.E., Titov A.S., Mudryak D.L., Shepelev A.D., Tenchurin T.Kh., Chvalun S.N., Dyuzheva T.G. Angiogenic vitalization of biocompatible and biodegradable scaffold (*in vivo* experimental study). *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 53—60. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.53-60

For correspondence: Klabukov Ilya Dmitrievich, researcher of Advanced Cell Technologies Dept., Sechenov First Moscow State Medical University, e-mail: ilya.klabukov@gmail.com

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

Acknowledgments. The work was supported by Ministry of Education and Science of the Russian Federation. (grant No. 14.604.21.0133, ID RFMEFI60414X0133).

Information about authors:

Klabukov I.D., <https://orcid.org/0000-0002-2888-7999>

Balyasin M.V., <https://orcid.org/0000-0002-3097-344X>

Lyundup A.V., <https://orcid.org/0000-0002-0102-5491>

Krashennnikov M.E., <https://orcid.org/0000-0002-3574-4013>

Titov A.S., <https://orcid.org/0000-0001-6794-8240>

Mudryak D.L., <https://orcid.org/0000-0002-6570-3909>

Shepelev A.D., <https://orcid.org/0000-0003-1997-967X>

Tenchurin T.Kh., <https://orcid.org/0000-0003-1000-6003>

Chvalun S.N., <https://orcid.org/0000-0001-9405-4509>

Dyuzheva T.G., <https://orcid.org/0000-0003-0573-7573>

Received 28.11.2017

Введение

Недостаточная васкуляризация зоны имплантации искусственных материалов — одна из важнейших причин развития ишемии, фиброза, бактериального инфицирования и некроза тканей вокруг трансплантата [1]. С целью предотвращения нежелательных последствий и стимулирования нормального роста тканей применяется активация зоны имплантации биологически активными соединениями (БАС). Проблема целевой доставки таких молекул является одной из ключевых проблем современной прецензионной медицины, решением которой служит разработка специальных на принципах клеточной хемо- и механорецепции. Одним из вариантов пролонгации действия препаратов является биологическая активация трансплантата, изготовленного из нативных или искусственных материалов [3].

Ангиогенная витализация — модификация естественного или искусственного материала с целью стимулирования роста сосудов в зоне имплантации, предотвращения развития послеоперационных осложнений и обеспечения миграции клеток в соответствующие ниши, например, при имплантации ген-активированных материалов или витализированных тканеинженерных конструкций [4]. Ранее было показано, что использование белковых факторов роста (bFGF, EGF, VEGF, PDGF и др.) при местном введении, осаждении на поверхности материала или размещении в объеме биодеградируемого материала способствует росту сосудов в зоне имплантации [5]. При этом подчеркиваются преимущества пролонгированного высвобождения БАС из структуры полимера по сравнению с местным введением или абсорбцией на поверхности материала [6, 7].

В качестве материалов-носителей БАС используются гидрогели, поликапролактон (ПКЛ), полимолочная кислота [5], и другие полимеры и сополимеры. Выбор материала для модификации имеет значение из-за различий в биосовместимости и сроках биодеградации, что оказывает влияние на сроки и темпы выхода БАС из структуры материала при имплантации.

Использование белковых молекул имеет ряд недостатков, таких как видоспецифичность и иммуногенность [8], поэтому использование соединений на основе неиммуногенных молекул (например, нуклеиновых кислот) является перспективным направлением модификации биосовместимых имплантов. Например, генотерапевтический препарат на основе плазмиды VEGF165 используется для стимулирования терапевтического ангиогенеза при ишемии нижних конечностей.

Биологическая стимуляция роста сосудов, использованная в настоящей работе, основана на спонтанной трансфекции плазмид в клетки. В литературе обсуждаются возможные молекулярные механизмы проникновения в клетки плазмидных конструкций, несущих ген ангиогенного фактора VEGF [9]. Плазида с встроенным терапевтическим геном преодолевает плазматическую мембрану клетки посредством эндцитоза или гидропорации, и не вызывает иммунологической реакции. Ранее были известны способы активации поверхности материала плазмидой VEGF [10], но работ по внедрению плазмид в структуру материала с целью их пролонгированного высвобождения известно не было.

Цель исследования — оценка влияния на ангиогенез конструкций из волокнистого поликапролактона, витализированного плазмидой с геном сосудистого фактора роста, при имплантации крысам.

Методика

Биосовместимый материал. Конструкции размером 1 см × 1 см и толщиной 500 ± 15 мкм изготовлены из волокнистого поликапролактона (ПКЛ) в НИЦ «Курчатовский институт» методом эмульсионного электроформования. Диаметр полученных волокон составлял 2—3 мкм. Материалы из ПКЛ относят к биосовместимым [11] и биорезорбируемым [12, 13]. В процессе электроформования по разработанной нами методике в волокнистые материалы были внедрены образцы препарата «Неоваскулген» (НВГ) в двух концентрациях: низкой (НКп) — 0,005 мг/мл, и высокой (ВКп) — 0,05 мг/мл. Ранее по данной методике нами были получены конструкции из ПКЛ, содержащие белковый эпидермальный фактор роста [11]. Препарат НВГ представляет собой ДНК-плазмиду pl-VEGF165 (регистрационное удостоверение Росздравнадзора № ЛП-000671 от 28.09.2011). В качестве контроля использовалась имплантация конструкций без НВГ.

Животные. Опыты выполнены на 24 крысах-самках Вистар исходной массой 180—200 г в возрасте 2 мес. из питомника «Андреевка» НИЦ «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (пос. Светлые Горы, МО) и содержащихся в Центральном виварии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова при свободном доступе к пище и воде и естественной смене светового режима.

Этическая экспертиза. Содержание животных и манипуляции с ними проводили в соответствии с требованиями законодательства об этике проведения экспериментальных исследований на животных, одобренными Локальным этическим комитетом Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Все экспериментальные работы выполнены с соблюдением утвержденных Европейской конвенцией правил биоэтики о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях и Правилами лабораторной практики, утвержденными приказом МЗ РФ № 708 от 23.08.2010 г.

Под анестезией с помощью ветеринарных препаратов «Золетил 100» (Virbac, Франция) и «Рометар» (Bioveta, Чехия) в стерильных условиях производили рассечение кожи в межлопаточной области крыс с последующим внедрением и фиксацией каркасов в подкожную клетчатку, после чего операционную рану зашивали наглухо. В сроки на 7-е, 16-е, 33-и, 46-е и 64-е сут. животных декапитировали под хлороформным наркозом. Окружающие каркас ткани извлекали, фиксировали в 10%-м нейтральном растворе формалина, подвергали стандартной обработке для последующего морфологического исследования.

Морфологические исследования. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм изготавливали на микротоме Microm HM 355s (Thermo Fisher Scientific, США), окрашивали гематоксилином и эозином. Оцифрованные изображения срезов высокого разрешения получали при помощи сканирующей системы Pannoramic DESK (3DHitech Ltd., Венгрия).

Биосовместимость. Ранее нами было показано отсутствие цитотоксичности волокнистого ПКЛ без витализации *in vitro* [11]. Биосовместимость материала оценивали на окрашенных гематоксилин-эозином образцах: качественно оценивали количество иммунных клеток в области имплантации материала, токсичность определяли по количеству нейтрофилов. Деструкцию материала оценивали по изменению количества макрофагов и гигантских клеток инородных тел (ГКИТ) в образце.

Биодеградируемость. Поскольку волокнистый материал растворялся при пробоподготовке образцов,

то степень резорбции материала ($A_m/A_{общ}$) подсчитывали косвенно, как отношение площади материала (белые области) к общей площади поля зрения. Параметры определяли в области имплантации при увеличении $\times 10$ в программе Pannoramic Viewer.

Ангиогенез. Плотность распределения и долю крупных сосудов в области резорбции имплантированного материала подсчитывали вручную слепым методом совместно с сотрудниками лаборатории экспериментальной морфологии Первого МГМУ им. Сеченова. Плотность сосудов оценивали на микрофотографиях как количество сосудов на 1 мм^2 зоны наблюдения. Крупными считали сосуды диаметром более 15 мкм. Количество и размер сосудов подсчитывали в 5 полях зрения диаметром 600 мкм каждое в программе Pannoramic Viewer v.1.15.4.

Статистика. Статистическую обработку данных проводили методом вариационной статистики при помощи компьютерной программы GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., США). Выборки проверяли на нормальное распределение по критерию Шапиро—Уилка, после чего выявляли влияние исследуемого препарата на количество сосудов методом однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA) с апостериорным анализом Тьюки. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего (SEM).

Результаты и обсуждение

Биосовместимость материала. Морфологическое изучение гистологических препаратов экспериментального материала показало отсутствие на всех сроках признаков инфильтрации иммунными клетками, а именно наличия нейтрофилов, лимфоцитов и плазмоцитов. Отмечено присутствие в ткани гигантских многоядерных клеток инородных тел. Отсутствие воспалительной реакции и признаков отторжения материала свидетельствует о минимальной цитотоксичности материала в условиях *in vivo*.

Биодеградируемость материала. Отмечалось постепенное уменьшение видимого материала вследствие его фрагментации и резорбции в зонах сосудистого роста. Если на 7-е сут. материал составлял 40% видимой зоны, то на 64-е сут. его доля снизилась до 15% (рис. 1).

Ангиогенез (размеры и плотность распределения сосудов). Проведено исследование образцов (тканевый лоскут с частично деградировавшим имплантированным каркасом) на сроках 7-е, 16-е, 33-и, 46-е и 64-е сут. Гистологическая картина по срокам изменений в образцах представлена на рис. 2 и 3.

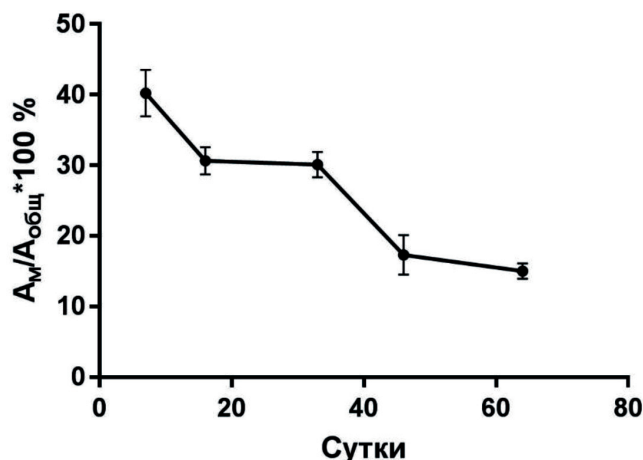


Рис. 1. Биодеградация волокнистого материала в зонах роста сосудов.

Материал на 7-е сут. наблюдения описывали только качественно (без подсчета числа сосудов) ввиду слаборазвитой в эти сроки ткани вокруг сохранных волокон имплантированной конструкции. Около 80% матрикса не фрагментировано, сосуды, в основном, находятся на периферии сохраненного матрикса (рис. 2).

На 16-е сут. 25% матрикса подверглось резорбции, среди формирующейся в зоне резорбции матрикса грануляционной ткани наблюдается сформированная сосудистая сеть (сосуды капиллярного типа). На 33-и сут. наряду с сосудами капиллярного типа появляются крупные сосуды. Грануляционная ткань вокруг волокон материала хорошо развита (рис. 3), на сроках 46—64 сут. она превращается в зрелую соединительную ткань.

В образцах на 46-е и 64-е сут. матрикс из ПКЛ практически полностью фрагментирован. Не выявлено различий в образцах по сравнению с контролем плотности распределения сосудов.

В таблице представлены данные о плотности распределения сосудов в контрольных образцах и образцах при имплантации матриксов с различной концентрацией НВГ.

На 16-е сут. отмечено увеличение плотности распределения сосудов в группах ВКп и НВп по сравнению с контролем (на 17%, $p < 0,05$), что объясняется выходом БАС из структуры полимера. Поскольку БАС находились в объеме полимера, то их выход носил отсроченный характер.

На 33-и сут. отмечено уменьшение общей плотности распределения сосудов в контрольной группе вследствие смены этапа васкулогенеза (капилляры диаметром менее 15 мкм) на нормальный ангиогенез, однако на этом фоне в группе с ВКп плотность распределения сосудов на 46% ($p < 0,001$) превысила значения в контроле, что может объясняться выходом НВГ из объема резорбирующего волокнистого поликапролактона.

Полученные результаты согласуются с работами других авторов, изучавших ангиогенную модификацию матриксов. Так, в работе по изучению влияния белкового фактора bFGF на локальный ангиогенез, отмечалось увеличение на 35% плотности распределения сосудов по сравнению с имплантацией контрольного коллагенового матрикса [14]. Использование преваскуляризированных трансплантов из альгината показало увеличение плотности сосудов более чем в 2 раза на 7-е сут. имплантации. При этом пик васкуляризации приходился на 10-й сут. [15].

Изучение показателей роста сосудов в контрольной группе выявило увеличение плотности распределения сосудов со временем (рис. 4, А), что полностью согласуется с данными других авторов об этапности сосудобразо-

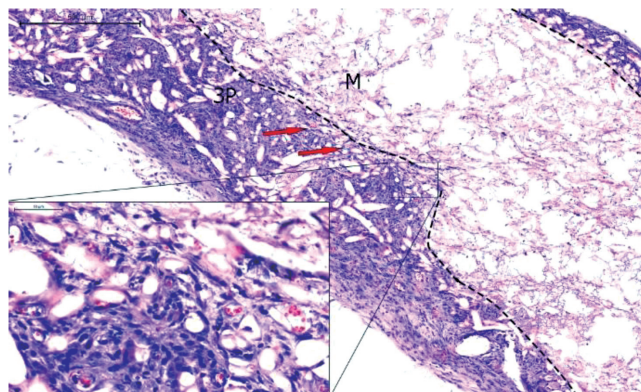


Рис. 2. Имплантированный каркас (НКп 7-е сут.): М — пунктирной линией отмечена зона нерезорбированного материала. ЗР — зона резорбции материала. Красными стрелками показаны сосуды. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. $\times 50$ —400.

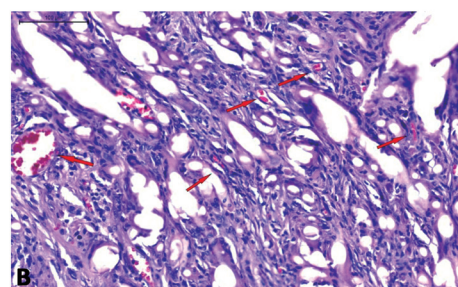
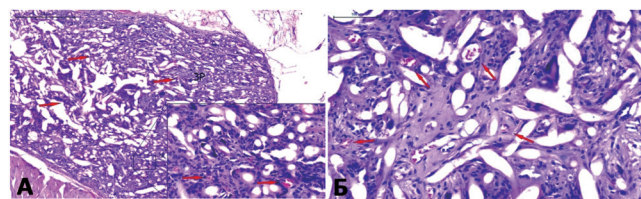


Рис. 3.

А. Имплантированный каркас (НКп, 33 сут.). ЗР — большая часть ткани представлена зоной резорбции материала. Красными стрелками показаны сосуды. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. $\times 50$ —400; Б. Имплантированный каркас (контроль, 33 сут.). Красными стрелками показаны сосуды. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. $\times 200$ В. Имплантированный ПКЛ-каркас (ВКп, 33 сут.). Красными стрелками показаны сосуды. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. $\times 200$.

вания *in vivo* [16]. В группе сравнения наблюдалась та же закономерность, при этом на 33-и сут. в группе с высокой концентрацией НВГ плотность распределения сосудов была статистически значимо выше, чем в контроле и образцах с низкой концентрацией НВГ.

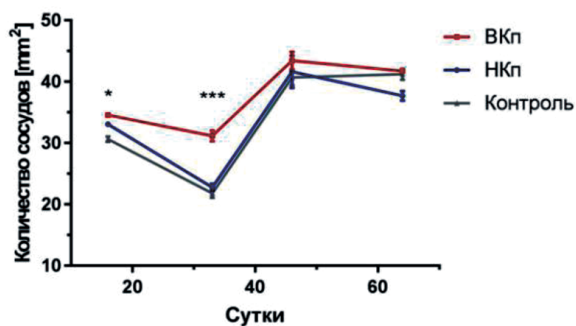
Доли крупных сосудов в контрольной группе и в группах сравнения были схожи, при этом на 33-и сут. наблюдались максимальные различия в группах высокой и низкой концентрации НВГ (рис. 4, Б). Известно, что новообразованные соматические капилляры (васкулогенез) имеют диаметр до 10—15 мкм, а дальнейшее их развитие — (ангиогенез) регулируется множеством цитокинов, ростовых

Таблица

Плотность распределения сосудов в группах сравнения (п/мм²)

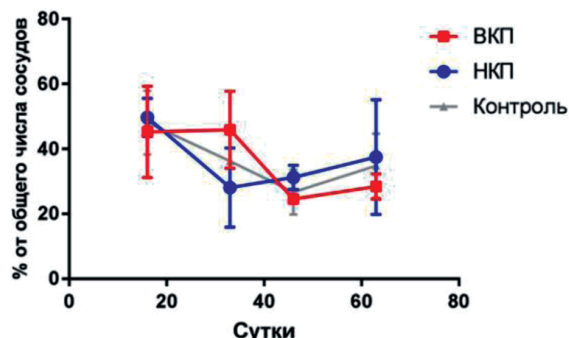
Группа сравнения	Среднее ± стандартная ошибка среднего (SEM)
16-е сутки	
Контроль	30,65 ± 2,49
Низкая концентрация НВГ	33,09 ± 1,07
Высокая концентрация НВГ	34,58 ± 2,29
33-и сутки	
Контроль	21,81 ± 5,23
Низкая концентрация НВГ	22,78 ± 4,04
Высокая концентрация НВГ	31,17 ± 5,25
46-е сутки	
Контроль	40,71 ± 9,92
Низкая концентрация НВГ	41,66 ± 14,51
Высокая концентрация НВГ	43,45 ± 7,80
64-е сутки	
Контроль	41,26 ± 6,13
Низкая концентрация НВГ	37,73 ± 4,28
Высокая концентрация НВГ	41,76 ± 0,12

Примечание. НВГ — препарат "Неоваскулген"



*p < 0,05, ***p < 0,001 Контроль-ВКп

А



Б

Рис. 4. Показатели роста сосудов на 16-е, 33-и, 46-е и 64-е сутки: А — плотность распределения сосудов, мм²; Б — доля крупных сосудов.

факторов, а также характером взаимодействия эндотелиальных клеток друг с другом, с компонентами экстрацеллюлярного матрикса и с клетками микроокружения [17]. Лишь спустя некоторое время, происходит образование «взрослых» сосудов, «схлопывание» локальных зон микрососудов и таким образом — общее уменьшение локальной плотности распределения сосудов. Это же мы наблюдали при изучении морфологии препаратов в контроле — в период с 16-х до 64-х сут. наблюдалось изменение процентного соотношения сосудов большого диаметра (более 15 мкм).

На 46-е и 64-е сут. параллельно с биорезорбцией полимерных волокон матрикса (разрушение и фрагментация волокнистого материала), наблюдалось сглаживание различий в группах по сравнению с контролем, обусловленное «схлопыванием» микрососудов, образованных во время начального васкулогенеза, при прекращении воздействия факторов, стимулирующих сосудообразование (рис. 4,А).

Показано, что витализация биосовместимых и биодеградируемых каркасов геннотерапевтическим препаратом возможна с тем же физиологическим эффектом, что и при использовании рекомбинантных белковых факторов роста. Ранее исследователями было показано, что рецепторы VEGF играют значимую роль в прогнозе и терапии заболеваний, протекающих с выраженными нарушениями ангиогенеза [18], решением которой могут быть тканеинженерные конструкции — носители кодирующих нуклеиновокислотные последовательности ростовых факторов васкуляризации.

Таким образом, полученные данные показали статистически значимое увеличение плотности распределения сосудов в зонах имплантации каркасов из поликапролактона, модифицированных введением генно-терапевтического препарата на основе нуклеиновой кислоты внутрь волокон биосовместимого материала. Отмечено увеличение плотности распределения сосудов на 46% при высвобождении БАС. Результаты согласуются с данными других авторов, которые продемонстрировали возможность использования БАС — двуцепочечных ДНК-плазмид как альтернативы белковым факторам, без выраженного цитотоксического эффекта. Показано дозозависимое влияние на васкуляризацию и ангиогенез при увеличении концентрации препарата «Неоваскулген» в материале. При этом эффект является обратимым, и при прекращении выхода препарата из резорбированного матрикса, плотность распределения сосудов приближается к значениям в контроле. Результаты продемонстрировали эффективность ангиогенной витализации матриксов на основе биосовместимых и биodeградируемых материалов для обеспечения физиологической и биологической совместимости трансплантатов.

References

- Alexandre N., Amorim I., Caseiro A.R., Pereira T., Alvites R., Rema A., et al. Long term performance evaluation of small-diameter vascular grafts based on polyvinyl alcohol hydrogel and dextran and MSCs-based therapies using the ovine pre-clinical animal model. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017; 523(2): 515-30.
- Dmitrieva L.A., Pivovarov Yu.I., Kurilskaya T.E., Sergeeva A.S. Modern state of problem of delivery of medicines with use of erythrocytes as cell-carriers. *Journal of Pathophysiology and Experimental Therapy*. 2016; 60(3): 88-94. (In Russian)
- Sevostyanova V.V., Matveeva V.G., Antonova L.V., Velikanova E.A., Shabaev A.R., Senokosova E.A., et al. Constructing a blood vessel on the porous scaffold modified with vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *AIP Conference Proceedings*. 2016; 1783: 20204.
- Del Gaudio C., Baiguera S., Ajallouiean F., Bianco A., Macchiarini P. Are synthetic scaffolds suitable for the development of clinical tissue-engineered tubular organs?. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2014; 102(7): 2427-47.
- Antonova L.V., Sevostyanova V.V., Kutikhin A.G., Mironov A.V., Krivkina E.O., Shabaev A.R., et al. Vascular endothelial growth factor improves physico-mechanical properties and enhances endothelialization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/poly(e-caprolactone) small-diameter vascular grafts in vivo. *Frontiers in Pharmacology*. 2016; 7: 230.
- Antonova L.V., Seifalian A.M., Kutikhin A.G., Sevostyanova V.V., Matveeva V.G., Velikanova E.A., et al. Conjugation with RGD Peptides and Incorporation of Vascular Endothelial Growth Factor Are Equally Efficient for Biofunctionalization of Tissue-Engineered Vascular Grafts. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17(11): 1920.
- Simon-Yarza T., Formiga F.R., Tamayo E., Pelacho B., Prosper F., Blanco-Prieto M.J. Vascular Endothelial Growth Factor-Delivery Systems for Cardiac Repair: An Overview. *Theranostics*. 2012; 2(6): 541-52.
- Wissing T.B., Bonito V., Bouten C.V., Smits A.I. Biomaterial-driven in situ cardiovascular tissue engineering — a multi-disciplinary perspective. *npj Regenerative Medicine*. 2017; 2(1): 18.
- Grigorian, A.S., Schevchenko K.G. Some possible molecular mechanisms of VEGF encoding plasmids functioning. *Cellular Transplantation and Tissue Engineering*. 2011; 6(3): 24-8. (in Russian)
- Deev R.V., Drobyshev A.Y., Bozo I.Y., Galetsky D.V., Korolev O.V., Eremin I.I., et al. Construction and biological effect evaluation of gene-activated osteoplastic material with human VEGF gene. *Cellular Transplantation and Tissue Engineering*. 2013; 8(3): 78-85. (in Russian)
- Lyundup A.V., Demchenko A.G., Tenchurin T.H., Krashennnikov M.E., Klabukov I.D., Shepelev A.D., et al. Improving the seeding effectiveness of stromal and epithelial cell cultures in biodegradable matrixes by dynamic cultivation. *Genes and Cells*. 2016; 11(3): 102-7. (in Russian)
- Tenchurin T., Lyundup A., Demchenko A., Krashennnikov M., Balyasin M., Klabukov I., et al. Modification of biodegradable fibrous scaffolds with Epidermal Growth Factor by emulsion electrospinning for promotion of epithelial cells proliferation. *Genes and Cells*. 2017; 12(4): 47-52. (in Russian)
- Arutyunyan I., Tenchurin T., Kananykhina E., Chernikov V., Vasyukova O., Elchaninov A., et al. Nonwoven polycaprolactone scaffolds for tissue engineering: the choice of the structure and the method of cell seeding. *Genes and Cells*. 2017; 12(1): 62-71. (in Russian)
- Zhou J., Zhao Y., Wang J., Zhang S., Liu Z., Zhen M., et al. Therapeutic Angiogenesis Using Basic Fibroblast Growth Factor in Combination with a Collagen Matrix in Chronic Hindlimb Ischemia. *The Scientific World Journal*. 2012; 2012 (2012): 652794.
- Dvir T., Kedem A., Ruvinov E., Levy O., Freeman I., Landa N., et al. Prevascularization of cardiac patch on the omentum improves its therapeutic outcome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009; 106(35): 14990-95.
- Lemon G., Howard D., Tomlinson M.J., Buttery L.D., Rose F.R.A.J., Waters S.L., et al. Mathematical modelling of tissue-engineered angiogenesis. *Mathematical Biosciences*. 2009; 221(2): 101-20.
- Sokolov D.I. Vasculogenesis and angiogenesis in development of a placenta. *Journal of obstetrics and woman disease*. 2007; 56(3): 129-33. (in Russian)
- Batyrova A.S., Bakanov M.I., Surkov A.N. Current status of vascular remodeling and angiogenesis in chronic liver diseases. *Journal of Pathophysiology and Experimental Therapy*. 2016; 60(1): 73-8. (in Russian)

Сведения об авторах:

Клабуков Илья Дмитриевич, науч. сотр. отдела передовых клеточных технологий Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: ilya.klabukov@gmail.com

Балясин Максим Витальевич, лаборант отдела передовых клеточных технологий Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: max160203@gmail.com

Люндуп Алексей Валерьевич, канд. мед. наук, зав. отделом передовых клеточных технологий Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: lyundup@gmail.com

Крашенинников Михаил Евгеньевич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. отдела передовых клеточных технологий Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: krashen@rambler.ru

Титов Александр Сергеевич, врач-хирург для оказания экстренной помощи ГКБ № 67, e-mail: theendisnigh@inbox.ru

Мудряк Даниил Леонидович, студент 6-го курса, лечебное дело, ДОП МШМБ, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: maaze@yandex.ru

Шепелев Алексей Дмитриевич, канд. хим. наук, вед. науч. сотр. лаб. полимерных материалов НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: shepelev_alexey@mail.ru

Тенчурин Тимур Хасянович, канд. хим. наук, науч. сотр. лаб. полимерных материалов НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: tenchurin.timur@mail.ru

Чвалун Сергей Николаевич, доктор хим. наук, проф., начальник отд-ния материаловедения и кристаллографии Курчатовского комплекса НБИКС-технологий НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: s-chvalun@yandex.ru

Дюжева Татьяна Геннадьевна, доктор мед. наук, проф., зав. отделом регенеративной хирургии печени и поджелудочной железы Института регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Минздрава России, e-mail: dtg679@gmail.com

© Коллектив авторов, 2018

УДК 616-002-008.953-092+616-092.9

Сахаров В.Н.¹, Литвицкий П.Ф.¹, Алексеева Е.И.^{1,2}, Маянский Н.А.², Закиров Р.Ш.²

Изменения экспрессии IL-4 и IFN- γ в моноцитах и Т-лимфоцитах-хелперах при моделировании системного ювенильного идиопатического артрита у крыс Wistar

¹ 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

² ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, 119991, г. Москва, Россия, Ломоносовский просп., д. 2, стр. 1

Цель исследования — изучение перепрограммирования мононуклеарных лейкоцитов на модели системного ювенильного идиопатического артрита (сЮИА), воспроизводимой у крыс Wistar с использованием полного адьюванта Фрейнда и липополисахарида. **Методика.** сЮИА воспроизведен у 6-месячных крыс-самцов Wistar. На 40-е сут. эксперимента животные были разделены на 3 группы: 1-я группа — контроль; 2-я — группа доксицилина; 3-я — группа дексаметазона. Взятие проб крови у животных проводили на нулевые, 41-е и 55-е сут. Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли гравиметрически, после чего окрашивали их на маркеры и внутриклеточные цитокины. Дифференцировали моноциты (CD3-CD4+) и Т-хелперы (CD3+CD4+). Анализировали динамику внутриклеточной экспрессии интерлейкина IL-4 (рассматривали как маркер про-M2 фенотипа, так как в случае выделения из клетки ИЛ-4 служит стимулятором M2 поляризации макрофагов) и IFN- γ (как маркер про-M1 фенотипа) по данным проточной цитофлуориметрии. Применяли непараметрический статистический тест Mann-Whitney-Wilcoxon в программе R для статистической обработки данных. **Результаты и заключение.** При моделировании сЮИА выявлено закономерное изменение фенотипа моноцитов. Применение же доксицилина и дексаметазона приводило к более ранней поляризации их по про-M2-пути в отношении моноцитов (на 41-е сут.) в сравнении с контролем. Про-M1 эффект (на 55-е сут., в сравнении с контролем) выявлен также в группах доксицилина и дексаметазона. У животных разных групп обнаружены характерные динамические изменения внутриклеточной экспрессии цитокинов. Важно, что различная направленность поляризации фенотипа при сЮИА и применении препаратов наблюдается не только у моноцитов, но и у Т-хелперов.

Ключевые слова: системный ювенильный идиопатический артрит; фенотип; моноциты; Т-хелперы; макрофаги.

Для цитирования: Сахаров В.Н., Литвицкий П.Ф., Алексеева Е.И., Маянский Н.А., Закиров Р.Ш. Изменения экспрессии IL-4 и IFN- γ в моноцитах и Т-лимфоцитах-хелперах при моделировании системного ювенильного идиопатического артрита у крыс Wistar. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 61—69.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.61-69

Для корреспонденции: Сахаров Владимир Николаевич, аспирант, ассистент каф. патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Scopus Author ID: 56712440000, e-mail: vladimirsah91@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при федеральной бюджетной поддержке ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), реализующего программы подготовки в аспирантуре.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.07.2017

Sakharov V.N.¹, Litvitskiy P.F.¹, Alekseeva E.I.^{1,2}, Mayansky N.A.², Zakirov R.Sh.²

Changes of IL-4 and IFN- γ expression in monocytes and T-helper lymphocytes while modeling of systemic juvenile idiopathic arthritis in Wistar rats

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenovskiy University), Trubetskaya Str. 8-2, Moscow, 119991, Russia

² National Scientific and Practical Center of Children's Health, Lomonosovsky Prospekt 2, 1, Moscow 119991, Russia

The study objective was to evaluate targeted reprogramming of peripheral blood mononuclear cells in systemic juvenile idiopathic arthritis (sJIA) modeled in 6-month-old male Wistar rats by co-administration of complete Freund's adjuvant and lipopolysaccharide. **Methods.** On day 40 of the experiment, rats were divided into three groups: control, doxycycline, and dexamethasone groups. Blood samples were collected on days 0, 41, and 55. Peripheral blood mononuclear cells were

isolated gravimetrically and stained for markers and cytokines. Monocytes (CD3-CD4+) and T-helpers (CD3+CD4+) were differentiated as target cells. IL-4 was considered a marker for the pro-M2 phenotype since IL-4 can activate M2 macrophage polarization; IFN- γ was considered a marker for the pro-M1 phenotype. Time-related changes in the intracellular expression of IL-4 and IFN- γ were studied using flow cytometry. Data were analyzed using nonparametric statistical tests (Mann-Whitney-Wilcoxon) in the R environment for statistical computing. **Results and conclusions.** Monocytes (like macrophages) underwent reprogramming during the development of modeled sJIA disease. In monocytes of doxycycline and dexamethasone treatment groups, pro-M2 effects were observed earlier (day 41) than in the control group. Pro-M1 effects were observed in monocytes of doxycycline and dexamethasone groups on day 55, as compared with the control group. Characteristic time-related changes of intracellular cytokine expression were described for different groups. Importantly, the differently directed phenotype polarization was observed in sJIA and treatment groups for both monocytes and T-helpers.

Keywords: systemic juvenile idiopathic arthritis; phenotype; monocytes; T-helpers; macrophages.

For citation: Sakharov V.N., Litvitskiy P.F., Alekseeva E.I., Mayansky N.A., Zakirov R.S. Changes of IL-4 and IFN- γ expression in monocytes and T-helper lymphocytes while modeling of systemic juvenile idiopathic arthritis in Wistar rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 61—69.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.61-69

For correspondence: Sakharov Vladimir Nikolaevich, post-graduate, assistant of the Department of Pathophysiology, Faculty of Medicine, FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University), e-mail: vladimirsah91@mail.ru

Acknowledgment. The work has federal budgetary support of FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University) which provides post-graduate training courses.

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

Information about authors:

Sakharov V.N., Scopus Author ID: 56712440000

Litvitskiy P.F., <http://orcid.org/0000-0003-0151-9114>, Scopus Author ID: 56624867400; Researcher ID: N-7294-2014; SPIN 6657-5937

Alekseeva E.I., <http://orcid.org/0000-0002-3874-4721>; Scopus Author ID: 7006883469; Researcher ID: J-1169-2014

Mayansky N.A., <http://orcid.org/0000-0001-8077-5313>

Zakirov R.S., <http://orcid.org/0000-0002-3101-0207>

Accepted 10.07.2017

Введение

Цель исследования — изучение возможностей направленной модификации процесса перепрограммирования мононуклеарных клеток на авторской [1, 2] биологической модели системной формы ювенильного идиопатического артрита (сЮИА) у крыс Wistar. Известно, что сЮИА является тяжелой формой патологии, осложняющейся у части пациентов жизнеугрожающим состоянием — синдромом активации макрофагов. Изучение патогенеза этой формы патологии необходимо для разработки эффективной патогенетически обоснованной терапии сЮИА. Именно для сЮИА, среди других форм ЮИА, показано максимальное вовлечение в его патогенез механизмов системы врожденного иммунитета, доказана ключевая роль аутовоспалительного компонента [3]. В то же время, полностью исключить аутоиммунную составляющую патогенеза сЮИА нельзя, так как имеются данные и в ее пользу [4]. Учитывая эти факты, а также то, что существовавшие ранее модели артрита имеют существенные

ограничения в связи с описанными выше особенностями патогенеза сЮИА, была разработана авторская модель [1, 2]. Принималось во внимание то, что у молодых крыс ниже воспроизводимость артрита. В связи с этим при разработке указанной модели ранее были использованы 8-месячные крысы, а при воспроизведении модели в данном исследовании — 6-месячные. На основании данных [5] об усредненном соотношении продолжительности жизни человека и лабораторных крыс, 8- и 6-месячный возраст последних соответствует примерно 14 и 11 годам человека.

Авторская модель сЮИА имеет ряд преимуществ в сравнении с другими моделями артрита. Она адекватна для изучения процессов перепрограммирования моноцитов/макрофагов в патогенезе артрита, патогенетически наиболее близка к сЮИА (сочетает в себе аутоиммунный компонент и действие стимулятора M1 ответа), имеет более выраженные (по сравнению с «классическим» адьювантным артритом) проявления, не приводит к существенной дезорганизации

межклеточного матрикса. Последнее чревато искажением результатов из-за потенцирования коллагенообразования и M2 ответа [6], что возможно при ряде других моделей и рассматривается нами как их недостаток при решении поставленных нами задач.

В настоящей работе на модели сЮИА у крыс Wistar оценивалась внутриклеточная продукция моноцитами и Т-лимфоцитами-хелперами цитокинов, вызывающих перепрограммирование макрофагов: интерлейкина-4 (IL-4) и гамма-интерферона (IFN- γ). Оценивалось влияние на экспрессию этих веществ доксициклина и дексаметазона. При этом клетки, вырабатывавшие IFN- γ , рассматривались как про-M1, а клетки, продуцировавшие IL-4 — как про-M2 в связи со способностью указанных цитокинов после выделения их из клеток активировать макрофаги (т.е. указанные клетки обладают потенциальной способностью вызывать M1 и M2 эффекты).

В качестве фармакологических препаратов, модифицирующих течение модельного сЮИА, были выбраны доксициклин и дексаметазон. Доксициклин привлекает внимание потому, что на моделях различных форм патологии описана его способность ингибировать M2 активацию макрофагов [7, 8]. Перспективен этот препарат еще и потому, что он способен изменять конформационную стабильность белковых молекул (из-за чего он рассматривался даже как потенциальное средство для борьбы с прионными заболеваниями, демонстрируя убедительные результаты *in vitro* [9]). Возможно, широкий спектр эффектов доксициклина обусловлен его способностью снижать активность одних белков (в том числе регуляторных) и повышать ее у других. Глюкокортикоиды же определенно относят к группе стимуляторов M2 активации макрофагов [10], в связи с чем они введены в стандарты лечения ревматических заболеваний.

Полученные результаты позволяют оценить изменение фенотипа популяций клеток (моноцитов и Т-хелперов) в целом на протяжении моделирования, в том числе под действием модифицирующих веществ, т.е. позволяют говорить о структуре популяции клеток (по выбранным маркерам) и ее изменении в условиях воспалительного процесса и действия использованных фармакологических препаратов. Полученные данные, в том числе о наличии несколько противоречивых эффектов у оцениваемых препаратов, позволили заключить, что важно оценивать профиль эффектов лекарственного препарата и сравнивать его с профилем интересующего заболевания, а также что общий «противовоспалительный эффект» препарата может включать и провоспалительные его компоненты. Это может объяснить формирование нежелательных эффектов лекарственных средств (при неполном перекрытии вышеуказанных профилей) и открывает еще одно перспектив-

ное направление для создания управляемых и «заточенных» под конкретные провоспалительные профили заболеваний стратегий лечения.

Методика

Модифицированная модель системного ювенильного идиопатического артрита [1, 2] воспроизведена на 24 крысах Wistar (самцы, 6 мес.). Схема дизайна исследования приведена на рис. 1. Использовано двукратное введение животным полного адьюванта Фрейнда (внутрикожные многоточечные инъекции общим объемом 0,5 мл адьюванта, 1 мг/мл, (Sigma Aldrich, USA) на нулевые и 40-е сут.) и трехкратное липополисахарида (Медгамал, Россия) в возрастающих количествах: нулевые сутки — из расчета 5 мкг/кг массы тела животных, 18-е сут. — из расчета 10 мкг/кг, 40 сут. — по 10 мкг каждому животному. На 40-е сут. все крысы были разделены на 3 группы: в группе «доксициклин» дополнительно подкожно введен раствор доксициклина (Саратов, Россия) из расчета 50 мг/кг массы тела; в группе «дексаметазон» подкожно инъецирован раствор дексаметазона (KRKA, Словения) из расчета 4 мг/кг. В группе «контроль» подкожно введено по 0,2 мл физиологического раствора хлорида натрия (Борисовский завод медицинских препаратов, Борисов, Беларусь). Аналогичные количества доксициклина, дексаметазона и физраствора вводили повторно на 54-е сут. исследования. Взятие образцов крови (для оценки внутриклеточных цитокинов) осуществляли на нулевые, 41-е и 55-е сут.

В подготовленных с помощью RPMI-1640 пробах крови форменные элементы подвергались гравиметрическому разделению: 400g на градиенте Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Мононуклеарные клетки окрашивались с помощью антител Biotin Anti-Rat CD3, BD Pharmingen; APC Anti-rat CD4 (domain 2) Antibody, SONY; PE Anti-rat IL-4 Antibody, SONY; PE Anti-rat IFN- γ Antibody, SONY. Этап пермебиализации (для внутриклеточных маркеров) проводился с использованием Cytofix/Cytoperm (BD Cytotfix/Сytoperm). Пробы анализировались на проточном цитофлуориметре (Cell Analyzer BD FACSCanto II (USA)). Процедуры выполнялись в соответствии с инструкциями производителей.

CD3-CD4⁺ клетки рассматривались с учетом информации BD Biosciences (www.bdbiosciences.com) как моноциты, а CD3⁺CD4⁺ клетки как Т-лимфоциты-хелперы [11].

Оценка статистической значимости различий показателей проводилась с использованием программного обеспечения R [12] путем проведения теста Mann-Whitney-Wilcoxon. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

На графиках представлены диаграммы размаха для изученных показателей. На указанном типе диаграмм черная горизонтальная линия — медиана. Ящики ограничены 25-м и 75-м перцентилями (Q1 и Q3 соответственно), верхняя граница соответствует $Q3 + 1,5 * (Q3 - Q1)$, нижняя: $Q1 - 1,5 * (Q3 - Q1)$. Отдельными точками отмечаются выбросы. Ряд статистических приложений, в том числе и R при формировании ящиков определяет не непосредственно квартили 1 и 3, а медианы верхней и нижней половин данных [13], которые могут несколько отличаться от квартилей, в частности, в зависимости от того, четные или нечетные показатели.

Результаты и обсуждение

Доля клеток, экспрессирующих IL-4, среди популяции моноцитов (CD3-CD4+) при моделировании сЮИА у крыс Wistar

Доли иммунологически выявленных моноцитов (CD3-CD4+) с внутриклеточной продукцией IL-4 (рис. 2) статистически значимо изменялись на протяжении исследования, причем обнаружены существенные особенности в различных группах животных.

Так, у крыс группы контроля (естественное течение экспериментального сЮИА) обнаружена отсроченность изменений по сравнению с другими группами

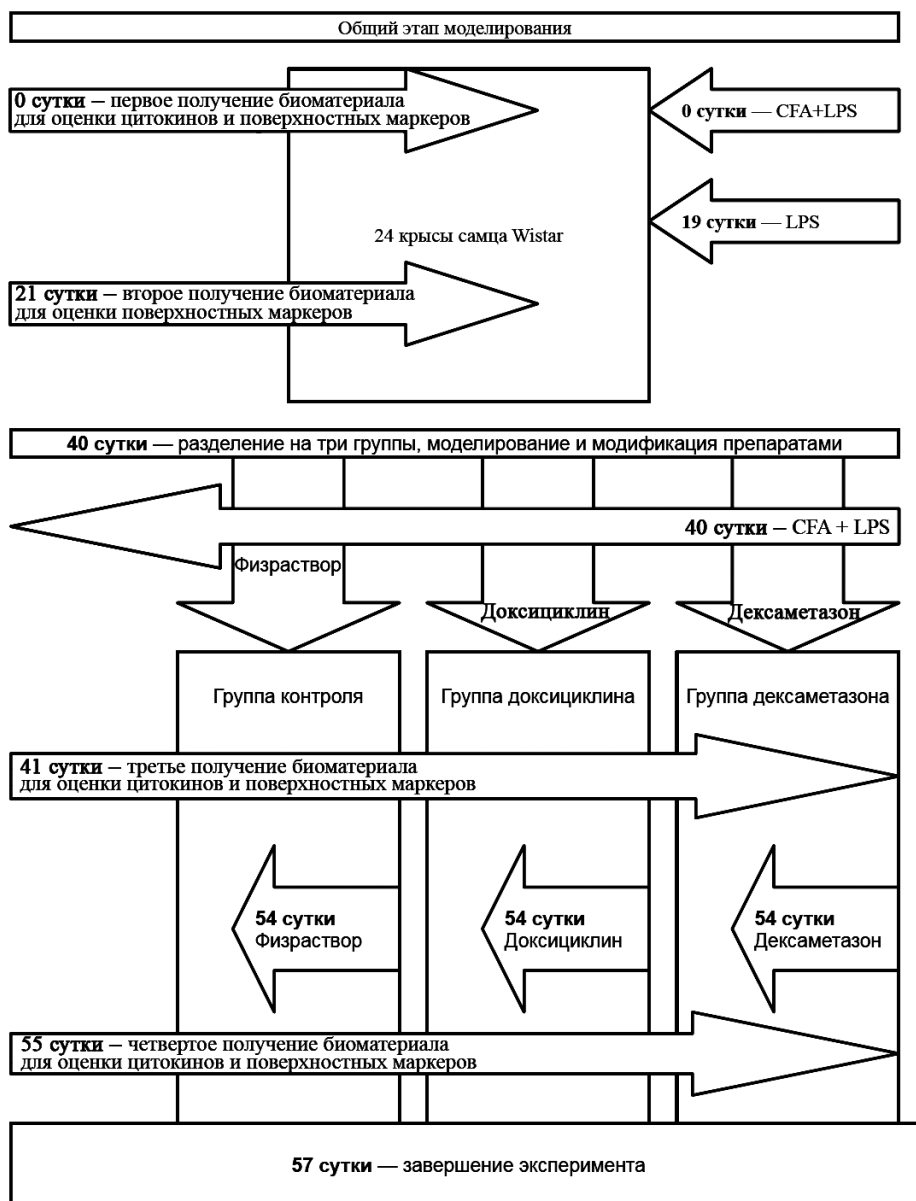


Рис. 1. Схематичное представление дизайна исследования. CFA — полный адьювант Фрейнда, LPS — липополисахарид.

животных: на 41-е сут. показатель доли клеток, экспрессирующих IL-4, среди популяции моноцитов статистически значимо не отличался от исходных данных. При применении дексаметазона наибольшие медианные значения показателя определялись уже на 41-е сут., на 55-е сут. значения не отличались от таковых на 41-е сут. При этом на 41-е сут. группа «дексаметазон» демонстрировала статистически значимо более высокие доли продуцирующих IL-4 моноцитов по сравнению с контролем. Группа животных «доксидиклин» также значимо отличается по указанному показателю от исходных значений уже на 41-е сут. (имея меньшие медианные значения), но не отличается существенно от показателей групп «дексаметазон» и «контроль». Вместе с тем следует отметить, что для долей моноцитов, продуцирующих IL-4, в группе «доксидиклин» на 41-е сут. в сравнении с контролем разница была статистически не значима ($p = 0,054$).

У животных групп «контроль» и «доксидиклин» отмечено статистически значимое увеличение этого показателя в период между 41-ми и 55-ми сут., а с 55-х сут. все показатели трех групп крыс уже статистически значимо не различались.

Таким образом, можно сделать вывод, что как реализация патогенетических звеньев модели сЮИА, так и применение в условиях ее развития вышеуказанных препаратов приводят к перепрограммированию моноцитов в динамике. При этом и доксидиклин, и дексаметазон вызывали более раннее (на 41-е сут.)

статистически значимое повышение доли моноцитов, экспрессирующих IL-4. Следовательно, оба указанных препарата обладают про-M2 действием, так как после выделения указанного цитокина из клеток он может действовать как аутокринно, так и через влияние на другие мононуклеарные фагоциты. При естественном же течении экспериментального сЮИА в контрольной группе (напомним, что в этой группе на 40-е сут. использовался липополисахарид, полный адъювант Фрейнда и физиологический раствор хлорида натрия) изменения оказываются отсроченными.

Доля клеток, экспрессирующих IL-4, среди популяции Т-лимфоцитов-хелперов (CD3+CD4+) при моделировании сЮИА у крыс Wistar

Обнаружены особенности динамики изменения показателя долей клеток, продуцирующих IL-4 и среди Т-хелперов (рис. 3). Так, статистически значимое увеличение (по сравнению с исходными данными) указанного показателя наблюдалось только на 55-е сут. При этом у животных группы «дексаметазон» отмечены наибольшие медианные значения и статистически значимое различие с показателями группы «доксидиклин». От контроля показатели группы «дексаметазон» не отличались.

Таким образом, можно заключить, что моделирование сЮИА у крыс сопровождалось повышением в динамике доли Т-хелперов, продуцирующих IL-4. Также обращает на себя внимание тот факт, что при-

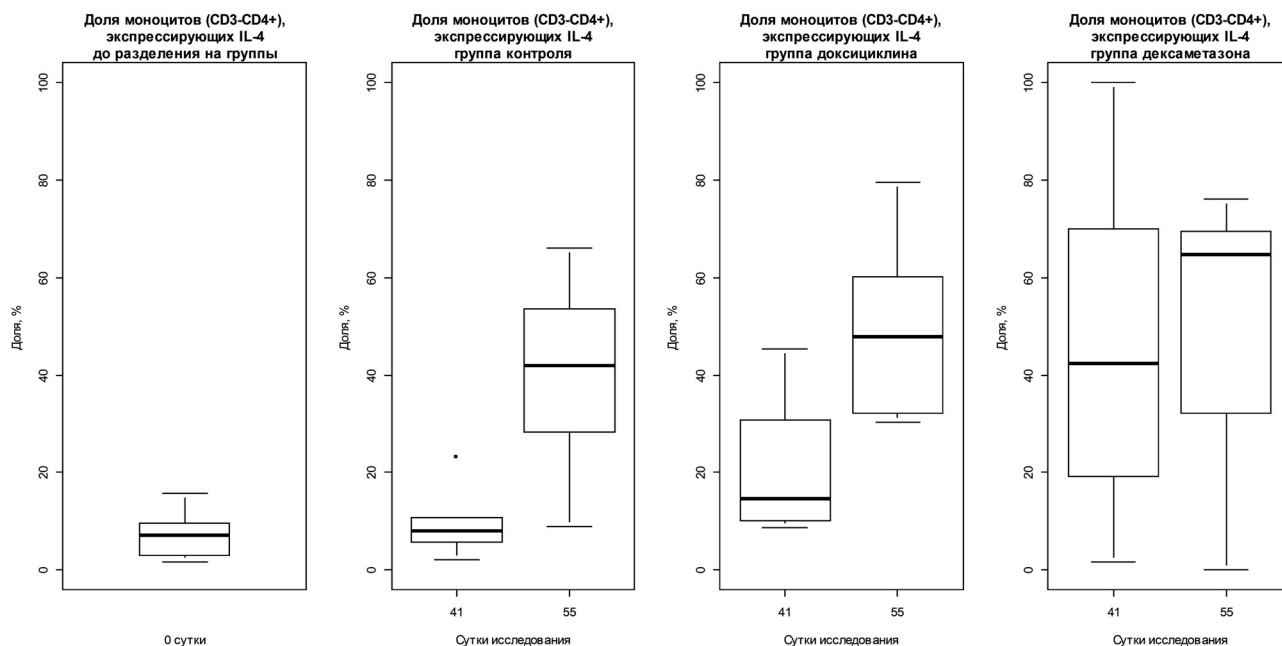


Рис. 2. Доли моноцитов, экспрессирующих IL-4, при моделировании сЮИА у крыс Wistar. Статистически значимые отличия (по данным теста Mann-Whitney-Wilcoxon) показателей от исходных данных: группа контроля: 55-е сут. ($p = 0,001243$); группа «доксидиклин»: 41-е сут. ($p = 0,01041$), 55-е сут. ($p = 0,0001554$); группа «дексаметазон»: 41-е сут. ($p = 0,006993$), 55-е сут. ($p = 0,01041$). Статистически значимые различия между группами: группа контроля — группа «дексаметазон» на 41-е сут. ($p = 0,0289$).

менение дексаметазона приводит к большему (статистически значимому по сравнению с доксициклином) увеличению этого показателя, т.е. имеет место значимое перепрограммирование популяции Т-хелперов.

Доля клеток, экспрессирующих IFN-γ, среди популяции моноцитов (CD3-CD4+) при моделировании сЮИА у крыс Wistar

В популяции моноцитов (рис. 4) на 41-е сут. моделирования сЮИА в условиях применения как доксициклина, так и дексаметазона происходило статистически значимое увеличение процентного содержания моноцитов, вырабатывающих IFN-γ, по сравнению с исходными показателями. У контрольных животных отмечено, что показатель долей вырабатывающих IFN-γ моноцитов на 41-е сут. был значимо ниже таковых в группах «доксициклин» и «дексаметазон», но не отличался от исходных значений.

На 55-е сут. наблюдалось статистически значимое снижение показателя долей моноцитов, вырабатывающих IFN-γ, по сравнению с 41-ми сут. во всех группах крыс. При этом у животных групп «доксициклин» и «дексаметазон» показатели не отличались от исходного уровня. В контрольной же группе доли моноцитов, экспрессирующих IFN-γ, были статистически значимо ниже исходных.

Таким образом, при естественной реализации патогенетических звеньев модели сЮИА у крыс происходит статистически значимое уменьшение доли про-M1 моноцитов (ниже исходного уровня!) и возрастание доли про-M2. В то же время увеличение показателя про-M2 ответа в контрольной группе не было столь выраженным, как в других группах.

У животных групп «доксициклин» и «дексаметазон» доли моноцитов, вырабатывающих IFN-γ, на 55-е сут. статистически значимо не отличались от исходных, а в контрольной группе в это же время отмечено их статистически значимое снижение по сравнению с исходными данными. Нарастание про-M2 ответа моноцитов в динамике моделирования сЮИА наблюдалось раньше в группах «доксициклин» и «дексаметазон».

Таким образом, выявлена существенная роль дексаметазона и доксициклина в перепрограммировании не только макрофагов (что было известно), но и моноцитов.

Доля клеток, экспрессирующих IFN-γ, среди Т-лимфоцитов-хелперов (CD3+CD4+) при моделировании сЮИА у крыс Wistar

В динамике изменений долей Т-хелперов, продуцирующих IFN-γ (рис. 5), выявлены следующие изменения: на 41-е сут. только у животных в группе «дексаметазон» обнаружено статистически значимое увеличение таких долей по сравнению с исходными

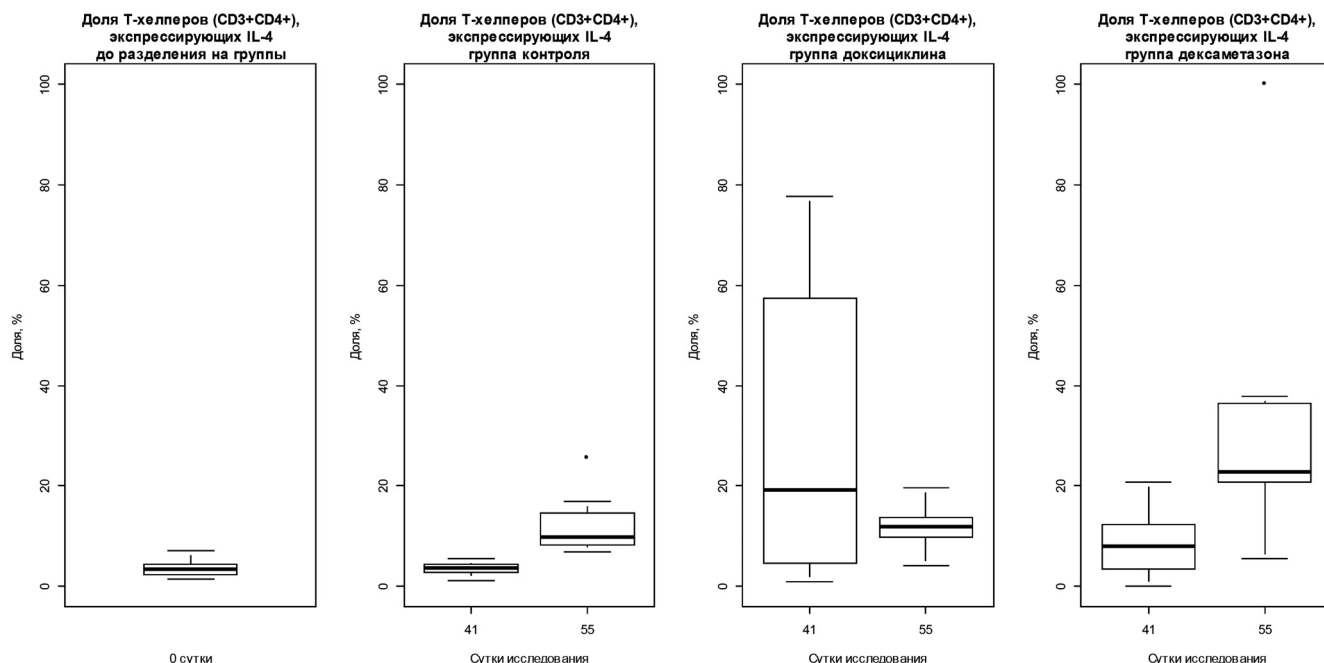


Рис. 3. Доли Т-лимфоцитов хелперов, экспрессирующих IL-4, при моделировании сЮИА у крыс Wistar. Статистически значимые отличия (по данным теста Mann-Whitney-Wilcoxon) показателей от исходных данных: группа контроля: 55-е сут. (p = 0,001243); группа «доксициклин»: 55-е сут. (p = 0,001088); группа «дексаметазон»: 55-е сут. (p = 0,0003108). Статистически значимые различия между группами: группа «доксициклин»-группа «дексаметазон» на 55-е сут. (p = 0,006993).

значениями. При этом на 55-е сут. отмечены значимо большие доли продуцирующих IFN- γ Т-хелперов в группе «дексаметазон» по сравнению с группой «доксциклин».

Таким образом, выявлен факт перепрограммирования популяции Т-хелперов в динамике моделирования сЮИА у крыс Wistar. В группе «дексаметазон» по сравнению с группой «доксциклин» на 55-е сут.

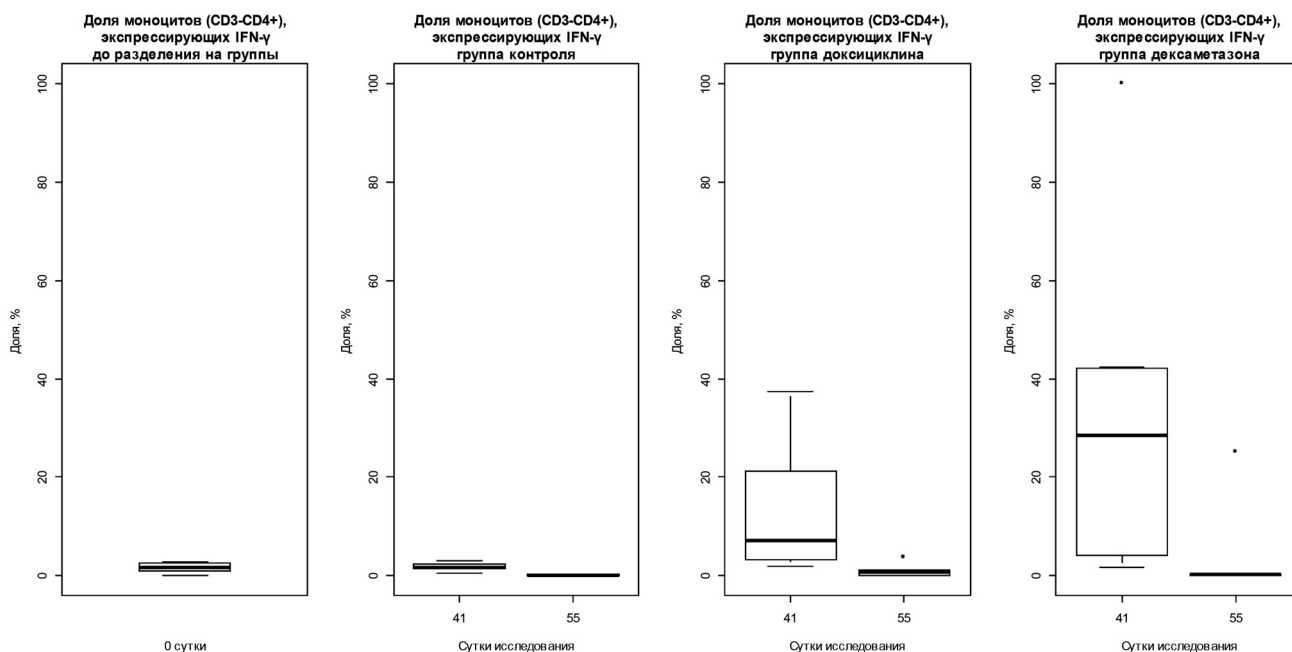


Рис. 4. Доли моноцитов, экспрессирующих IFN- γ , при моделировании сЮИА у крыс Wistar. Статистически значимые отличия (по данным теста Mann-Whitney-Wilcoxon) показателей от исходных данных: группа контроля: 55-е сут. ($p = 0,009155$); группа «доксциклин»: 41-е сут. ($p = 0,002953$); группа «дексаметазон»: 41-е сут. ($p = 0,001865$). Статистически значимые различия между группами: группа контроля-группа «доксциклин» на 41-е сут. ($p = 0,005905$), группа контроля-группа «дексаметазон» на 41-е сутки ($p = 0,005905$).

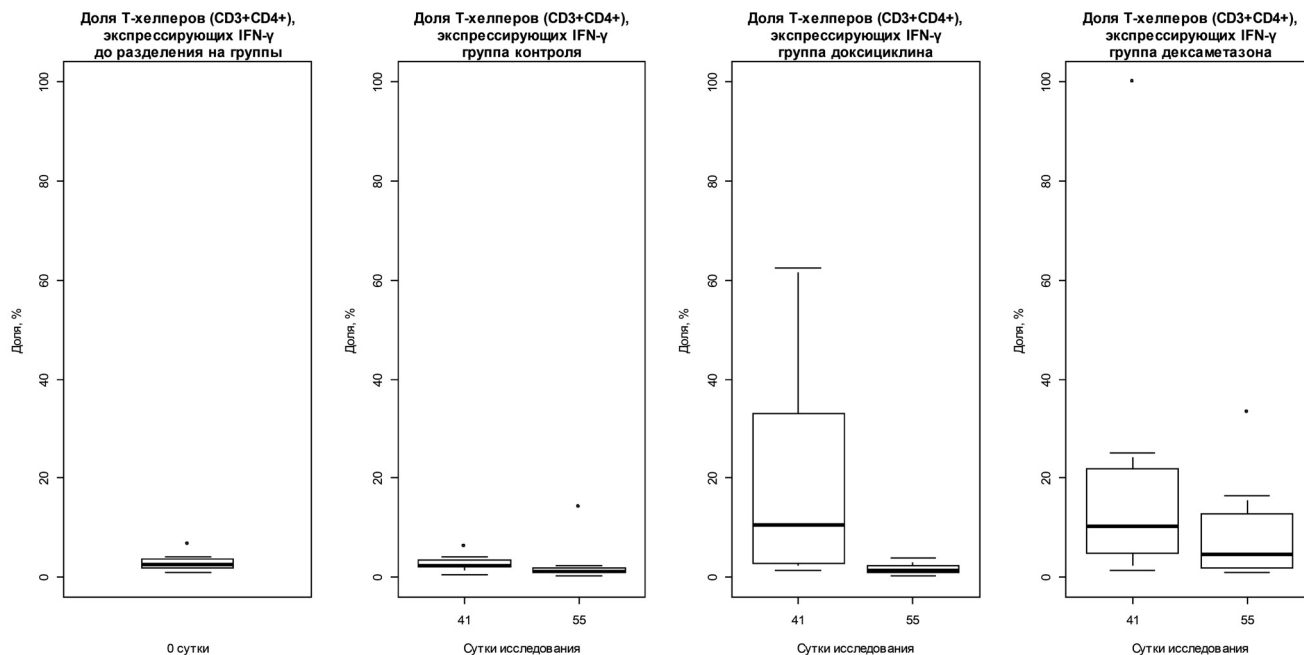


Рис. 5. Доли Т-лимфоцитов хелперов, экспрессирующих IFN- γ , при моделировании сЮИА у крыс линии Wistar. Статистически значимые отличия (по данным теста Mann-Whitney-Wilcoxon) показателей от исходных данных: группа «дексаметазон»: 41-е сут. ($p = 0,03792$). Статистически значимые различия между группами: группа «доксциклин»-группа «дексаметазон» на 55-е сут. ($p = 0,02813$).

наблюдался наибольший процент лимфоцитов, вырабатывающих как IL-4, так и IFN-γ. Роль указанной группы клеток при сЮИА требует специального исследования. С одной стороны, продемонстрированный факт может отражать различную активацию Т-хелперов 1 и 2 типа при применении указанных препаратов. Тем не менее, внутри группы CD3+CD4+ описана (и в последнее время интенсивно изучается при самых различных формах патологии) группа Т-регуляторных CD25+ клеток [14]. Однако эта ли субпопуляция привела к обнаруженному в нашем исследовании явлению перепрограммирования Т-хелперов, сказать пока невозможно (что и не было целью данного исследования).

В целом по данным оценки про-М1 и про-М2 ответа моноцитов и Т-хелперов можно сделать заключение (таблица), что при применении дексаметазона, в отличие от доксициклина, реализуется большее число компонентов как про-М1, так и про-М2 ответа (т.е. про-М1 и про-М2 ответы моноцитов, а также про-М1 и про-М2 ответы лимфоцитов). Следовательно, можно предположить, что результирующее влияние этих компонентов на проявления сЮИА у крыс зависит от выраженности каждого компонента и их конкретного вклада.

Выводы

1. Реализация патогенетических звеньев модели сЮИА у крыс Wistar приводит к статистически значимому перепрограммированию популяции моноцитов.
2. Раздельное применение доксициклина и дексаметазона при моделировании сЮИА обуславливает:

а) перепрограммирование не только макрофагов (что было известно), но и моноцитов крови (по данным о количестве клеток, продуцирующих IFN-γ и IL-4);

б) более раннее (в сравнении с контрольной группой) значимое повышение доли моноцитов, экспрессирующих IL-4, что свидетельствует о наличии у обоих препаратов про-М2 эффекта.

с) ограничение степени снижения показателя про-М1-ответа моноцитов (про-М1 эффект препаратов).

Таким образом, как доксициклин, так и дексаметазон при моделировании сЮИА у крыс Wistar оказывают двоякое воздействие на моноциты: вызывают и про-М1, и про-М2 эффект.

3. Развитие самой модели сЮИА характеризуется определенной динамикой перепрограммирования моноцитов: статистически значимым уменьшением доли про-М1 моноцитов и возрастанием доли про-М2.

4. На 55-е сут. моделирования сЮИА у крыс Wistar выявляется снижение про-М1-ответа моноцитов не только до исходного уровня, но и значимо ниже такового. При этом увеличение показателя про-М2 ответа не было максимально выраженным.

5. Применение при моделировании сЮИА дексаметазона (в сравнении с доксициклином) обуславливает включение большего числа компонентов ответа как про-М1, так и про-М2 направленности.

6. Реализация модели сЮИА у крыс сопровождается перепрограммированием популяции Т-хелперов (увеличением показателя про-М2 ответа на 55-е сут.).

Таблица

Ключевые эффекты модификации доксициклином и дексаметазоном про-М1 и про-М2 ответа моноцитов и Т-лимфоцитов хелперов при моделировании сЮИА у крыс линии Wistar

Показатель	Эффект доксициклина	Эффект дексаметазона
Моноциты (про-М2): доля экспрессирующих IL-4	Более раннее увеличение показателя (41-е сут.) при сравнении с динамикой изменения в группе контроля.	1. Более раннее увеличение показателя (41-е сут.) при сравнении с динамикой изменения в группе контроля. 2. Большие значения показателя (41-е сут.) по сравнению с группой контроля
Лимфоциты (про-М2): доля экспрессирующих IL-4		Большие значения показателя по сравнению с группой "доксициклин" (55-е сут.).
Моноциты (про-М1): доля экспрессирующих IFN-γ	1. Увеличение показателя в динамике группы (41-е сут.) по сравнению с динамикой контрольной группы. 2. Большие значения показателя (41-е сут.) по сравнению с группой контроля. 3. Ограничение снижения показателя в динамике группы (55-е сут.) по сравнению с динамикой контрольной группы.	1. Увеличение показателя в динамике группы (41-е сут.) по сравнению с динамикой показателя контрольной группы. 2. Большие значения показателя (41-е сут.) по сравнению с группой контроля. 3. Ограничение снижения показателя в динамике группы (55-е сут.) по сравнению с динамикой контрольной группы.
Лимфоциты (про-М1): доля экспрессирующих IFN-γ		Большие значения показателя по сравнению с группой "доксициклин" (55-е сут.).

7. Использование дексаметазона, в отличие от доксицилина, при моделировании сЮИА у крыс приводит к более выраженному перепрограммированию Т-хелперов (что проявляется увеличением доли клеток, продуцирующих факторы активации как М1-, так и М2-ответа (IFN- γ и IL-4 соответственно).

References

1. Litvitskiy P., Sakharov V., Alexeeva E. et al. THU0212 Model of Arthritis with The Typical Systemic Manifestations in Wistar Rats. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2016; 75: 264.
2. Litvitskiy P.F., Sakharov V.N., Alekseeva E.I., Mayanskij N.A. *Method for creation biological model of systemic juvenile idiopathic arthritis in experiment*. Invention patent RU 2612843 C1. Application 18.02.2016. Registration date 13.03.2017.
3. Sikora K.A., Grom A.A. Update on the pathogenesis and treatment of systemic idiopathic arthritis. *Curr Opin Pediatr*. 2011; 23 (6): 640-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045308>.
4. Ombrello M.J., Remmers E.F., Tachmazidou I., Grom A., Foell D., Haas J.P., Martini A. et al. HLA-DRB1*11 and variants of the MHC class II locus are strong risk factors for systemic juvenile idiopathic arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015; 112(52): 15970-5. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26598658>.
5. Yushkov B.G., Chereshev V.A. *Definition of normal parameters in physiology (physiological constants in laboratory animals. [Ponyatie normy v fiziologii (fiziologicheskie konstanty laboratornykh zhivotnykh)]*. Moscow; NP «Tsentr strategicheskogo Partnerstva»; 2016, 189. (in Russian)

6. McWhorter F.Y., Wang T., Nguyen P., Liu W.F. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110 (43): 17253-8 URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24101477>.

7. He L., Marneros A.G. Doxycycline inhibits polarization of macrophages to the proangiogenic M2-type and subsequent neovascularization. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014; 289 (12): 8019 — 8028. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24505138>.

8. Han L., Su W., Huang J., Zhou J., Qiu S., Liang D. Doxycycline inhibits inflammation-induced lymphangiogenesis in mouse cornea by multiple mechanisms. *PLoS One*. 2014; 9 (9): e108931. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25268699>.

9. Haik S., Marcon G., Mallet A., Tettamanti M., Welaratne A., Giaccone G. et al. Doxycycline in Creutzfeldt-Jakob disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*. 2014; 13 (2): 150-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24411709>.

10. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*. 2014; 6: 13 URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3944738/> (дата обращения: 05.04.2014).

11. *Rat immunology. From Genes to Proteins to Cells*. BD Biosciences (www.bdbiosciences.com)

12. R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

13. Krzywinski M., Altman N. Points of significance: Visualizing samples with box plots. *Nat Methods*. 2014; 11(2): 119-20 URL: <http://www.nature.com/nmeth/journal/v11/n2/full/nmeth.2813.html>.

14. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008; 133(5): 775-87 URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18510923>.

Сведения об авторах:

Сахаров Владимир Николаевич, аспирант, ассистент каф. патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Scopus Author ID: 56712440000, e-mail: vladimirсах91@mail.ru

Литвицкий Петр Францевич, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, зав. каф. патофизиологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: litvicki@mma.ru;

Алексеева Екатерина Иосифовна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. педиатрии и детской ревматологии педиатрического факультета, декан педиатрического факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрав России (Сеченовский Университет), зав. отд-нием детской ревматологии ФГАУ НМИЦЗД Минздрава России;

Маянский Николай Андреевич, доктор мед. наук, проф., руководитель лаб. отд-ния ФГАУ НМИЦЗД Минздрава России, e-mail: mayansky@nczd.ru;

Закиров Р.Ш., врач клинично-лабораторной диагностики лаб. отд-ния ФГАУ НМИЦЗД Минздрава России, e-mail: biochemic@bk.ru

© Коллектив авторов, 2018

УДК 577.2:612.398.12:616.71-007.157-089.227.84

Выхованец Е.П., Сакулин Н.В., Лунева С.Н., Накоскина Н.В., Климов О.В.

Факторы роста семейства TGF- β в крови больных ахондроплазией на этапах ортопедического лечения

ФГБУ Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. Акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, 640014, г. Курган, Россия, ул. М. Ульяновой, д. 6

Наиболее важной задачей при дистракционном остеосинтезе является создание простых и эффективных способов контроля темпов дистракции позволяющих производить удлинение конечности в оптимальном режиме у различных групп пациентов. **Цель** исследования — анализ содержания сывороточных концентраций TGF β -1 и TGF β -2, BMP-4 и BMP-6 у лиц при увеличении роста с косметической целью и у пациентов с ахондроплазией на этапах дистракционного остеогенеза при удлинении голени методом Илизарова. **Методика.** Определение ростовых факторов проводили на комплексе оборудования фирмы Thermofisher (США): детектор Multiscan FC, встряхиватель iEMS, автоматический промыватель планшет WellWash. Для измерения концентрации факторов в сыворотке крови использовали наборы для иммуноферментного анализа (ИФА) eBioscience и RayBiotech Inc. (США). **Результаты.** Показано, что в сыворотке крови людей с ахондроплазией, еще до какого-либо ортопедического лечения концентрации TGF- β 2 и BMP-4, ниже, а TGF- β 1 и BMP-6, выше, чем концентрации этих факторов у людей при увеличении роста с косметической целью. У последних удлинение конечностей сопровождается возрастанием содержания в сыворотке крови факторов TGF- β 1 и TGF- β 2 на этапах начала и середины процесса дистракции. У пациентов с ахондроплазией, наблюдается обратная динамика: концентрация данных факторов (BMP-4 и BMP-3) в крови ахондропатов к концу дистракции увеличивается в 3,5 и 2 раза соответственно, снижаясь в периоде фиксации. **Заключение.** Таким образом, у пациентов с ахондроплазией происходит нарушение этапности процессов костного ремоделирования.

Ключевые слова: факторы роста; сыворотка крови; репаративный остеогенез; ахондроплазия; увеличение роста; чрескостный остеосинтез.

Для цитирования. Выхованец Е.П., Сакулин Н.В., Лунева С.Н., Накоскина Н.В., Климов О.В. Факторы роста семейства TGF- β в крови больных ахондроплазией на этапах ортопедического лечения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 70—76.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.70-76

Для корреспонденции: Выхованец Евгения Петровна, e-mail: vykhovanets.eva@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 24.07.2017

Vykhovanets E.P., Sakulin N.V., Luneva S.N., Nakoskina N.V., Klimov O.V.

Growth factors of the TGF- β family in blood of achondroplasia patients at stages of orthopedic treatment

Federal State Budgetary Institution "Russian Ilizarov Scientific Center, Restorative Traumatology and Orthopaedics, M. Ulianovoy Str., 6, Kurgan 640014, Russia

Elaboration of simple and effective ways for managing the distraction rate to provide an optimum regimen of limb lengthening for different groups of patients is an important task in implementation of transosseous osteosynthesis. The **aim** of this study was to analyze blood serum concentrations of TGF β -1, TGF β -2, BMP-4, and BMP-6 in individuals undergoing cosmetic height increase and patients with achondroplasia at different stages of distraction osteogenesis in tibial lengthening using the Ilizarov method. **Methods.** Concentrations of growth factors were measured using a set of Thermofisher (USA) equipment, including a Multiscan FC detector, iEMS Shaker, and automatic WellWash Washer and ELISA kits (eBioscience and RayBiotech Inc., USA). **Results.** Serum concentrations of TGF β -2 and BMP-4 were lower and TGF β -1 and BMP-6 were higher in achondroplasia patients than in individuals with cosmetic height increase even before any orthopedic treatment. Long bone lengthening for cosmetic height increase was associated with increases in serum levels of TGF β -1 and TGF β -2 at the start and in the middle of distraction. In achondroplasia patients, opposite changes were observed; serum concentrations of BMP-4 and BMP-3 increased 3.5 and 2 times, respectively, by the end of distraction and decreased during fixation. **Conclusion.** Therefore, we observed a disorder of the stage-by-stage bone remodeling process in achondroplasia patients.

Keywords: growth factors, blood serum, reparative osteogenesis, achondroplasia, height increase, transosseous osteosynthesis.

For citation: Vykhovanets E.P., Sakulin N.V., Luneva S.N., Nakoskina N.V., Klimov O.V. Growth factors of TGF- β family in the blood of achondroplasia patients at the stages of orthopaedic treatment. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 70—76. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.70-76

For correspondence: *Vykhovanets Evgeniya Petrovna*, e-mail: vykhovanets.eva@mail.ru

Conflict of interests. The authors disclaim any conflict of interests.

Information about authors:

Vykhovanets Evgeniya Petrovna, Author ID: 26024323300, <https://orcid.org/0000-0002-0578-1964>

Acknowledgments. The study had no sponsor's support.

Received 24.07.2017

Введение

Проблема удлинения конечностей остается одной из самых сложных в ортопедии и травматологии. Внедрение метода Илизарова позволило производить коррекцию длины конечности при дефектах врожденного и посттравматического генеза, увеличивать рост за счет удлинения конечностей при системных заболеваниях скелета и в эстетических целях [1]. При этом сочетание механического и биологического факторов в условиях дистракционного остеосинтеза по Илизарову обеспечивает оптимальное использование потенциальных возможностей репарации костной и других тканей [2, 3]. Наиболее важной задачей при дистракционном остеосинтезе является создание наиболее простых и эффективных способов контроля за темпом дистракции, позволяющей производить удлинение конечности в оптимальном режиме у различных групп пациентов [4]. При этом особую актуальность приобретают новые временные данные по механизмам остеорепаляции в нормальных и патологических условиях.

Понимание характера влияния факторов роста (ФР) и интенсивность их экспрессии на этапах дистракционного остеосинтеза по Илизарову может помочь как при изучении механизмов репарации костной ткани [5], так и в клинической практике — при выяснении причин нарушения сращения фрагментов кости, а также при персонализированной прогностической оценке репаративных возможностей у конкретного пациента. Среди ФР, оказывающих наибольшее влияние на процесс репаративного остеогенеза, можно выделить семейство TGF- β , которое включает более 40 различных трансформирующих факторов, сгруппированных в несколько подсемейств, основной функцией которых является регуляция процессов пролиферации и дифференциации клеток [6]. Представителей данной группы можно назвать самыми универсальными участниками репаративных процессов

организма [7, 8]. С точки зрения влияния на репаративный остеогенез наиболее значимыми представителями данной суперсемьи являются костные морфогенетические белки (ВМР): TGF- β 1 и TGF- β 2. Основными источниками TGF- β являются тромбоциты, костный и хрящевой матрикс. Источниками костных ВМР — костные клетки предшественники, остеобласты и костный матрикс [9, 10].

В настоящее время установлено, что TGF- β 1 и TGF- β 2 — стимулируют продукцию коллагена II типа и протеогликанов мезенхимальными клетками, усиливают хемотаксис для костеобразующих клеток и макрофагов, способствуют дифференцировке остеобластов, хондроцитов, клеток предшественников, а также мезенхимальных клеток [11 — 13]. Присутствие рецепторов к TGF на поверхности остеобластов и хондроцитов дает возможность предположить участие этих факторов на всех этапах регенерации кости [14, 15].

Костные морфогенетические белки — ВМР, одна из основных групп морфогенетических сигнальных белков, которые организуют построение тканей в теле, прежде всего за счет регуляции пролиферации и дифференциации клеток. При этом ВМР-6 в основном выполняют регуляторную роль при оссификации, стимулируя созревание хондроцитов, тогда как ВМР-4 помогают в формировании соединительнотканной костной мозоли и стимулируют миграцию моноцитов из крови [16]. Вследствие этого происходит поступление факторов роста семейства TGF- β в кровь, что может быть использовано в диагностических целях [17].

Цель исследования — анализ содержания сывороточных факторов TGF- β 1 и TGF- β 2, ВМР-4 и ВМР-6 у людей с косметическим увеличением роста и у пациентов с ахондроплазией на этапах дистракционного остеогенеза при удлинении голени методом Илизарова.

Методика

Работа основана на определении концентрации факторов роста семейства TGF в сыворотке крови 19 пациентов (5 мужчин и 14 женщин), находящихся на стационарном лечении в Центре Илизарова. Возраст пациентов от 18 до 35 лет.

В 1-ю группу вошло 9 пациенток в возрасте от 20 до 35 лет, перенесших косметическую операцию по увеличению роста, методом чрезкостного дистракционного остеосинтеза (ЧДОС) с установлением на голень циркулярного аппарата Илизарова. Все пациенты, вошедшие в 1-ю группу, были обследованы при помощи рентгенологических, морфометрических и клинических методов. Критерием включения в группу было отсутствие костно-суставной патологии, включая недифференцированную дисплазию соединительной ткани.

Группа 2-я включала 10 пациентов (5 мужчин и 5 женщин от 18 до 21 года) с верифицированным диагнозом *ахондроплазия*, находящихся на плановом лечении по увеличению роста методом ЧДОС. Больные ахондроплазией проходили первый этап лечения.

Всем больным проводили поэтапное удлинение голени методом билочкального дистракционного остеосинтеза, использовали методики одновременного или последовательного удлинения сегмента. Дистракцию начинали на 5-е — 6-е сут. Удлинение в таком темпе продолжали в течении первых 10-е — 15-е сут. дистракции, затем меняли с учетом индивидуальных особенностей пациента. Средняя величина удлинения голени у больных АП составила $9,7 \pm 0,5$ см. Суммарный темп дистракции составил 1,25 мм/сут. Средняя величина удлинения голени пациентов перенесшие косметическую операцию по увеличению роста составила $6,5 \pm 0,7$ см. Колебания темпа тракций фрагментов происходило в пределах 0,5—1,25 мм/сут. Забор крови осуществлялся до операции на 10-е, 40-е и 70-е сут. после начала дистракции и на 10-е, 50-е и 90-е сут. после начала фиксации.

Определение ростовых факторов проводили на комплексе оборудования фирмы Thermofisher (США): детектор Multiscan FC, встряхиватель iEMS, автоматический промыватель планшет WellWash. Для измерения концентрации факторов в сыворотке крови использовали наборы для иммуноферментного анализа (ИФА): TGF- β 1, TGF- β 2; BMP-4, BMP-6. Анализ проводили в соответствии с методикой руководства к наборам eBioscience и RayBiotech Inc., производство США. Концентрацию факторов роста определяли на следующих этапах лечения: до операции; в начале, середине и конце дистракции; в начале, середине и конце периода фиксации.

При определении референтных значений концентрации факторов роста семейства TGF в сыворотке

крови не было обнаружено возрастных и половых различий, поэтому мы сочли возможным сравнение изучаемых показателей между группами.

Морфометрические исследования включали определение массы тела (кг), роста стоя и сидя (м), длину голени (м), обхват голени в верхней и нижней трети (м). На основании проведенных исследований был рассчитан индекс массы тела (ИМТ) по Кетле. Коэффициент пропорциональности (КП) вычисляли по формуле:

$$\text{КП} = \frac{(L1 - L2)}{L2} \times 100\%$$

где L1 — длина тела в положении стоя;
L2 — длина тела в положении сидя.

Соответствующим норме считали КП = 87—92% [18].

На проведение исследований было получено разрешение комитета по этике при ФГБУ РНЦ ВТО им. акад. Г.А. Илизарова. Исследования проводились в соответствии с этическими стандартами Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г., «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденной Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Всеми пациентами подписано информированное согласие на забор крови для проведения данного исследования и публикацию результатов исследований без идентификации личности.

Результаты исследований обработаны методом вариационной статистики, применяемым для малых выборок с принятием уровня значимости (ρ), равным 0,05. Статистическую значимость различий между двумя несвязанными выборками определяли по W-критерию Вилкоксона для независимых выборок. При статистической обработке результатов исследования был использован интегральный модуль AtteStat 1.0 для программы Microsoft Excel. Результаты исследования представлены в виде медиан, нижних и верхних квартилей.

Результаты и обсуждение

В последние годы возрастает число соматически здоровых людей увеличивших рост при помощи методик дистракционного остеосинтеза по Илизарову. Средний рост пациентов 1-й группы составил 160,5 см, коэффициент пропорциональности — 90%, масса тела — 52,5 кг (табл. 1), что соответствовало анатомо-функциональной норме [19, 20], однако психологически воспринималось пациентами как не соответствующее современным эстетическим кри-

Таблица 1

Некоторые соматометрические показатели пациентов перед лечением

Группа пациентов	Пациенты с косметическим увеличением роста	Ахондроплазия
Рост стоя (см)	160,50 [154,75-166,85]	104,50* [101,70-118,38]
Рост сидя (см)	84,71 [80,20-90,08]	70,00 [66,00-78,75]
Коэффициент пропорциональности, %	90,1 [85,7-96,5]	49,4* [48,6-53,8]
Вес (кг)	52,500 [47,750-59,120]	21,600* [19,500-27,250]
ИМТ Кетле	20,22 [19,21-21,83]	19,28 [18,75-19,95]
Тип телосложения	Нормостеническое	Диспластическое

Примечание. Данные представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей; * — различия между группами статистически значимо при $p \leq 0,05$

Таблица 2

Концентрация TGF- β 1 и TGF- β 2 в сыворотке крови пациентов на этапах увеличения голени методом чрезкостного дистракционного остеосинтеза по Илизарову

Группа пациентов	Пациенты с косметическим увеличением роста		Ахондроплазия		
	ФР	TGF- β 1 (нг/мл)	TGF- β 2 (нг/мл)	TGF- β 1 (нг/мл)	TGF- β 2 (нг/мл)
Этап					
До операции		14,24 [13,59-15,85]	3,06 [2,76-3,20]	20,64* [18,59-21,39]	2,11* [1,82-2,41]
Начало дистракции, 10-е сут.		32,00# [30,25-33,58]	4,86# [3,91-5,12]	3,43*# [3,38-3,57]	1,53*# [1,20-1,66]
Середина дистракции, 40-е сут.		29,26# [27,96-30,16]	5,04# [4,27-5,61]	7,59*# [7,46-7,98]	0,44*# [0,39-0,47]
Конец дистракции, 70-е сут.		24,03# [23,57-24,95]	2,09# [2,06-2,25]	22,68 [20,54-25,11]	3,93*# [3,75-4,01]
Начало фиксации, 10-е сут.		7,39# [7,21-7,49]	4,67# [4,13-5,16]	17,53* [16,49-18,76]	0,73*# [0,58-0,84]
Середина фиксации, 50-е сут.		11,40# [11,05-11,97]	4,08# [3,84-4,59]	19,62* [18,35-20,47]	3,37# [2,81-4,12]
Конец фиксации, 90-е сут.		10,39# [9,86-11,82]	4,12 [3,14-4,80]	21,69* [21,03-22,59]	1,63* [1,48-1,95]

Примечание. Данные представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей; * — различия между группами статистически значимы при $p \leq 0,05$; # — различия статистически значимы при $p \leq 0,05$ по сравнению с дооперационным уровнем.

териям. Кроме того, необходимость увеличения роста они объясняли требованиями их профессии. Решение об увеличении роста оперативным методом принималось персонифицировано для каждого пациента, исходя из его психологического, ортопедического и соматического статуса¹.

Эстетический аспект в лечении пациентов с ахондроплазией не являлся преобладающим мотивом, но большая часть пациентов придавала ему значительную роль. В антропометрической практике для оценки фундаментальных пропорций тела используют коэффициент пропорциональности, в норме равный 87—92% [21]. Фактически данный коэффициент показывает процент длины нижних конечностей от длины туловища [18]. Как видно из табл. 1, среднее значение роста сидя и ИМТ Кетле у пациентов с ахондроплазией и аналогичные показатели у здоровых людей статистически значимо не отличались, в то время как коэффициент пропорциональности различался почти в 2 раза.

Поскольку известно, что секреция представителей семейства TGF-бета и их концентрация в циркулиру-

ющей крови напрямую связаны [22], и учитывая их важнейшую роль в физиологическом и репаративном костеобразовании, мы сочли возможным изучение сывороточной концентрации факторов роста семейства TGF- β на этапах дистракционного остеогенеза физически здоровых лиц, перенесших операцию по увеличению роста с косметической целью. В табл. 2 представлены значения концентрации TGF- β 1 и TGF- β 2 в сыворотке крови пациентов на этапах удлинения голени методом ЧДОС по Илизарову.

Концентрация TGF- β 1 в сыворотке крови людей с косметическим увеличением роста, достигала максимума в начале дистракции, увеличиваясь в 2 раза, и оставалась таковой вплоть до окончания периода тракции, статистически значимо снижаясь в начале фиксации. В середине и в конце периода фиксации содержание TGF- β 1 в сыворотке крови людей с косметическим увеличением роста приближалось к дооперационным значениям, оставаясь, однако, статистически значимо ниже дооперационного уровня. Ди-

¹ Новиков К.И. Удлинение бедра у детей и подростков при ахондроплазии: Дис. ... канд. мед. наук. Курган; 2001.

динамика содержания TGF-β2 в сыворотке крови людей с косметическим увеличением роста на этапе distraction в целом соответствовала динамике содержания TGF-β1. На этапе фиксации концентрация TGF-β2 в сыворотке крови пациентов повышалась и до конца этого периода превышала дооперационные значения. Таким образом, вплоть до снятия аппарата концентрация TGF-β1 в сыворотке крови оставалась более чем на 30% ниже, а TGF-β2 более чем на 30% выше нормальных значений для данной группы пациентов. Подобная динамика сывороточных концентраций TGF-β1 и TGF-β2 отмечена и другими авторами, полагающими, что TGF-β1 рано представлены в растущих и обновляющихся структурах в процессе морфогенеза, тогда как TGF-β2 проявляется позже в зрелых и дифференцирующихся клетках [9].

У больных с ахондроплазией концентрация TGF-β1 в сыворотке крови в 1,5 раза превышала содержание этого фактора в крови людей с косметическим увеличением роста, тогда как сывороточные концентрации TGF-β2 были в 1,5 раза ниже, чем у соматически здоровых лиц (табл. 2). В процессе удлинения голени, на начальных этапах distraction содержание TGF-β1 в крови больных ахондроплазией уменьшалось более чем в 6 раз, поднималось на более поздних этапах, к концу distraction достигало дооперационных значений и сохранялось на таком уровне на протяжении всего периода фиксации. Концентрация TGF-β2 в сыворотке крови больных ахондроплазией на этапах удлинения также имела обратную зависимость по сравнению с группой пациентов с косметическим увеличением роста. Минимальное содержание TGF-β2 в сыворотке крови больных наблюдалось в середине distraction. Примечательно, что, несмотря на противоположную динамику в процессе лечения, содержание TGF-β2 в сыворотке кро-

ви пациентов обеих групп в конце периода фиксации статистически значимо не отличалось от дооперационных значений.

Результаты исследования сывороточных концентраций некоторых представителей подсемейства BMP представлены в табл. 3. У людей с косметическим увеличением роста концентрация BMP-4 в сыворотке крови в течение всего периода тракций не отличалась от дооперационного уровня, повышалась в 1,5 раза в начальном периоде фиксации, затем снижалась и к моменту снятия аппарата была на 46% ниже дооперационных значений. Принципиально другая динамика содержания BMP-4 наблюдалась в крови больных ахондроплазией. При дооперационном исследовании было выявлено почти двукратное снижение концентрации данного фактора в крови ахондропатов, затем на начальных этапах удлинения происходило увеличение его концентрации, которая достигала максимума в конце периода distraction. В течение всего периода фиксации содержание BMP-4 в крови больных с ахондроплазией не отличалось от значений здоровых людей.

Содержание BMP-6 в сыворотке крови людей с косметическим увеличением роста последовательно увеличивалось в течение distraction, более чем в 3 раза превышая дооперационный уровень в конце данного периода, снижалось в периоде фиксации и к моменту снятия аппарата не отличалось от дооперационного значения. Изменения концентрации BMP-6 у пациентов с ахондроплазией носили подобный, но менее выраженный характер. Так, увеличение содержания BMP-6 в конце периода distraction составило 200%, в период фиксации оно снижалось, оставаясь, однако выше более чем в 3 раза дооперационных значений, наблюдаемых у лиц с косметическим увеличением роста.

Таблица 3

Концентрация BMP-4 и BMP-6 в сыворотке крови пациентов на этапах увеличения голени методом чрескостного distractionного остеосинтеза по Илизарову

Группа пациентов	Пациенты с косметическим увеличением роста		Пациенты с ахондроплазией		
	ФР	BMP-4 (нг/мл)	BMP-6 (нг/мл)	BMP-4 (нг/мл)	BMP-6 (нг/мл)
Этап					
До операции		99,2 [90,4–112,5]	42,7 [30,5–58,4]	44,8* [31,9–66,4]	163,1* [111,5–193,2]
Начало distraction, 10 день		107,5 [95,8–121,3]	55,5 [42,7–71,7]	100,6# [86,9–117,2]	239,8* [212,1–340,7]
Середина distraction, 40 день		88,5 [78,3–100,2]	93,3# [79,9–108,5]	145,1* [130,5–162,6]	298,1* [200,5–346,1]
Конец distraction, 70 день		97,1 [80,0–114,2]	135,7# [122,9–153,4]	161,8*# [145,1–179,7]	331,1* [275,8–375,3]
Начало фиксации, 10 день		149,5# [140,6–162,5]	117,2# [104,2–132,5]	63,8* [45,3–91,9]	169,3* [137,3–192,5]
Середина фиксации, 50 день		97,7 [95,2–115,8]	86,4# [73,5–100,8]	70,9* [60,5–94,6]	117,2# [72,3–153,8]
Конец фиксации, 90 день		54,1# [41,7–67,9]	44,1 [31,7–58,6]	106,1*# [93,5–123,5]	150,6*# [113,5–194,9]

Примечание. Данные представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей; * — различия между группами статистически значимы при $p \leq 0,05$; # — различия статистически значимы при $p \leq 0,05$ по сравнению с дооперационным уровнем.

Заключение

К настоящему времени известно, что ахондроплазия является следствием генной мутации в одной из хромосом 4-й пары в локусе, соответствующем кодированию аминокислотной последовательности полипептидной цепи тирозинкиназы, являющейся трансмембранным рецептором фактора роста фибробластов 3 (FGFR3) [23, 24]. Это точечная мутация в нуклеотиде 1138 сДНК, которая приводит к замене аргининового остатка глицином в трансмембранной зоне генного рецептора [25]. Этим как правило объясняют дефекты экспрессии у больных ахондроплазией коллагена типа II, протеогликанов и других компонентов органического происхождения, включающихся в структурный состав соединительной ткани [26, 27].

Предполагается, что в условиях остеотомии с последующим удлинением голени будут выявлены другие изменения в секреции остеотропных факторов роста. Известно, что рост сосудов детерминирован балансом между его стимуляторами и ингибиторами. Концентрация исследуемых факторов в сыворотке крови людей с ахондроплазией статистически значимо отличалась от значений пациентов с косметическим увеличением роста. При этом еще до ортопедического лечения сывороточные концентрации TGF- β 2 и BMP-4, были ниже, а TGF- β 1 и BMP-6 выше, чем их концентрации в сыворотке крови пациентов с косметическим увеличением роста [28].

Удлинение костей голени при косметическом увеличении роста приводило к росту содержания в сыворотке крови факторов TGF- β 1 и TGF- β 2 на этапах начала и середины distraction. При этом изменение сывороточной концентрации TGF- β 1 происходило быстрее и было более выраженным (более чем в 2 раза), чем изменение концентрации TGF- β 2. У пациентов с ахондроплазией, находящихся на этапах удлинения костей голени, наблюдалась обратная динамика изменений концентраций данных факторов. Так, значительное их снижение в сыворотке крови пациентов данной группы происходило на этапах начала и середины distraction. То есть на ранних этапах костеобразования, когда структура регенерата активно подвергается морфогенезу, у людей с ахондроплазией наблюдается дефицит TGF- β 1. Концентрация BMP-4 и BMP-3 у пациентов с ахондроплазией к концу distraction увеличивается в 3,5 и 2 раза соответственно, снижаясь в периоде фиксации.

Полученные данные позволяют сделать заключение, что у пациентов с ахондроплазией существуют значительные отличия в концентрации ростовых факторов в сыворотке крови относительно показателей здоровых людей. Расшифровка патофизиологических механизмов в данном случае достаточно сложна, так как факторы роста синтезируются многочисленными неспециализированными клетками, находящимися во

всех тканях, и эффекты, реализуемые данным фактором роста сходны. Применительно к костной ткани таким эффектом TGF- β является его способность оказывать разнонаправленное влияние на костную ткань. С одной стороны TGF- β 2 — мощный стимулятор выработки коллагена, с другой он значительно активизирует остеокласты, тем самым усиливая резорбцию кости [29, 30]. Следовательно, сохранение низких концентраций данного фактора в сыворотке крови пациентов с ахондроплазией в ходе оперативного лечения данной патологии может свидетельствовать о неблагоприятном течении репаративного остеогенеза.

References

- Gubin A.V., Borzunov D.Yu., Marchenkova L.O., Smirnova I.L. Scientific legacy of academician GA Ilizarov: a view from the past to the future (part I) (dedicated to the 95th anniversary of the birth of Academician G.A. Ilizarov). *Geniy ortopedii*. 2016; 2: 6-12. (in Russian)
- Shchukin A.A., Aranovich A.M., Popkov A.V., Popkov D.A. Evaluation of the results of lengthening of the lower limbs in patients with systemic skeletal diseases accompanied by pathologically low growth. *Geniy ortopedii*. 2014; 2: 44-51. (in Russian)
- Stogov M.V., Luneva S.N., Tkachuk Y.A. Biochemical parameters in the prediction of the course of osteoreparative processes in skeletal injury. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2010; (12): 5-7.
- Popkov A.V. *Intramedullary implants in the treatment of fractures of long tubular bones and their consequences*. Deutschland: Palmarium Academic Publishing; 2016. (in Russian)
- Reddi A.H. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat. Biotechnol.* 1998; 16(3): 247-52.
- Poplavets E.V., Nemtsov L.M. The significance of the transforming growth factor β in diseases of the gastrointestinal tract. *Vestnik VGMU*. 2010; 9(1): 56-63. (in Russian)
- Novik A.A., Kamilov T.A., Tsygan V.N. Introduction to the molecular biology of carcinogenesis. *Geotar — Med*. 2004. (in Russian)
- Parekh T.V., Gama P., Xie W. et al. Transforming growth factor- β signaling is disabled early in human endometrial carcinogenesis concomitant with loss of growth inhibition. *Cancer Res*. 2002; 62: 27778 — 90.
- Blobe G.C. et al. Role of transforming growth factor β in human disease. *N. Engl. J. Med*. 2000; 342: 1350 — 8.
- Klass B.R., Grobbelaar A.O., Rolfe K.J. Transforming growth factor β 1 signalling, wound healing and repair: a multifunctional cytokine with clinical implications for wound repair, a delicate balance. *Postgraduate Medical Journal*. 2009; 85: 9 — 14.
- Harradine K.A. Mutations of TGF- β signaling molecules in human disease. *Annals of medicine*. 2006; 38(6): 403 — 14.
- Gorkun A.A., Kozhina K.V., Zurina I.M., Kosheleva N.V., Saburina I.N. Pathophysiological and molecular mechanisms of extracellular matrix protein resorption during skin aging, and the ways to their restoration. *Patologicheskaya Fizologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60 (4): 128-33. (in Russian)
- Piek E., Heldin C.H., Ten Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF- β superfamily signaling. *Faseb*. 1999; 13: 2105 — 24.

14. Rudoy A.S. TGF — beta — dependent pathogenesis of Marfan syndrome and related hereditary connective tissue disorders. *Arterial'naya gipertenziya*. 2009; 15(2): 223 — 6. (in Russian)
15. Sanchez-Capelo A. Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005; 16(1): 15 — 34.
16. Hari Reddi A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): From morphogens to metabologens. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009; 20 (5-6): 341 — 2.
17. Sturm A., Sturm A. et al. Transforming growth factor-beta and hepatocyte growth factor plasma levels in patients with inflammatory bowel disease. *Eur. J.Gastroenterol. Hepatol*. 2000; 12(4): 445 — 50.
18. Il'inich V.I. *Physical culture of the student*. Moscow; Gardariki, 2000. (in Russian)
19. Khomutov A. B. *Anthropology*. Rostov n/D: Feniks, 5 izd. 2004. (in Russian)
20. Mikhel' D.V. *Social anthropology of medical systems: medical anthropology. Textbook for students*. Saratov: Novyy proekt; 2010. (in Russian)
21. Ovcharenko V.A., Luk'yanova N.E. *Anthropology. Tutorial*. INFRA; 2010. (in Russian)
22. Kishkun A.A. *Biological age and aging: the possibilities of determination and the path of correction: A guide for physicians*. Moscow; GEOTAR-Media; 2008. (in Russian)
23. Laederich, M.B. and Horton, W.A. Achondroplasia: pathogenesis and implications for future treatment. *Curr. Opin. Pediatr*. 2010; 22: 516-23.
24. Garcia S., Dirat B., Tognacci T., Rochet N., Mouska X., Bonnafous S., et.al. Postnatal soluble FGFR3 therapy rescues achondroplasia symptoms and restores bone growth in mice. *Sci. Transl. Med*. 2013; 5, 203-5.
25. Wendt D.J., Dvorak-Ewell M., Bullens S., Lorget F., Bell S.M., et al. Neutral endopeptidase-resistant C-type natriuretic peptide variant represents a new therapeutic approach for treatment of fibroblast growth factor receptor 3-related dwarfism. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2015; 353: 132-49.
26. Horton W.A. and Degenin, C.R. FGFs in endochondral skeletal development. *Trends Endocrinol. Metab*. 2009; 20: 341-8.
27. Hartmann J.T., Haap M., Kopp H.G., Lipp H.P. Tyrosine kinase inhibitors—a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Curr. Drug. Metab*. 2009; 10: 470-81.
28. Cheng H., Jiang W., Phillips F., Haydon R., Peng Y., Zhou L. et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am*. 2003; 85-A(8): 1544-52.
29. Klimov O.V. Calculation and control of the biomechanical axis of the lower limb in the frontal plane with its correction according to Ilizarov. *Rossiyskiy zhurnal biomekhaniki*. 2014; 18(2): 239 — 47. (in Russian)
30. Ibbotson K.J., Harrod J., Gowen M., D'Souza S., Smith D.D., Winkler M.E. et al. Human recombinant transforming growth factor alpha stimulates bone resorption and inhibits formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1986; 83 (7): 2228-32.

Сведения об авторах:

Выхованец Евгения Петровна, аспирант лаб. биохимии, e-mail: vykhovanets.eva@mail.ru

Сакулин Никита Владимирович, аспирант лаб. биохимии

Лулева Светлана Николаевна, доктор биол. наук, проф., зав.лаб. биохимии

Накоскина Наталья Викторовна, мл. науч. сотр. лаб. биохимии

Климов Олег Владимирович, канд. мед. наук, врач высшей категории

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616-092

Мусалаева И.О.¹, Тарасенко Е.В.¹, Азова М.М.¹, Галина Т.В.¹, Мяндина Г.И.¹, Оленев А.С.²

Роль полиморфного варианта *G-105A* гена *SEPS1* в инициации преждевременных родов

¹ Российский университет дружбы народов, медицинский институт, 117198, г. Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

² Городская клиническая больница № 24 Департамента здравоохранения города Москвы, Перинатальный центр, 127287, г. Москва, Россия, 4-й Вятский переулок, д. 39

Причины спонтанных преждевременных родов до конца не изучены. К факторам риска спонтанных преждевременных родов относятся: акушерско-гинекологический анамнез, осложнения текущей беременности, наличие инфекционных осложнений, генетическая предрасположенность, социальные причины, сопутствующие заболевания. Одним из таких факторов риска может быть полиморфный вариант *G-105A* гена селенопротеина S (*SEPS1*), который может рассматриваться как претендент на роль нового маркера воспаления. **Цель исследования** — изучение ассоциации полиморфного варианта *G-105A* гена *SEPS1* с риском преждевременных родов у женщин европейской популяции в городе Москве. **Методы.** В исследование включены 33 женщины с преждевременными родами на сроках от 23,5 до 37 недель беременности и 29 женщин с доношенной беременностью (контрольная группа). Исследование проводилось после получения информированного согласия от пациентов. Генотипирование полиморфного варианта *G-105A* гена *SEPS1* осуществляли методом ПЦР-ПДРФ анализа. **Результаты.** В проведенном исследовании было показано, что частота встречаемости аллеля А полиморфного варианта *G-105A* гена *SEPS1* 2.0 раза выше у женщин с преждевременными родами чем в контрольной группе. Впервые выявлены статистически значимые различия в частотах генотипов полиморфного варианта *G-105A* гена *SEPS1* между контрольной и исследуемой группами ($\chi^2 = 3.921$, $p = 0.0477$ и по критерию Z ($t = 2.07$, $p = 0.0431$)). **Выводы.** В случае подтверждения полученных результатов полиморфный вариант гена *G-105A* *SEPS1* может быть использован для скрининга высокого риска преждевременных родов у женщин на ранних сроках беременности.

Ключевые слова: преждевременные роды, спонтанные преждевременные роды, воспаление, генетические маркеры.

Для цитирования: Мусалаева И.О., Тарасенко Е.В., Азова М.М., Галина Т.В., Мяндина Г.И., Оленев А.С. Роль полиморфного варианта *G-105A* гена *SEPS1* в инициации преждевременных родов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 77—81.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.77-81

Для корреспонденции: Мусалаева Индира Омаровна, e-mail: i700@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.01.18

Musalaeva I.O.¹, Tarasenko E.V.¹, Azova M.M.¹, Galina T.V.¹, Myandina G.I.¹, Olenev A.S.²

The role of polymorphous variant *G-105A* of *SEPS1* gene in the initiative of premature birth

¹ Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6 Miklukho-Maklaya St, 117198, Moscow, Russia

² City Clinical Hospital No. 24 DZM, Perinatal Center, 4th Vyatsky pereulok, 39, 127287 Moscow, Russia

Causes of spontaneous preterm birth are not fully understood. Risk factors for spontaneous preterm labor include obstetric and gynecological anamnesis, complications of current pregnancy, presence of infectious complications, genetic predisposition, social reasons, accompanying illnesses. One of these risk factors may be the polymorphic variant of the *G-105A* of the selenoprotein S (*SEPS1*) gene, which can be considered as a candidate for the role of a new marker of inflammation. **The aim** of the study was to study the association of the polymorphic variant *G-105A* of the *SEPS1* gene with the risk of premature birth in women of the European population in Moscow. **Methods.** The study included 33 women with preterm delivery at terms from 23.5 to 37 weeks of pregnancy and 29 women with full term pregnancy (control group). The study was conducted after obtaining informed consent from patients. Genotyping of polymorphic variant *G-105A* of *SEPS1* gene was carried out by PCR-RFLP analysis. **Results.** In the study, it was shown that the incidence of allele A of polymorphic variant *G-105A* of the *SEPS1* gene is 2.0 fold higher in women with premature birth than in the control group. For the first time, statistically significant differences in the genotype frequencies of the polymorphic variant *G-105A* of the *SEPS1* gene were

established between the control and the study groups ($\chi^2 = 3.921$, $p = 0.0477$ and according to the Z (t = 2.07, $p = 0.0431$) test). **Conclusions.** Such findings can assume that polymorphous variant G-105A of *SEPS1* gene may be a potential gene marker for preterm birth.

Key words: preterm birth; spontaneous preterm birth; inflammation; gene marker.

For citation: Musalaeva I.O., Tarasenko E.V., Azova M.M., Galina T.V., Myandina G.I., Olenev A.S. The role of *SEPS1* G-105A gene polymorphism in the initiation of premature birth. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 77—81. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.77-81

For correspondence: Musalaeva Indira Omarovna, e-mail: i700@mail.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Musalaeva I.O., <http://orcid.org/0000-0001-6588-5653>

Received 11.01.18

Введение

По данным ВОЗ (2014 г.), ежегодно рождается порядка 15 миллионов недоношенных детей. Преждевременными считаются роды, наступившие в сроки беременности от 22 до 37 недель. С преждевременными родами (ПР) связано порядка 75% случаев перинатальной смертности. Причины спонтанных преждевременных родов (СПР) до конца не изучены. К факторам риска СПР относятся: акушерско-гинекологический анамнез (гинекологические заболевания, исходы предыдущих беременностей и родов), осложнения текущей беременности, гестозы, многоплодие, многоводие, предлежание плаценты), социальные причины (возраст, вредные привычки, условия жизни), сопутствующие заболевания (пороки сердца, заболевания почек, острые инфекционные заболевания). Частота ПР в разных странах составляет 5—12% [1]. По данным разных авторов порядка 40% СПР обусловлено наличием инфекции [2]. У 80% детей, родившихся в срок до 30-й недели беременности, диагностируется гистологически верифицированный хориоамнионит [3].

Воспалительные процессы играют значимую роль в развитии многих заболеваний. К настоящему времени идентифицировано достаточно большое количество генов, продукты которых могут считаться маркерами воспаления, либо которые напрямую связаны с реализацией инфекционных процессов в организме [4]. Таким образом, известно более 200 цитокинов (интерлейкины (*IL*), факторы некроза опухолей (*TNF- α*), интерфероны, факторы роста), также маркерами воспаления являются С-реактивный белок, трансформирующий ростовой фактор (*TGF- β*) и многие другие. Активное изучение полиморфных вариантов генов интерлейкинов позволило установить взаимосвязь между различными аллельными вариантами этих генов с развитием ПР, развитием астмы, онкологиче-

ских заболеваний, вирусного гепатита, ревматоидного артрита и многих других заболеваний. В настоящее время накоплено большое количество данных о роли воспаления в развитии преждевременных родов [5, 6]. Так, например, выявлена корреляция полиморфизма генов *IL-1 β* , толл-подобных рецепторов (*TLR*) с невынашиванием беременности и преждевременными родами [5, 7, 8, 9, 10]. В человеческом организме существует особый класс белков — селенопротеины, один из которых, *SEPS1* может рассматриваться как претендент на роль нового маркера воспаления. Белки селенопротеины содержат один или несколько остатков селеносодержащей аминокислоты селеноцистеина и выполняют разнообразные функции. Так, селенопротеин Р входит в состав плазмы крови и отвечает за безопасный транспорт химически активного селена по организму, а глутатионпероксидазы защищают ткани организма от окислительного повреждения и представляют собой селеносодержащие гликопротеины.

В семействе селенопротеинов особым нестандартным протеином является селенопротеин S. Он оказывает влияние на иммунные и воспалительные сигнальные пути [10]. Селенопротеин S может быть классифицирован как новый мембранный протеин предотвращающий стрессовый ответ на активацию воспалительного каскада. В гене *SEPS1* обнаружено несколько полиморфизмов, на настоящий момент практически не изученных. Для полиморфного варианта G-105A (*rs28665122*) гена *SEPS1* показана корреляции с риском возникновения преждевременных родов у женщин в китайской популяции [11], риском развития рака желудка у японцев и китайцев [5, 10], риском развития рака легких у норвежцев [6]. В то же время есть данные, что в зависимости от этнической принадлежности и различного влияния экологии генетические проявления могут различаться [12].

Поскольку исследования полиморфного варианта G-105A (rs28665122) гена *SEPS1* в Российской Федерации не проводились, представляется весьма актуальным изучение ассоциации данного полиморфного варианта гена с преждевременными родами в московской популяции.

Методика

Исследование проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288).

В данное исследование были включены 33 женщины с преждевременными родами на сроках от 23,5 до 37 недель беременности. В качестве контрольной группы выступали 29 женщин с доношенной беременностью. Исследование проводилось при получении письменного информированного согласия пациентов.

Кровь для исследования забирали у пациенток родильных домов №29 и №8. Кровь собирали в пробирки с EDTA и хранили при температуре — 20°C. ДНК выделяли из лейкоцитов крови наборами «ДНК-экспресс-кровь» производства ООО «Синтол».

Для анализа полиморфного варианта G-105A (rs28665122) гена *SEPS1* использовался метод определения полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ, RFLP-restriction fragment length polymorphism).

Реакцию ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси содержащей 20 нг ДНК, 0,2 мкм каждого праймера, 0,2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфата и 0,5 ед Таг-полимеразы в 1х буфере (ООО «Синтол»). Амплификацию проводили по программе: 95°C — 2 мин; 35 циклов (94°C — 30 с; 57°C — 30 с; 72°C — 30 с и 72°C — 7 мин). ПЦР проводили на амплификаторе Терцик (ДНК-технология, Россия). В работе были использованы следующие праймеры: прямой 5'-TCSTTGGCTTCAGTGTCCAAT-3' и обратный 5'-CGCGGACAGAGACTCCTCTT-3' [5]. Обязательно ставили негативный контроль, содержащий вместо матрицы деионизованную воду. Далее амплифицированный фрагмент ДНК длиной 370 н.п. подвергали обработке эндонуклеазой Mox20 I (НПО «Сибэзним») [5]. Расщепление ДНК проводили в объеме 20 мкл в рекомендованном производителем буфере и соответствующей температуре в течение 1,5 часов. Проверка полноты расщепления ДНК рестриктазами осуществлялась путём расщепления 1 мкг фага лямбда за 1 час. Для продукта амплифика-

ции использовали трёхкратное количество фермента. Фрагменты ДНК после рестрикции разделяли в 3% агарозном геле с бромистым этидием. Электрофорез проводили в горизонтальной камере с использованием в качестве электродного буфера 1хТАЕ при напряженности поля 10 В/см. По окончании электрофореза гель просматривали в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм.

У носителей аллеля G фрагмент ДНК гена *SEPS1* имеет размер 370 н.п., в то время как у носителей аллеля A фрагмент ДНК имеет размер 233 и 137 н.п. У носителей гетерозиготного генотипа выявляются все три фрагмента.

Математическую обработку результатов проводили с использованием закона генетического равновесия Харди—Вайнберга для аутосомных признаков. При сравнении частот встречаемости генотипов применяли критерий Пирсона. Комплексную оценку взаимосвязей между исследуемыми генотипами и риском заболевания проводили с помощью логистической регрессии, определяя отношение шансов (OR) и 95% доверительный интервал (CI_{95%}), значение $p < 0,05$. Анализ с использованием Z-критерия (аналог критерия Стьюдента для долей) проводили в системе для статистического анализа данных Statistica 6.1 RUS.

Работа выполняется на базе межкафедральной лаборатории молекулярных методов исследования Медицинского института РУДН. Выделение ДНК проводится на базе ЦКП НОЦ РУДН.

Результаты и обсуждение

Популяционная частота аллелей гена *SEPS1* в разных популяциях изучена недостаточно. По данным Yan Wang с соавт. среднепопуляционная частота аллеля A гена в китайской популяции составляет 6%. Частота гетерозигот GA полиморфного варианта G-105A гена *SEPS1* в данной популяции составляет 11,1%, частота гомозигот AA — 0,2% [11]. Нами получены предварительные данные, согласно которым, популяционная частота аллеля A среди европейской популяции в городе Москве составляет 12%, что значительно превышает частоту встречаемости данного аллеля в китайской популяции, что согласуется с данными из базы 1000 genomes (<http://www.1000genomes.org/>).

По предварительным данным, в группе женщин с преждевременными родами частота встречаемости аллеля A полиморфного варианта G-105A гена *SEPS1* статистически значимо выше, чем в контрольной группе (24,2% против 12,1%, $p < 0,05$).

Распределение частот генотипов полиморфного варианта G-105A гена *SEPS1* в контрольной группе и группе пациенток с недоношенной беременностью

Таблица

Частота генотипов гена *SEPS1* и показатели статистических различий между группами

Генотип <i>SEPS1</i>	Группа с невынашиванием (недоношенные)		Контрольная группа		Критерий Z / p	Критерий χ^2 / p
	N = 33	%	N = 29	%		
GG	17	51,5%	22	75,9%	t = 2,07/0,0431	3,921/0,0477
AG	16	48,5%	7	24,1%		
AA	0	0%	0	0%		
Итого	33	100%	29	100%		

(таблица) соответствует аддитивной модели наследования (тест Кохрана—Армитаджа для линейных трендов). Следует подчеркнуть, что наличие даже одного аллеля *A* полиморфного варианта *G-105A* гена *SEPS1* может провоцировать преждевременные роды (доминантная модель наследования: GG против (AG+AA), OR = 2,96, CI_{95%} = (0,99 — 8,8)).

Выводы

Таким образом, исследование полиморфного варианта *G-105A* гена *SEPS1* при угрозе возникновения преждевременных родов может быть использовано как один из скрининговых методов диагностики риска реализации ПР.

Список литературы

1. Скрипниченко Ю.П., Баранов И.И., Токова З.З. Статистика преждевременных родов. *Проблемы репродукции*. 2014 (4): 11-14.
2. Allen-Daniels M. J., Serrano M. G., Pflugner L. P., Fettweis J.M., Prestosa M.A., Koparde V. N. et al. Identification of a gene in *Mycoplasma hominis* associated with preterm birth and microbial burden in intraamniotic infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2015; 212 (6): 779.e1-779.e13.
3. Радзинский В. Е. Акушерство. ГЭОТАР-Медиа. 2015. P. 728.
4. York T.P., Eaves L.J., Neale M.C. Strauss J.F. The contribution of genetic and environmental factors to the duration of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2014; 210(5): P. 398 — 405.
5. Huajie Mao, Ruifang Cui, Xiaochun Wang. Association analysis of selenoprotein S polymorphisms in Chinese Han with susceptibility to gastric cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(7): 10993-10999.
6. Hart K., Landvik N.E., Lind H. Skaug V, Haugen A and Zienolddiny S. A combination of functional polymorphisms in the CASP8, MMP1, IL10 and SEPS1 genes affects risk of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2011; 71(2): 123-129.
7. Noguchi T., Sado T., Naruse K. Evidence for Activation of Toll-Like Receptor and Receptor for Advanced Glycation End Products in Preterm Birth. *Mediators of Inflammation*. 2010; 2010: e490406.
8. Langmia I.M., Apalasy Y.D., Omar S.Z, Mohamed Z. et al. Impact of IL1B gene polymorphisms and interleukin 1B levels on susceptibility to spontaneous preterm birth. *Pharmacogenet Genomics*. 2016; 26(11): 505-509.

References

1. Skripnichenco U.P., Baranov I.I., Tokova Z.Z. Statistics of the preterm births. *Problemy reproduktivnoy. 2014; 4: 11-14. (in Russian)*
2. Allen-Daniels M.J., Serrano M.G., Pflugner L.P., Fettweis J.M., Prestosa M.A., Koparde V.N. et al. Identification of a gene in *Mycoplasma hominis* associated with preterm birth and microbial burden in intraamniotic infection. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2015; 212 (6): 779.e1-779.e13.
3. Radsinski V.E. *Obstetrics. [Akusherstvo]*. GEO-TAR-Media. 2015. (in Russian)
4. York T.P., Eaves L.J., Neale M.C. Strauss J.F. The contribution of genetic and environmental factors to the duration of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2014; 210(5): P. 398 — 405.
5. Huajie Mao, Ruifang Cui, Xiaochun Wang. Association analysis of selenoprotein S polymorphisms in Chinese Han with susceptibility to gastric cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(7): 10993-10999.
6. Hart K., Landvik N.E., Lind H. Skaug V, Haugen A and Zienolddiny S. A combination of functional polymorphisms in the CASP8, MMP1, IL10 and SEPS1 genes affects risk of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2011; 71(2): 123-129.
7. Noguchi T., Sado T., Naruse K. Evidence for Activation of Toll-Like Receptor and Receptor for Advanced Glycation End Products in Preterm Birth. *Mediators of Inflammation*. 2010; 2010: e490406.
8. Langmia I.M., Apalasy Y.D., Omar S.Z, Mohamed Z. et al. Impact of IL1B gene polymorphisms and interleukin 1B levels on susceptibility to spontaneous preterm birth. *Pharmacogenet Genomics*. 2016; 26(11): 505-509.

9. Yang X., Peng W., Zhu L.N, Zhang X., Wang Y. Association between interleukin-1 β C+3953T and genetic susceptibility to spontaneous preterm birth: a case-control study. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2016; 18(11): 1123-1129.

10. Shibata T., Arisawa T., Tahara T., Ohkubo M., Yoshioka D., Maruyama N. et al. Selenoprotein S (SEPS1) gene -105G>A promoter polymorphism influences the susceptibility to gastric cancer in the Japanese population. *BMC Gastroenterol*. 2009; 9:2.

11. Wang Y., Yang X., Zheng Y., Wu Z.H., Zhang X.A., Li Q.P., He X.Y., Wang C.Z., Feng Z.C. The SEPS1 G-105A Polymorphism Is Associated with Risk of Spontaneous Preterm Birth in a Chinese Population. *PLoS One*. 2013; 8(6): e65657.

12. Sun H.Y., Liu T.B., Wang Q.C., Wu W.Q., He Y.J. Single nucleotide polymorphism in the SEPS1 gene may contribute to the risk of various human diseases: a meta-analysis. 2016; 43(5): 469-479.

Сведения об авторах:

Мусалаева Индира Омаровна, аспирант каф. акушерства и гинекологии РУДН, e-mail: i700@mail.ru

Галина Татьяна Владимировна, проф. каф. акушерства и гинекологии РУДН, e-mail: tatiana.galina1@mail.ru

Оленев Антон Сергеевич, зам. гл. врача, зав. филиалом 2 ГКБ 24 ДЗМ, e-mail: felidis@mail.ru

Тарасенко Екатерина Владимировна, доцент каф. биологии и общей генетики Медицинского института РУДН, e-mail: tarasenko_ev@inbox.ru

Мяндина Галина Ивановна, проф. каф. биологии и общей генетики Медицинского института РУДН, e-mail: gmyand@mail.ru

Азова Мадина Мухамедовна, зав. каф. биологии и общей генетики Медицинского института РУДН, e-mail: azovam@mail.ru

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616.379-008.64

Федорова Т.В.¹, Торкова А.А.¹, Лисицкая К.В.¹, Алчинова И.Б.²

Гипогликемические свойства пектина из тыквы (*Cucurbita maxima d.*) при аллоксан-индуцированном сахарном диабете

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, 119071, г. Москва, Россия, Ленинский просп., д. 33, стр. 2

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

Биохимическим маркером сахарного диабета и его тяжелейших осложнений является гипергликемия. В качестве новых средств растительного происхождения, обладающих гипогликемической активностью, в настоящее время рассматривают пектины. **Цель** исследования — оценка функциональных свойств пектина, полученного из тыквенного жома с использованием кавитационно-мембранной технологии. **Методика.** Использована модель аллоксан-индуцированного сахарного диабета. Эксперимент проводили на крысах — самцах Wistar (инъекции раствора аллоксана моногидрата из расчета 43 мг/кг массы). Развитие диабета подтверждалось уровнем глюкозы (>10 мМ) в периферической крови. Для тестирования гипогликемической активности тыквенного пектина опытной группе крыс внутрижелудочно с помощью металлического зонда (Kent Scientific, США) вводили 5% раствор пектина в дистиллированной воде в дозировке 25 мг/100 г живой массы в сутки в течение 3 нед. Пектин, полученный из тыквенного жома с использованием кавитационно-мембранной технологии, имел следующие характеристики: диапазон молекулярных масс 90—120 кДа, содержание полигалактуроновой кислоты в среднем около 75% и степень этерификации 72%, что позволяет его отнести к пектинам с высокой степенью этерификации. **Результаты.** У животных 2-й и 3-й групп по истечении 1—3 нед. после воспроизведения диабета выявлена гипергликемия — уровень глюкозы в цельной крови был значимо выше. Статистический анализ «size effect» показал, что в начале эксперимента различия в уровне глюкозы в крови животных 2-й и 3-й групп незначительны ($d_{Cohen} = 0,39$). Через 3 нед. они достигают среднего эффекта ($d_{Cohen} = 0,50$). Этот факт можно расценивать как тенденцию к нормализации уровня глюкозы на фоне приема тыквенного пектина. Значимое снижение сывороточной концентрации фруктозамина в опытной группе показало гипогликемический эффект тыквенного пектина. Введение пектина животным также снижало содержание холестерина в печени и сывороточную концентрацию неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК), демонстрируя его гипохолестеринемические свойства. Антиоксидантные свойства пектина проявлялись нормализацией уровня ТБК-реактивных продуктов в сыворотке крови опытной группы животных. **Заключение.** Подтверждены гипогликемический, гипохолестеринемический и антиоксидантный эффекты пектина из тыквы (*Cucurbita maxima D.*) при аллоксан-индуцированном сахарном диабете.

Ключевые слова: активные формы кислорода; аллоксан-индуцированный сахарный диабет; тыквенный пектин; фруктозамин; холестерин.

Для цитирования: Федорова Т.В., Торкова А.А., Лисицкая К.В., Алчинова И.Б. Гипогликемические свойства пектина из тыквы (*Cucurbita maxima d.*) при аллоксан-индуцированном сахарном диабете. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 82—89.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.82-89

Для корреспонденции: Федорова Татьяна Васильевна, канд. техн. наук, и.о. зав. лаб. молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха, e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-00094).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.08.2017

Fedorova T. B.¹, Torkova A.A.¹, Lisitskaya K.V.¹, Alchinova I.B.²

Hypoglycemic properties of pectine from pumpkin (*Cucurbita maxima* d.) in a model of alloxan-induced type 1 diabetes mellitus

¹ A.N. Bach Institute of Biochemistry, the Federal Research Center «Fundamentals of Biotechnology», Russian Academy of Sciences, Leninsky Prospekt, 33, Bldg 1, Moscow 119071, Russia

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

Hyperglycemia is a biochemically defined initial symptom of diabetes and its serious complications (atherosclerosis, retinopathy, kidney damage). Pectins are currently considered as novel plant-produced hypoglycemic agents. **The aim** of this study was to evaluate bio-functional properties of pumpkin pectin obtained from pumpkin pulp using cavitation-membrane technologies in a model of alloxan-induced diabetes. **Methods.** Male Wistar rats were used in the experiments. Diabetes was modeled by injections of 4.3% alloxan monohydrate solution. The development of diabetes was confirmed by glucose concentration in peripheral blood (glucose levels of >10 mM in whole blood was consistent with diabetes). To test the hypoglycemic activity of pumpkin pectin, a 5% pectin solution in distilled water was administered to rats of the experimental group (25 mg/100 g body weight, daily, for three weeks) through a metal gastric tube (Kent Scientific, USA). **Results.** A significant decrease of fructosamine concentration observed in the experimental group indicated a hypoglycemic effect of pectin. Administration of pectin to animals also reduced concentrations of cholesterol in liver and non-esterified fatty acids (NEFAs) in blood serum, which demonstrated cholesterol-lowering properties of pectin. Antioxidant properties of pectin provided a decrease in serum TBA-reactive products to the level observed in non-diabetic rats, in pectin-treated diabetic animals compared to the untreated diabetic group.

Keywords: alloxan-induced diabetes mellitus, cholesterol, pumpkin pectin, reactive oxygen species, fructosamine.

For citation: Fedorova T.B., Torkova A.A., Lisitskaya K.V., Alchinova I.B. Hypoglycemic properties of pectine from pumpkin (*Cucurbita maxima* d.) *in vivo* on the model of alloxan-induced diabetes mellitus type 1. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62 (2): 82—89. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.82-89

For correspondence: Fedorova Tatyana Vasilievna, Ph.D., Acting Head of the Laboratory of molecular fundamentals of biotransformation of the Institute of Biochemistry. A.N. Bach, Russian Academy of Sciences; 33 Leninsky prospekt, Moscow, 119071, e-mail: fedorova_tv@mail.ru

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

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation (Grant № 16-16-00094).

Information about authors:

Fedorova T.B. <https://orcid.org/0000-0002-0355-6800>

Torkova A.A. <https://orcid.org/0000-0002-7671-8655>

Lisitskaya K.V. <https://orcid.org/0000-0002-3922-5253>

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

Received 13.08.2017

Введение

Биохимическим маркером сахарного диабета и его тяжелых осложнений (атеросклероза, ретинопатий, поражений почек) является гипергликемия.

В качестве новых средств растительного происхождения, обладающих гипогликемической активностью, в настоящее время рассматривают пектины. Это сложные, являющиеся структурными элементами тканей растений, которые широко используются в пищевой промышленности и являются природными энтеросорбентами. Пектины легко образуют комплексы с двухвалентными металлами, в том числе с ионами токсичных элементов (ртути, свинца, кадмия), что обуславливает их цитопротективный эф-

фект, обладают антиоксидантным, гипогликемическим, гипохолестеринемическим и иммуномодулирующим действием [1, 2]. Значительное количество работ рассматривает также пребиотические свойства пектинов из различного растительного сырья, при этом установлена прямая взаимосвязь между составом кишечной микрофлоры и оказываемым полисахаридами гипогликемическим и гипохолестеринемическим действием [3, 4]. Строение пектиновой макромолекулы, в том числе и ее разветвленной области, важно для проявления свойств пектина и его биофункционального действия [5, 6, 7]. В свою очередь, строение и, как следствие, свойства пектинов зависят от растительного источника и способа их получения.

Обязательным этапом при поиске новых соединений с гипогликемической активностью является тестирование их свойств *in vivo* на лабораторных животных.

Цель исследования — тестирование *in vivo* гипогликемических свойств тыквенного пектина на модели аллоксан-индуцированного сахарного диабета.

Методика

Эксперимент проводили на крысах — самцах Wistar с начальной массой 302 ± 27 г. В ходе эксперимента все животные содержались в стандартных условиях вивария. Наиболее перспективной для тестирования соединений с гипогликемической активностью в настоящее время является модель аллоксан-индуцированного сахарного диабета [8, 9]. Животным ($n = 60$) в хвостовую вену вводили 4,3% раствор аллоксана моногидрата в физиологическом растворе в дозе 43 мг/кг веса. Животным контрольной группы ($n = 10$) — группа 1 — внутривенно вводили аналогичное количество физиологического раствора. Пектин полученный из тыквенного жома с использованием кавитационно-мембранной технологии имел следующие характеристики: диапазон молекулярных масс 90—120 кДа, содержание полигалактуроновой кислоты в среднем около 75% и степень этерификации 72%, что позволяет его отнести к пектинам с высокой степенью этерификации [10].

На 3-й сут. после введения аллоксана отмечали развитие клинических симптомов сахарного диабета — полидипсии и полиурии, отмечались вялость и астенизация. С интервалом в 1 и 2 нед после воспроизведения диабета контролировали живую массу животных и уровень глюкозы в крови. Забор венозной крови проводили из подкожной боковой вены бедра. Содержание глюкозы в цельной крови определяли с помощью тест-полосок и портативного глюкометра One Touch Select (Accu check, США). Среди 60 животных опытной группы летальный исход наблюдался у 7 крыс (11,7%), развитие стойкой гипергликемии (уровень глюкозы в цельной крови >10 мМ) — у 42 (70,0%), отсутствие симптомов гипергликемии или развитие нестойкой гипергликемии (уровень глюкозы в цельной крови >10 мМ только в одной из временных точек) — у 11 (18,3%). В дальнейшем использованы животные только со стойкой гипергликемией, последние случайным образом были разделены на 2 группы: 2-я группа ($n = 10$) — диабет, 3-я группа ($n = 11$) — крысы с диабетом, в рацион которых вводили тыквенный пектин.

Анализ данных литературы по использованию пектинов из различного сырья показал, что гипогликемический эффект наблюдается в диапазоне доз от 20 до 500 мг/100 г массы животного в сутки [11, 12]. При тестировании гипогликемической актив-

ности тыквенного пектина нами выбрана дозировка 25 мг/100 г живой массы в сутки. Пектин опытной группе крыс вводили внутривенно с помощью металлического зонда (Kent Scientific, США) в виде 5% раствора пектина в дистиллированной воде в дозировке 25 мг/100 г живой массы в сутки в течение 3 нед.

В ходе эксперимента животным 3-й группы внутривенно с помощью металлического зонда (Kent Scientific, США) вводили 5% раствор пектина в дистиллированной воде. Животным 1-й и 2-й групп внутривенно вводили дистиллированную воду в дозировке 0,5 мл/100 г живой массы.

Животных выводили из эксперимента методом углекислотной эвтаназии. За 12 ч до окончания эксперимента животные лишались корма. Забор крови проводили из полости сердца с последующей декапитуацией животных гильотиной (Kent Scientific, США), вскрытием, анализом индексов массы и макроморфологии внутренних органов.

После окончания эксперимента в цельной крови и сыворотке определяли следующие биохимические показатели:

1 — Содержание фруктозамина в сыворотке крови с использованием набора реагентов Fructosamine (BioSystems, Испания).

2 — Концентрацию инсулина в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора EIA-2048 Insulin (Rat) Elisa (DRG International, Inc., США). Анализ проводили на микропланшетном фотометре-флуориметре Synergy 2 (BioTek, США).

3 — Определение содержания общего холестерина, триглицеридов, ЛПВП, ЛПНП, НЭЖК и белка в сыворотке крови экспериментальных животных проводили соответственно с использованием наборов реагентов Cholesterol (BioSystems, Испания), Triglycerides (BioSystems, Испания), Cholesterol HDL direct (BioSystems, Испания), Cholesterol LDL direct (BioSystems, Испания), SFA-1 96-well serum/plasma fatty acid kit (ZenBio, Inc., США) и Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific, США). Оптическую плотность растворов определяли спектрофотометрически в 1 см пластиковых кюветах с использованием биохимического анализатора Stat Fax 3300 (Awareness Technology Inc., США).

4 — Анализ содержания НЭЖК и белка в сыворотке крови проводили на микропланшетном фотометре-флуориметре Synergy 2 (BioTek, США).

5 — Содержание ТБК-реактивных продуктов в сыворотке крови оценивали по методу M. Mihara с соавт. [13]. 0,2 мл сыворотки крови смешивали с 2 мл 1,4%-ной ортофосфорной кислоты и 1 мл 0,5%-ной тиобарбитуровой кислоты. Смесь инкуби-

ровали в кипящей бане 45 мин, после чего охлаждали и добавляли 2 мл н-бутанола. Пробирки тщательно встряхивали и центрифугировали при 4000 г в течение 20 мин. Верхнюю фазу фотометрировали против контрольной пробы в 96-луночных несорбирующих микропланшетах на фотометре-флуориметре Synergy 2 (BioTek, США) при 2-х длинах волн — 535 и 572 нм. В качестве стандарта для построения калибровочной зависимости использовали малоновый диальдегид (МДА). Содержание ТБК-реактивных продуктов в сыворотке крови выражали в единицах эквивалентной молярной концентрации (мкмоль/дм³) МДА.

6 — Антиоксидантную емкость (АОЕ) сыворотки крови и экстрактов липофильных и гидрофильных компонентов печени по отношению к пероксильному радикалу определяли по методу [14]. Перед проведением анализа: образцы сыворотки крови размораживали на льду и готовили рабочие разведения в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) рН 7,4 в 120 и 160 раз; гидрофильные экстракты печени разводили в 15—25 раз буфером ФСБ; липофильные экстракты печени разводили в 25—35 раз. Пероксильный радикал генерировался непосредственно в реакционной среде при термическом распаде азосоединения 2,2'-азобис(2-метилпропионамидина) дигидрохлорида (ААРН), инициируемом путем инкубации при 37°C в течение 10 мин. Для построения калибровочной кривой в качестве стандартного антиоксиданта использовали тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетра метилхро-ман-2-карбоновая кислота) (Trolox, «Sigma-Aldrich», США). Кинетику убыли свечения флуоресцеина при взаимодействии с пероксильным радикалом в отсутствие антиоксидантов (контроль) и в присутствии тролокса или анализируемых образцов (сыворотки крови, липофильных и гидрофильных экстрактов печени) в реакционной среде регистрировали в течение 1 ч с интервалом измерений 60 с при температуре 37°C на фотометре-флуориметре «Synergy 2» («BioTek», США) в режиме регистрации интенсивности флуоресценции (длина волны возбуждения — 485 нм, длина волны испускания — 528 нм). АОЕ сыворотки крови, липофильных и гидрофильных экстрактов печени по отношению к пероксильному радикалу выражали в мМ эквивалентов тролокса (ТЭ).

Для выделения липофильных и гидрофильных компонентов экстрактов печени, навеску ткани массой 200 мг помещали в смесь метанол-хлороформ (2:1) и 11,5% раствор хлорида калия соответственно. Гомогенизацию проводили в течение 5 мин при температуре +4°C в гомогенизаторе Silent Crusher S, снабженным насадкой 7F (Heildolph, Германия) при скорости вращения рабочего ножа 75000 об./мин.

Гомогенаты центрифугировали при температуре +4°C в течение 10 мин при 7000g и 20 мин при 30000g соответственно в случае липофильных и гидрофильных экстрактов. Надосадочную жидкость для определения гидрофильных экстрактов отделяли и разводили в ФСБ для дальнейшего анализа. В случае липофильных экстрактов надосадочную жидкость отделяли, а к осадку добавляли 6 мл смеси метанол-хлороформ-вода 2,0:1,0:0,8 (об./об./об.) и повторяли процедуру гомогенизации и центрифугирования. Надосадочные жидкости, полученные на обоих этапах экстракции, объединяли и добавляли 4,5 мл хлороформа и 4,5 мл деионизированной воды. Смесь тщательно перемешивали в течение 10 мин на вортексе (Elmi, Латвия) и центрифугировали при 7000g и температуре +4°C. Водный экстракт удаляли, а хлороформенный экстракт высушивали в потоке инертного газа. Экстракт липофильных компонентов перерастворяли в 1 мл 7% раствора метил-β-циклодекстрина в смеси ацетон-вода в объемном отношении 1:1 и инкубировали в течение 15 мин в ультразвуковой бане Sonogex (Bandelin, Германия) для получения стабильной эмульсии.

Липидные компоненты печени отделяли путем экстракции по методу Фолча [15]. Содержание холестерина в полученном экстракте определяли с использованием набора реагентов Cholesterol (BioSystems, Испания) на биохимическом анализаторе Stat Fax 3300 (Awareness Technology Inc., США).

Экспериментальное исследование с использованием лабораторных животных (крыс) выполнено в соответствии с Международными соглашениями о гуманном обращении с животными: EU Directive 86/609/ЕЕС от 24 ноября 1986г.; Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes от 22 сентября 2010 г.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ «Microsoft Excel» и «Statistica 6.0». Статистически значимыми по двустороннему критерию Стьюдента считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Адекватное развитие аллоксан-индуцированного диабета контролировали по нескольким показателям. Средний уровень глюкозы в крови животных 1-й группы варьировал в пределах от 6,32 до 9,74 мМ, что соответствует физиологической норме для крыс [16]. У животных 2-й и 3-й групп по истечении 1—3 нед. после воспроизведения диабета выявлена гипергликемия — уровень глюкозы в цельной крови был значительно выше (рис. 1). Статистический анализ «size effect» показал, что в начале эксперимента различия в уровне глюкозы в крови животных 2-й и 3-й групп незначительны

($d_{Cohen} = 0,39$). Через 3 нед. они достигают среднего эффекта ($d_{Cohen} = 0,50$) [17]. Этот факт можно расценивать как тенденцию к нормализации уровня глюкозы на фоне приема тыквенного пектина.

У животных, имевших стойкую гипергликемию на фоне аллоксанизации (2-я и 3-я группы) отмечалось значимое снижение массы тела по сравнению с животными контрольной группы, что является одним из клинических признаков развития сахарного диабета. Следует также отметить, что средняя концентрация инсулина в сыворотке крови у животных с сахарным диабетом ниже физиологической нормы для крыс (0,5—2,0 мкг/л), что обусловлено токсическим действием аллоксана на β -клетки островков Лангерганса поджелудочной железы, продуцирующих инсулин.

После аутопсии у двух животных 2-й группы при анализе макроморфологии почек выявлены инфаркты в правых почках. Кроме того, у одного из животных этой группы отмечалось сморщивание правой почки. У животных 3-й группы не выявлено патологических изменений макроморфологии почек. Зарегистрированное увеличение индекса массы почек обусловлено

компенсаторной интенсификацией их работы в условиях стойкой гипергликемии и полиурии.

Обнаруженное увеличение массы головного мозга у животных 2-й и 3-й групп, вероятно, связано с отеком ткани. Утилизация глюкозы в нервных клетках без участия инсулина (полиоловый путь) приводит к накоплению в клетках сорбитола и притоку жидкости.

Значимым прогностическим маркером длительной гипергликемии является концентрация фруктозамина. Содержание фруктозамина в сыворотке крови животных с сахарным диабетом (2-я и 3-я группы) в среднем втрое выше ($p < 0,001$) по сравнению с величиной данного показателя у животных в контрольной группе без диабета. После перорального введения тыквенного пектина показано статистически значимое снижение ($p < 0,05$) сывороточной концентрации фруктозамина по сравнению со 2-й группой, что свидетельствует о гипогликемическом действии тыквенного пектина (рис. 2).

В результате проведенных экспериментов установлено, что в группах животных с сахарным диабетом (группы 2 ($63,69 \pm 2,46$ мг/мл) и 3 ($62,86 \pm 2,39$ мг/мл)) концентрация общего белка в сыворотке крови статистически значимо ниже по сравнению группой 1 ($72,16 \pm 2,81$ мг/мл). Это обусловлено компенсаторным увеличением объема циркулирующей крови на фоне стойкой гипергликемии, а также переключением клеточного метаболизма на утилизацию аминокислот в качестве энергетических субстратов. При этом во всех исследованных группах животных сывороточный уровень общего белка соответствует физиологической норме для самцов крыс Wistar [16].

По результатам проведенных экспериментов между группами животных не выявлено значимых различий в уровне общего холестерина, триглицеридов и ЛПНП в сыворотке крови. В то же время содержание холестерина в печени у животных 2-й гр. ($2,01 \pm 0,09$ мг/г) значимо ($p < 0,05$) выше по сравнению с контрольной группой без диабета ($1,74 \pm 0,08$ мг/г). При этом у животных 3-й гр. с аллоксан-индуцированным сахарным диабетом и введение тыквенного пектина отмечена нормализация уровня холестерина в печени ($1,71 \pm 0,05$ мг/г) ($p < 0,01$) по сравнению с животными 2-й гр. (контроль-диабет) до уровня данного показателя у животных без сахарного диабета — группа 1.

У животных с сахарным диабетом (группы 2 ($56,29 \pm 5,18$ мг/дл) и 3 ($52,74 \pm 4,28$ мг/дл)) показано статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение сывороточной концентрации неатерогенной фракции липопротеидов — ЛПВП по сравнению с животными без сахарного диабета ($41,02 \pm 2,19$ мг/дл). Увеличение концентрации ЛПВП, по-видимому, обусловлено увеличением потребности клеток в энергетических субстратах, в роли которых на фоне снижения способности кле-

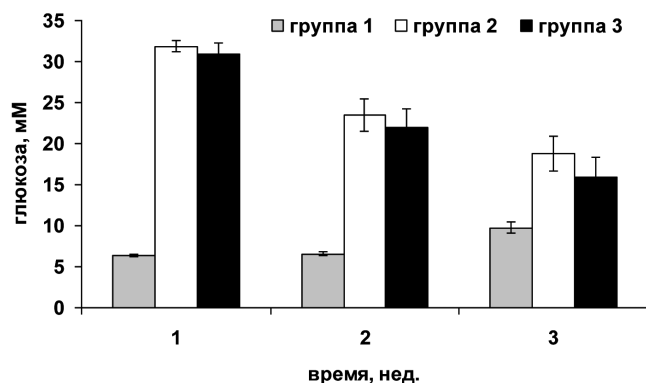


Рис. 1. Уровень глюкозы в крови животных: по оси абсцисс — время в неделях, по оси ординат — концентрация глюкозы в мМ.

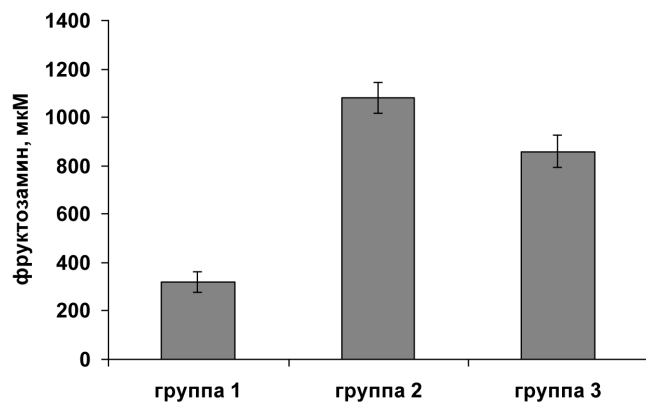


Рис. 2. Индексы массы почек и мозга у лабораторных животных. По оси ординат — индекс массы, %.

ток утилизировать глюкозу в условиях низкой концентрации инсулина выступают жирные кислоты.

Повышенный уровень НЭЖК, ассоциированный с ожирением, является одним из факторов, стимулирующих развитие резистентности к инсулину. Кроме того, НЭЖК оказывают прямое повреждающее действие на бета-клетки поджелудочной железы. У животных группы 3 ($1,69 \pm 0,20$ мкМ) показано значимое ($p < 0,05$) снижение сывороточной концентрации НЭЖК по сравнению с контрольными группами.

Поскольку гипергликемия, наряду с усилением потока НЭЖК в клетки, обусловленного гиперлипидемией, является специфическим для ожирения и сахарного диабета патогенетическим механизмом формирования окислительного стресса, было проведено тестирование антиоксидантной емкости (АОЕ) сыворотки крови и экстрактов липофильных и гидрофильных компонентов печени по отношению к пероксильному радикалу, а также определение в сыворотке крови содержания продуктов перекисного окисления липидов (ТБК-реактивных продуктов).

При анализе показателей антиоксидантного статуса между экспериментальными группами животных не выявлено значимых отличий по величинам антиоксидантной емкости сыворотки крови. В то же время по содержанию в сыворотке крови ТБК-реактивных продуктов исследованные экспериментальные группы животных имеют существенные отличия (таблица). Содержание ТБК — реактивных продуктов у животных с диабетом (2-я гр.) почти вдвое выше ($p < 0,01$) по сравнению с величиной данного показателя у животных без диабета (группа 1). При этом у животных с сахарным диабетом, которым вводили пектин, показано статистически достоверное ($p < 0,01$) снижение содержания ТБК-реактивных продуктов в сыворотке крови по сравнению с животными 2 гр. до уровня данного показателя у животных без сахарного диабета.

По содержанию липофильных антиоксидантов в печени контрольные группы животных с диабетом и без

диабета (группы 2 и 1) не имеют значимых различий (таблица). Однако у животных с аллоксан-индуцированным сахарным диабетом на фоне приема тыквенного пектина (группа 3) показано статистически значимое увеличение АОЕ экстракта липофильных компонентов печени по сравнению с животными 1-й группы (контроль без диабета). По результатам проведенных исследований показано, что по сравнению с контрольной группой животных без диабета (группа 1) содержание гидрофильных антиоксидантов в печени на фоне аллоксанизации значимо возросло как в контрольной группе с диабетом, так и у аллоксанизированных животных, получавших тыквенный пектин.

Таким образом, в ходе проведенного тестирования гипогликемических свойств тыквенного пектина у животных с аллоксан-индуцированным сахарным диабетом наблюдается:

- гипогликемический эффект, выражающийся в снижении сывороточной концентрации маркера длительной гипергликемии — фруктозамина по сравнению с контролем с сахарным диабетом;
- гипохолестеринемический эффект, выражающийся в статистически достоверном ($p < 0,01$) снижении содержания холестерина в печени по сравнению с животными 2 группы (контроль-диабет) до уровня данного показателя у животных без сахарного диабета и статистически значимым снижением сывороточной концентрации НЭЖК по сравнению с контролем без сахарного диабета;
- антиоксидантный эффект, выражающийся в статистически значимом снижении содержания ТБК-реактивных продуктов в сыворотке крови по сравнению с контролем с сахарным диабетом до уровня данного показателя у животных без сахарного диабета.

Механизмы гипогликемического, гипохолестеринемического и антиоксидантного действия растворимых пищевых волокон до конца не ясны [18]. Однако недавно была показана корреляционная взаимосвязь между уровнем холестерина и триглицеридов в крови и печени крыс и содержанием желчных и короткоцепочеч-

Таблица

Показатели антиоксидантного статуса у лабораторных животных при тестировании гипогликемических свойств тыквенного пектина на модели аллоксан-индуцированного сахарного диабета

Показатель	Группа		
	1 (n = 10)	2 (n = 10)	3 (n = 11)
АОЕ сыворотки крови по отношению к пероксильному радикалу, мМ ТЭ	$10,15 \pm 0,38$	$10,00 \pm 0,39$	$10,16 \pm 0,27$
ТБК-реактивные продукт в сыворотке крови, мкМ экв. МДА	$2,39 \pm 0,49$	$4,73 \pm 0,49^*$	$2,84 \pm 0,25^\#$
АОЕ экстракта липофильных компонентов печени по отношению к пероксильному радикалу, мкмоль ТЭ/г	$0,87 \pm 0,10$	$1,06 \pm 0,10$	$1,32 \pm 0,17$
АОЕ экстракта гидрофильных компонентов печени по отношению к пероксильному радикалу, мкмоль ТЭ/г	$21,17 \pm 0,68$	$24,36 \pm 1,04$	$26,97 \pm 0,60$

Примечание. * — $p < 0,01$ по сравнению с группой 1, # — $p < 0,01$ по сравнению с группой 2 по критерию Стьюдента

ных жирных кислот в толстом кишечнике на фоне приема пектина [4]. При этом профили и содержание как желчных кислот, так и короткоцепочечных жирных кислот (продуктов вторичного метаболизма микрофлоры ЖКТ) зависели от состава микрофлоры кишечника. К примеру, содержание таких короткоцепочечных жирных кислот как уксусная, пропионовая, масляная и капроновая имело положительную корреляцию с численностью *Bifidobacterium*, которая, в свою очередь, возрастала в присутствии пектина. Предполагают, что корма, в состав которых входит пектин, имеют вязкую консистенцию, благодаря чему в ЖКТ происходит связывание желчных кислот, препятствующее их абсорбции и тем самым приводящее к снижению холестерина в крови и печени. Чем выше степень метоксилирования, тем выше вязкость пектинов, тем выше их гиполипидемический эффект. Также предполагают, что вязкость влияет на процессы ферментации микробиоты в ЖКТ и как следствие на состав ее вторичных метаболитов [19]. Исследованный в данной работе пектин из тыквы является высокометоксилированным и имеет самое высокое значение динамической вязкости, по сравнению с цитрусовыми и яблочными пектинами [8].

Облегченную диффузию глюкозы внутрь клеток, чувствительных к инсулину (адипоциты, миоциты и кардиомиоциты), осуществляет транспортер глюкозы 4 типа (ГЛЮТ-4) [20]. В условиях окислительного стресса нарушается транскрипция генов, кодирующих ГЛЮТ-4. Однако было показано, что некоторые жирные кислоты стимулируют экспрессию активируемого пероксисомными пролифераторами рецептора гамма (PPAR), который, в свою очередь, увеличивает уровень ГЛЮТ-4 [21]. В отличие от нерастворимых пищевых волокон пектин и другие растворимые пищевые волокна подвергаются расщеплению под действием микрофлоры толстого кишечника, приводящего к образованию короткоцепочечных жирных кислот. Последние оказывают положительное влияние на липидный профиль в крови, а также участвуют в регуляции процессов дифференцировки и апоптоза в клетках эпителия толстой кишки, поддерживая тем самым его барьерную функцию.

References

- Holck J., Hotchkiss Jr. A.T., Meyer A.S., Mikkelsen J.D. and Rastall R.A. Production and Bioactivity of Pectic Oligosaccharides from Fruit and Vegetable Biomass. In: *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd; 2014: 76-87.
- Babbar N., Dejonghe W., Gatti M., Sforza S., Kathy E. Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: production, characterization and health benefits. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2016; 36(4): 594-606.

- Parkar S.G., Redgate E.L., Wibisono R., Luo X., E.T.H. Koh, Schroder R. Gut health benefits of kiwifruit pectins: Comparison with commercial functional polysaccharides. *Journal of Functional Foods*. 2010; 2(3): 210-18.

- Ghaffarzadegan T., Marungruang N., Fak F., Nyman M. Molecular properties of guar gum and pectin modify cecal bile acids, microbiota, and plasma lipopolysaccharide-binding protein in rats. *PLoS ONE*. 2016; 1-18.

- Rubio-Senent F., Rodriguez-Gutierrez G., Lama-Munoz A., Fernandez-Bolanos J. Pectin extracted from thermally treated olive oil by-products: Characterization, physico-chemical properties, *in vitro* bile acid and glucose binding. *Food Hydrocolloids*. 2015; 43: 311-21.

- Nosa ova G., Prisenznakova , Kosalova Z., Ebringero-va A., Hromadkova Z. Suppressing effect of pectic polysaccharides from *Cucurbita pepo* L. var. *Syriaca* on citric acid-induced cough reflex in guinea pigs. *Fitoterapia*. 2011; 82(3): 357-64.

- Holck J., Hjerno K., Lorentzen A., K.L. Vignsngs, Hemmingsen L., Licht T.R., Mikkelsen J.D., Meyer A.S. Tailored enzymatic production of oligosaccharides from sugar beet pectin and evidence of differential effects of a single DP chain length difference on human faecal microbiota composition after *in vitro* fermentation. *Process Biochemistry*. 2011; 46(5): 1039-49.

- Lisickaya K.V., Torkova A.A., Nikolaev I.V., Fedorova T.V., Mihaleva M.A., Koroleva O.V. Comparative analysis of the antioxidant properties of pectins from different plant raw materials on model cellular systems. *Pishhevaia promyshlennost'*. 2012; 12: 64-7. (in Russian)

- Etuk E.U. Animal models for studying diabetes mellitus. *Agriculture Biol. J. North Am.* 2010; 1: 130-4.

- Rohilla A. Alloxan induced diabetes: mechanisms and effects. *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* 2012; 3: 819-23.

- Gomathy R., Vijayalekshmi N.R., Kurup P.A. Hypoglycemic action of the pectin present in the juice of the inflorescence stalk of plantain (*Musa sapientum*) — Mechanism of action. *J. Biosci.* 1990; 15: 297-303.

- Barbalho S.M., de Souza M.S.S., de Paula e Silva J.C., Mendes C.G., de Oliveira G.A., Costa T., Farinazi-Machado F.M.V. Yellow passion fruit rind (*Passiflora edulis*): an industrial waste or an adjuvant in the maintenance of glycemia and prevention of dyslipidemia? *J. Diabetes Res. & Clin. Metabol.* 2012; 1: 1-4.

- Mihara M., Uchiyama M., Fukuzawa K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication, and vitamin E deficiency. *Biochemical Medicine*. 1980; 23(3): 302-11.

- Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 4619-26.

- Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1957; 226: 497-509.

- Zhang Z.-P., Tian Y.-H., Li R., Cheng X.-Q., Guo S.-M., Zhang J.-X., Wang J.-J., Hu L. The comparison of the normal blood biochemical values of Wistar rats with different age and sex. *Asian J. Drug Metabol. Pharmacokinet.* 2004; 4: 215.

- Cohen, B. *Explaining psychological statistics (3rd ed.)*. New York: John Wiley & Sons; 2008.

- Papathanasopoulos A., Camilleri M. Dietary Fiber Supplements: Effects in Obesity and Metabolic Syndrome and Relationship to Gastrointestinal Functions. *Gastroenterology*. 2010; 138: 65-72.

19. Tin'kov A.A., Gatiatulina E.R., Popova E.V., Polyakova V.S., Skal'naya A.A., Agletdinov E.F., Nikonorov A.A., Radysh I.V., Karganov M.Yu., Skal'nyj A.V. Influence of adipogenic diet at an early age on the content of trace elements in the tissues of rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(4): 79-85. (in Russian)

20. Kuz'menko D.I., Udincev S.N., Kliment'eva T.K., Serebrov V.Yu. Oxidative stress of adipose tissue as the pri-

mary link in the pathogenesis of insulin resistance. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2016; 62(1): 14-21. (in Russian)

21. Park K.S., Ciaraldi T.P., Lindgren K. et al. Troglitazone effects on gene expression in human skeletal muscle of type II diabetes involve up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 83: 2830-5.

Сведения об авторах:

Федорова Татьяна Васильевна, канд. техн. наук, и.о. зав. лаб. молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха, e-mail: fedorova_tv@mail.ru;

Торкова Анна Алексеевна, мл. науч. сотр. лаб. молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха, e-mail: anna_torkova@mail;

Лисицкая Ксения Валерьевна, канд. биол. наук, лаб. молекулярных основ биотрансформаций Института биохимии им. А.Н. Баха, e-mail: lisksenia@mail.ru;

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

© Коллектив авторов, 2018
УДК 612.018:616-36-006:616-092.9

Каплиева И.В., Франциянц Е.М., Трепитаки Л.К., Черярина Н.Д.

Экспериментальная оценка функционирования основных регуляторных систем организма (надпочечниковой, тиреоидной и гонадной) на этапах метастазирования саркомы 45 в печень

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, 344037, г. Ростов-на-Дону, Россия, ул. 14 линия, д. 63

Метастазирование в печень — частый признак прогрессирования злокачественного процесса, механизм которого до конца не изучен. **Цель** — изучение особенностей функционирования основных систем нейрогуморальной регуляции: надпочечниковой (ГНЧС), тиреоидной (ГТТС) и гонадной (ГПГС), на этапах метастазирования саркомы 45 (С45) в печень. **Методика.** Работа выполнена на 43 белых крысах-самцах. Через 1, 2, 5, 7 нед. от момента введения клеток саркомы 45 в дислоцированную под кожу селезенку. Органы взвешивались, в сыворотке крови (СК) методом РИА исследовали уровни фолликулостимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона (ЛГ), тиреотропного гормона, аденокортикотропного гормона, кортизола, альдостерона, общей формы тестостерона, свободной и общей форм тироксина и трийодтиронина (Т₃св и Т₃); методом ИФА — эстрона, эстрадиола, свободного тестостерона. **Результаты.** Метастазирование в печень сопровождалось активацией с последующим истощением ГНЧС со снижением в 1,8 раза уровней *кортизола* и *альдостерона* в крови; значительной активацией ГПГС (пятикратное увеличение ЛГ в крови и уменьшение в 1,7 раза массы семенников) вследствие гипотестостеронемии (в 9,7 раза) на фоне гиперэстрадиолемии (в 2,3 раза); активацией ГТТС с формированием «low Т₃» синдрома (в 4,6 раза). **Заключение.** Процесс метастазирования в печень — системная патология, в основе которой лежат глубокие нарушения работы основных систем регуляции организма.

Ключевые слова: метастазирование в печень; гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система; гипоталамо-гипофизарно-тиреоидная система; гипоталамо-гипофизарно-гонадная система; крысы; саркома 45.

Для цитирования: Каплиева И.В., Франциянц Е.М., Трепитаки Л.К., Черярина Н.Д. Экспериментальная оценка функционирования основных регуляторных систем организма (надпочечниковой, тиреоидной и гонадной) на этапах метастазирования саркомы 45 в печень. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 90—97.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.90-97

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Каплиева Ирина Викторовна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ РНИОИ Минздрава России, e-mail: kapliirina@yandex.ru

Поступила 11.10.2017

Kaplieva I.V., Frantsiyants E.M., Trepitaki L.K., Cheryarina N.D.

Experimental assessment of major regulatory systems (adrenal, thyroid and gonadal) in liver metastases from s45 sarcoma

Rostov Research Institute of Oncology; Liniya 14, 63, Rostov-on-Don 344037, Russia

Aim: To evaluate functioning of three major systems of neurohumoral regulation, adrenal (HPA), thyroid (HPT), and gonadal (HPG) axes, in liver metastasis based on weights of organs and blood levels of hormones. **Methods:** The study included 34 white male rats. Organs were weighted at 1, 2, 5, and 7 weeks after S45 sarcoma cell injections into the subcutaneously transferred spleen; blood serum levels of FSH, LH, TSH, ACTH, cortisol, aldosterone, total testosterone, free and total thyroxine, and triiodothyronine were measured by RIA; estrone, estradiol, and free testosterone concentrations were measured by ELISA. **Results.** The process of liver metastasis was accompanied by activation and following exhaustion of the HPA axis with 1.8 time decreases in blood levels of *cortisol* and *aldosterone*, significant activation of the HPG axis (5-fold increased *LH* level and 59% decreased testicular weight) due to hypotestosteronemia (9.7 times) and hyperestradiolemia (2.3 times), and activation of the HPT axis with the low Т₃ syndrome (4.6 times). **Conclusion.** Liver metastasis is a systemic pathology based on profound dysfunction of the major regulatory systems.

Keywords: liver metastases, hypothalamic-pituitary-adrenal axis; hypothalamic-pituitary-thyroid axis; hypothalamic-pituitary-gonadal axis; rats; sarcoma 45.

For citation: Kaplieva I.V., Frantsiyants E.M., Trepitaki L.K., Cheryarina N.D. Experimental assessment of main regulatory systems of the body (adrenal, thyroid and gonadal) at liver metastases from S45 sarcoma. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 90—97. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.90-97

For correspondence: Irina V. Kaplieva, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher, Rostov Research Institute of Oncology; 63, 14 Liniya, 344037, Rostov-on-Don, Russia, e-mail: kaplirina@yandex.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Kaplieva I.V., <http://orcid.org/0000-0002-3972-2452>

Frantsiyants E.M., <http://orcid.org/0000-0003-3618-6890>

Trepitaki L.K., <http://orcid.org/0000-0002-9749-2747>

Received 11.10.2017

Список сокращений:

ГГНС — гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система, ГГТС — гипоталамо-гипофизарно-тиреоидная система, ГГГС — гипоталамо-гипофизарно-гонадная система, С45 — саркома 45, ВК — весовой коэффициент, ТТГ — тиреотропный гормон, $T_3(св)$ и $T_3(общ)$ — свободная и общая форма трийодтиронина, $T_4(св)$ и $T_4(общ)$ — свободная и общая форма тироксина, Сгт — кортизол, ФСГ — фолликулостимулирующий гормон, ЛГ — лютеинизирующий гормон, Т общ — общая форма тестостерона, Т св — свободная форма тестостерона, E_1 — эстрон, E_2 — эстрадиол.

Введение

В настоящее время злокачественные поражения печени, в том числе и метастатические, занимают одно из ведущих мест в структуре онкопатологии [1]. Несмотря на частую встречаемость, механизмы метастазирования до конца не изучены, следовательно, эффективность методов профилактики и адекватной терапии этой патологии невысока. Таким образом, изучение патогенеза метастазирования злокачественных опухолей в печень остается на сегодняшний день актуальной задачей. Клинические исследования в этом аспекте ограничены по ряду причин. Это и позднее обращение больных вследствие бессимптомного течения начала метастатического процесса и ограниченность доступного для изучения материала. Исследование крови возможно на любом этапе развития злокачественной опухоли, однако оно не всегда информативно. Исследование метастазов, полученных интраоперационно, позволяет получить представление лишь о соотношении тех или иных биологически активных веществ в них на момент забора материала, нельзя проследить динамику в процессе их роста.

Имеющиеся способы воспроизведения метастатического поражения печени в экспериментах у животных [2, 3] имеют ряд недостатков. К ним можно от-

нести: при введении канцерогенов — токсичность, малый процент «выхода» опухолей и метастазов, длительность процесса; при введении опухолевых клеток в регионарные сосуды или селезенку — небольшое количество одномоментно интраоперационно перевитых животных, отсутствие первичного опухолевого узла, а при интраспленальном расположении первичной опухоли в брюшной полости — невозможность безаппаратного контроля динамики её роста. В нашей лаборатории разработана модель метастатического поражения печени, которая позволила вводить в эксперимент сразу большое количество животных и контролировать у них размеры первичной опухоли.

Воспроизведение метастатического процесса в печени осуществлялось путем введения опухолевой взвеси саркомы 45 (С45) в предварительно выведенную под кожу селезенку крысы. Метастазы в печени, морфологически верифицированные как круглоклеточная саркома, воспроизводились в 95% случаев и в 100% случаев завершались летальным исходом [4].

Цель исследования — изучение морфофункциональной активности основных систем регуляции организма: гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГНС), -тиреоидной (ГГТС) и -гонадной (ГГГС) на этапах метастазирования в печень.

Методика

Эксперимент поставлен на 43 белых беспородных крысах-самцах местной разводки вивария РНИОИ массой 220-300 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном световом режиме и свободном доступе к воде и пище. Работу с животными проводили в соответствии с правилами «Европейской конвенции о защите животных, используемых в экспериментах» (Директива 86/609/ЕЕС).

Крысам основных групп предварительно под кожу живота была выведена селезенка. Через 4 нед. после заживления операционной раны в селезенку производили пассаж 0,1 мл взвеси опухолевых клеток С45 в физиологическом растворе в разведении 1×10^6 .

Сформировано 7 экспериментальных групп. 1-ю группу составили интактные крысы-самцы ($n = 7$); 2-ю группу — контроль (К) — крысы с выведенной под кожу селезенкой ($n = 7$); 3-ю группу — крысы ($n = 7$) через 1 нед. после перевивки саркомы 45 (С45) в селезенку (МТС1); 4-ю группу (МТС2) — крысы через 2 нед. после перевивки С45 в селезенку ($n = 6$); 5-ю группу (МТС5) — крысы через 5 нед. после перевивки С45 в селезенку ($n = 7$); 6-ю группу (МТС7) — крысы через 7 нед. после перевивки С45 в селезенку. Группа МТС7, в свою очередь, подразделялась на 2 подгруппы: МТС7А — крысы ($n = 6$) с наличием только регионарных метастазов в печени, и МТС7Б — крысы ($n = 3$) с наличием регионарных метастазов в печени и отдаленных метастазов в легких.

Клетки саркомы получены из РОНЦ им. Блохина, в экспериментах использовали 5—6-ю генерацию опухолей.

Через 1, 2, 5 и 7 нед. после введения клеток С45 в селезенку животных взвешивали и декапитировали на гильотине. Кровь собирали в сухие пробирки без консерванта, центрифугировали при 2 тыс. об./мин в течение 10 мин. Полученную сыворотку использовали для исследования. Гипофиз, гипоталамус, щитовидную железу, надпочечники, легкие, селезенку, печень, семенники, предстательную железу взвешивали. Весовой коэффициент (ВК) рассчитывали по общепринятой формуле:

$$ВК = \frac{\text{масса органа (г)}}{\text{масса животного (г)}}$$

Радиоиммунным методом в сыворотке крови (СК) определяли (стандартные тест наборы фирмы Иммунотех, Чехия; анализатор «Ариан», Россия) уровень тиреотропного гормона (ТТГ), свободных и общих форм трийодтиронина ($T_{3св}$ и $T_{3общ}$) и тироксина ($T_{4св}$ и $T_{4общ}$), кортизола (Сrt), фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ), общую форму тестостерона

(Тобщ). Методом ИФА определяли свободную форму тестостерона ($T_{св}$) (ИФА, ХЕМА, Россия), эстрон (E_1), эстрадиол (E_2) (ИФА, DBC, Канада), альдостерон и АКТГ (BIOMERICA, США). Здесь мы хотим сразу уточнить, что нам известно мнение о том, что поскольку гипофизарные гормоны имеют пептидную природу, а наборы для их определения были разработаны для людей, то и результаты при их использовании у крыс будут недостоверными. Однако мы не претендовали получить истинное количество того или иного гипофизарного гормона в сыворотке, мы стремились изучить их динамику в сравнительном аспекте, предварительно максимально стандартизовав исследование.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи параметрического критерия Стьюдента на персональном компьютере посредством программы STATISTICA 10.0 и непараметрического критерия Вилкоксона—Манна—Уитни. Статистически значимыми считали различия между двумя выборками при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

1. Выведение селезенки под кожу приводило к значимому увеличению её массы, а также увеличению массы репродуктивных органов: семенников и предстательной железы, соответственно в 1,2 раза, в 1,1 раза и в 1,3 раза; ВК — не изменялись (табл. 1, 2). В противоположность этому, при неизменной массе гипоталамуса, печени и щитовидной железы, их ВК уменьшались соответственно в 1,2 раза, в 1,3 раза и в 1,2 раза (табл. 1, 2). Масса легких увеличивалась в 1,5 раза, ВК — в 1,2 раза, в то время как показатели ВК гипофиза и надпочечников статистически значимо уменьшались: в 1,3 и в 1,5 раза соответственно (табл. 1, 2).

Уменьшение ВК гипофиза и гипоталамуса, являющихся центральным звеном основных регуляторных систем организма: ГГНС, ГГТС и ГПГС, регистрировалось на фоне разнонаправленной динамики уровня их тропных гормонов в крови: уменьшения содержания АКТГ — в 1,9 раза, и увеличения — ТТГ и ЛГ — соответственно в 1,7 раза и в 8,0 раз (табл. 2—5). Уменьшение массы и ВК надпочечников в сочетании с изменением уровня АКТГ указывало на участие ГГНС в ответе организма на дислокацию селезенки. На момент исследования — через 4 нед. после операции, уровень основного стресс-реализующего гормона ГГНС — Сrt в крови, а, следовательно, и функционирование системы возвращалось к норме (табл. 3). Увеличение содержания ТТГ в совокупности с нарастанием концентрации $T_{3св}$ — в 1,8 раза, $T_{4св}$ — в 1,2 раза и T_4 — в 1,6 раза, в крови, на фоне уменьшения ВК щитовидной железы, свидетельствовало об акти-

вазии ГГТС с формированием тиреоидной гиперфункции (табл. 2, 4). Периферические звенья ГГТС: семенники и предстательная железа, реагировали на дислокацию селезенки увеличением массы (табл. 1). В крови отмечалось накопление E_2 (в 2,6 раза) и редукция (в 50 раз) Тсв (табл. 5). Уменьшение ВК печени, на наш взгляд, было обусловлено изменением её кровоснабжения после выведения селезенки под кожу. На модификацию кровоснабжения внутренних органов после дислокации селезенки косвенно указывало и увеличение веса и ВК легких вследствие возможного застоя крови в них. Для уточнения этого предположения необходимо провести их гистологическое исследование.

Таким образом, через 4 нед. после выведения селезенки под кожу регистрировалась разная степень дисбаланса основных регуляторных систем организма: восстановление ГГНС с нормализацией уровня C_{Tt} в крови, гиперактивность тиреоидной системы с сохранением её функционального резерва и модификация метаболизма половых стероидов с истощением Тсв и накоплением E_2 и ЛГ в сыворотке крови.

2. Метастазы в печени

2.1. МТС1. Через 1 нед. после введения клеток С45 в селезенку все изменения массы внутренних органов, выявленные у крыс с подкожно выведенной селезенкой, сохранялись, кроме уменьшения до ин-

Таблица 1

Динамика веса внутренних органов крыс-самцов при развитии метастазов печени

	Гипофиз (мг)	Гипоталамус (мг)	Щитовидная железа (мг)	Надпочечники (мг)	Легкие (г)	Селезенка (г)	Печень (г)	Семенники (г)	Предстательная железа (г)	
Интактные	9,00 ± 0,77	193,50 ± 13,40	21,40 ± 1,93	74,10 ± 3,42	2,01 ± 0,17	1,45 ± 0,05	9,65 ± 0,31	3,35 ± 0,20	0,22 ± 0,04	
Контроль	7,00* ± 0,30	187,45 ± 10,63	19,55 ± 2,20	58,18* ± 3,25	2,91* ± 0,24	1,80* ± 0,15	10,09 ± 0,31	3,80* ± 0,07	0,30* ± 0,02	
МТС в печени	МТС1	7,67 ± 0,42	194,71 ± 18,59	18,86 ± 1,64	64,00* ± 4,41	2,79 ± 0,15	1,61 ± 0,30	9,86 ± 0,30	3,93* ± 0,71	0,22 ⁺ ± 0,03
	МТС2	5,17* ^{+,1} ± 0,48	177,30 ± 12,14	15,67 ± 2,35	54,00* ± 5,80	2,83* ± 0,17	2,10* ± 0,18	10,75* ± 0,44	3,87* ± 0,12	0,15 ⁺ ± 0,01
	МТС5	7,50 ² ± 0,29	206,25 ± 29,01	11,00* ^{+,1} ± 1,29	68,75 ² ± 5,31	2,25 ± 0,25	13,00* ^{+,1,2} ± 2,00	9,00 ± 0,50	2,92 ^{+,1,2} ± 0,15	0,17* ⁺ ± 0,02
	МТС7А	6,00 ± 0,22	209,18 ± 21,72	17,015 ± 2,22	17,02* ^{+,1,2,5} ± 2,05	1,67 ^{+,1,2,5} ± 0,17	16,25* ^{+,1,2} ± 1,05	23,37* ^{+,1,2,5} ± 3,00	1,71* ^{+,1,2,5} ± 0,10	0,25 ^{2,5} ± 0,02
	МТС7Б	7,00 ± 0,34	141,10 ^{5,7} ± 15,84	16,005 ± 1,71	74,96 ^{+,2,7} ± 6,37	2,707 ± 0,15	7,41* ^{+,1,2,5,7} ± 0,53	13,37 ⁷ ± 1,52	3,13 ^{+,2,7} ± 0,15	0,60* ^{+,1,2,5,7} ± 0,06

Примечание. Здесь и в табл. 2–5: * — статистически значимые отличия от показателей интактных крыс, ⁺ — от контроля, ^{1, 2, 5, 7} — значимые отличия от показателей крыс соответствующих групп: МТС1, МТС2, МТС5, МТС7А

Таблица 2

Динамика весовых коэффициентов (у.е.) внутренних органов крыс-самцов при развитии метастазов печени

	Гипофиз *10 ⁻⁵	Гипоталамус *10 ⁻³	Щитовидная железа *10 ⁻⁵	Надпочечники *10 ⁻⁵	Легкое *10 ⁻³	Селезенка *10 ⁻³	Печень *10 ⁻³	Семенники *10 ⁻³	Предстательная железа *10 ⁻³	
Интактные	3,67 ± 0,29	0,78 ± 0,04	8,68 ± 0,66	30,64 ± 2,02	8,07 ± 0,50	5,97 ± 0,31	39,69 ± 1,74	13,60 ± 0,60	0,88 ± 0,11	
Контроль	2,41* ± 0,10	0,65* ± 0,04	6,83* ± 0,84	20,14* ± 1,27	9,99* ± 0,86	6,24 ± 0,58	34,62* ± 0,65	13,14 ± 0,48	1,04 ± 0,08	
МТС в печени	МТС1	2,67* ± 0,13	0,69* ± 0,07	6,69* ± 0,54	22,85* ± 1,76	9,89* ± 0,47	5,73 ± 0,21	35,02* ± 0,73	14,00 ± 0,42	0,76 ⁺ ± 0,09
	МТС2	1,84* ^{+,1} ± 0,19	0,63* ± 0,04	5,62* ± 0,91	19,61* ± 2,63	10,20* ± 1,11	7,42* ± 0,61	37,93 ± 0,96	13,67 ± 0,40	0,66* ± 0,13
	МТС5	3,14 ^{+,1,2} ± 0,14	0,87 ± 0,15	4,62* ± 0,61	28,54 ^{+,2} ± 0,71	9,47 ± 1,23	48,61* ^{+, 1,2} ± 5,68	37,63 ± 1,12	12,41 ± 1,25	0,69* ± 0,08
	МТС7А	1,44* ^{+, 1,5} ± 0,09	0,50* ^{+, 1,2,5} ± 0,02	4,08* ^{+, 1} ± 0,64	4,08* ^{+, 1,2,5} ± 0,02	4,01* ^{+,1,5} ± 0,81	38,97* ^{+, 1,2,5} ± 3,24	56,04* ^{+, 1,2,5} ± 6,22	4,10* ^{+, 1,2,5} ± 0,50	0,60 ⁺ ± 0,04
	МТС7Б	1,76* ^{+, 1,5} ± 0,18	0,35* ^{+, 1,2,5} ± 0,05	4,02* ^{+, 1} ± 0,57	18,84* ^{5,7} ± 1,97	6,91 ^{+, 1,2,5,7} ± 0,76	18,62* ^{+,1,2,5,7} ± 1,96	33,58* ^{2,7} ± 2,82	7,86* ^{+, 1,5,7} ± 0,72	1,51* ^{+, 1,2,5,7} ± 0,18

тактных значений весовых показателей предстательной железы и массы селезенки (табл. 1, 2).

На фоне сохранения низких значений ВК органов ГГНС и низкого уровня АКТГ, концентрация *Crt* в крови изменялась разнонаправлено: у 2/3 крыс —

уменьшалась (в 1,9 раза), у 1/3 — увеличивалась (в 1,4 раза); содержание альдостерона увеличивалось в 3,2 раза, относительно интактных животных (табл. 3). Такие изменения наводят на мысль о том, что низкий уровень АКТГ в крови был обусловлен

Таблица 3

Содержание гормонов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы в сыворотке крови крыс-самцов на этапах метастазирования в печень

	Интактные	Контроль	MTC1	MTC2	MTC5	MTC7	
						А	Б
АКТГ (пг/мл)	12,76 ± 1,50	6,65 ± 0,96*	8,61 ± 1,00*	6,28 ± 0,69*	6,77 ± 0,74*	6,38 ± 0,24*	5,91 ± 0,48*
Кортизол (нг/мл)	18,98 ± 1,82	18,41 ± 2,73	16,37 ± 4,48 ↓ 9,52 ± 2,15 60%*,+ ↓ 26,67 ± 3,25 40%*,+	7,86 ± 1,68*+,	24,71 ± 2,88 ^{1,2}	13,39 ± 1,94 ^{2,5}	29,00 ± 3,19*+, ^{1,2,7}
Альдостерон (пг/мл)	577,81 ± 100,25	—	1852,35 ± 20,15*	—	1852,68 ± 84,31*	1014,30 ± 65,13* ^{1,5}	1353,70 ± 78,10* ^{1,5,7}

Таблица 4

Содержание гормонов гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной системы в сыворотке крови крыс-самцов на этапах метастазирования в печень

	Интактные	Контроль	MTC1	MTC2	MTC5	MTC7	
						А	Б
ТТГ (мМЕ/л)	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,01*	0,05 ± 0,01 ⁺	0,04 ± 0,01 ⁺	0,20 ± 0,04*+, ^{1,2}	0,25 ± 0,03*+, ^{1,2}	0,25 ± 0,02*+, ^{1,2}
T ₃ св (пмоль/л)	5,00 ± 0,59	8,81 ± 0,47*	10,97 ± 0,83*+,	11,34 ± 1,25*+,	8,96 ± 1,64*	1,96 ± 0,28*+, ^{1,2,5}	0,53 ± 0,04*+, ^{1,2,5,7}
T ₄ св (пмоль/л)	17,39 ± 1,46	21,72 ± 1,31*	23,43 ± 0,81*	24,16 ± 1,04*	20,79 ± 2,76*	20,74 ± 2,07*	7,81 ± 0,56*+, ^{1,2,5,7}
T ₃ (нмоль/л)	0,80 ± 0,09	—	—	—	—	0,82 ± 0,00	1,01 ± 0,04* ⁷
T ₄ (нмоль/л)	51,93 ± 3,50	81,03 ± 14,08*	—	—	—	38,54 ± 2,10*+,	51,81 ± 6,00* ⁷

Таблица 5

Содержание гормонов гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы в сыворотке крови крыс-самцов на этапах метастазирования в печень

	Интактные	Контроль	MTC1	MTC2	MTC5	MTC7	
						А	Б
ЛГ (МЕ/л)	0,04 ± 0,05	0,32 ± 0,11*	0,185 ± 0,09*	0,078 ± 0,04	0,18 ± 0,05*	0,83 ± 0,06	0,38 ± 0,05
ФСГ (МЕ/л)	14,30 ± 3,95	14,66 ± 2,57	13,98 ± 1,31	9,19 ± 1,13	2,74 ± 0,46*+, ^{1,2}	2,83 ± 0,31	1,90 ± 0,25
Эстрон (пг/мл)	10,10 ± 0,65	9,22 ± 0,29	30,58 ± 10,86 ↓ 12,33 ± 0,02 50% ↓ 48,82 ± 6,48 ⁺ 50%	60,90 ± 0,30*+, ¹	12,79 ± 1,34 ²	12,52 ± 1,05 ^{1,2}	14,66 ± 1,69 ^{+,1,2}
Эстрадиол (пг/мл)	21,57 ± 0,92	61,78 ± 2,62*	44,29 ± 5,28*+,	55,00 ± 1,73*+, ¹	43,60 ± 4,95*+, ²	100,10 ± 6,50 *+, ^{1,2,5}	155,05 ± 7,89 *+, ^{1,2,5,7}
Тестостерон (нг/мл)	1,00 ± 0,18	0,79 ± 0,11	1,61 ± 0,50 ↓ 0,83 ± 0,02 67% ↓ 3,16 ± 1,10 33%	3,25 ± 1,46*+ ↓ 0,90 ± 0,14 60% ↓ 6,78 ± 0,70 40%	1,12 ± 0,18	0,42 ± 0,05 ^{+,1,2,5}	0,35 ± 0,01 ^{+,1,2,5}
Свободный тестостерон (пг/мл)	1,99 ± 0,60	0,04 ± 0,01*	4,88 ± 0,34*+,	0,47 ± 0,23*+, ¹	1,85 ± 0,53 ^{+,1,2}	0,19 ± 0,02*+, ^{1,2,5}	0,10 ± 0,01*+, ^{1,2,5,7}

не ослаблением его продукции в гипофизе, а увеличением связывания с рецепторами, что способствовало усилению стероидогенеза в тканях. Однако в надпочечниках — основной мишени гипофизарного АКТГ — усиливалась синтез альдостерона и, возможно — предшественников андрогенов, в то время как *Crt*-синтетические процессы были угнетены. Гиперкортизолемиа, выявленная у 1/3 крыс, скорее всего, была обусловлена выбросом гормона в кровь из органов-депо, где он накопился ранее, например — из дислоцированной селезенки. Низкий уровень *Crt* и высокий уровень ДГЭАс в надпочечниках, а также редукция увеличенного уровня *Crt* в селезенке у крыс из группы МТС1 были выявлены нами в параллельно проводимом исследовании [5].

Двукратное уменьшение концентрации ТТГ в крови так же, как и в случае с АКТГ, было вызвано увеличением его связывания с рецепторами в тканях: щитовидной железы, что поддерживало её гиперфункцию (высокий уровень T_4 (св) в крови) и других, например, опухолевой (табл. 4). Предположение, что ТТГ может связываться не только с рецепторами щитовидной железы, было высказано в отношении яичников и костей [6, 7]. Обнаруженное нами нарастание концентрации T_3 (св) в крови (в 1,2 раза) способствовало торможению клеточного превращения T_3 из T_4 в тканях, в частности в гипофизе и, как следствие — стимуляции синтеза ТТГ (табл. 3). Гипер-*Crt*-емия, обнаруженная у части крыс из группы МТС1, также была необходима для регуляции синтеза ТТГ в гипофизе — она способствовала увеличению чувствительности его клеток к T_3 [7]. Увеличение уровня гипофизарного ТТГ было установлено нами ранее [8]. Известно, что взаимодействие тиреоидных гормонов с глюкокортикоидами приводит также и к стимуляции синтеза СТГ гипофизом [9].

Развитие опухолевых клеток в организме изменяло метаболизм половых стероидов: происходил сдвиг эстрогенов в сторону накопления E_1 (у 50% крыс его количество увеличивалось в 5,3 раза), регистрировалось увеличение концентрации тестостерона (T): свободной (у 100% крыс — в 41,9 раза) и общей (у 33% крыс — в 4,0 раза) форм — на фоне увеличенного уровня ЛГ в сыворотке крови (табл. 5). Эти сдвиги были вызваны изменением работы, в том числе и репродуктивных органов (уменьшение веса и ВК простаты). С другой стороны, такая динамика весовых показателей предстательной железы могла быть следствием высокого уровня эстрогенов в сыворотке крови: величина E_2 оставалась в 2 раза выше интактных значений, хотя и несколько редуцировалась (в 1,4 раза) после введения опухолевых клеток в селезенку (табл. 5). Оказывать влияние на функциониро-

вание предстательной железы могли не только эстрогены, но и андрогены, гормоны щитовидной железы [10].

2.2. МТС2. У животных из группы МТС2 — перед «выходом» первичной опухоли в селезенке — её весовые показатели увеличивались: масса — в 1,4 раза, ВК — в 1,2 раза, относительно интактных значений (табл. 1, 2). Впервые статистически значимо увеличивалась масса печени — в 1,1 раза по сравнению с интактными крысами, при этом её ВК не изменялся (табл. 1, 2). Масса и ВК гипофиза уменьшались ещё больше — в 1,5 раза, по сравнению с предыдущим периодом исследования, что указывало на нарастающее напряжение регуляторных процессов в организме. Изменения в работе ГГНС, выявленные у крыс из группы МТС1 — усиливались: низкие весовые показатели надпочечников сочетались с тотальной гипо-*Crt*-емией: уровень *Crt* был в 2,3 раза ниже, чем у контрольных животных (табл. 3). ГГТС работала в прежнем гиперактивном режиме, о чём свидетельствовал высокий уровень тиреоидных гормонов в крови (табл. 4). Дисбаланс половых стероидов усугублялся. Концентрации E_1 и E_2 увеличивались соответственно в 2 и в 1,2 раза относительно группы МТС1, при этом E_2 оставался в 1,1 раза меньше контроля (табл. 5). Известно, что эстрогены относятся к числу важных стимуляторов роста не только репродуктивных, но и остальных тканей и оправдано сохраняют ведущую роль модификаторов или инициаторов гормонального канцерогенеза [11]. У крыс с высоким на предыдущем этапе уровнем T , его количество увеличивалось в 3,0 раза. Концентрация $T_{св}$ уменьшалась в 10,4 раза, но оставалась в 11,8 раз выше контрольных значений (табл. 5). Нарастающее превалирование эстрогенов над андрогенами в крови могло способствовать ещё большему уменьшению ВК простаты, который впервые становился значимо ниже (в 1,3 раза) интактных значений (табл. 2).

2.3. МТС 5. На 5-й нед. развития метастатического процесса в печени на фоне снижения массы крыс регистрировался значительный рост первичного опухолевого узла в селезенке, в результате масса и ВК селезенки увеличивались в 6,5 раз (табл. 1, 2). Метастазы в печени не визуализировались, весовые показатели органа существенно не отличались от контроля. На фоне гиперальдостеронемии и увеличения весовых показателей надпочечников: масса — в 1,3 раза и ВК — в 1,5 раза, уровень *Crt* в крови возрастал до контрольных значений, что указывало на сохраняющуюся адреналовую активацию с восстановлением синтеза *Crt* (табл. 1-3). Увеличение

содержания Crt в надпочечниках мы регистрировали у крыс из группы МТС5 в параллельно проводимых исследованиях [5]. Нарастание сывороточного ТТГ (в 5,0 раза) могло быть обусловлено и усилением его синтеза в гипофизе (ВК гипофиза увеличивался в 1,7 раза), и уменьшением его связывания в тканях: щитовидной железы (уменьшение веса железы в 1,4 раза и ослабление её гиперфункции), возможно — в опухолевой (табл. 1, 2, 4). В то же время, уменьшение уровней эстрогенов в крови: E_1 — в 4,8 раза, E_2 — в 1,3 раза, по нашему мнению, было вызвано увеличением их захвата из крови злокачественными клетками. Повторное нарастание концентрации $T_{св}$ (в 3,9 раза) в крови было обусловлено увеличением его синтеза в семенниках и/или в опухоли в результате стимуляции высоким уровнем ЛГ (табл. 1, 2, 5). ФСГ, напротив — редуцировался: его содержание становилось в 5,4 раза ниже контроля и в 3,4 раза ниже предыдущего периода наблюдения (табл. 5).

МТС7А. Общая масса тела животных в период сформированных метастазов в печени увеличивался из-за нарастания опухолевой массы (первичной опухоли и метастазов), в результате уменьшались ВК практически всех органов, кроме печени как в группе МТС7А, так и в группе МТС7Б. Резкое уменьшение массы надпочечников — в 4,0 раза, в сочетании с низким уровнем АКТГ и равнозначным снижением (в 1,8 раза) уровней Crt и альдостерона в крови у крыс из группы МТС7А, свидетельствовало об истощении органа вследствие его продолжающейся стимуляции (табл. 1, 3). Масса щитовидной железы, напротив — увеличивалась в 1,5 раза, при этом сохранялись высокие значения ТТГ и $T_{4св}$ в крови, что указывало на сохранение тиреоидной гиперфункции (табл. 1, 4). В то же время, формировался, так называемый, «low T_3 » синдром, основной признак которого — уменьшение уровня $T_{3св}$ (в 4,6 раза) в крови (табл. 4). Подобная модель измененного состояния тиреоидной системы является результатом экстратиреоидного периферического метаболизма, обусловленного как изменением работы дейодиназы в тканях, вследствие влияния, например, высоких уровней эстрогенов и других гормонов, так и нарушением белок-синтетической функции печени [12]. Резкое нарастание концентрации E_2 в крови (в 2,3 раза) при контрольном уровне E_1 , выявленное у крыс из группы МТС7А, было обусловлено, по нашему мнению, увеличением его синтеза в метастазах печени (табл. 5). Ещё большее снижение массы семенников (в 1,7 раза) в сочетании с почти пятикратным увеличением концентрации ЛГ, свидетельствовало о нарастающей стимуляции гонад (табл. 1, 5). Уменьшение содержания T — в 2,7 раза, и $T_{св}$ — в 9,7 раза, в крови

могло быть вызвано несколькими факторами: истощением T -синтезирующей функции семенников, вследствие их значительной активации, или захватом андрогенов растущей опухолью с последующим использованием, например, для синтеза эстрогенов.

МТС7Б. У крыс, имеющих, наряду с печеночными метастазами — метастазы в легких, весовые показатели селезенки и печени были меньше — соответственно в 2,2 раза и в 1,7 раза, а легких — больше — в 1,6 раза, чем у крыс из группы МТС7А (табл. 1, 2). При этом масса легких с метастазами (МТС7Б) статистически значимо не отличалась от предыдущего периода наблюдения, а без метастазов (МТС7А) — была в 1,3 раза меньше (табл. 1, 2). И у тех, и у других крыс селезенка была представлена небольшими островками ткани по периферии первичной опухоли; печень имела крупные метастатические узлы. В 1,5 раза меньшая масса гипоталамуса у крыс из группы МТС7Б свидетельствовала, на наш взгляд, о большем напряжении центральных регуляторных механизмов (табл. 1, 2). В то же время, высокая активность ГНС несколько ослабевала, но, в отличие от МТС7А, не сопровождалась истощением: масса надпочечников и уровень Crt в крови не отличались от группы МТС5, уровень альдостерона снижался в меньшей степени (табл. 1, 3). На фоне повышенной, как и в группе МТС7А, стимуляции щитовидной железы (увеличение массы щитовидной железы и уровня ТТГ в крови) — концентрация $T_{4св}$ в крови уменьшалась (в 2,7 раза) вследствие нарушения поступления синтезированного тироксина в кровь (табл. 1, 4). Накопление $T_{4св}$ в щитовидной железе крыс этой группы мы наблюдали ранее [8]. Кроме того, уровень $T_{3св}$ в крови снижался в большей степени — в 3,7 раза, чем у крыс из группы МТС7А — формировался более тяжёлый «low T_3/T_4 » синдром. Общие формы тиреоидных гормонов были выше, чем у крыс из группы МТС7А — T_4 (в 1,3 раза), T_3 (в 1,2 раза) вследствие большей сохранности белок-синтетической функции печени и более высокого уровня E_2 в крови. Известно, что эстрогены увеличивают уровень сывороточного T_4 -связывающего глобулина [12]. Вес репродуктивных органов у крыс из группы МТС7Б был больше, чем в группе МТС7А: семенников — в 1,7 раза, простаты — в 2,4 раза; уровни тропных гормонов в крови — ниже: ЛГ — в 2,2 раза (умеренное увеличение), ФСГ — в 1,4 раза (снижение); а амплитуда отклонений половых гормонов — значительнее: E_2 — в 1,6 раза ($p < 0,05$) (увеличение), $T_{св}$ — в 1,9 раза (уменьшение) (табл. 1, 5).

Заключение

Таким образом, развитие злокачественного процесса в организме с метастазированием в печень, протекало на фоне нарастающей активации основных регуляторных систем организма. ГГНС характеризовалась восстановлением первоначальной блокады синтеза *Crt* в надпочечниках и последующим адреналовым истощением со снижением уровней *Crt* и альдостерона в крови. Со стороны ГГТС после предварительного увеличения уровня $T_{3св}$ в крови формировался «low T_3 » синдром. В ГГТС регистрировалось увеличение синтеза T в гонадах вследствие нарастающей гипо- T -емии на фоне гиперэстрогемии.

Отличительными признаками функционирования регуляторных систем при сочетанном метастатическом поражении печени и лёгких являлось условие умеренной активации ГГНС и ГГТС с сохранением их резервных возможностей и большим накоплением E_2 в крови, а также активация ГГТС с нарушением оттока T_4 из щитовидной железы в кровь с формированием более тяжелого «low T_3/T_4 » синдрома.

References

1. Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V., eds. *State of oncological care in Russia in 2015 [Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2015 godu]*. Moscow; MNIIOI im. P.A. Gertsena; 2016. (In Russian)
2. Moskvichev E.V., Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Kostrova O.Yu. Morphology of colon cancer after application of 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2009; 1: 76. (In Russian)
3. Lee W.Y., Hong H.K., Ham S.K., Kim C.I., Cho Y.B. Comparison of colorectal cancer in differenti-

ally established liver metastasis models. *Anticancer Res*. 2014; 34(7): 3321-8.

4. Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Evstratova O.F. A method for reproduction of metastases in the liver. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2014; 157(6): 745-7. (In Russian)

5. Kaplieva I.V., Frantsiyants E.M., Trepitaki L.K., Cheryarina N.D., Pogorelova Yu.A. Characteristics of steroid metabolism in male rats during experimental liver metastasis. *Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal*. 2017; 22(2): 93-100. (In Russian)

6. Aghajanova L., Lindeberg M., Carlsson I. B., Stavreus-Evers A., Zhang P. et al. Receptors for thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones in human ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online*. 2009; 18 (3): 337-47.

7. Den'ga O.V., Kolesnik K.A. The role of thyroid hormones in the integrated regulation of bone metabolism in the norm and in hypothyroidism (literature review). *Tavrishskiy mediko-biologicheskii vestnik*. 2012; 1(15): 332-7. (In Russian)

8. Kit O.I., Kaplieva I.V., Frantsiyants E.M., Trepitaki L.K., Pogorelova Yu.A. Characteristics of thyroid status in experimental liver metastasis. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2016; 135 (11): 53-8. (In Russian)

9. Gudoshnikov V.I. Role of thyroid hormones and iodine consumption in the ontopathogeny of various diseases: focus on interactions with glucocorticoids and some endocrine disruptors Literature review. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireodologiya*. 2016; 12 (1): 16-21. (In Russian)

10. Anguiano B., Lopez A., Delgado G., et al. Deiodinase type 1 activity is expressed in the prostate of pubescent rats and is modulated by thyroid hormones, prolactin and sex hormones. 2006; 190(2): 363-71.

11. Berstein L.M., Bartchuk A.S., Gershfeld E.D., Kovalevsky A.Yu., Maximov S.Ya. et al. Use of aromatase and its inhibitors in dealing with different oncological pathologies other than breast cancer. *Voprosy onkologii*. 2007; 53(1): 7-13. (In Russian)

12. Brent G.A., Geffen D. *Thyroid function testing*. Springer: New York, 2010; 284 DOI 10.1007/978-1-4419-1485-9.

Сведения об авторах:

Каплиева Ирина Викторовна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ РНИОИ Минздрава России, e-mail: kaplirina@yandex.ru

Франциянц Елена Михайловна, доктор биол. наук, проф., рук. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ РНИОИ Минздрава России

Трепитаки Лидия Константиновна, науч. сотр., лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ РНИОИ Минздрава России

Черярина Наталья Дмитриевна, врач-лаборант, лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ РНИОИ Минздрава России

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616-08-039.73+ 616-008.1

Фоменко О.Ю.¹, Шельгин Ю.А.^{1,2}, Порядин Г.В.³, Титов А.Ю.¹, Козлов В.А.¹, Белоусова С.В.¹

Первый опыт применения экстракорпоральной магнитной стимуляции в лечении недостаточности анального сфинктера

¹ ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» Минздрава России, 123423, г. Москва, Россия, ул. Саляма Адила, д. 2

² ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, 125993, г. Москва, Россия, ул. Баррикадная, д.2/1, стр. 1

³ ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1

Цель исследования. В связи с отсутствием четких алгоритмов консервативного лечения анальной инконтиненции и доказанным превосходством мультимодальной терапии, целью исследования было сравнение двух комплексных программ консервативного лечения недостаточности анального сфинктера (НАС), включающих в качестве одной из составляющих анальную электростимуляцию или экстракорпоральную магнитную стимуляцию по специально разработанным протоколам. **Методика.** В исследование включено 59 чел. с недостаточностью анального сфинктера. В 1-й группе, состоящей из 22 пациентов (20 женщин, 2 мужчины, средний возраст $50,9 \pm 5,1$ года), анальная электростимуляция сочеталась с БОС-терапией (терапией биологической обратной связью) и тиббиальной нейромодуляцией. Во 2-й группе, состоящей из 37 пациентов (33 женщины, 4 мужчин, средний возраст $51 \pm 4,4$ года), экстракорпоральная магнитная стимуляция сочеталась с БОС-терапией и тиббиальной нейромодуляцией. **Результаты.** У 22 больных 1-й группы показатели тонуса и сократительной способности анальных сфинктеров до лечения составляли $33,3 \pm 2,8$ мм рт. ст. в покое и $77,3 \pm 16,0$ при волевом сокращении, а после лечения — $42,6 \pm 4,2$ и $99,5 \pm 19,2$, т.е. увеличение давления в анальном канале составило 27,9% и 28,7% соответственно. У 37 пациентов 2-й группы показатели тонуса и сократительной способности анальных сфинктеров до лечения составили $32,4 \pm 2,0$ и $91,4 \pm 9,5$ мм рт. ст., а после лечения отмечены на уровне $40,9 \pm 3,0$ и $109,8 \pm 11,9$ мм рт. ст., т.е. давление в анальном канале возросло на 26,2% и 20,1% в покое и при волевом сокращении соответственно. **Обсуждение.** Проводимая консервативная реабилитация оказывает положительное воздействие на мышцы запирающего аппарата прямой кишки у пациентов с анальной инконтиненцией, вызывая увеличение показателей как тонуса, так и сократительной способности анальных сфинктеров, что имеет важное клиническое значение. Статистически значимых различий между природой показателей давления в группах пациентов с анальной и магнитной стимуляцией не зарегистрировано.

Ключевые слова: недостаточность анального сфинктера; инконтиненция; сфинктерометрия; экстракорпоральная магнитная стимуляция; анальная электростимуляция; нейротибиальная модуляция.

Для цитирования: Фоменко О.Ю., Шельгин Ю.А., Порядин Г.В., Титов А.Ю., Козлов В.А., Белоусова С.В. Первый опыт применения экстракорпоральной магнитной стимуляции в лечении недостаточности анального сфинктера. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 98—106

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.98-106

Для корреспонденции: Фоменко Оксана Юрьевна, канд. мед. наук, руководитель лаборатории клинической патофизиологии ФГБУ ГНЦК им. А.Н. Рыжих Минздрава России, e-mail: info@gnck.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.09.2017

Fomenko O.Yu.¹, Shelygin Yu.A.^{1,2}, Poryadin G.V.³, Titov A.Yu.¹, Kozlov V.A.¹, Belousova S.V.¹

The first experience of using extracorporeal magnetic stimulation in the treatment of anal sphincter failure

¹ State Scientific Centre of Coloproctology, Saliyam Adil, Str. 2, Moscow 123423, Russia

² Russian Medical Academy of Postgraduate Education; 2/1, p.1, ul. Barrikadnaya Str. 2/1, Bldg. 1, Moscow 125993, Russia

³ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU); Ostrovityanova Str. 1, Moscow 117997, Russia

Aim. Since clear algorithms for conservative treatment of anal incontinence are unavailable while advantages of the multimodal therapy have been proven, the aim of this study was to compare two complex programs of conservative treatment of anal sphincter failure. The programs included study-specific protocols of anal electrostimulation or extracorporeal magnetic stimulation as one of treatment components. **Methods.** The study included 59 patients with anal sphincter failure. The first

group, which consisted of 22 patients (20 (90.9%) women and 2 (9.1%) men; mean age, 50.9 ± 5.1), underwent anal electrostimulation combined with biofeedback therapy and tibial neuromodulation. The second group, which consisted of 37 patients (33 (89.2%) women and 4 (10.8%) men; mean age, 51 ± 4.4), underwent extracorporeal magnetic stimulation combined with biofeedback therapy and tibial neuromodulation. **Results.** For 22 patients of the first group, pretreatment values of perianal sphincter tone and contractility were 33.3 ± 2.8 mm Hg at rest and 77.3 ± 16.0 mm Hg during a strong voluntary contraction; posttreatment values increased to 42.6 ± 4.2 mm Hg and 99.5 ± 19.2 mm Hg, respectively, i.e., the anal canal pressure increased by 27.9% and 28.7%, respectively. For 37 patients of the second group, pretreatment values of perianal sphincter tone and contractility were 32.4 ± 2.0 mm Hg and 91.4 ± 9.5 mm Hg; posttreatment values increased to 40.9 ± 3.0 mm Hg and 109.8 ± 11.9 mm Hg, i.e., the anal canal pressure increased by 26.2% and 20.1% at rest and during a strong contraction, respectively. **Discussion.** The conservative rehabilitation was beneficial for the anal sphincter in patients with anal incontinence by increasing both tone and contractility of perianal sphincters, which is clinically highly important. Statistically significant differences in increments of pressure values between groups of patients with colorectal and magnetic stimulation were absent.

Keywords: anal sphincter failure; sphincterometry; extracorporeal magnetic stimulation, anal electrostimulation; tibial neuromodulation.

For citation: Fomenko O.Yu., Shelygin Yu.A., Poryadin G.V., Titov A.Yu., Kozlov V.A., Belousova S.V. The first experience of application of extracorporeal magnetic stimulation in the treatment of anal sphincter insufficiency. *Patologicheskaya Fiziologiya i Experimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 98—106. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.98-106

For correspondence: Oksana O. Fomenko, Candidate of Medical Sciences, head of the laboratory of clinical pathophysiology, State Scientific Centre of Coloproctology, e-mail: info@gnck.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Fomenko O.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-9603-6988>

Shelygin Yu.A., <https://orcid.org/0000-0002-8480-9362>

Poryadin G.V., <https://orcid.org/0000-0003-2010-3296>

Titov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-1636-8075>

Kozlov V.A., <https://orcid.org/0000-0003-1788-1484>

Belousova S.V., <https://orcid.org/0000-0003-1475-2599>

Received 12.09.2017

Введение

Консервативная реабилитация пациентов с недержанием кишечного содержимого на сегодняшний день остается нерешенной проблемой [1, 2]. В литературе отсутствуют четкие алгоритмы применения различных методов физиотерапевтического воздействия и сроков проведения процедур. Позиционируется комплексный подход к лечению, т.е. сочетание различных методов разнонаправленного воздействия, с целью достижения максимальной эффективности лечения и дальнейшего сохранения результатов проведенной реабилитации.

Показано, что модулируемая электростимуляция с использованием средних частот с БОС-терапией и тренировкой мышц тазового дна улучшает результаты лечения анальной недостаточности. При этом длительность курса лечения составляет от 2 до 3 мес. [3]. Основываясь на собственных результатах многие авторы утверждают, что ни метод БОС-терапии, ни

комплекс упражнений для тренировки мышц тазового дна не являются сами по себе более предпочтительными по сравнению с другими методами, однако сочетание БОС-терапии с электростимуляцией может быть более эффективным, особенно у пациентов с резистентностью к другим консервативным методам лечения [3—7].

Роль мультимодальной терапии для реабилитации до конца не ясна, однако результаты ряда исследований [8] представляются многообещающими, так как положительный эффект, согласно данным опросников, достигнут в 90% случаев, а у 40% пациентов удалось добиться исчезновения симптомов.

Представляется чрезвычайно интересным систематический обзор [9], в котором проанализированы результаты 13 рандомизированных клинических исследований (РКИ), оценивающих эффективность БОС-терапии, электростимуляции и их сочетания. В 12 РКИ проводилось сравнение только БОС-терапии и/или ее сочетания с электростимуляцией, в то

время как только электростимуляция оценивалась в 7 исследованиях. На основании анализа результатов лечения в общей сложности 939 пациентов авторы позиционируют следующие основные моменты:

- ни одно исследование не показало значимых различий в группах «только БОС-терапия» или «только электростимуляция» относительно контрольных групп, по сравнению с группами «БОС-терапия + электростимуляция»;

- явное превосходство ЭМГ-контролируемой БОС-терапии сочетанное с электростимуляцией над любым видом лечения в виде монотерапии (приблизительно в 2 раза эффективнее);

- среднечастотная электростимуляция с модулируемой амплитудой (АМ-МФ), также известная как премодуляционная интерференционная электростимуляция, в сочетании с БОС-терапией показывает лучшие результаты по сравнению с низкочастотной электростимуляцией и только БОС-терапией, причем 50% этих пациентов не отмечали явлений недержания спустя 6 мес. после лечения. Эффект улучшался пропорционально длительности лечения;

- низкочастотная электромиостимуляция имеет значительно большее количество побочных эффектов, связанных с применением данных приборов, что невыгодно отличает их от АМ-МФ. Данный феномен связан с тем, что электрические импульсы воздействуют не только на мышечные волокна, но и на болевые рецепторы. При низкочастотной терапии пациент не в состоянии терпеть импульсы, необходимые для эффективного сокращения мышечных волокон. Электростимуляция в режиме АМ-МФ вызывает потенциалы действия, являющиеся менее болезненными; возникают более естественные сокращения мышц.



Рис. 1. Комплекс для экстракорпоральной магнитной стимуляции ФГБУ ГНЦК А.Н. Рыжих Минздрава России.

Цель исследования — сравнение двух комплексных программ консервативного лечения анальной инконтиненции, включающих в качестве одной из составляющих анальную электростимуляцию или экстракорпоральную магнитную стимуляцию по специально разработанным протоколам.

Методика

Для сравнительной оценки эффективности комплексных программ консервативного лечения анальной инконтиненции за период с января 2016 по май 2017 г. было обследовано 59 чел. с явлениями недостаточности анального сфинктера. У всех пациентов получено письменное информированное добровольное согласие на обследование.

В 1-й группе было 22 пациента (20 женщин, 2 мужчин, средний возраст $50,9 \pm 5,1$ года) анальная электростимуляция (АС) сочеталась с тиббиальной нейромодуляцией. Тиббиальная нейромодуляция и электростимуляция проводились на аппарате «Био-Браво» (Германия).

Во 2-й группе было 37 пациентов (33 женщины и 4 мужчины, средний возраст $51 \pm 4,4$ года), магнитная стимуляция МСБОС-терапия сочеталась с тиббиальной нейромодуляцией и неинвазивной экстракорпоральной магнитной стимуляцией на кресле с расположенным внутри магнитным индуктором.

Нами были разработаны собственные оригинальные протоколы экстракорпоральной магнитной стимуляции и оценены результаты первого клинического опыта. Использовался магнитный комплекс с охлаждением MagPro R30 (Производство Topica Elektronik, Дания). Форма импульса — бифазная, тип индуктора — круглый. Для экстракорпоральной стимуляции было сконструировано специальное кресло, внутрь которого для проведения сеансов и был помещен индуктор (рис. 1).

Протоколы стимуляции:

Экстракорпоральная моторная МС (Anal incontinence 02 motor)

Пациента усаживали на специальное кресло (рис. 1) с вмонтированным генератором магнитного поля, охлаждением и внешним источником питания. Данная программа запускалась в 3 положениях пациента.

У женщин:

- а) в положении с локализацией койла максимально на урогенитальную область;
- б) на область анального отверстия;
- в) с направленностью стимуляции в область копчика.

У мужчин: первая и вторая позиции — на область анального отверстия, третья — направленность к копчику (табл. 1).

Экстракорпоральная сенсорная МС (Anal incontinence 03 sens)

Пациент продолжает сидеть на кресле, область воздействия — анальное отверстие (табл. 2). Интенсивность определяли по минимальной чувствительности (легкие покальвания) в области анального сфинктера и органов малого таза, сокращений быть не должно. Общая продолжительность протокола 5 мин.

Все пациенты предъявляли жалобы на недержание различных компонентов кишечного содержимого, при этом диагноз анальной инконтиненции I, II или III степени был установлен методом комплексной сфинктерометрии [10] в соответствии с параметрами степени недостаточности анального сфинктера [11]. Субъективную оценку жалоб на недержание различных компонентов стула проводили в соответствии с Кливлендской шкалой оценки степени инконтиненции (шкала Wexner, шкала Векснера), где 0 — отсутствие жалоб, 20 — полное недержание всех компонентов кишечного содержимого [12].

В группе больных АС органическая причина инконтиненции (НАС), развившейся вследствие перенесенных травматических, послеродовых или послеоперационных нарушений структур анального сфинктера была выявлена у 15 из 22 чел. (14 женщин и 1 мужчина, средний возраст $48,4 \pm 6,3$ года). АС

функционального генеза имела у 7 пациентов из 22 чел. (6 женщин и 1 мужчина, средний возраст — $56,1 \pm 10,2$ года).

У пациентов группы МС органическая инконтиненция отмечена у 21 из 37 пациентов (19 женщин и 2 мужчины, средний возраст $46,4 \pm 6,0$ лет). Функциональная НАС была выявлена у 16 из 37 пациентов (14 женщин и 2 мужчины, средний возраст составил $57,1 \pm 5,5$ лет) больных.

Результаты и обсуждение

У 22 больных группы АС показатели тонуса и сократительной способности анальных сфинктеров до лечения были $33,3 \pm 2,8$ в покое и $77,3 \pm 16,0$ мм рт. ст. при волевом сокращении, а после лечения составили соответственно $42,6 \pm 4,2$ и $99,5 \pm 19,2$ мм рт. ст., т.е. увеличение давления в анальном канале составило 27,9% и 28,7%.

У 37 пациентов группы МС показатели тонуса и сократительной способности анальных сфинктеров до лечения составили $32,4 \pm 2,0$ и $91,4 \pm 9,5$ мм рт. ст., а после лечения отмечены на уровне $40,9 \pm 3,0$ и $109,8 \pm 11,9$ мм рт. ст., т.е. давление в анальном канале возросло на 26,2% и 20,1% в покое и при волевом сокращении.

Таблица 1

Разработанные протоколы стимуляции двигательных нервов малого таза

Частота	Количество импульсов	Пауза, секунды
5 Гц	20 имп.	1 с
10 Гц	20 имп.	1 с
15 Гц	20 имп.	1 с
20 Гц	20 имп.	1 с
Пауза 10 с		
Интенсивность определяется по минимальному мышечному сокращению		
Примечание. Общая продолжительность протокола 6 мин.		

Таблица 2

Разработанные протоколы стимуляции сенсорных нервов малого таза

Частота	Количество импульсов	Пауза, секунды
10 Гц	20 имп.	2 с
20 Гц	20 имп.	2 с
30 Гц	30 имп.	2 с
40 Гц	40 имп.	2 с
50 Гц	50 имп.	2 с
60 Гц	60 имп.	2 с
70 Гц	70 имп.	2 с
80 Гц	80 имп.	2 с
Пауза 20 с		

Показатели сфинктерометрии у пациентов с органической НАС в группах АС и МС до и после лечения¹ Таблица 3

Показатели сфинктерометрии	Среднее давление покоя (мм рт. ст.)			Максимальное давление при волевом усилии (мм рт. ст.)		
	Группа АС	Группа МС	р	Группа АС	Группа МС	р
До лечения	33,1 ± 3,8	31,0 ± 3,1	0,35	79,6 ± 22,9	86,9 ± 12,6	0,53
После лечения	40,3 ± 5,0	38,8 ± 4,7	0,64	98,7 ± 26,8	102,4 ± 14,1	0,78
р	0.001	0.000		0.002	0.000	

Примечание. р по горизонтали — сравнение показателей давления до и после лечения отдельно по АС и МС; р по вертикали — сравнение групп АС и МС.

Показатели сфинктерометрии у пациентов с функциональной НАС в группах АС и МС до и после лечения Таблица 4

Показатели сфинктерометрии	Среднее давление покоя (мм рт. ст.)			Максимальное давление при волевом усилии (мм рт. ст.)		
	Группа АС	Группа МС	р	Группа АС	Группа МС	р
До лечения	33,7 ± 5,0	34,4 ± 2,6	0,48	72,4 ± 21,8	97,3 ± 15,7	0,06
После лечения	47,6 ± 8,9	43,8 ± 3,3	0,27	101,3 ± 30,8	119,5 ± 21,6	0,31
р	0,001	0,000		0,004	0,000	

Примечание. р по горизонтали — сравнение показателей давления до и после лечения отдельно по АС и МС; р по вертикали — сравнение групп АС и МС.

Рассмотрим отдельно результаты лечения двух групп пациентов в зависимости от этиопатогенетического фактора недостаточности анального сфинктера.

Показатели лечения при органической недостаточности анального сфинктера

Результаты полученные у пациентов группы АС (у 15 из 22 пациентов) с органической НАС — показатели тонуса и сократительной способности анальных сфинктеров до и после лечения представлены в табл. 3. Как показывают данные табл. 3, давление в анальном канале возросло с 21,8% до 24,0%. Средний балл по шкале инконтиненции Векснера до и после лечения составил 8,5 ± 3,7 против 6,7 ± 3,2 соответственно (р>0,05).

У 21 из 37 пациентов группы МС с органической НАС (табл.3) показатели тонуса и сократительной способности анальных сфинктеров до и после лечения представлены также в табл. 3. Увеличение давления в сфинктерном аппарате составило 25,2% и 17,8% соответственно (табл. 3). По шкале Векснера после лечения также отмечена некоторая положительная динамика: до лечения — 7,3 ± 2,9, после — 6,4 ± 2,7 балла (р>0,05).

Показатели лечения при функциональной недостаточности анального сфинктера

Результаты обследования 7 из 22 пациентов группы АС с функциональной НАС и 16 из 37 пациентов группы МС до и после лечения представлены в табл.

4. Увеличение давления в анальном канале в группе АС и группе МС в покое и при волевом сокращении составило 41,2% и 39,9% соответственно (табл. 4). По шкале Векснера средний балл до и после лечения в группе АС составил 7,9 ± 1,8 и 5,9 ± 1,1 и в группе МС — 8,9 ± 3,4 и 6,6 ± 2,7 (р>0,05).

Отметим, что особенных различий между давлением в группах пациентов, которых определили на лечение АС и МС, не отмечалось. Только максимальное давление при волевом усилии на 10% уровне (спорная значимость) демонстрирует большее значение для группы МС. Следовательно, различия в результатах вряд ли могут быть вызваны различиями у пациентов.

Кроме того, при сравнении средних значений была выявлена значимая (на уровне 1%, так как р<0.01) разница между показателями давления до и после лечения для всех способов (рис. 2). Таким образом, обе комплексные программы повышают давление. В обоих случаях нами использовался t-критерий.

В абсолютных цифрах прирост показателей давления приведен на рис. 3. Несколько большие значения выявлены при проведении анальной стимуляции, однако данный прирост был обусловлен успехом применения метода у больных, страдающих функциональной НАС. В случае с органической НАС результаты не столь очевидны (для давления в состоянии покоя результаты даже несколько более высокие при магнитной стимуляции).

¹ В табл. 3 и 4 в качестве значения ± «к средней» указывает не стандартное отклонение, а границы доверительного интервала.

Кроме того, при проведении t-теста (Стьюдента) для сравнения средних значений приростов показателей давления статистически значимых различий (даже на уровне 10%) для анальной и магнитной стимуляции выявить не удалось (ни для давления в условиях покоя, ни для давления при волевом сокращении). Правда, отсутствие статистической значимости может быть объяснено небольшим числом наблюдений.

После тестирования на нормальность с помощью критерия Шапиро—Уилка выяснено, что, например, невозможно утверждать, что нормально будет распределено изменение следующих показателей:

- показателя давления в покое в случае внутрианальной стимуляции;
- показателя давления при волевом сокращении в случае магнитной стимуляции.

Таким образом, при условии небольшого числа наблюдений и, в ряде случаев, отсутствия нормального распределения, целесообразным представляется применение непараметрических тестов. В данной работе для определения значимости различий мы применили простой непараметрический ранговый критерий Манна—Уитни (U-тест). В итоге при функциональной НАС в состоянии покоя внутрианальная стимуляция показала значимо больший прирост ($p < 0,05$) по сравнению с магнитной стимуляцией. Отметим, что в данном конкретном случае то же самое подтверждает и непараметрический тест равенства медиан (Non parametric quality-of-medians test).

Рассмотрев вместо абсолютных значений прироста относительные приросты (прирост в % к показателю, измеренному до проведения лечения) показателей внутрианального давления при различных видах НАС и методах стимуляции, можно сказать, что превышение средних значений в случае АС устойчиво (рис. 3). Таким образом, нельзя сказать, что полученные и представленные на рис. 4 характеристики связаны с различиями в первоначальном уровне внутрианального давления между группами пациентов, которым назначались разные виды стимуляции, что уже было показано выше в табл. 3 и 4.

Отметим, что при небольших выборках средние значения могут оказаться не совсем информативными. Для более детального сравнения распределений между полученными показателями (медиана, нижний и верхний квартили, минимальное и максимальное значение выборки) рассмотрим так называемые ящичковые диаграммы (box-and-whiskers diagram or plot, box plot)² (рис. 4).

² Интерпретация графика «ящика с усами»: черта в середине ящика — медианное значение, верхняя часть ящика — граница верхнего квартиля — выше находятся 25% результатов с самыми большими значениями, нижняя часть — нижнего — ниже находятся 25% с самыми маленькими значениями, «усы» определяют минимальное и максимальное значение выборки (все, что попадает в 95% доверительный интервал, а значения, выходящие за его пределы будут считаться «выбросами»). На рис. 3 для экономии места на шкале выбросы не изображены.

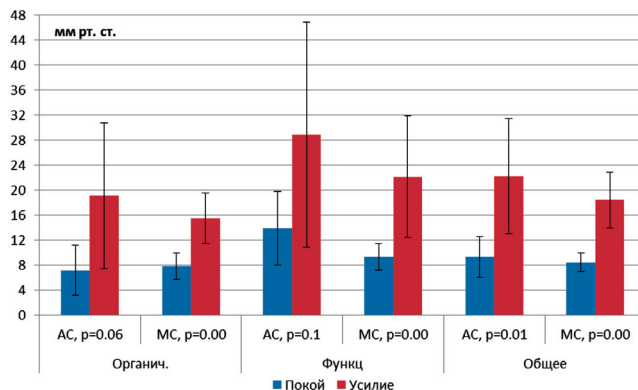


Рис. 2. Показатели прироста давления (мм рт. ст.) после проведения различных видов стимуляции в зависимости от вида (органическая или функциональная) НАС.

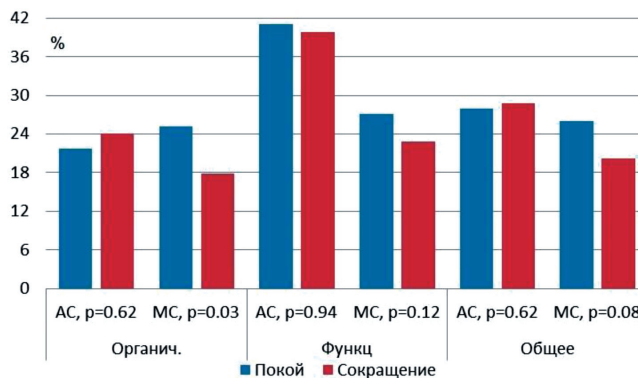


Рис. 3. Показатели прироста давления (%) после проведения различных видов стимуляции в зависимости от этиологии НАС.

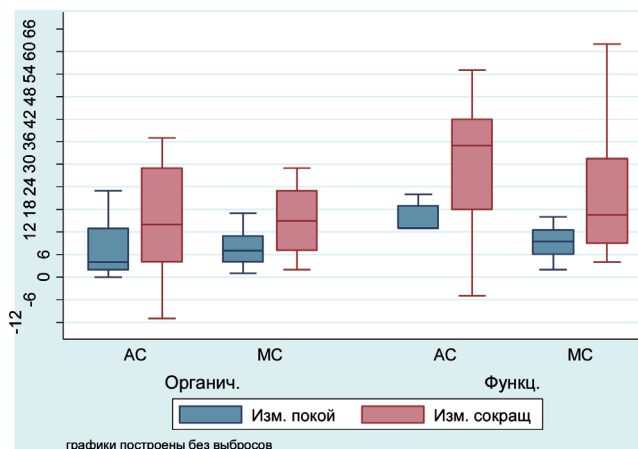


Рис. 4. Диаграммы прироста давления после различных видов лечения по данным сфинктерометрии.

Таблица 5

Показатели ящичковых диаграмм после проведенного лечения, включающего АС и МС*

		Тип стимуляции	Медиана	Среднее	25%	75%	Асимметрия
Общее	Покой	МС	8	8,46	5	12	0,26
		АС	7	9,32	2	15	0,41
	Сокращение	МС	16	18,42	8	26	1,38
		АС	21,5	22,23	6	35	0,59
Органическая НАС	Покой	МС	7	7,81	4	11	0,57
		АС	4	7,20	2	13	1,07
	Сокращение	МС	15	15,52	7	23	0,15
		АС	14	19,13	4	29	1,08
Функциональная НАС	Покой	МС	9,5	9,31	6	12,5	-0,11
		АС	13	13,86	13	19	-0,72
	Сокращение	МС	16,5	22,19	9	31,5	1,04
		АС	35	28,86	18	42	-0,49

Примечание. * — по данным сфинктерометрии.

Показатели ящичковых диаграмм приведены в табл. 5. Помимо медианы и показателей верхнего и нижнего квартиля мы приводим так называемый относительный показатель асимметрии³.

В целом, значительного отклонения средних и медианных показателей не наблюдается кроме случаев с приростом показателей сокращения при проведении магнитной стимуляции, что, как показывает дальнейший анализ, вызвано высокой асимметрией в случае функциональной НАС. В то же время, при органической НАС большие показатели асимметрии наблюдаются при анальной стимуляции.

Таким образом, в случае функциональной НАС внутрианальная стимуляция (АС) приводит к более высоким медианным значениям прироста давления как в состоянии покоя, так и в состоянии волевого сокращения. В данном случае относительно низкое среднее значение показателя обусловлено несколькими значительными снижениями давления, которые наблюдались в данной выборке⁴. При МС в случае функциональной НАС в состоянии покоя отрицательная асимметрия незначительная, а в состоянии сокращения наблюдается заметная положительная асимметрия. В то же время при органической НАС внутрианальная стимуляция приводит к значительно-

му превышению среднего значения величины медианы, то есть ситуации, когда относительно высокое среднее значение обусловлено большим разбросом (дисперсией) более высоких значений — относительно высокая средняя обусловлена несколькими значительными величинами прироста давления, в то время как при магнитной стимуляции показатели асимметрии ниже.

В итоге в случае применения внутрианальной стимуляции при функциональной НАС прирост показателей давления получается большим (для давления покоя даже значимо, однако проблема в том, что пациентов в выборке всего 7) по сравнению с магнитной. Однако уровень дисперсии при (внутри)анальной стимуляции выше для всех нарушений. Причем при органической НАС среднее значение больше медианного (среднее значение определяется несколькими очень успешными случаями), а в случае с функциональной НАС выше медианное значение — объясняется это тем, что было отмечено несколько случаев снижения давления⁵ после процедуры, что привело к отрицательной асимметрии.

Таким образом, АС является методом, который приводит к несколько более высоким средним значениям (в ряде случаев, эти различия статистически

³ Величина показателя асимметрии может быть положительной (если средняя больше медианы), тогда говорят о наличии правосторонней асимметрии, и отрицательной (если средняя меньше медианы), в этом случае говорят о левосторонней асимметрии. Принято считать, что если коэффициент асимметрии меньше 0,25, то асимметрия незначительная, если свыше 0,5, то асимметрия значительная.

⁴ Хотя в случае с давлением в состоянии покоя медиана совпадает с границей нижнего квартиля (из 7 наблюдений 3 принимают значения 13, по большому счету показатели лишены в данном случае смысла).

⁵ Показатели снижения давления наблюдались только при сокращении и только после АС.

значимы, но в большинстве подвыборок — нет), но его надежность несколько меньше. Под меньшей надёжностью понимается и большая дисперсия показателя, и размах вариации, захватывающий отрицательные значения (при МС для всех пациентов показатель давления вырос, а при АС давление при волевом сокращении в ряде случаев оказалось ниже, чем было до лечения).

Проведенное исследование показало, что проводимая консервативная реабилитация оказывает положительное воздействие на мышцы запирающего аппарата прямой кишки (ЗАПК) у пациентов с недостаточностью, вызывая увеличение показателей как тонуса, так и сократительной способности анальных сфинктеров, что имеет крайне важное клиническое значение. При сравнении эффективности комбинированных программ консервативного лечения, включающих АС или МС, мы не выявили преимуществ магнитного воздействия. Данный факт явился для нас ожидаемым вследствие схожести воздействия магнитного и электрического поля на изучаемые структуры мышц тазового дна. Магнитное поле при экстракорпоральном расположении индуктора воздействует на внутримышечные аксоны с генерацией электрического поля и последующим сокращением мышц. В то же время, электрическое поле локально воздействует непосредственно на мышцы и нервы, также инициируя сокращение мышечных структур. Возможным объяснением факта отсутствия преимуществ в плане лечебного воздействия магнитной стимуляции перед электрической, на наш взгляд, может служить близость созданного электрического поля при внутрианальном расположении электрода к структурам тазового дна при электростимуляции и возможность непосредственного воздействия на мышцы ЗАПК. На сегодняшний день мы имеем положительные результаты применения экстракорпоральной магнитной стимуляции в колопроктологии для лечения недостаточности анального сфинктера — воздействие магнитного стимула схоже по эффективности с электростимуляцией. Однако следует подчеркнуть, что эта эффективность реализуется в составе комплексных программ реабилитации. Насколько возможно расширить применение магнитной стимуляции в качестве монотерапии при лечении анальной инконтиненции и насколько эффекты будут схожи или отличаться от электрической стимуляции в монорежиме — именно это и будет являться предметом нашей дальнейшей работы. Требуются также дальнейшие исследования в плане оценки длительности сохранения эффекта применяемых нами программ комплексной реабилитации, возможности комбинированного использования методов электрической и магнитной стимуляции и, наконец, модификации программ магнитной стимуля-

ции. Мы не получили статистически значимого снижения среднего балла по шкале Векснера, т.е. изменения субъективной оценки функции держания сразу после проведения курса (10 сеансов) консервативной реабилитации. Наша работа будет продолжена с целью выбора оптимального количества курсов лечения и сроков проведения опроса пациентов после консервативной реабилитации.

Относительно предпочтения выбора метода внутрианальной электрической или экстракорпоральной магнитной стимуляции — на сегодняшний день это может определяться только техническими и материальными возможностями медицинских учреждений, необходимостью стерилизации электродов при анальной стимуляции и субъективными предпочтениями пациентов.

Вводя комплексные программы реабилитации, мы рассчитывали на многофакторный патогенетически оправданный эффект, описанный при комбинировании методов воздействия в рандомизированных контролируемых исследованиях [8]. Во-первых, применение электрической или магнитной стимуляции, на наш взгляд, направлено на создание рабочей гипертрофии поперечнополосатых мышц ЗАПК и тазового дна, увеличение, таким образом, их сократительной способности при волевом сокращении. Во-вторых, применение тиббиальной нейромодуляции также имеет опосредованное воздействие через *p.tibialis* на *p.pudendus*, а затем на поперечнополосатые мышцы ЗАПК и тазового дна. В-третьих, проведение БОС-терапии по программам анальной инконтиненции моделирует эффект лечебной физкультуры, но только под контролем «физиологического зеркала» (аппарата для БОС-терапии). Однако возникает закономерный вопрос — почему же помимо увеличения сократительной способности не было выявлено увеличения тонуса сфинктерного аппарата? Ответ на данный вопрос, на наш взгляд, следующий. Тонус сфинктерного аппарата на 80% определяется гладкими мышцами внутреннего сфинктера и на 20% тонусом поперечнополосатых мышц ЗАПК [13, 14]. Вероятнее всего, применяемое воздействие оказывает комплексное влияние именно на произвольную мускулатуру тазового дна, увеличивая как тонус, так и параметры волевого сокращения. Именно в этом ракурсе можно объяснить и то, что прирост тонической активности не так значителен из-за более низкого вклада в общий тонус сфинктеров доли поперечнополосатой мускулатуры. Кроме того, можно предположить, что увеличение длительности проведения программы реабилитации позволит более значительно увеличить сократительную способность ЗАПК.

References

1. Fomenko O.Yu., Shelygin Yu.A., Poryadin G.V., Titov A.Yu., Berseneva E.A., Mudrov A.A., Belousova S.V. The muscle fatigue of external anal sphincter in patients with anal incontinence.

Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. 2017; 61(3): 69-75.

2. Il'kanich A.Ya., Slepikh N.V., Barbashinov N.A., Abubakirov A.S. The experience of using anal swabs «Koloplast» in patients with anal incontinence. *Koloproctologiya*. 2013; 4(46): 35-7. (in Russian)

3. Norton C., Chelvanayagam S., Wilson-Barnett J. et al. Randomized controlled trial of biofeedback for fecal incontinence. *Gastroenterology*. 2003; 125: 1320-9.

4. Heymen S., Scarlett Y., Jones K. et al. Randomized controlled trial shows biofeedback to be superior to alternative treatments for fecal incontinence. *Dis Colon Rectum*. 2009; 52: 1730-37.

5. Fynes M.M., Marshall K., Cassidy M. et al. A prospective, randomized study comparing the effect of augmented biofeedback with sensory biofeedback alone on fecal incontinence after obstetric trauma. *Dis Colon Rectum*. 1999; 42: 753-61.

6. Miner P.B., Donnelly T.C., Read N.W. Investigation of the mode of action of biofeedback in treatment of fecal incontinence. *Dig Dis Sci*. 1990; 35: 1291-8.

7. Schwandner T., Konig I.R., Heimerl T. et al. Triple target treatment (3T) is more effective than biofeedback alone

for anal incontinence: the 3T-AI study. *Dis Colon Rectum*. 2010; 53: 1007-16.

8. Pucciani F., Iozzi L., Masi A. et al. Multimodal rehabilitation for faecal incontinence: experience of an Italian centre devoted to faecal disorder rehabilitation. *Tech Coloproctol*. 2003; 7: 139-47.

9. Vonthein R., Heimerl T., Schwandner T. et al. Electrical stimulation and biofeedback for the treatment of fecal incontinence: a systematic review. *Int J Colorectal Dis*. 2013; 28: 1567.

10. Shelygin Yu.A., Fomenko O.Yu., Titov A.Yu., Veselev V.V., Belousova S.V., Aleshin D.V. The sphincterometric pressure in the anal canal is normal. *Koloproctologiya*. 2016; 2(56): 32-6. (in Russian)

11. Shelygin Yu.A., Fomenko O.Yu., Titov A.Yu., Berseneva E.A., Mudrov A.A., Belousova S.V. Sphincterometric gradation of anal sphincter failure. *Koloproctologiya*. 2016; 4(58): 54-9. (in Russian)

12. Jorge J.M., Wexner S.D. Etiology and management of fecal incontinence. *Dis Colon Rectum*. 1993; 36(1): 77-97.

13. Lestar B, Penninckx F, Rigauts H, Kerremans R. The internal anal sphincter can not close the anal canal completely. *Int J Colorectal Dis*. 1992; 7(3): 159-61.

14. Yoo S.Y., Bae K.S., Kang S.J. et al. How important is the role of the internal anal sphincter in fecal continence? An experimental study in dogs. *J Pediatr Surg*. 1995; 30(5): 687-91.

Сведения об авторах:

Фоменко Оксана Юрьевна, канд. мед. наук, руководитель лаб. клинической патофизиологии ФГБУ ГНЦК им. А.Н. Рыжих Минздрава России

Шельгин Юрий Анатольевич, член-корр. РАН, доктор мед. наук, проф., директор ФГБУ ГНЦК им. А.Н. Рыжих Минздрава России, зав. каф. колопроктологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

Порядин Геннадий Васильевич, член-корр. РАН, доктор мед. наук, проф., советник ректора, зав. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России

Титов Александр Юрьевич, доктор мед. наук, руководитель отд-ния общей и реконструктивной колопроктологии ФГБУ ГНЦК им. А.Н. Рыжих Минздрава России

Козлов Владимир Александрович, ФГБУ ГНЦК им. А.Н. Рыжих Минздрава России

Белуцова Светлана Васильевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. клинической патофизиологии ФГБУ ГНЦК им. А.Н. Рыжих Минздрава России

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616.316:616.24

Мичурина С.В.¹, Васендин Д.В.², Ищенко И.Ю.¹

Влияние мелатонина на клеточный состав печени крыс Wistar при алиментарном ожирении

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» Сибирского отделения Российской академии наук, 630060, г. Новосибирск, Россия, ул. Тимакова, д. 2

² ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 630091, г. Новосибирск, Россия, Красный пр., д. 52

Цель — морфофункциональная характеристика нарушений функции печени при алиментарном ожирении и их коррекция мелатонином. **Методы.** В эксперименте использовано 3 группы половозрелых (2 мес.) крыс-самок Wistar с исходной массой 180—200 г. 1-я группа — контроль (интактные крысы); 2-я — группа «ожирение» (модель алиментарного ожирения воспроизводилась путем добавления (без ограничения) к стандартному лабораторному рациону в течение 3 мес. пищевых жиров животного происхождения) и 3-я группа («ожирение + мелатонин») — животные с алиментарным ожирением, которым в течение 14 сут. *per os* через желудочный зонд 1 раз в сут. вводили водный раствор мелатонина (0,1 г на 100 г массы тела), животные жиры из рациона во время введения препарата не исключались. Крыс декапитировали под этиминаловым наркозом (40 мг на кг), извлекали печень для морфометрического и светооптического исследования (микроскоп LEICA DM 750, камера LEICA ICC 50 HD). Патогистологические препараты готовили по общепринятой методике. Исследование препаратов печени проводили при увеличении $\times 1000$ на срезах толщиной 5 мкм, окрашенных гематоксилином Майера и эозином, сульфатом нильского голубого. Для морфометрического анализа использовали метод наложения точечных морфометрических сеток (сетка 256 точек). Определяли относительную площадь сети синусоидов, ядер и цитоплазмы гепатоцитов, численную плотность синусоидных клеток и гепатоцитов и двоядерных паренхиматозных клеток; рассчитывали ядерно-цитоплазматическое соотношение, отношение численной плотности синусоидных клеток к численной плотности всех гепатоцитов, вычисляли долю диплокариоцитов от общего числа гепатоцитов, рассчитывали коэффициент Vizotto — отношение площади сети синусоидов к площади всех гепатоцитов. **Результаты.** Введение мелатонина нивелировало признаки нарушения кровообращения, крово- и лимфотока. Отмечалась сохранность сосудов портального тракта, восстановление архитектоники центральных вен. Большинство участков гемо- и лимфообращения не имело признаков грубых нарушений. **Заключение.** Ожирение приводит к значительным нарушениям в системе кровообращения и лимфотока в печени, развитию жировой дистрофии. Введение таким животным гормона эпифиза мелатонина способствует усилению репаративных процессов в печени, нормализации микроциркуляторных процессов, восстановлению микроструктурной и функциональной организации органа.

Ключевые слова: экспериментальное алиментарное ожирение; мелатонин; коррекция; микроциркуляция.

Для цитирования: Мичурина С.В., Васендин Д.В., Ищенко И.Ю. Влияние мелатонина на клеточный состав печени крыс Wistar при алиментарном ожирении. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 107—112.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.107-112

Для корреспонденции: Васендин Дмитрий Викторович, канд. мед. наук, доцент, доцент каф. мобилизационной подготовки здравоохранения и медицины катастроф ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: vasendindv@gmail.com

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.05.2017

Michurina S.V.¹, Vasendin D.V.², Ishchenko I.Yu.¹

Effect of melatonin on cellular composition of the liver in wistar rats with alimentary obesity

¹ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Timakova Str. 2, Novosibirsk 630117, Russia

² Novosibirsk State Medical University, Krasny Pr. 52, Novosibirsk 630091, Russia

Aim. To identify and assess morpho-functional changes in the liver of Wistar rats on a model of alimentary obesity and correct the changes with the pineal hormone, melatonin, a universal adaptogen, immune modulator, and potent antioxidant.

Methods. Sexually mature female Wistar rats aged 2 months and weighing 180—200 g at baseline were used for the experiment. Rats were allocated to three groups, 1) control group (intact rats); 2) group with alimentary obesity modeled by adding animal fat to the *ad libitum* standard laboratory diet for 3 months (obesity group); and 3) obesity group treated with melatonin 0.1 g/100 g body weight in 200 µl of distilled water, orally through a gastric tube, once daily for 14 days; during the treatment, animal fat was not excluded from the diet (obesity + melatonin group). Rats were sacrificed under etaminal anesthesia (40 mg/kg body weight) by decapitation. For morphometric and optical studies (LEICA DM 750 microscope, LEICA ICC 50 HD camera), histopathological preparations were fixed in 10% buffered formalin and examined with a standard method. Morphometric studies of liver samples were performed at a x1000 magnification on 5 µm sections stained with Mayer's hematoxylin and eosin stain and Nile blue sulfate using superposition of point morphometric grids (grid of 256 points). Relative areas of sinusoid network, hepatocyte nuclei and cytoplasm; numerical density of sinusoidal cells, hepatocytes, and dual-parenchymal cells were measured. The nuclear-cytoplasmic ratio; ratio of sinusoidal cell numerical density to the numerical density of all hepatocytes; and per cent of diplocaryocytes of the total number of hepatocytes were computed; the Vizotto coefficient was calculated as a ratio of the area of sinusoid network to the area of all parenchymal hepatocytes. **Results.** Administration of the animal hormone, melatonin, exerted a pronounced effect on the studied morphometric parameters and reversed signs of circulatory and lymph flow disorders. Blood vessels of the portal area were preserved, and the architectonics of central veins was recovered. Most parts of hemo- and lymph circulation had no abnormal features. **Conclusion.** Obesity leads to significant disorders of blood circulation and lymph flow in the liver and results in fatty degeneration of hepatic parenchyma. Administration of the pineal hormone, melatonin, to such animals enhances reparative processes in the liver, normalizes microcirculation, and restores the structural and functional organization of the body.

Keywords. experimental alimentary obesity; melatonin; correction; microcirculation.

For citation. Michurina S.V., Vasendin D.V., Ishchenko I.Yu. The effect of Melatonin on cellular composition of the liver Wistar rats with alimentary obesity. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 107—112. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.107-112

For correspondence: Dmitry V. Vasendin, Cand. of Med. Sciences, associate Professor, associate Professor of Department of mobilization training of health and disaster medicine of the «Novosibirsk state medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation; 52, Krasny Av., Novosibirsk, Russian Federation, e-mail: vasendindv@gmail.com

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Michurina S.V., <http://orcid.org/0000-0002-3630-4669>

Vasendin D.V., <http://orcid.org/000-0002-9503-6940>

Ishchenko I.Yu., <http://orcid.org/0000-0003-4756-5001>

Received 02.05.2017

Введение

Изучение метаболического синдрома представляет большой интерес для экспериментаторов и клиницистов. Международный диабетический фонд (IDF) при пересмотре критериев метаболического синдрома сделал акцент на центральном ожирении как на ключевой характеристике метаболического синдрома [1]. Современные взгляды на этиопатогенез и особенности развития основных проявлений ожирения позволяют рассматривать ожирение как самостоятельное заболевание с характерными проявлениями. В то же время, ожирение является важнейшим фактором риска развития сахарного диабета 2-го типа, артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца и других социально значимых заболеваний [2]. Следовательно, ожирение можно рассматривать в качестве патогенного фактора. Степень патогенности ожирения, как и любого повреждающего агента, в значите-

льной степени лимитируется состоянием печени — уникального органа, в котором осуществляются ключевые обменные процессы. Современные методы позволяют получить четкое представление о структурных и функциональных основах адаптации, дезадаптации и восстановления печени, необходимые для комплексного решения актуальной проблемы профилактики и терапии ожирения и связанных с ожирением осложнений, а также разработки методов предупреждения нарушений и восстановления поврежденных структур [3, 4].

Цель исследования — изучение морфофункциональных изменений в печени крыс Вистар при моделировании алиментарного ожирения и возможности их коррекции гормоном эпифиза мелатонином.

Мелатонин считается универсальным адаптогеном, иммуномодулятором и мощным антиоксидантом — веществом эффективным и перспективным в лечении целого ряда патологических состояний [5—8].

Методика

Все эксперименты выполнены с соблюдением правил биоэтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для лабораторных или иных целей.

В экспериментах использованы половозрелые (2 мес.) крысы-самки Вистар с исходной массой 180—200 г.

Было выделено 3 группы животных:

- 1-я группа — контроль (интактные крысы, получавшие стандартный лабораторный пищевой рацион);

- 2-я группа — группа «ожирение» (модель алиментарного ожирения воспроизводилась путем добавления (без ограничения) к стандартному лабораторному рациону пищевых жиров животного происхождения в течение 3 мес.);

- 3-я группа («ожирение + мелатонин») — животные с алиментарным ожирением, которым в течение 14 сут. *per os* через желудочный зонд 1 раз в сутки вводили водный раствор мелатонина (0,1 г на 100 г массы тела).

Животные жиры из рациона во время введения препарата не исключались. Крыс декапитировали под этиминаловым наркозом (40 мг/кг). Извлекали печень для морфометрического и светооптического исследования (микроскоп LEICA DM 750, камера LEICA ICC 50 HD). Ткань печени фиксировали в 10% забуференном формалине. Патогистологические препараты готовили по общепринятой в гистологии методике. Исследование препаратов печени проводили при увеличении $\times 1000$ на срезах толщиной 5 мкм, окрашенных гематоксилином Майера и эозином, сульфатом нильского голубого. Для морфометрического анализа использовали метод наложения точечных морфометрических сеток (сетка 256 точек) [9]. Определяли относительную площадь сети синусоидов, ядер и цитоплазмы гепатоцитов, численную плотность синусоидных клеток, гепатоцитов и двуядерных паренхиматозных клеток; рассчитывали ядерно-цитоплазматическое соотношение, отношение численной плотности синусоидных клеток к численной плотности всех гепатоцитов, вычисляли долю диплокариоцитов от общего числа гепатоцитов, рассчитывали коэффициент Vizotto — отношение площади сети синусоидов к площади всех гепатоцитов [10].

Статистическую обработку результатов исследования проводили методом вариационной статистики при помощи пакета программ «Statistica 7.0.» с использованием параметрического t-критерия Стьюдента [11]. Различия сравниваемых величин считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты морфометрического исследования срезов печени крыс в группе контроля и экспериментальных группах представлены в таблице.

Морфометрическое исследование печени контрольных крыс показало достаточную стабильность изучаемых параметров, соответствующих строго определенной морфологической организации. В цитоплазме гепатоцитов признаки жировой дистрофии отсутствовали. Между печеночными балками располагаются внутريدольковые синусоидные кровеносные капилляры. Синусоиды четко отделены от клеток паренхимы синусоидными клетками. Последние, как известно, представляют собой гетерогенную клеточную популяцию: эндотелиальные клетки, клетки Купфера и Pit-клетки.

Синусоидные клетки значительно мельче гепатоцитов, имеют более вытянутую форму. На общем фоне их ядра выделяются более выраженной базофилией. С целью оценки паренхимно-стромальных взаимоотношений было вычислено отношение численной плотности синусоидных клеточных элементов к численной плотности гепатоцитов.

У крыс с алиментарным ожирением (группа 2 «ожирение») абсолютная масса печени увеличилась по сравнению с группой контроля на 32%. При этом прирост массы тела крыс соответствует 1-й степени ожирения. На основании результатов светооптического и морфометрического исследований печени крыс с ожирением был выявлен ряд статистически значимых изменений, касающихся, в первую очередь, состояния микроциркуляторного русла, а также ряда других морфометрических параметров [12]. В то же время структура органа и балочное строение печеночных долек сохранялись. Выявлялись обширные области с признаками мелко- и крупнокапельной жировой дистрофии гепатоцитов. Множественные липидные капли имели тенденцию к слиянию.

При жировой дегенерации печени свободные жирные кислоты (СЖК), холестерин и фосфолипиды накапливаются в лизосомах гепатоцитов. Согласно известной теории «двух ударов», избыточное поступление в печень СЖК, наблюдаемое при ожирении (особенно висцеральном), является «первым ударом» в развитии стеатоза печени. Поступление СЖК индуцирует развитие «второго удара» — оксидативного стресса (ОС). Одной из причин накопления СЖК в клетках может быть нарушение окислительных процессов в митохондриях. Вместе с тем само ожирение способствует индукции и прогрессированию ОС и митохондриальной дисфункции. Увеличение секреции цитокинов: фактора некроза опухолей- α (ФНО- α), интерлейкина-6 (ИЛ-6) приводит в итоге к воспалению, апоптозу и некрозу гепатоцитов, а в дальнейшем

к развитию фиброза и цирроза печени [13]. При ожирении подавляется как окислительное фосфорилирование, так и β -окисление жирных кислот в митохондриях, развивается крупнокапельный или спонгиозитарный (значительно реже) стеатоз. Одним из основных механизмов возникновения стеатоза в настоящее время считают подавление секреции триглицеридов в составе липопротеинов очень низкой плотности, что ведет к их накоплению в гепатоцитах [14, 15]. Выявлены значимые признаки нарушения кровообращения и лимфотока: слабо выражена сеть синусоидных капилляров при неравномерности их кровенаполнения, расширение поддольковых и внутридольковых вен, стаз эритроцитов в венах и артериях портального тракта. Наблюдается дилатация лимфатических пространств Малла и инфильтрация их клетками лимфоидного ряда, миграция лимфоцитов в паренхиму и периферические области, а также формирование нелимфоидных агрегатов, или лимфоидных узелков, которые рассматриваются как временные скопления лимфоидной ткани, формирующиеся в ответ на повреждение [16], в нашем случае — на избыточное поступление в организм жиров животного происхождения. Расширение лимфатических пространств Малла (щелей между паренхимой печени и соединительной тканью, окружающей ветви воротной вены) свидетельствует о напряженном состоянии путей тканевой микроциркуляции, затруднении продвижения жидкостных составляющих, отводимых от печеночной доли. При этом по расширенным тканевым щелям и лимфатическим сосудам происходит интенсивная миграция лимфоидных элементов и макрофагов. Известно, что именно макрофагам принадлежит определенная роль в формировании метаболического симптомокомплекса и развитии ожирения (точнее — жировой дистрофии гепатоцитов): макрофаги, подвергаясь воздействию модифицированных липопротеинов низкой плотности, экспрессируют на своей поверхности специфические сквенджер рецепторы, которые связывают и усваивают частицы липопротеинов низкой плотности. Макрофаг по мере того как его цитозоль переполняется холестерином приобретает гистологические характеристики так называемой пенной клетки. Последние способны провоцировать и усугублять воспалительный процесс. Наличие и/или прогрессирование воспалительного процесса стимулирует развитие стеатогепатита. Внутри печеночных долек отмечено чередование участков расширенных кровеносных синусоидных капилляров с участками их спазмирования. В синусоидах обнаруживаются признаки стаза (микротромбирование эритроцитами). Закупорка капилляров сладжированными эритроцитами наряду с выделяемым эндотелиоцитами и клетками Ito эндотелином, вызывающим локальные спаз-

мы синусоидов печени, — одна из основных причин замедления кровотока. Описанные явления могут вносить свой вклад в формирование местной гипоксии [17].

Морфометрически установлено, что у животных группы «ожирения» относительная площадь паренхимы увеличилась на 12% (табл.), при этом доля гепатоцитов с признаками жировой дистрофии составила 72% от числа всех паренхиматозных клеток на исследуемой площади, а средний размер гепатоцита вырос на 8,5%. Значительно (почти в 3 раза) уменьшилось число неизмененных гепатоцитов. При ожирении, как известно, нарастающий оксидативный стресс инициирует процесс апоптотической гибели гепатоцитов — это характерная черта неалкогольной жировой болезни печени. Выраженность апоптоза коррелирует с тяжестью течения патологического процесса. При апоптозе гепатоцитов происходит прямое нарушение целостности клеточных органелл, наблюдается выраженная дисфункция митохондрий с нарушением клеточного дыхания и «утечкой» цитохромов. В зависимости от энергетического статуса клетки дисфункция может вести к ее гибели по механизму апоптоза или некроза [18]. Увеличение относительной площади ядер паренхиматозных клеток (на 54% по сравнению с контролем) превосходило увеличение относительных размеров их цитоплазмы (на 12% по сравнению с контролем) и как следствие — значительно (в 1,5 раза) повышалось ядерно-цитоплазматическое отношение. Обнаружено значительное увеличение количества диплокариоцитов и возрастание их доли среди всех гепатоцитов. Наблюдаемые изменения паренхиматозных клеток печени свидетельствуют об активизации обменных процессов как между ядром и цитоплазмой, так и между клеткой и внеклеточной средой, что обычно сопровождается высоким функциональным напряжением капилляро-соединительнотканых структур. В нашем эксперименте у животных с моделью ожирения структурно-функциональные перестройки в гепатоцитах проходили на фоне активации стромальных элементов, что выражалось в возрастании относительной площади синусоидных клеток печени (на 56%) и увеличении среднего размера «синусоидной клетки» (на 86%). При этом необходимо учитывать, что в группу «синусоидных клеток» входят эндотелиальные клетки синусоидных капилляров, клетки Купфера (звездчатые, или перисинусоидальные клетки), клетки Ito (липоциты) и Pit-клетки (большие гранулодержащие лимфоциты). У крыс группы «ожирение» обнаружено уменьшение в 2,2 раза относительной площади сети синусоидных капилляров в промежуточной зоне печеночных долек. Основываясь на снижении (в 2,6 раза) соотношения удельной площади синусоидов и удель-

ной площади гепатоцитов (коэффициент Vizotto), можно предполагать две причины наблюдаемых изменений: либо усиление дренажной функции регионарных лимфатических узлов, либо недостаточность кровоснабжения при возрастающих потребностях паренхимы органа.

Анализ результатов светооптического и морфометрического исследования печени крыс 3-й группы «ожирение + мелатонин» показал, что использование данного препарата ускоряет восстановительные процессы и нормализует микроциркуляцию в органе, что в итоге приводит к значительному улучшению функционального состояния печени. Примечательно, что все изменения в печени крыс группы «ожирение + мелатонин» характеризуются статистически значимыми отличиями от соответствующих показателей групп «контроль» и «ожирение» (таблица). Введение мелатонина животным с экспериментальным ожирением приводило к нивелированию признаков нарушения кровообращения и лимфотока, обращала на себя внимание сохранность сосудов портального тракта, восстановление архитектоники центральных вен. Большинство участков гемо- и лимфообращения были без признаков патологии. Значительно менее были выражены мозаичность кровенаполнения сосудов печеночных долек, расширение сосудов портальных трактов и поддольковых вен, стазирование их просветов эритроцитами. Морфометрия показала увеличение относительной площади сети синусоидных капилляров (почти в 2 раза) и снижение относительных размеров паренхимы по сравнению с группой «ожирение». Восстановление кровообращения, лимфотока и нормализация путей

тканевой несосудистой микроциркуляции способствовали созданию условий для восстановления структурной организации и нормального функционирования паренхиматозных клеток печени. Введение мелатонина привело к практически полному устранению дистрофических изменений гепатоцитов и многократному увеличению (почти в 3 раза) числа морфологически сохраненных гепатоцитов по сравнению с группой «ожирение», что согласуется данными литературы [19] о возможности нормализации реактивности паренхимы печени крыс с экспериментальным алиментарным ожирением при введении экзогенного мелатонина. Одним из возможных механизмов, объясняющих снижение интенсивности клеточной гибели по типу апоптоза при введении мелатонина, может быть регуляция активности НАД- и НАДФ-изоцитратдегидрогеназ в печени крыс при индукции апоптоза и действии мелатонина. При этом отмечается уменьшение удельной площади ядер и цитоплазмы гепатоцитов и снижение ядерно-цитоплазматического отношения. Однако полного восстановления этих параметров до уровня контроля не происходило, что может свидетельствовать о стойкости выявленных нарушений.

В настоящее время доказано, что в деятельность различных клеточных элементов мелатонин включается различными путями, выполняя важную миссию естественного адаптогена. При этом его универсальные защитные свойства определяются в первую очередь антиоксидантной активностью, представляющей собой сложный многофакторный феномен [20]. В комплекс протекторных возможностей мелатонина необходимо включить повышение энергетического потенциала кле-

Таблица

Результаты морфометрического исследования срезов печени крыс в группе контроля и экспериментальных группах (M ± m), %

Параметр, структура	"Контроль"	"Ожирение"	"Ожирение + мелатонин"
Цитоплазма гепатоцитов	70,84 ± 0,34	73,42 ± 0,29*	69,6 ± 0,4*#
Ядро гепатоцитов	8,92 ± 0,19	13,7 ± 0,28*	10,15 ± 0,29*#
Кровеносные синусоидные капилляры	20,12 ± 0,26	9,0 ± 0,19*	17,44 ± 0,18*#
Общее количество гепатоцитов	51,54 ± 0,94	53,22 ± 0,85	45,38 ± 0,91*#
Количество неизмененных гепатоцитов	51,54 ± 0,94	14,68 ± 0,5*	42,34 ± 0,89*#
Количество дистрофически измененных гепатоцитов	0	38,54 ± 0,78*	3,04 ± 0,27*#
Число двуядерных клеток	1,72 ± 0,15	5,06 ± 0,27*	2,44 ± 0,2*#
Общее число синусоидных клеток	20,4 ± 0,59	17,26 ± 0,57*	24,62 ± 0,62*#
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,13 ± 0,003	0,19 ± 0,004*	0,15 ± 0,005*#
Отношение числа синусоидных клеток к числу всех гепатоцитов	0,4 ± 0,01	0,33 ± 0,01*	0,55 ± 0,02*#
Отношение числа двуядерных гепатоцитов к числу всех гепатоцитов	0,03 ± 0,003	0,1 ± 0,006*	0,06 ± 0,005*#
Отношение числа кровеносных синусоидных капилляров к паренхиме	0,26 ± 0,004	0,1 ± 0,002*	0,22 ± 0,003*#

Примечание. * — отличия статистически значимы по сравнению с показателями группы "Контроль"; # — отличия статистически значимы по сравнению с показателями группы "Ожирение".

ток за счет интенсификации процессов окислительного фосфорилирования в результате стабилизации митохондриальных мембран. Нельзя сбрасывать со счетов иммуномодулирующие свойства мелатонина и способность ослаблять местные воспалительные процессы путем ограничения продукции провоспалительных цитокинов. У больных ожирением ограничение эндотелиальной дисфункции при использовании мелатонина характеризуется ослаблением ОС и повышением активности антиоксидантных ферментов [5, 21].

Заключение

Таким образом, ожирение приводит к значительным нарушениям кровообращения и лимфотока в печени, развитие в органе жировой дистрофии гепатоцитов. Введение таким животным гормона эпифиза мелатонина способствует усилению репаративных процессов в печени, нормализации микроциркуляции, восстановлению микроструктурной и функциональной организации органа. Мелатонин является перспективным препаратом в профилактике и лечении жирового перерождения печени по типу гепатоза.

References

1. Zimmet P., Alberti G., Shaw J. A new IDF worldwide definition of the metabolic syndrome: the rationale and results. *Diabetes Voice*. 2005; 50: 31 — 3.
2. Beljakov N.A., V.I. Mazurov V.I. *Obesity. [Ozhirenie]. Saint-Petersburg; SPbMAPO Publ.; 2003.* (in Russian)
3. Vasendin D.V. Metabolic syndrome and structural and functional changes in the liver (scientific review). *Profilakticheskaya i klinicheskaya meditsina*. 2015; 3: 112 — 17. (in Russian)
4. Vasendin D.V. Modern approaches to the treatment of obesity (literature review). *Uchenye zapiski Petrozavodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Estestvennye i tekhnicheskie nauki*. 2015; 151 (6): 72 — 80. (in Russian)
5. Arushanian E.B., Schetinin E.V. Melatonin as a universal modulator of any pathological process. *Pathological Physiology and Experimental Therapy*. 2016; 60(1): 79-88. (in Russian)
6. Bespjatyh A.Ju., Burlakova O.V., Golichenkov B.A. Melatonin as an antioxidant: the main functions and properties. *Uspehi sovremennoy biologii*. 2010; 130 (5): 487 — 96. (in Russian)
7. Syresina O.V., Zhukova E.A., Vidmanova T.A., Korkotashvili L.V., Kolesov S.A., Nefedova O.A. Melatonin in treat-

ment of gastroesophageal reflux disease in children. *Pediatric-heskaya farmakologiya*. 2012; 9 (1): 77 — 80. (in Russian)

8. Konenkov V.I., Klimontov V.V., Michurina S.V., Prudnikova M.A., Ishchenko I.Ju. Melatonin and diabetes: from pathophysiology to treatment perspectives. *Sakharnyy diabet*. 2013; 59(2): 11 — 6. (in Russian)

9. Avtandilov G.G. *Medical morphometry. [Meditsinskaya morfometriya]*. Moscow; Meditsina; 1990. (in Russian)

10. Vizotto L., Romani F., Fernario V.F. Characterization by morphometric of liver regeneration in the rat. *The Amer. J Anatomy*. 1989; 185: 444 — 54.

11. Lakin G.F. *Biometrics. [Biometriya]*. Moscow; Vysshaya shkola; 1990. (in Russian)

12. Michurina S.V., Vasendin D.V., Ishchenko I.Ju. Liver morphological alterations in Wistar rats with alimentary obesity model. *Vestnik Ivanovskoy meditsinskoy akademii*. 2014; 19 (4): 19 — 22. (in Russian)

13. Butrova S.A., Eliseeva A.Yu. Non-alcoholic fatty liver disease: current projects. *Ozhirenie i metabolizm*. 2007; 1: 2 — 7. (in Russian)

14. Freneaux E., Larrey D., Pessayre D. Steatosis hepatic medicamentoses a triglycerides. *Rev. Franc. Gastroenterol*. 1988; 240 (24): 873 — 8.

15. Manne J., Argeson A.C., Siracusa L.D. Mechanisms for pleiotropic effects of the agouti gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92: 4721 — 4.

16. Konenkov V.I., Borodin Ju.I., Ljubarskiy M.S. *Lymphology. [Limfologiya]*. Novosibirsk; Izdatel'skiy dom "Mansukript"; 2012. (in Russian)

17. Luk'janova L.D. Bioenergetic hypoxia: definition, mechanisms, and methods of correction. *Bulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1997; 124 (9): 244 — 54. (in Russian)

18. Shul'pekova Yu.O. The pathogenic role of lipids in non-alcoholic fatty liver disease. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2012; 22 (1): 45 — 56. (in Russian)

19. Berezovskiy V.A., Yanko R.V., Litovka I.G., Volovich O.I. Reactivity of the liver parenchyma of rats after administration of exogenous melatonin. *Ukrainskiy morfologicheskii al'manakh*. 2012; 4: 178 — 81. (in Russian)

20. Arushanyan E.H.B. Limiting oxidative stress as the main reason for the universal protective properties of melatonin. *Ehksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2012; 75 (5): 44 — 9. (in Russian)

21. Kozirog M., Poliwczak A.R.P., Duchnowicz P., Kotter-Micholak M., Sikora J., Broncel M. Melatonin treatment improves blood pressure, lipid profile and parameters of oxidative stress in patient with metabolic syndrome. *J. Pineal Res*. 2011; 50: 261 — 6.

Сведения об авторах:

Мичурин Светлана Викторовна, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр. ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» СО РАН

Васендин Дмитрий Викторович, канд. мед. наук, доцент, доцент каф. мобилизационной подготовки здравоохранения и медицины катастроф Новосибирского государственного медицинского университета Минздрава России, e-mail: vasendindv@gmail.com

Ищенко Ирина Юрьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» СО РАН

© Пальцын А.А., 2018
УДК 616-092

Пальцын А.А.

Саркопения

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8
Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования
Российская медицинская Академия последипломного образования, 123995, г. Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1

Саркопения (старческое уменьшение силы и массы мышц) прогрессировала в распространенности и тяжести проявления вместе с прогрессом медицины и развитием цивилизации. На заре человечества проблемы не было, поскольку до саркопении не доживали. Затем в течение многих тысяч лет с малым количеством стариков в популяции и отвлечением внимания инфекционными эпидемиями медицине было «не до неё». Следствия быстрого старения человечества в конце XX и начале XXI веков вывели саркопению из тени в разряд самых актуальных проблем современной медицины. Саркопения приобрела своё название около 30 лет назад, год назад вошла в международную классификацию болезней, а сегодня уже называется гериатрическим гигантом. Взлет популярности закономерен и достоин ещё большего внимания по двум причинам. Во-первых. Саркопенией обусловлены многие беды старости: физическая слабость, депрессия, боли, снижение качества жизни, оптимизма, трудоспособности, рост травматизма, инвалидность, утрата независимости, смертность. Во-вторых. Саркопения затрудняет и снижает двигательную активность, чем способствует развитию наиболее распространенных болезней, эпидемий неинфекционной природы: гипертонической болезни, атеросклероза, диабета, рака, деменции, воспалений, остеопороза. Профилактика и лечение саркопении отодвигает или предотвращает приход её «спутников».

Ключевые слова: старение; динапения; нагрузки; хрупкость; гериатрия; мышца; сила; тренировка.

Для цитирования: Пальцын А.А. Саркопения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 113—121.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.113-121

Для корреспонденции: Пальцын Александр Александрович, e-mail: lrrp@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.12.2017

Paltsyn A.A.^{1,2}

Sarcopenia

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

² Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow 125315, Russia

Sarcopenia is a senile reduction in muscular force and mass. Sarcopenia prevalence and severity of manifestations have progressed together with the progress of medicine and development of the civilization. In the infancy of mankind, the problem was absent since people did not live to sarcopenia. Then for many thousand years, when old people were not numerous in the population, medicine was distracted by infectious epidemics and not interested in sarcopenia. Consequences of rapid aging of the population during the late 20th and early 21st centuries have brought sarcopenia from the shadows to the foreground as one of the most urgent problems of modern medicine. Sarcopenia acquired its name about 30 years ago, was included into the international classification of diseases a year ago, and today it is already called the geriatric giant. This increase in popularity is logical, and sarcopenia is worth even more extensive exploring for two reasons. First, sarcopenia causes many troubles of old age, such as physical weakness, depression, pains; impaired quality of life, optimism, and working capacity; more frequent traumas and disability; loss of independence; and high mortality. Second, sarcopenia complicates and reduces physical activity and, thereby, contributes to development of common diseases and non-infectious epidemics, including hypertension, atherosclerosis, diabetes, cancer, dementia, inflammations, osteoporosis. Prevention and treatment of sarcopenia delays or prevents the arrival of its «satellites».

Key words: aging; dynapenia; exercise; frailty; geriatrics; muscle; sarcopenia; strength; training.

For citation: Paltsyn A.A. SARKOPENIA *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2018; 62(2): 113—121. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.113-121

For correspondence: Paltsyn A.A., e-mail: lrrp@mail.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 15.12.2017

*Когда же юность легким дымом
Умчит веселья юных дней,
Тогда у старости отыmem
Всё, что отыметcя у ней.
А.С. Пушкин*

Саркопения, известная как явление с доисторических времен, получила своё название всего лишь около 30 лет назад [1]. Название появилось вместе с осознанием важности проблемы. Предложивший название Rosenberg, обозначил им уменьшение силы и массы мышц, связанное с возрастом. Ундрицов с соавторами даёт такое определение: «Саркопения — возрастное атрофическое дегенеративное изменение скелетной мускулатуры, приводящее к постепенной потере мышечной массы и силы» [2]. После многотысячелетнего пребывания в тени медицинского интереса и лишь год назад включенная в международную классификацию болезней [3], саркопения в последнее время стала привлекать всё большее внимание исследователей и врачей. Её даже называют новым гериатрическим гигантом [4]. Первичная и очевидная причина такого роста популярности саркопении — старение человечества. По прогнозу ВОЗ, в 2050 году 22% населения Земли будет в возрасте, превышающем 60 лет [5]. Старая, мы неизбежно и всё глубже погружаемся в сферу медицины. В Англии, например, люди старше 60 лет уже сейчас составляют 17% общей популяции и занимают 60% госпитальных мест [5]. Современная действительность заставила медицину понять, что многие беды старости: боли, снижение качества жизни, оптимизма, трудоспособности, рост травматизма в значительной мере обусловлены саркопенией. Это мрачноватая сторона проблемы, свидетельствующая о неотвратимости саркопении с её последствиями для всех, кому удастся до саркопении дожить. Она смягчается тем, что в современном быстром росте медицинского и общественного внимания к саркопении есть и «сдержанно оптимистическая» составляющая. Суть её заключается в возможности профилактики и лечения саркопении. Её можно отодвинуть на более поздний возраст и уменьшить тяжесть проявлений.

Саркопению обычно рассматривают как компонент синдрома frailty (за рубежом) или синдрома хрупкости (у нас). Конечно, можно было подобрать слову frailty более удачный русский перевод, чем хрупкость, но буду использовать это слово как, воз-

можно, уже знакомое читателю. Имеется в виду синдром, нарастающей с возрастом физической слабости, замедления движений и мыслительных реакций, уныния, подверженности различным болезням. Снижаются выносливость и все виды активности, нарастает несвязанная с ограничением в пище потеря веса, становится невозможно обходиться без посторонней помощи. Нарастает недостаточность функций многих органов (мультисистемное расстройство), нарушается гомеостаз. Выделяют 5 признаков хрупкости: немотивированное уменьшение массы тела (4 кг или 5% массы тела за год); уровня физической активности (меньше 1/5 от среднего расхода ккал, принятого для лиц данного пола и массы тела); скорости походки (менее 20% от средней для данного пола и роста); силы кисти (менее 20% от средней для данного пола и массы тела); нарастание худощавости. Лица с тремя показателями считаются хрупкими, с одним или двумя — прехрупкими [6, 7]. По этим критериям хрупкость была оценена в длительном (54 мес.) исследовании лиц старше 70 лет (без инвалидности на старте анализа), проводимом с 18-месячным интервалом [8]. Статус участников устанавливался по шкале: нехрупкость, прехрупкость, хрупкость. В ходе исследования 57,6% участников имели, по крайней мере, хотя бы один переход между состояниями нехрупкость, прехрупкость и хрупкость. Переходы с нарастанием хрупкости встречались чаще (43%), однако наблюдалось также и значительное число переходов с уменьшением хрупкости (23%). Следовательно, хрупкость оказалась состоянием, которое может быть хотя бы частично обратимо. Можно даже в весьма преклонном возрасте ликвидировать все проявления хрупкости. Значительное улучшение силовыми нагрузками двигательной функции описано у людей старше 90 лет [9]. На большом числе исследуемых (1079 человек в возрасте от 50 до 83 лет и состоянием здоровья от нормы до хрупкости) описана высокая эффективность аэробных силовых тренировок с постепенным нарастанием величины нагрузок при частоте занятий не менее 3 раз в неделю [10].

По приведенному выше перечню расстройств, характеризующему хрупкость, видно, что она, по сути, является комплексом негативных проявлений старости. Саркопения — наиболее постоянный компонент этого комплекса [9]. Саркопения может быть не только одним из расстройств, обуславливающих хрупкость, но и изолированно развившимся состоянием

без остальных проявлений хрупкости. В оценке хрупкости больше ориентируются на силовые показатели (силу легче измерить, чем массу мышц). Характерно снижение скорости ходьбы (меньше 0,8 м/с, тогда как за нормальную среднюю скорость принимается 4,0 м/с), силы кисти (меньше 26—30 кг для мужчин и 16—19 кг для женщин) [11]. Удобство диагностики саркопении по силовым показателям и тот факт, что между уменьшением мышечной массы и силы нет прямого соответствия, побудили Clark и Manini использовать в таких ситуациях термин динапения [12]. Они предложили этим словом называть уменьшение силы мышц, связанное с возрастом, но не с неврологическим или мышечным заболеванием считая, что уменьшение силы точнее предсказывает риск инвалидности и смерти, чем уменьшение мышечной массы [13]. Наблюдения в течение 5 лет изменений в четырехглавой мышце бедра у 1678 участников показали, что снижение силы мышц происходит быстрее, чем потеря мышечной массы и что сохранение или даже увеличение массы мышц не предотвращало возрастного уменьшения силы [14]. Этот факт объясняют сокращением числа мотонейронов и моторных единиц [15], замедлением у людей среднего и старшего возраста скорости включения моторных единиц [15], замедлением импульса мотонейрона [16]. Возрастное сокращение объема белого вещества [17] свидетельствует о развивающейся недостаточности нейрональных связей [18]. Скорость формирования и перестройки связей в моторной коре снижается у стариков по сравнению с людьми среднего возраста и молодыми [19]. В старости нарушается согласованность действия мышц агонистов и антагонистов, что также снижает силу сокращений [15]. Увеличение возраста сопровождается накоплением в мышцах адипоцитов, располагающихся как интра-, так и интермускулярно [20].

Возрастная атрофия мышц обычно начинает проявляться с 40 лет, вначале со средней скоростью 8% за десятилетие, а с 70 лет в среднем по 15% [21]. Что же касается силы, то эти авторы указывают следующую печальную тенденцию: снижение силы ног за десятилетие до 70 лет: 10—15%, а в последующие десятилетия по 25—40%. Часто мышечная атрофия комбинируется с накоплением жира и по весовым показателям может быть незаметна.

Причины саркопении известны: снижение физической активности, гормональные изменения, инсулинорезистентность, генетическая предрасположенность, нарушения аппетита, пищевая недостаточность, сниженный синтез белка, оксидативный стресс. Однако о механизме действия этих факторов известно не так много. Понятно, что такие анаболические стимулы, как инсулин, инсулиноподобный фактор роста 1

(IGF-1), физические нагрузки, тестостерон усиливают синтез мышечных белков, стимулируют пролиферацию сателлитов и миобластов. Старение же способствует развитию противоположных изменений: малоподвижности, инсулинорезистентности, снижению уровня гормонов и IGF-1. Предполагаемая формальной логикой связь развития саркопении с возрастным уменьшением числа сателлитов, скорости их пролиферации и дифференцировки подтверждается на экспериментальных моделях [22]. В культуре дифференцировка старческих сателлитов существенно замедлялась в присутствии аутоыворотки и ускорялась сывороткой лошади или молодого человека [22, 23].

В 1997 году в журнале Nature появилась статья McPherron с сотрудниками [24] об открытии у мышей ещё одного представителя семейства трансформирующих факторов роста бета (TGF- β), названного авторами growth/differentiation factor-8 (GDF-8), а позже ставшего под названием миостатин популярным в медицине и, ещё более, в спорте и культуризме. Мыши с выключенным геном GDF-8 оказались значительно крупнее животных дикого типа. Мышцы у таких животных были в 2—3 раза объемнее за счет гиперплазии и гипертрофии волокон. Авторы пришли к заключению, что GDF-8 (миостатин) является негативным регулятором роста скелетных мышц. В связи с этим представляется обоснованным предположение о возможности целенаправленного снижения содержания миостатина для предотвращения и устранения саркопении.

При сниженной концентрации миостатина уменьшается накопление жира и улучшается метаболизм глюкозы [25] что открывает перспективу лечения ожирения и диабета. Однако путь от полученного в эксперименте факта до его использования в практической медицине оказался длинным, изобилующим неожиданностями и до сих пор незавершенным. Данные о возрастной динамике содержания миостатина не укладывались в схему обратной пропорциональности с развитием мышц. На эффект миостатина не меньше, чем его концентрация влияет чувствительность его рецепторов. Не обнаружилось и прямой связи между содержанием и активностью вещества. Выявились сложности в определении концентрации и регуляции посттрансляционной активности [26]. Уровень миостатина можно регулировать с помощью его антагониста (блокатора) фоллистатина, способного связываться и с рецепторами миостатина.

Активин А действует как миостатин и предлагается его использование в терапии с целью оптимизации соотношения польза-риск при мышечных заболеваниях человека [27]. Однако в регуляции мышечной массы как через миостатин, так и через активин А ещё много неясного, эти вещества действуют и на другие

системы организма. В связи со сложностью «миостатиновой» регуляции этот путь профилактики и лечения саркопении еще не достиг стадии клинического применения [28].

Биология и медицина последних лет характеризуются быстрым нарастанием свидетельства важной и нередко решающей роли митохондрий во множестве нормальных и патологических проявлений жизни. Развитие серьезных патологических процессов в митохондриях при действии самого распространенного патогенного фактора — гипоксии послужило основой для создания в 1956 году Харманом свободнорадикальной теории старения. Излагая её, он называл митохондрии биологическими часами [29]. Теория стала популярной и за прошедшие годы многократно и разнообразно проверялась экспериментами и клиническими испытаниями. Одно из таких исследований привожу в качестве примера. Введение генетически не модифицированным мышам, начиная со среднего возраста, миметика супероксиддисмутазы уменьшало выраженность оксидативного стресса, облегчало обучение, улучшало память, продлевало жизнь мышей [30]. Вероятно, я не удивлю читателя, сообщив, что, несмотря на справедливость идеи Хармана, сегодня её редко называют теорией старения. Причина в том, что события в митохондриях не единственный, хотя и очень важный, фактор старения. Оно такое же сложное явление, как и жизнь. Следствием сложности стало существование нескольких вполне справедливых, но неизбежно односторонних, неполных «теорий старения» [31, 32].

Конечно, сказанное не только не принижает роль митохондрий в развитии саркопении, но обуславливает её главенство в развитии этой «энергетической болезни». Главные возрастные изменения митохондрий: уменьшение их объемного содержания в мышечных волокнах, продукции в них АТФ и скорости синтеза белка, сочетаются с мышечной слабостью и, в частности, снижением скорости походки [33]. В мышцах пожилых мышей находили снижение уровня NAD^+ и активности SIRT1, а также повышение уровня HIF-1 α (гипоксия-индуцируемый фактор). Повышение уровня NAD^+ приемом витамина B3 или ограничением калорийности пищи уменьшало уровень HIF-1 α и повышало двигательную активность [34]. Конечно, это только частный пример из множества эффекторных молекул — регуляторов функции митохондрий.

Повреждающее действие оксидантов в митохондриях особо значимо, поскольку здесь оно развивается по принципу порочного круга — бьет по защитникам от ROS: мтДНК и компонентам электронно-транспортной цепи. Уязвимость мтДНК усугубляется от-

сутствием при ней защищающих (экранирующих) гистонов [35].

Два главных фактора, влияющих на функцию мышечных митохондрий: возраст и физическая активность [36]. Морфологическое выражение гомеостаза митохондрий соотношение слияние — деление с возрастом сдвигается в сторону деления [36]. Снижается содержание ключевого регулятора биогенеза и функции митохондрий — PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α) и его мРНК [35]. Наблюдается положительная корреляция содержания PGC-1 α с оксидативной способностью у молодых и старых людей [35]. Умеренное увеличение уровня PGC-1 α в мышцах мышей предотвращало возрастную атрофию мышц [37]. Выявляется положительная корреляция содержания PGC-1 α с оксидативной способностью у здоровых молодых людей [38] и скоростью походки у стариков [39].

У старых животных и людей снижается экспрессия гена PGC-1 α . Это связывают с развитием у стариков воспалительных реакций с повышением уровня IL-6 и TNF α [40]. Жесткая корреляция биоэнергетики и саркопении демонстрируется прямым влиянием соотношения: скорости синтеза АТФ/поглощения кислорода на скорость походки пожилых людей [40]. Не следует забывать, что способность выполнять тренировки и действие тренировок зависит не только от состояния мышц конечностей, но не в меньшей степени и от дыхательной мускулатуры.

Анализ экспрессии генов в биоптатах мышц у малоподвижных пожилых людей обнаружил снижение скорости транскрипции генов оксидативного фосфорилирования и усиление транскрипции генов оксидативного стресса (сравнительно с молодыми малоподвижными). У постоянно использующих аэробные тренировки стариков сравнительно с тренирующимися молодыми таких различий не было. У тех и других находили повышенный уровень транскрипции генов фосфорилирования [41]. Митохондрии — ключевой фактор в цепи событий, приводящих к апоптозу, поскольку они содержат множество проапоптозных белков и продуцируют ROS [42, 43], активирующие сигнальный механизм апоптоза. Есть экспериментальные и клинические наблюдения, свидетельствующие об участии апоптозного вклада в саркопению, формируемую возрастом и физической пассивностью. В облегчении и даже обратном развитии саркопении тренировками присутствует и их антиапоптозное действие [35, 44].

Физические нагрузки естественный и поэтому наиболее эффективный путь профилактики и лечения саркопении. Известны некоторые механизмы действия нагрузок. Прежде всего, они увеличивают продукцию ROS и, соответственно, оксидативные по-

вреждения митохондрий и других внутриклеточных структур. Этим действием повторяющиеся нагрузки стимулируют антиоксидантную систему митохондрий и тем самым вызывают адаптацию к оксидативному стрессу по механизму гормезиса. Поскольку оксидативный стресс — универсальный патогенный фактор чуть ли не всех болезней, благотворное действие нагрузок сказывается не только на течении саркопении, но и на других недугах старости. В мышцах нагрузки, активацией механорецепторов увеличивают уровень IGF-1. Повышение уровня IGF-1 и сама по себе нагрузка активируют mTOR (mammalian target of rapamycin). Эти изменения стимулируют синтез миофибрилярного белка и ингибируют его деградацию, активируют сателлиты и снижают жировую инфильтрацию мышц [45]. Активация нагрузками центрального регулятора функции митохондрий — PGC-1 α стимулирует их биогенез, долговечность, снижает уровень оксидативного стресса, воспаления, экспрессии TNF- α , апоптоза, аутофагии, активации протеосом [35]. Тренировка улучшает в старческих мышцах оксидативное фосфорилирование, синтез АТФ, экспрессию каталазы, гомеостаз Ca²⁺, активирует функцию эндотелия и ангиогенез [11, 35]. Понятно, что всё сказанное выше — это принципиальные возможности воздействия тренировок. Необходимы обширные рандомизированные исследования влияния типа, частоты и интенсивности нагрузок для профилактики или лечения возрастной недостаточности мышц не у старшего поколения вообще, а персонифицированно у конкретных стариков. Так, например, оптимальные антиоксидантные показатели получены при аэробных тренировках с нагрузкой 50—80% от максимума и частотой 2—3 сеанса в неделю [46].

Наряду с нагрузками и вместо нагрузок предупредить и лечить саркопению можно и нужно питанием. Прежде всего, для сохранения мышечной массы, анаболизма белка необходимо получать ежедневно с пищей примерно 1 г белка на килограмм массы тела [47].

В старости утрачивается часть моторных нейронов и соответственно часть моторных единиц. Гомеостаз — состояние динамичное, оно, в частности, выражается постоянным remodelированием моторных единиц: денервацией-реинервацией. С возрастом первое начинает преобладать [9].

Такие изменения структуры функционально проявляются в снижении силы и массы мышц, повышении утомляемости. Следует отметить, что в обеспечивающих положение тела постуральных мышцах, (стабильнее нагруженных повседневной жизнью) дегенеративные изменения развиваются медленнее [48]. На уровне клеточных взаимодействий в старости развивается дисбаланс между возрастающей скоростью де-

структивных повреждений мышечных волокон и замедлением перехода стволовых (сателлитных) мышечных клеток из покоящегося состояния в активное [49]. Исследование аутопсийного материала 53 мужчин от 15 до 83 лет без мышечной патологии показало, что атрофия, выражающаяся утратой волокон, начинается с 25 летнего возраста. Сокращение числа красных волокон (выполняющих продолжительные нагрузки низкой интенсивности, например бег на длинные дистанции, плавание, ходьба, многочисленные повторы низкоинтенсивных силовых упражнений) и белых волокон (быстро сокращающиеся с большой силой) происходит, по некоторым данным, примерно одинаково, а сокращение размера в большей степени свойственно белым волокнам [50]. Есть сообщения и о преимущественной утрате с возрастом быстрых «силовых» волокон [51]. Нарастающая с возрастом утрата скорости движений внушает доверие к последним данным. Конечно, в поисках причины возрастной атрофии мышц были предприняты многочисленные исследования скорости синтеза белка в мышцах людей разного возраста. Результаты оказались противоречивыми и наиболее правдоподобный вывод из них — признание того, что скорость синтеза в течение суток непостоянна и должна определяться в строгой связи с моментом приема пищи. Измерением скорости синтеза мышечного белка после еды установили значительное снижение её у старых людей [52]. Скорость синтеза белка после физической нагрузки (компенсаторная) также оказалась ниже у старых людей [53]. Австралийские исследователи [54] изучали возрастные физиологические изменения мышечных волокон. Исследовали биоптаты бедренной мышцы. Участники обоего пола: 16 молодых (22 ± 3) года и 20 старых (70 ± 4) года статистически значимо различались только по возрасту. По росту, весу, физическим нагрузкам различия не были существенны. Обнаружено снижение (на 17%) сократительной способности в белых волокнах мышц у стариков. Эти волокна оказались менее чувствительными к активации кальцием. В саркоплазматическом ретикулуме как белых, так и красных волокон у стариков содержание кальция, включающего процесс сокращения оказалось меньше, чем у молодых людей. Иными словами, работа показала, что одна из причин саркопенической слабости заключается в снижении силовых возможностей индивидуальных мышечных волокон.

Gava с сотрудниками [55] исследуя группу чемпионов мира, установили, что независимо от спортивной специализации (бег, прыжки, метания) мышцы начинают слабеть после 30 лет с примерной скоростью утраты силы на 25% за каждые 20 лет. Выяснилось, что у гораздо менее одаренных физически, но здоро-

вых людей, динамика утраты силы примерно такая же. К возрасту 70 лет они сохраняют около 50% от своей силы в 30 лет, что можно считать достаточным для нормального в отношении физической активности стиля жизни. Биопсийное исследование мышц у мужчин в возрасте от 22 до 79 лет показало, что существенной причиной возрастной атрофии является денервация волокон, обусловленная гибелью мотонейронов, уменьшением числа моторных единиц [56]. Происходящий одновременно процесс реиннервации в некоторой степени компенсирует деградацию мышц, увеличивая пропорцию медленных волокон (сравнительно с молодыми или старыми малоподвижными людьми). Те же авторы показали, что долговременные и значительной интенсивности нагрузки стимулировали реиннервацию, сохранение функции, размера и строения мышц, замедляли возрастное снижение двигательной активности и старческую зависимость от помощи посторонних [56].

Среди современного населения Земли велика доля людей, не способных по множеству причин (отсутствие жажды жизни, воли, подходящих условий, болезнь, значительное ожирение, хрупкость, старость и др.) выполнять регулярные физические нагрузки. Объем нагрузок часто бывает меньше оптимума, необходимого для профилактики и лечения саркопении. Для этой части населения сегодня исследуются пищевые возможности тормозить развитие саркопении. Определение клеточных мишеней, активируемых движением, позволило найти средства, имитирующие некоторые эффекты нагрузок на энергетический обмен мышц и проявляющие «физкультуроподобное действие» на мозг. Мишеней много, действие их сложно, многоступенчато, мало изучено и поэтому распределить мишени по значительности их роли в интересующих нас процессах, по-видимому, невозможно. Упомяну в случайном порядке наиболее обсуждаемые вопросы.

Тему влияния на саркопению пищевых факторов начну с обсуждения вещества с очень широким диапазоном действия — витамина D. Его благотворное действие распространяется кроме рахита, остеопороза, инфекций, инсультов, инфарктов, рака, депрессии и на саркопению. Оно проявляется на разных уровнях организации жизни. Инкубация сателлитных клеток с витамином D вызывала выраженный промиогенный эффект [57]. Добавление витамина D к диете пожилых женщин положительно влияло на мышечную силу, самочувствие, снижало частоту падений и переломов [58].

О влиянии микронутриентов на силу известно, что низкий уровень витамина E, каратиноидов и селена (ограничивающий синтез селенопротеинов) способствует мышечной слабости [15]. Механизм такого влия-

ния принято объяснять снижением микронутриентами уровня оксидативного стресса, повреждающего ДНК, белки и липиды.

Железо необходимый элемент для осуществления многих процессов жизни [59] и в том числе для нормальной функции мышц [60]. Поэтому при любом нарушении функции мышц вполне разумно контролировать достаточность железа.

Сиртуины, в частности SIRT1 — зависимый от уровня NAD⁺ белок, регулирующий (деацетилирующий) около 40 нижестоящих в цепи регуляции белков. В том числе таких важных для энергетического метаболизма мышц, биогебеза и респираторной активности митохондрий, как AMPK (АМФ-активируемая протеинкиназа) и PGC-1 α . Введение молодым и старым мышам агониста AMPK вызывало улучшение когнитивной и двигательной функции [61]. Активация AMPK — один из механизмов действия популярного антидиабетического препарата метформина. Прием его повышает чувствительность гипоталамуса к лептину, снижает усвоение пищи, вес тела, уровень холестерина, глюкозы, кровяного давления, провоспалительных цитокинов [62]. Сообщения о действии метформина на мозг противоречивы: описаны положительные и отрицательные последствия [62]. Популярное в проблеме физических нагрузок вещество ресвератрол, многократно проявившее себя усилителем благотворного действия движения, замедлителем движения не оказывается [62, 63]. Создать полный эквивалент физической нагрузки таблеткой пока не удается и следует использовать все возможности дополнять таблетку мышечной работой.

Перспективным направлением медицины в разработке суррогатов движения сегодня представляется исследование действия на мышцы функциональной электростимуляции (Functional Electrical Stimulation-FES) [64]. Международная группа исследователей (20 авторов) описала результаты электрической стимуляции бедренных мышц у 8 мужчин и 8 женщин в возрасте $73,1 \pm 6,9$ года [65]. Программа исследования включала биопсию мышц. Стимуляцию проводили в течение 9 нед. (24 сеанса стимуляции по 60 мин). В итоге обнаружили повышение (сравнительно с исходным состоянием) функциональных показателей: скорости и силы движений, снижение утомляемости. Увеличивались содержание и диаметр быстрых, второго типа мышечных волокон и уменьшение диаметра медленных волокон. Цитохимическим анализом установлена активация сателлитных клеток, увеличивалось и их число. Стимуляция повышала в мышцах уровень IGF-1. Авторы заключают, что электростимуляцией можно противодействовать старческой деградации мышц. Имеющиеся в литературе сведения по FES свидетельствуют о том, что в случа-

ях, когда физические нагрузки ограничиваются по каким-либо причинам, электростимуляция может с явным успехом использоваться для противодействия возрастной деградации мышц. Оптимистичны данные относительно возможности FES и при более тяжелых, сравнительно с саркопенией, поражениях мышц. В большом разностороннем исследовании больных с синдромом конского хвоста (продолжительность болезни 2—6 лет) в денервированных и, следовательно, атрофированных четырехглавых мышцах бедра после годового курса FES наблюдали сокращения, а также цитохимические и ультраструктурные признаки восстановления структуры [66].

Жизнь и движение неразделимы. Поэтому обусловленное саркопенией нарушение двигательной активности оказывает неблагоприятное влияние на течение многих болезней. Снижение скорости и силы сокращений пораженных саркопенией мышц одна из главных причин старческой физической пассивности, а также увеличения частоты падений и других видов травматизма. Ближайшее, неразрывно связанное с саркопенией патологическое явление — остеопороз: уменьшение массы, прочности и изменение структуры костей. Не углубляясь в гормональные проблемы, физическая причина развития остеопороза заключается в снижении двигательной активности больного саркопенией и, в качестве неизбежного следствия, снижения нагрузки на кости. Запуск и развитие саркопении и остеопороза часто определяются одними и теми же факторами риска: физической пассивностью, неадекватным питанием, дисбалансом гормонов и факторов роста, воспалением [67]. Понятно, что осложнение саркопении остеопорозом усугубляет опасность проявлений саркопении: трудность ходьбы, замедление и неустойчивость походки, падения, травматизм, инвалидность, снижение и утрата физической независимости, ухудшение качества жизни, депрессия, увеличение заболеваемости и смертности.

Как болезнь, затрудняющая осуществление главного условия жизни — движения, саркопения часто сочетается с другими наиболее распространенными болезнями человечества. При этом особое внимание уделяется связи саркопении — диабет. Подобно саркопении диабет обнаруживает явную тенденцию поражать пожилых людей. В США, например, 26,9% жителей старше 65 лет — диабетики [7]. Самые постоянные спутники диабета старость, саркопения и ожирение. В качестве этиологических или, по крайней мере, предрасполагающих факторов саркопении и диабета называются прогрессивное замещение жиром мышечной массы (особенно ног), увеличение массы жира во внутренних органах, нарушения питания, физическая пассивность, возрастные изменения половых и ростовых гормонов, воспалительных цитокинов,

утрата моторных нейронов, диабетическая нейропатия, атеросклероз, инсулинорезистентность, гипергликемия [68].

Диалектически обоснованным выходом из этого мрачного списка выступает трудная, но всё же реальная возможность изменением отношения к жизни, образа жизни, движением, питанием, электростимуляцией замедлить приход саркопении самой по себе и вместе с другими болезнями старости.

References

1. Rosenberg H. Summary comments. *Am J Clin Nutr* 1989; 50: 1231S-1233S; Цит. по Rosenberg IH Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr* 1997; 127, 990S-991S.
2. Undritsov V.M., Undritsov I.M., Serova L.D. Age changes of muscular system. in the book. «The guide for gerontology» under redaction of the academician Shabalina V.N. publishing house «Citadel Trade» Moscow, 2005; 486 — 99. (in Russian)
3. AIM Coalition Announces Establishment of ICD-10-CM (M62.84) Code for Sarcopenia by the Centers for Disease Control and Prevention, April 28, 2016.
4. Morley J.E. Frailty and Sarcopenia: The New Geriatric Giants. *Rev Invest Clin*. 2016; Mar-Apr; 68(2): 59-67.
5. Keevil V.L., Romero-Ortuno R. Ageing well: a review of sarcopenia and frailty. *Proc Nutr Soc*. 2015; Nov. 74(4): 337-47.
6. Fried LP, Tangen C.M., Walston J., Newman A.B., Hirsch C., Gottdiener J. et al. Frailty in Older Adults: Evidence for a Phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001; 56:M146-M156.
7. Morley J.E., Malmstrom T.K., Rodriguez Manas L., Sinclair A.J. Frailty, sarcopenia and diabetes. *J Am Med Dir Assoc*. 2014;15: 853-9.
8. Gill T.M., Gahbauer E.A., Allore H.G., Han L. Transitions between frailty states among community-living older persons. *Arch Intern Med*. 2006; 166, 418-23.
9. Papa E.V., Dong X., Hassan M. Skeletal Muscle Function Deficits in the Elderly: Current Perspectives on Resistance Training. *J Nat Sci*. 2017; Jan; 3(1). pii: e272.
10. Peterson M.D., Rhea M.R., Sen A., Gordon P.M. Resistance exercise for muscular strength in older adults: a metaanalysis. *Ageing Res Rev* 9, 2010; 226-37.
11. Gomes M.J., Martinez P.F., Pagan L.U., Damato R.L., Cezar M.D., Lima A.R. et al. Skeletal muscle aging: influence of oxidative stress and physical exercise. *Oncotarget*. 2017; Mar 21; 8(12): 20428-40.
12. Clark B.C., Manini T.M. Sarcopenia = / = dynapenia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008; 63: 829-34.
13. Manini T.M., Clark B.C. Dynapenia and aging: an update. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012; Jan; 67(1): 28-40.
14. Delmonico M.J., Harris T.B., Visser M., Park S.W., Conroy M.B., Velasquez-Mieyer P. et al. Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration *Am J Clin Nutr*. 2009; Dec; 90(6): 1579-85.
15. Clark B.C., Manini T.M. What is dynapenia? *Nutrition*. 2012; May; 28(5): 495-503.
16. Christie A., Kamen G. Doublet discharges in motoneurons of young and older adults. *J Neurophysiol*. 2006; 95: 2787-95.

17. Good C.D., Johnsrude I.S., Ashburner J., Henson R.N., Friston K.J., Frackowiak R.S. A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. *Neuroimage*. 2001; 14(1 Pt. 1): 21-36.
18. Marner L., Nyengaard J.R., Tang Y., Pakkenberg B. Marked loss of myelinated nerve fibers in the human brain with age. *J Comp Neurol*. 2003; 462: 144-52.
19. Fathi D., Ueki Y., Mima T., Koganemaru S., Nagamine T., Tawfik A. et al. Effects of aging on the human motor cortical plasticity studied by paired associative stimulation. *Clin Neurophysiol*. 2009; 121: 90-3.
20. Delmonico M.J., Harris T.B., Visser M., Park S.W., Conroy M.B., Velasquez-Mieyer P. et al. Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration. *Am J Clin Nutr*. 2009; 90: 1579-85.
21. Kim T.N., Choi K.M. Sarcopenia: Definition, epidemiology, and pathophysiology. *J Bone Metab*. 2013; 20: 1-10.
22. Barber L., Scicchitano B.M., Musaro A. Molecular and Cellular Mechanisms of Muscle Aging and Sarcopenia and Effects of Electrical Stimulation in Seniors. *Eur J Transl Myol*. 2015; Aug 25; 25(4): 231-6.
23. Barberi L., Scicchitano B.M., De Rossi M., Bigot A., Duguez S., Wielgosik A. et al. Age-dependent alteration in muscle regeneration: the critical role of tissue niche. *Biogerontology*. 2013; Jun; 14(3): 273-92.
24. McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 1997; 387: 83-90.
25. Lee S.J., Lee Y.S., Zimmers T.A., Soleimani A., Matzuk M.M., Tsuchida K. et al. Regulation of muscle mass by follistatin and activins. *Mol Endocrinol*. 2010; Oct; 24(10): 1998-2008.
26. White T.A., LeBrasseur N.K. Myostatin and sarcopenia: opportunities and challenges — a mini-review. *Gerontology*. 2014; 60(4): 289-93.
27. Latres E., Mastaitis J., Fury W., Milosco L., Trejos J., Pangilinan J. et al. Activin A more prominently regulates muscle mass in primates than does GDF8. *Nat Commun*. 2017; Apr 28; 8: 15153.
28. Bergen H.R., Farr J.N., Vanderboom P.M., Atkinson E.J., White T.A., Singh R.J. et al. Myostatin as a mediator of sarcopenia versus homeostatic regulator of muscle mass: insights using a new mass spectrometry-based assay *Skelet Muscle*. 2015; 5: 21.
29. Harman D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954-2009. *Biogerontology*. 2009; Dec; 10(6): 773-81.
30. Quick K.L., Ali S.S., Arch R., Xiong C., Wozniak D., Dugan L.L. A carboxyfullerene SOD mimetic improves cognition and extends the lifespan of mice. *Neurobiol Aging*. 2008; 29: 117-28.
31. Chandrasekaran A., Sosa Idelchik M., Melendez J. A Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biol*. 2017; Apr; 11: 91-102.
32. Rugarli E., Trifunovic A. Is mitochondrial free radical theory of aging getting old? *Biochim Biophys Acta*. 2015; Nov; 1847(11): 1345-6.
33. Coen P.M., Jubrias S.A., Distefano G., Amati F., Mackey D.C., Glynn N.W. et al. Skeletal muscle mitochondrial energetics are associated with maximal aerobic capacity and walking speed in older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013; 68: 447-55.
34. Gomes A.P., Price N.L., Ling A.J., Moslehi J.J., Montgomery M.K., Rajman L. et al. Declining NAD⁺ induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell*. 2013; 155: 1624-38.
35. Joseph A.M., Adhihetty P.J., Leeuwenburgh C. Beneficial effects of exercise on age-related mitochondrial dysfunction and oxidative stress in skeletal muscle. *J Physiol*. 2016; 594: 5105-23.
36. Carter H.N., Chen C.C., Hood D.A. Mitochondria, muscle health, and exercise with advancing age. *Physiology*. 2015; 30: 208-23.
37. Wenz T., Rossi S.G., Rotundo R.L., Spiegelman B.M., Moraes C.T. Increased muscle PGC-1 α expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 05-20410.
38. Garnier A., Fortin D., Zoll J., N'Guessan B., Mettauer B., Lampert E. et al. Coordinated changes in mitochondrial function and biogenesis in healthy and diseased human skeletal muscle. *FASEB J*. 2005; 19, 43-52
39. Joseph A.M., Adhihetty P.J., Buford T.W., Wohlge-muth S.E., Lees H.A., Nguyen L.M. et al. The impact of aging on mitochondrial function and biogenesis pathways in skeletal muscle of sedentary high- and low-functioning elderly individuals. *Aging Cell* 2012; 11, 801-809.
40. Morley J.E. Pharmacologic Options for the Treatment of Sarcopenia. *Calcif Tissue Int*. 2016; 98: 319-33.
41. Johnson M.L., Lanza I.R., Short D.K., Asmann Y.W., Nair K.S. Chronically endurance-trained individuals preserve skeletal muscle mitochondrial gene expression with age but differences within age groups remain. *Physiol Rep*. 2014; 2, e12239.
42. Luk'ynova L.D. Mitochondrial dysfunction — molecular mechanism of hypoxia. *Patogenez*. 2003; 1: 52-67. (in Russian)
43. Luk'yanova L.D. Modern problems of adaptation to hypoxia. Signal pathways and their role in the system of regulation. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2011; 1: 3-19. (in Russian)
44. Calvani R., Joseph A.M., Adhihetty P.J., Miccheli A., Bossola M., Leeuwenburgh C. et al. Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy. *Biol Chem*. 2013; 394: 393-41.
45. Phu S., Boersma D., Duque G. Exercise and Sarcopenia. *J Clin Densitom*. 2015; 18: 488-92.
46. Bouzid M.A., Filaire E., McCall A., Fabre C. Radical oxygen species, exercise and aging: an update. *Sports Med*. 2015; 45: 1245-61.
47. Bosaeus I., Rothenberg E. Nutrition and physical activity for the prevention and treatment of age-related sarcopenia. *Proc Nutr Soc*. 2016; May; 75(2): 174-80.
48. Hepple R.T., Rice C.L. Innervation and neuromuscular control in ageing skeletal muscle. *J Physiol*. 2016; Apr 15; 594(8): 1965-78.
49. Blau H.M., Cosgrove B.D., Ho A.T. The central role of muscle stem cells in regenerative failure with aging. *Nat Med*. 2015 Aug; 21(8): 854-62.
50. Lexell J, Taylor CC, Sjostrom M. What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *Journal of the neurological sciences*. 1988; 84: 275-94.
51. Laura Barberi, Bianca Maria Scicchitano, and Antonio Musaro Molecular and Cellular Mechanisms of Muscle Aging and Sarcopenia and Effects of Electrical Stimulation in Seniors *Eur J Transl Myol*. 2015; Aug 24; 25(4): 5227.
52. Wall BT, Gorissen SH, Pennings B, Koopman R, Groen BB, Verdijk LB, van Loon LJ. Aging Is Accompanied

by a Blunted Muscle Protein Synthetic Response to Protein Ingestion. *PLoS one*. 2015; 10:e0140903.

53. Kumar V, Selby A, Rankin D, Patel R, Atherton P, Hildebrandt W, et al. Age-related differences in the dose-response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men. *J Physiol*. 2009; 587: 211-7.

54. Lamboley CR, Wyckelsma VL, Dutka TL, McKenna MJ, Murphy RM, Lamb GD. Contractile properties and sarcoplasmic reticulum calcium content in type I and type II skeletal muscle fibres in active aged humans. *J Physiol*. 2015; 593: 2499-514.

55. Gava P, Kern H, Carraro U. Age-associated power decline from running, jumping, and throwing male masters world records. *Exp Aging Res*. 2015; 41(2): 115-35.

56. Helmut Kern and Ugo Carraro Home-Based Functional Electrical Stimulation for Long-Term Denervated Human Muscle: History, Basics, Results and Perspectives of the Vienna Rehabilitation Strategy *Eur J Transl Myol*. 2014; Mar 31; 24(1): 3296.

57. Melissa Braga, Zena Simmons, Keith C Norris, Monica G Ferrini, and Jorge N Artaza Vitamin D induces myogenic differentiation in skeletal muscle derived stem cells. *Endocr Connect*. 2017; Apr; 6(3): 139-50.

58. Anagnostis P, Dimopoulou C, Karras S, Lambrinou-daki I, Goulis DG. Sarcopenia in post-menopausal women: is there any role for vitamin D? *Maturitas*. 2015; 82: 56-64.

59. Oberleas D., Skalny A.V., Skalnaya M.G., Nikonorov A.A., Nikonorova E.A. Pathophysiology of microelementoses. Post 3. Iron. *Pathogenez*. 2016; 14, 2, 20-7. (in Russian)

60. Stugiewicz M, Tkaczyszyn M, Kasztura M, Banasiak W, Ponikowski P, Jankowska EA. The influence of iron deficiency on the functioning of skeletal muscles: experimen-

tal evidence and clinical implications. *Eur J Heart Fail*. 2016; 18: 762-73.

61. Kobil T, Guerrieri D, Zhang Y, Collica SC, Becker KG, van Praag H. AMPK agonist AICAR improves cognition and motor coordination in young and aged mice. *Learning & Memory*. 2014; 21: (2): 119-26.

62. Guerrieri, D., Moon, H. Y., van Praag, H. Exercise in a Pill: The Latest on Exercise-Mimetics. *Brain Plasticity*, 2017; vol. 2(2): 153-69.

63. Dolinsky VW, Jones KE, Sidhu RS, Haykowsky M, Czubyrt MP, Gordon T, et al. Improvements in skeletal muscle strength and cardiac function induced by resveratrol during exercise training contribute to enhanced exercise performance in rats. *The Journal of Physiology*. 2012; 590: (11): 2783-99.

64. Ugo Carraro,1,2 Helmut Kern,3,4 Paolo Gava,2 Christian Hofer,4 Stefan Loeffler,4 Paolo Gargiulo et al. Biology of Muscle Atrophy and of its Recovery by FES in Aging and Mobility Impairments: Roots and By-Products *Eur J Transl Myol*. 2015; Aug 24; 25(4): 221-30.

65. Kern H, Barberi L, Lofler S, Sbardella S, Burggraf S, Fruhmann H et al Electrical stimulation counteracts muscle decline in seniors. *Front Aging Neurosci*. 2014; Jul 24; 6: 189.

66. Ugo Carraro, Simona Boncompagni, Valerio Gobbo, Katia Rossini, Sandra Zampieri, Simone Mosole et al. Persistent Muscle Fiber Regeneration in Long Term Denervation. Past, Present, Future. *Eur J Transl Myol*. 2015; Mar 11; 25(2): 4832.

67. Daly RM Exercise and nutritional approaches to prevent frail bones, falls and fractures: an update. *Climacteric*. 2017; Apr; 20(2): 119-24.

68. Hak Chul Jang Sarcopenia, Frailty, and Diabetes in Older Adults *Diabetes Metab J*. 2016; Jun; 40(3): 182-9.

Сведения об авторе:

Пальцын Александр Александрович, доктор биол. наук, лауреат Государственной премии СССР, гл. науч. сотр. НИИОПП, проф. РМАНПО.

Артеменков А. А., 2018
УДК 616-092+616.89

Артеменков А.А.

Этиопатогенетические механизмы возникновения дезадаптивных расстройств у человека в процессе обучения

ФГБОУ ВО «Череповецкий государственный университет» Министерства образования и науки России,
162600, г. Череповец, Россия, пр. Луначарского, д. 5

Цель исследования. Анализ факторов риска и патогенетических механизмов развития дезадаптивных расстройств (ДР) у человека в процессе обучения. **Методика.** В работе использованы общенаучные методы теоретического познания: абстрагирование, анализ и синтез, аналогия, индукция и дедукция, мысленное моделирование. **Результаты.** Показано, что пограничные расстройства адаптации имеют бифункциональную природу и характеризуются бессимптомным течением. Установлена роль социогенных факторов среды в возникновении ДР. Акцентируется, что ДР часто формируются в процессе обучения под воздействием неблагоприятных факторов среды и образа жизни. Рассмотрена роль этиологических факторов риска в развитии ДР, обсуждаются особенности течения психосоматических расстройств у студентов, их психофизиологический статус и особенности проявления у них дезадаптации. Детально анализируются современные представления об организации ДР при различных вариантах приспособления организма человека к условиям учебной среды. Обсуждается влияние типологии на уровень адаптации (дезадаптации) организма и системная организация психических функций. Показано ведущее значение в патогенезе ДР активации лимбико-ретикулярных образований, дисфункции срединно-стволовых структур мозга и дезинтеграции корково-подкорковых взаимоотношений. **Заключение.** Сделан вывод, что понимание механизмов развития ДР позволяет применять различные методы профилактики ДР. Обсуждаются некоторые немедикоментозные и фармакологические средства коррекции ДР и санаторная реабилитация обучающихся. Установление истинных механизмов развития дезадаптивных расстройств обеспечит решение многих вопросов патофизиологии интегративной деятельности мозга. Это в свою очередь позволит найти пути нормализации психосоматических нарушений, применять более эффективные методы медико-психологической помощи населению.

Ключевые слова: переходные состояния; дезадаптивные расстройства; факторы риска; патогенетические механизмы; профилактика.

Для цитирования: Артеменков А.А. Этиопатогенетические механизмы возникновения дезадаптивных расстройств у человека в процессе обучения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 122—128.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.122-128

Для корреспонденции: Артеменков Алексей Александрович, канд. биол. наук, доцент каф. теории и методики физической культуры и спорта, e-mail: basis@live.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.10.2017

Artemenkov A.A.

Etiopathogenetic mechanisms of disadaptive disorders in students during training

Cherepovets State University of the Ministry of Education and Science of Russia, Prospekt Lunacharskogo, 5, Cherepovets 162600, Russia

Aim. Based of published reports to analyze risk factors for development of disadaptive disorders (DD) and to elucidate pathogenetic mechanisms of DD development during education for their timely prevention and correction. **Methods.** In this study, general scientific methods of theoretical knowledge were used, such as abstraction, analysis and synthesis, analogy, induction and deduction, and mental modeling. **Results.** This review examined the literature on development of DD in people during training. We presented evidence that borderline disorders of adaptation are bifunctional and characterized by an asymptomatic course. The role of sociogenic, environmental factors in the occurrence of DD was established. Emphasis was placed on the fact that DD often develop in the process of learning under the influence of adverse environmental factors and lifestyle. Opinions on the role of etiologic risk factors in the development of DD were presented. Features of psychosomatic disorders, psychophysiological status, and manifestations of maladaptation in students were discussed. Current ideas about the DD organization and different types of body adaptation to the conditions of educational environment were analyzed in detail. The author focused on the effect of typology on the level of adaptation (maladaptation) in the body and the systemic

organization of mental functions. Activation of limbic-reticular formations, dysfunction of mid-brain stem structures, and disintegration of cortical-subcortical relationships were shown to play a leading role in the pathogenesis of DD. **Conclusion.** A detailed understanding of DD mechanisms allows to use different methods for prevention of DD. Some non-drug and pharmacological methods for DD correction and sanatorium rehabilitation of students were discussed in this review. Identifying true mechanisms for development of maladaptive disorders will provide a solution of many issues in pathophysiology of brain integrative activity. This, in turn, will help finding ways to correct psychosomatic disorders and to use more effective methods in medical and psychological care.

Keywords: transition states; disadaptive disorders; risk factors; pathogenetic mechanisms; prevention.

For citation: Artemenkov A.A. Etiopathogenetic mechanisms of disadaptive disorders of humans during education. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 122—128. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.122-128

For correspondence: Artemenkov Alexey Alexandrovich, Candidate of Biology, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Theory and Methods of Physical Culture and Sports, e-mail: basis@live.ru

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors.

Artemenkov A.A.; <http://orcid.org/0000-0001-7919-3690>

Received 20.10.2017

Введение

Наряду с общеизвестной адаптационной теорией в настоящее время складываются предпосылки для создания общей теории дезадаптации. Изучаются дезадаптивные расстройства (ДР), протекающие на границе нормы и патологии, т.е. исследуются преимущественно реакции перенапряжения адаптационных механизмов и их проявление. Кроме того, изучаются этиологические факторы, приводящие в действие дезадаптивные процессы. Все это позволяет понять общепсихологическую природу человека и специфику переходных процессов в системе «адаптация — дезадаптация — патология».

Несмотря на большое количество исследований по проблеме дезадаптации остаются недостаточно понятными механизмы формирования и развития дезадаптивных процессов у человека. Теория переходного состояния между нормой и патологией рассмотрена М.М. Хананашвили [1], показана бифункциональная природа переходного состояния — биологически положительная, защитная и биологически негативная. Обнаружено «бессимптомное» течение переходного состояния и показана его роль в развитии патологических процессов.

Ю.А. Александровский [2] указывает на основную роль социогенных факторов в формировании пограничных психических расстройств. Автором показано, что важнейшим критерием психической дезадаптации является нехватка «степеней свободы» адекватного и целенаправленного реагирования человека в психотравмирующей ситуации. Нарушение функциональных возможностей барьера психической адаптации является основой развития расстройств невротического уровня.

В связи с особой ролью социогенеза в развитии личности человека следует указать на главенствующую роль социальных факторов в формировании ДР.

В последнее время появилось много работ, связанных с изучением дезадаптивных процессов в период обучения у школьников и студентов. Действительно, студенты представляют особую социальную группу общества, объединенную специфическими условиями обучения и образом жизни. В современных образовательных учреждениях адаптация обучающихся к учебному процессу осуществляется в непростых социально-экономических условиях, при информационных перегрузках и гиподинамии, что приводит к дезадаптации, результатом которой является ухудшение психосоматического здоровья [3].

Цель обзора — анализ патогенетических механизмов и факторов риска развития ДР, особенностей возникновения ДР в процессе учебной деятельности и подходы к их профилактике и коррекции.

Этиологические факторы риска развития дезадаптивных расстройств у студентов

В настоящее время начинает доминировать мнение о том, что формирование ДР у студентов происходит в определенных условиях обучения и под воздействием комплекса этиологических факторов, нарушающих оптимальную адаптацию человека. В частности, А.К. Рубченко [4] проанализированы причины дезадаптации школьников и студентов. Были выделены наиболее общие социально-психологические факторы дезадаптации обучающихся:

1) экзогенные или социальные факторы (семья, образовательное учреждение, референтная группа, субкультура и др.);

2) эндогенные или психологические факторы:

а) индивидуальные (пол, возраст, особенности нервной системы, конституция тела, проблемы со здоровьем, генетическая предрасположенность);

б) личностные (мотивация, ценности, жизнестойкость, рефлексия и саморегуляция и др.).

В то же время выяснено, что у студентов первого курса, имеющих низкий уровень нервно-психической адаптации, отмечается преобладание в общей структуре шкалы адаптации следующих категорий: патологическая психическая адаптация, вероятное болезненное состояние. Следовательно, данная группа лиц имеет повышенный риск развития соматических и психических расстройств [5]. По мнению И.А. Погонышевой [6], факторами риска, усугубляющими ДР студентов, являются проживание в общежитии, работа в вечернее время, обострение хронических заболеваний, неблагоприятная обстановка в семье, стрессы. Тем не менее показано, что 30,0% обследуемых студентов первого курса и только 2,0% первокурсников входят в группу риска по развитию дезадаптивных реакций.

В настоящее время достаточно подробно изучены особенности психофизиологического статуса студентов, имеющих риск дезадаптации в университетской среде. Выявлены группы лиц с неполной адаптацией и срывом адаптации, студенты, которые характеризовались относительно большими величинами силы возбуждения и подвижности нервных процессов, а также высоким показателем нейротизма. Данное обстоятельство позволяет проводить целенаправленную работу по профилактике дезадаптации с учетом типологий и функционального состояния обучающихся [7]. Некоторые авторы считают, что тревожность, агрессивность, фрустрация, ригидность свидетельствует о наличии дезадаптивных проявлений у студентов [8]. Примечательно, что R. Mazurkiewicz соавт. [9] выявили эмоциональное выгорание у 71,0% студентов-медиков после трех лет обучения, которое привело к ухудшению самочувствия, нарушению сна и потере здоровья.

Патогенетические механизмы развития дезадаптивных расстройств у студентов

Тот факт, что процессы адаптации и дезадаптации выступают как взаимодополняющие друг друга явления, свидетельствует об их обусловленности комплексом природных и социальных факторов [10]. В связи с этим следует полагать, что адаптация студентов к условиям обучения — многоаспектный процесс,

в котором организация учебно-познавательной деятельности должна способствовать наиболее полной реализации личностного потенциала. Некоторые авторы [11] рассматривают успешную адаптацию как включенность в новую социальную среду, в учебно-воспитательный процесс, в новую систему отношений.

Однако существует и другое мнение. В частности, приводятся результаты исследования ДР у студентов и проявления эмоционально-волевых, мотивационных, социально-психологических реакций. Дезадаптивные состояния у студентов довольно часто сопровождаются вегетативными дисфункциями, астенией, нарушением сна, головными болями и функциональными нарушениями [12]. Сведения о том, что психологическая дезадаптация ярко выражена как у студентов вуза, так и у студентов колледжей, могут свидетельствовать об однотипности этиологических факторов риска. Однако у студентов высших учебных заведений по сравнению с учащимися средних специальных учреждений выраженность симптомов эмоциональной дезадаптации значительно выше. Между тем, выяснено, что уровень психологической дезадаптации студентов колледжей напрямую зависит от интенсивности социального статуса. Социальная тревожность у студентов колледжей выше, чем у студентов вузов [13].

В дальнейшем было установлено, что низкий уровень субъективности самосознания, общения и деятельности определяет объективную позицию студента, характеризующуюся личностной незрелостью и способствующую дезадаптации. Студент как субъект учебной деятельности должен быть ее инициатором и организатором. Успешность в учебной деятельности также определяет высокий уровень социально-психологической адаптации [14].

Предложена типология студентов-первокурсников, основанная на результатах кластерного анализа, важнейшими переменными которой является уровень адаптации/дезадаптации, экстраверсии/интроверсии, уровень развития самосознания, общения и деятельности. Среди студентов выделено 5 типов социально-психологической адаптации: высокоадаптированные экстраверты, адаптированные тревожные экстраверты, беззаботные тревожные экстраверты, дезадаптированные тревожные экстраверты и адаптированные доминантные экстраверты [15]. Вместе с тем, по соотношению показателей реактивной и личностной тревожности выделено 4 группы студентов с различными типами межличностных отношений, отражающих их мотивированность и адекватность деятельности, а также стабильность нервных процессов. При сравнительном анализе этих типов с корреляционными ритмограммами были выделены три типа адаптации к действию эмоционального стресса:

- 1) полностью завершена адаптация;
- 2) адаптация не завершена, но протекает адекватно;
- 3) дезадаптация — нарушение адаптационных возможностей организма [16].

Из рассмотренных результатов исследования становится очевидным, что ДР и их патогенетические механизмы имеют сложную организацию и затрагивают поведенческие процессы. Перспективным направлением изучения психической деятельности и дезадаптивных процессов является теория функциональных систем [17]. На основе разработанного понятия «системоквант психической деятельности» показана динамика построения информационного системокванта акцептора результатов действия [17]. По мнению автора, церебральная архитектура функциональных систем, осуществляющая психическую деятельность, представляет динамику информационных процессов, разыгрывающихся в структурах головного мозга. С системных позиций патогенез психосоматических заболеваний, вызванных стрессом, в упрощенном виде заключается в следующем. В конфликтных ситуациях происходит активация лимбико-ретикулярных структур мозга, что приводит к дезинтеграции и напряжению функциональных систем организма и развитию дисфункции. Нарушение деятельности одной ослабленной функциональной системы и расстройство регуляторной деятельности приводит к патологии [17].

А.Б. Холмогоровой и И.Д. Климовой было показано, что у лиц с выраженными чертами пограничных расстройств личности значительно чаще встречаются дезадаптивные копинг-стратегии (психическое избегание, отрицание, употребление психоактивных веществ) по сравнению с группой без выраженных черт пограничных расстройств личности [18]. Основываясь на психопатологических проявлениях и факторной модели были определены главные синдромы ДР: депрессивный (59,5%), тревожный (45,0%), психовегетативный (35,1%) и поведенческий (14,4%). Полученные данные свидетельствуют о том, что расстройства адаптации у студентов имеют сложную психопатологическую структуру [19].

В настоящее время продолжает увеличиваться объем данных по своеобразным индикаторам развившейся дезадаптации. Как выяснено, таковыми могут быть параметры variability сердечного ритма, концентрация кортизола в пробах слюны, тонус симпатoadrenalовой системы и дефицит магния. При осложненных формах ДР рекомендуется определять в сыворотке крови концентрацию аутоантител, чувствительных к белкам S-100, уровень которых меняется при развитии патологических процессов любого генеза, негативно влияющих на функции нейронов и/или глиальных клеток и сопровождающихся эмоциональными нарушениями [20, 21].

Вместе с тем, по данным электроэнцефалографии выяснено, что у студентов с нейросоматическими расстройствами отмечается дисфункция срединно-стволовых структур мозга, нарушение корково-подкорковых взаимоотношений, усиление активизирующих десинхронизирующих влияний ретикулярной формации ствола мозга [22].

Некоторые зарубежные авторы, основываясь на теории общего адаптационного синдрома Г. Селье, предписывают важную роль стероидным гормонам в биологических реакциях эмоционального напряжения. В связи с этим осуществлено клонирование кортикотропина и его рецепторов, что позволяет проводить экспериментальные исследования в этом направлении. Активная выработка кортикотропина и изучение его сигнальных путей в мозге, по-видимому, играют ключевую роль в расшифровке обусловленных стрессом эндокринных, автономных и поведенческих ответов [23, 24].

Профилактика и коррекция дезадаптивных расстройств у студентов

В последнее время интенсивно осуществляется разработка комплексных методов профилактики и коррекции ДР. Полученные результаты исследований ряда авторов демонстрируют необходимость мониторинга адаптационного состояния у студентов для проведения профилактических мероприятий [25]. Выявлена достаточная эффективность фармакологических и немедикоментозных подходов к коррекции психологической дезадаптации у лиц 18—22 лет с проявлениями вегетативного дисбаланса [26]. Однако максимальная эффективность вмешательства по поводу психологической дезадаптации наблюдается при использовании комплексного психофармакологического воздействия. Поскольку дезадаптация негативно сказывается на деятельности человека, некоторые авторы ставят вопрос о возможности применения библиотерапии для профилактики ДР [27].

Альтернативным подходом к профилактике ДР является мнение, что активный образ жизни способствует созданию в организме защитного фона против стресса [28]. Авторы рассматривают подходы к внедрению в учебный процесс основ здорового образа жизни, тренинговых курсов и здоровьесберегающих технологий для профилактики экзаменационного стресса у студенческой молодежи в образовательных учреждениях. Несомненно, представляет интерес модель организации медико-психологической помощи в студенческом санатории-профилактории [29]. Работа санаторной службы направлена на предупреждение и лечение таких пограничных состояний, как неврозы, патологическое развитие личности, субдепре-

сии, психогенные реакции. В качестве еще одного варианта профилактической работы рассматривается скрининг студентов, обнаруживающих факторы риска развития дезадаптивного поведения с последующим их мониторингом. Следующим шагом в профилактике ДР является использование различных видов релаксационной терапии (мышечная релаксация, дыхательная релаксация, аутогенная тренировка).

В источниках литературы активно обсуждаются исследования по выявлению наиболее напряженного течения адаптационных процессов у лиц с низким уровнем нейротизма. Проведенная экспериментальная работа показала возможность использования адаптогена «Эпсорин» в качестве препарата, улучшающего состояния неспецифических адаптивных реакций организма. За счет коррекции вегетативной регуляции снижается уровень эмоционального напряжения, что приводит к улучшению качества обучения студентов [30].

Обобщая мнение авторов по проблеме профилактики ДР у лиц юношеского возраста, следует подчеркнуть, что исследователями предлагаются различные мероприятия, проведение которых способствует полноценной адаптации к обучению. К таким мероприятиям также относятся внеаудиторная и научная работа, спортивная деятельность, поездки, экскурсии и соблюдение здорового образа жизни [31].

Заключение

Рассмотренные выше данные свидетельствуют о том, что ДР относятся к переходным состояниям, протекающим между нормой и патологией. Показано, что пограничные расстройства имеют бифункциональную природу. С этой точки зрения рассматривается биологически положительный и биологически негативных исход предпатологических нарушений, которые носят бессимптомный характер. Четко установлена роль социогенных факторов в развитии ДР. Тем не менее, о значительных успехах в этом направлении говорить пока рано, так как для этого необходимо решение некоторых непростых задач. Пока нет полной ясности в вопросе о том, на каких уровнях организации живой материи и непосредственно как протекают переходные дезадаптивные процессы. На настоящий момент можно выделить и хорошо исследовать крайние состояния организма (адаптацию, дезадаптацию или патологию). Также нет четкого понимания того, как происходит незаметный, порой бессимптомный переход к патологии? Какие процессы и эндокринные механизмы в этой биологической трансформации задействованы? И, наконец, как блокировать, или, по меньшей мере, затормозить необратимый переход в системе «адаптация-дезадаптация-патология».

Рассматривая причины и условия возникновения ДР у человека в определенной учебной социальной среде можно как минимум выделить и изучить этиологические факторы риска развития ДР. Исследователям удалось определить основную роль социально-психологических факторов в развитии ДР у человека, определить группы лиц, имеющих повышенный риск развития психосоматических расстройств. Изучить психофизиологический статус и типологию человека, находящегося в состоянии дезадаптации. Есть понимание того, что эмоциональное напряжение, тревожность, депрессия, астения, агрессивность и другие состояния являются проявлениями дезадаптации. Однако остается непонятным то, какие непосредственно экзогенные и эндогенные факторы и в каких условиях запускают в действие дезадаптивные процессы. Эту задачу еще предстоит решить в ближайшее время для установления причин развития дезадаптивных расстройств.

Понимание мозговой организации ДР наводит на мысль о том, что адаптация и дезадаптация — это взаимодополняющие процессы, имеющие определенный морфологический субстрат и единство механизмов регуляции функции. На их основе формируются те или иные проявления дезадаптации, возникающие у человека в определенных условиях жизнедеятельности. По величине адаптационных сдвигов в организме можно выделить типы адаптации: полностью завершенная адаптация, незавершенная адаптация и дезадаптация. Большая надежда возлагается на теорию функциональных систем, рассматривающую организацию психической деятельности с позиции системогенеза. Удалось установить роль активизации лимбико-ретикулярных структур мозга в процессах дезинтеграции функциональных систем. Существует мнение, что у человека с пограничными психическими расстройствами личности чаще встречаются дезадаптивные копинг-стратегии поведения, а применение факторной модели позволило определить главные синдромы ДР: депрессивный, тревожный, психовегетативный и поведенческий.

Выяснено, что индикаторами ДР могут быть параметры сердечного ритма, вегетативный тонус организма, концентрация кортизола в слюне, антитела к белкам S-100. Продолжается поиск нервно-эндокринных изменений при ДР. При выраженной дезадаптации выявляется дисфункция мезэнцефальных и диэнцефальных структур ствола мозга, возникают корково-подкорковые нарушения, вегетативные расстройства, изменение деятельности системы «гипоталамус-гипофизарно-надпочечниковой» оси. Между тем в этом направлении еще немало нерешенных вопросов. Пока непонятно, за счет преобладания каких процессов (возбуждения или торможения) в структу-

рах коры, базальных ганглиях, лимбической системы, таламуса эти процессы формируются? Каковы функциональные связи между анатомо-физиологическими образованиями мозга, ответственными за генерацию дезадаптивных реакций? И, наконец, не в полной мере известно, какие нейрхимические связи в этих процессах участвуют? Несмотря на множество нерешенных вопросов, в настоящее время уже проводятся профилактические, коррекционные и реабилитационные мероприятия для улучшения состояния здоровья лиц, находящихся в состоянии дезадаптации. Для этих целей используются различные методы воздействия на организм человека. Основная суть такого оздоровительного влияния заключается в стимуляции собственных компенсаторных механизмов для перехода из дезадапционного состояния в адаптационное. Исследования переходных дезадаптивных процессов позволят понять скрытые биологические механизмы перехода от нормы к патологии.

References

1. Khananashvili M.M. Theory of the transition state between normality and pathology. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2012; (1): 3-12. (in Russian)
2. Alexander Y.A. Sociogenic mental disorders. *Rossiyskiy psikhiatricheskij zhurnal*. 2014; (3): 21-4. (in Russian)
3. Kasatkina N.E., Semenkova T.N. The problem of high school students to adapt to the processes of learning and maintaining health. *Vestnik Kemerovskogo gosudarstvennogo universiteta kul'tury i iskusstv*. 2012; 1(18): 165-73. (in Russian)
4. Rubchenko A.K. Socio-psychological factors of disadaptation of students. *Mezhdunarodnyy akademicheskij vestnik*. 2014; (2): 22-5. (in Russian)
5. Novozhenina V.S. The problem of psychological and socio-psychological adaptation of first-year students at the South Ural State Medical University. *Vestnik Soveta molodykh uchenykh i spetsialistov Chelyabinskoy oblasti*. 2014; (5): 104-8. (in Russian)
6. Pogonyшева I.A., Pogonyшев D.A., Lukyanenko Y.G. Interconnection levels of anxiety and disadaptation of students. *Vestnik Surgutskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2015; 3(9): 65-9. (in Russian)
7. Postnova M.V. The system of measures to improve adaptation to the university environment. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo universiteta. Series 11: Natural sciences*. 2013; 2(6): 69-78. (in Russian)
8. Buduk-ool L.K., Khovalyg A.M., Saryg S.K. Features of socially-psychological adaptation and psycho-emotional status of first-year students of some faculties of the University. *Vestnik Tuvinskogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvennyye I sel'skokhozyaystvennyye nauki*. 2015; 2(25): 26-34. (in Russian)
9. Mazurkiewicz R., Korenstein D., Fallar R., Ripp J. The prevalence and correlations of medical student burnout in the pre-clinical years: a cross-sectional study. *Psychol Health Med*. 2012; 17(2): 188-95.
10. Berestneva O.G. Urazaev A.M., Shelekhov I.L. The main stages of individual adaptation. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2013; (6): 711-17. (in Russian)
11. Borax L.V., Chabanyuk A.S., Pohvalitova O.A. Features of adaptation of freshmen students to study at a higher education institution. *Problemy sovremennogo pedagogicheskogo obrazovaniya*. 2016; 50(2): 206-12. (in Russian)
12. Finogenko E.I. Autonomic disorders as a criterion of disadaptation state university students. *Vestnik Irkutskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta*. 2015; 4(99): 341-45. (in Russian)
13. Gorchakov V.A., Landa L.A., Matytsyna V.A., Krasnova V.V., Klimenkova E.N., Kholmogorova A.B. Psychological maladjustment in students of secondary and higher vocational education: a comparative analysis. *Psikhologicheskaya nauka i obrazovanie*. 2013; (4): 5-14. (in Russian)
14. Trofimova N.S. Study of the interrelationship of social and psychological adaptation and the subjectivity of college student 's personality. *Pedagogicheskoe obozrenie v Rossii*. 2013; (3): 116-21. (in Russian)
15. Trofimova N.S. typology features first-year students at the college stage of social and psychological adaptation. *Teoriya i praktika obshchestvennogo razvitiya*. 2014; (3): 99-103. (in Russian)
16. Shukurov F.A. Interpersonal relations and vegetative status in the evaluation of adaptation capabilities of students. *Zdorov'e, demografiya, ekologiya finno-ugorskikh narodov*. 2015; (4): 65-8. (in Russian)
17. Sudakov K.V. System organization of mental activity. *Psikhologicheskij zhurnal*. 2013; 34 (6): 72-81. (in Russian)
18. Kholmogorova A.B., Klimova I.D. Coping strategies and emotional disadaptation of students with the traits of borderline personality disorder. *Konsul'tativnaya psikhologiya i psikhoterapiya*. 2014; 2 (81): 153-67. (in Russian)
19. Shifner N.A., Bobrov A.E., Kulygina M.A. Clinical features and options for adaptation dynamics of disorders of students. *Vestnik psikhiiatrii i psikhologii Chuvashii*. 2012; (8): 43-61. (in Russian)
20. Davydova N.S. Psychophysiological monitoring as a method for early diagnosis of school exclusion. *Akademicheskij zhurnal Zapadnoy Sibiri*. 2012; (2): 4-5. (in Russian)
21. Boyar L.N., Gorbachev S.V., Potapenko S.V. The value of magnesium deficiency in the formation of vegetative disadaptation of children and adolescents with disorders of the gastrointestinal tract. *Zaporozhskiy meditsinskiy zhurnal*. 2015; 6(93): 29-32. (in Russian)
22. Okladnikov V.I. Psychological diagnostics and therapy in the treatment of disorders neurosomatic. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*. 2014; (8): 120-22. (in Russian)
23. Szabo S., Gyires K. Naming and classification of steroids and human stress ulcers. Articles of historic significance published by Hans Selye 70 years ago. *Orv Hetil*. 2015; 156(35): 1406-14.
24. Tache Y. Hans selye and the stress response: from «the first mediator» to the identification of the hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Ideggyogy Sz*. 2014; 67(3-4): 95-8.
25. Notova S.V., Kiyaveva E.V., Alidzhanova I.E. Psychodiagnostics disadaptive violations of students of different social groups. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2015; (3): 228-33. (in Russian)
26. Smolnyakova O.V., Korneeva S.I., Filippenko N.G. To a question about the effectiveness of combined correction manifestations of psychological maladjustment in individuals 18-22 years of preclinical manifestations of autonomic dysregulation. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2012; 20/3; 22(141): 66-70. (in Russian)

27. Saninsky V.I. Possibilities of bibliotherapy in the prevention of exclusion. *Aktual'nye problemy ekonomiki i menedzhmenta*. 2014; 1 (1): 85-9. (in Russian)

28. Tatarinov G.Sh., Otarova N.I. Prevention stressful conditions among students. *Novaya nauka: opyt, traditsii, innovatsii*. 2016; 5(83): 13-5. (in Russian)

29. Semikin G.I., Hramelashvili V.V., Kushnarev V.M. Prevention and correction of psychological disadaptation of students MSTU of Bauman. *Zhivaya psikhologiya*. 2016; 3(2): 145-52. (in Russian)

30. Nikolaeva E.N., Kolosova O.N., Yakovleva A.P., Melgueil N.V. Some of the physiological features of the health of students in the north and the possibility of their correction. *Vestnik Severo-Vostochnogo federal'nogo universiteta im. M.K. Ammosova*. 2012; 9(4): 140-45. (in Russian)

31. Ostapenko I.A. Psychological and pedagogical aspects of adaptation of students of secondary vocational obrazovaniyav university system. *Azimuth nauchnykh issledovaniy: pedagogika i psikhologiya*. 2016; 2(15): 120-23. (in Russian)

Сведения об авторах:

Артеменков Алексей Александрович, канд. биол. наук, доцент, каф. теории и методики физической культуры и спорта; e-mail: basis@live.ru

Островский Д.С.^{1,2}, Борзенко С.А.^{2,3}, Сабурин И.Н.¹,
Малюгин Б.Э.², Мушкова И.А.², Репин В.С.^{1,2}

Модель культуры кератоцитов человека в изучении биосовместимости полимерных материалов для роговичных имплантатов и биоискусственной роговицы

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАН, 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, 8

² ФГАУ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России; 127486, г. Москва, Россия, Бескудниковский бульвар, 59А

³ ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им.А.И. Евдокимова» Минздрава России; 127473, г. Москва, ул. Делегатская, 20/1.

Предложена модель *in vitro* изучения биологической совместимости и токсичности полимерных материалов на культурах клеток стромы роговицы человека — кератоцитах (КЦ). **Цель исследования** — изучение возможности использования выделенных культур кератоцитов донора-трупа человека для оценки биосовместимости полимерных материалов. **Методика.** Из роговицы трупного донорского глаза получали первичную культуру КЦ и пересевали до 4-го пассажа. Фенотип КЦ подтверждали методом иммуноцитохимического окрашивания с выявлением основных клеточных маркеров. КЦ культивировали в присутствии образцов полимерных материалов — четырех модификаций бисфенол-А-глицидилметакрилата (бис-ГМА) по 24 образца каждого (4 экспериментальные группы). В качестве группы сравнения 1 использовали образцы из полиметилметакрилата (ПММА) идентичной геометрии (24 образца), группа сравнения 2 — КЦ, культивированные по стандартной методике без полимерных образцов (24 образца). КЦ в каждой группе распределяли по 24 лункам культурального планшета, культивировали на протяжении 6 сут., ежедневно КЦ извлекали из четырех лунок в каждой группе и подсчитывали. Анализируя динамику клеточного роста и качественное состояние образцов полимеров, делали вывод о типе биологической совместимости исследуемых материалов. **Результаты.** Все кривые клеточного роста имели восходящую S-образную форму, количество клеток статистически значимо увеличивалось со 2-х по 4-е сут. и замедлялось к 6-м сут. Среди исследованных материалов бис-ГМА № 3 проявил наименьшую способность обеспечивать адгезию культивируемых клеток, бис-ГМА № 1 и № 2 — наибольшую. Результаты статистически значимы. **Заключение.** Проведенные исследования показали высокую информативность использования предложенной методики для определения биологической совместимости искусственных материалов. Исходя из полученных результатов, все исследуемые материалы были отнесены к числу биологически активных. Образцы исследуемых материалов в клеточной культуре статистически значимо влияют на уровень клеточной адгезии и степень пролиферации.

Ключевые слова: биоискусственная роговица; роговичные имплантаты; культуры кератоцитов; полимерные материалы.

Для цитирования: Островский Д.С., Борзенко С.А., Сабурин И.Н., Малюгин Б.Э., Мушкова И.А., Репин В.С. Модель культуры кератоцитов человека в изучении биосовместимости полимерных материалов для роговичных имплантатов и биоискусственной роговицы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(2): 129—135.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.129-135

Для корреспонденции: Островский Дмитрий Сергеевич, аспирант лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП, e-mail: dmitriy.ostrovskiy@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.03.2018

Ostrovskiy D.S.^{1,2}, Borzenok S.A.^{1,3}, Saburina I.N.², Malyugin B.E.², Mushkova I.A.², Repin V.S.^{1,2}

Biocompatibility of cornea implants from polymeric materials and bio-artificial cornea in a model of human keratocytes cell culture

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia² S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Complex, Beskudnikovskiy Blvd, 59A, Moscow 127486, Russia³ A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Delegatskaya Str. 20/1, Moscow 127473, Russian Federation

An *in vitro* model was proposed for studying biocompatibility and toxicity of polymeric materials in cultures of human corneal stromal cells, keratocytes (KCs). **The aim** of the present research was to study a possibility of using cultures of isolated human KCs to assess biocompatibility of polymeric materials. **Materials and methods.** The primary KC culture was obtained from donor's eye cornea and cultured to the 4th passage. The KC phenotype was confirmed by immunocytochemical staining, and the major cell markers were identified. KCs were cultured in the presence of four modifications of bisphenol-A-glycidyl methacrylate (bis-HMA) polymeric materials (24 replicate samples for each modification). Polymethylmethacrylate (PMMA) samples of identical geometry were used in the first comparison group (24 samples). In the second comparison group, KCs were cultured according to a standard procedure without polymer samples (24 wells). In each group, KCs were distributed to 24 wells of the culture plate and cultured for 6 days; cells were counted daily. Based on the dynamics of cell growth and qualitative condition of polymer samples, we made a conclusion about the type of biological compatibility of the materials under study. **Results.** All cell growth curves had an upward S shape; the number of cells increased statistically significantly from day 2 to day 4 ($p < 0.05$) and slowed by day 6 ($p > 0.05$). Among the studied materials, bis-HMA #3 showed the weakest ability ($p < 0.05$) and bis-HMA #1 and #2 — the greatest ability ($p < 0.05$) to provide adhesion of cultured cells. **Conclusion.** The study showed a high informative value of the proposed method for determining biological compatibility of artificial materials. All studied materials were classified as biologically active. Samples of the studied materials statistically significantly affected cell adhesion and proliferation in the cell culture.

Keywords: bio-artificial cornea, implantation, keratocytes, polymeric materials.

For citation: Ostrovskiy D.S., Borzenok S.A., Saburina I.N., Malyugin B.E., Mushkova I.A., Repin V.S. The study of the biocompatibility of the cornea implants from polymeric materials and the bio-artificial cornea in the model of the human keratocytes cells culture. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 129—135. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.129-135

For correspondence: *Dmitriy S. Ostrovskiy*, Graduate student Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», e-mail: dmitriy.ostrovskiy@gmail.com

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Ostrovskiy D.S., <https://orcid.org/0000-0002-2817-7102>

Borzenok S.A., <https://orcid.org/0000-0001-9160-6240>

Saburina I.N., <https://orcid.org/0000-0003-2014-2535>

Malyugin B.E., <https://orcid.org/0000-0001-5666-3493>

Received 05.03.2018

Введение

В настоящее время имеется большой выбор химических материалов, которые могут быть использованы для изготовления имплантируемых офтальмологических изделий — внутрироговичных и интраокулярных линз, внутрироговичных сегментов, склеральных дренажей и др. [1]. При выборе материалов для создания имплантов необходимо учитывать их химические, механические, оптические свойства, а также биологическую совместимость [2].

В зависимости от влияния на биологические свойства все имплантируемые материалы разделяют на 4 группы

— токсичные, когда используемый материал действует токсично на клетки и окружающую ткань; инертные, когда вокруг материала образуется волокнистая капсула; биоактивные, когда инкапсуляция минимальна, или отсутствует и биорезорбируемые, когда материал постепенно разрушается и заменяется тканью. Все перечисленные материалы, кроме токсичных, принято считать биологически совместимыми [3].

Для оценки взаимодействий «имплантат — ткань» в офтальмологии традиционно используют модель имплантации *in vivo*, чаще всего на кроликах. Однако данная модель обладает недостатками — наблюдается значительный разброс индивидуальных физиологических

параметров в популяции животных; интерпретация полученных данных зачастую сложна; эксперименты требуют длительного времени и больших материальных затрат. В последнее время исследования по изучению безопасности и биосовместимости разрабатываемых новых полимерных материалов проводят на моделях органических и клеточных культур *in vitro*. Использование культуры клеток позволяет изучать клеточную адгезию, миграцию, пролиферацию, экспрессию основных клеточных маркеров. На основании полученных результатов делают вывод о перспективе использования новых материалов [4]. Преимуществами такого подхода являются минимальное время исследования и высокая воспроизводимость результатов.

Традиционное использование *in vitro* известных линий трансформированных клеток человека или клеток, полученных из опухолевых тканей (линии HeLa и 3T3) [5], не отражает поведение нормальных клеток, поэтому создание модели культуры диплоидных клеток человека представляется актуальным. Наиболее перспективной для изучения биобезопасности и биосовместимости новых офтальмологических имплантов является модель первичных культур клеток человека, выделенных из постмортальных тканей. Поскольку кератоциты (КЦ) являются основными клетками стромы роговицы, участвуют в поддержании адекватного водно-солевого транспорта, метаболизма стромы роговицы и репаративных процессов [6] и поддаются культивированию, то именно они являются подходящими кандидатами для создания клеточной модели для исследования биосовместимости *in vitro* полимерных материалов, потенциально пригодных для имплантации в офтальмологии. В доступной литературе представлены единичные работы об использовании КЦ роговицы человека и животных для изучения биосовместимости офтальмоимплантов [4] из полимерных материалов, что обусловило выбор цели настоящего исследования.

Цель — изучение возможности использования культур кератоцитов человека, выделенных из постмортальной роговицы, в качестве модели для оценки биосовместимости полимерных материалов, пригодных для роговичной имплантации.

Методика

Культура клеток

Для выделения клеток КЦ использовали постмортальные роговицы глаз женщины 43 лет. Время от момента смерти до начала выделения КЦ составляло не более 12 ч. Показатель посмертной жизнеспособности соответствовал степени В согласно методу С.А. Борзенка по адреналиновой пробе.

Выделение и культивирование КЦ осуществлялось по протоколу, предложенному нами ранее [4]. Фрагмент ткани, выделенный из центральной зоны роговицы (16 мм), дезагригировали в растворе коллагеназы II типа при температуре +4°C в течение 15 ч. Полученную суспензию клеток промывали стерильным раствором фосфатного буфера (PBS) и центрифугировали в течение 5 мин при 1400 об./мин. К полученному осадку добавляли полную питательную среду DMEM/F12 (1:1) с добавлением 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота и смеси антибиотиков (пенициллин и стрептомицин по 100 ед./мл). Концентрацию клеток доводили до 3×10^5 кл/мл и переносили на чашку Петри (35 мм). Клетки культивировали в стандартных условиях в CO₂-инкубаторе с концентрацией углекислого газа 5%, атмосферного воздуха 95%, и повышенной влажностью при температуре 37°C. Каждые 3 сут. проводили полную смену среды. Культивирование проводили до 4-го пассажа.

Для подтверждения фенотипа клеток проводили иммуноцитохимическое окрашивание на специфические маркеры КЦ — люмикан, кератокан и кератан-сульфат, неспецифический маркер тканей мезенхимного типа — виментин и специфический маркер миофибробластов — гладкомышечный актин (α -SMA). КЦ после 3-го пассажа выращивали на покровном стекле до формирования монослоя с 70%-ной конфлюэнтностью, фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида в PBS в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего отмывали в растворе PBS. Клетки обрабатывали раствором Тритона X-100 в концентрации 0,25% в PBS в течение 10 мин при комнатной температуре, отмывали PBS и инкубировали с первичными антителами anti-Vimentin в разведении 1:200 (ab92547; Abcam, США), anti-Lumican 1:50 (sc-33785; Santa Cruz, США), anti-SMA 1:50 (sc-53142; Santa Cruz, США), anti-Keratocan 1:50 (sc-66941; Santa Cruz, США), anti-Keratan-sulfate 1:50 (sc-73518; Santa Cruz, США) в темноте при комнатной температуре в течение 60 мин с последующим отмыванием в растворе PBS. Затем инкубировали с вторичными антителами goat anti-rabbit Alexa Fluor 594 (ab150080, Abcam, США) и goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (ab150113, Abcam, США). Ядра клеток окрашивали раствором Hoechst 33258 (ПанЭко) в течение 10 мин в темноте при комнатной температуре. Окрашенные препараты изучали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Fluoview FV10i (Olympus, Япония). Жизнеспособность клеток оценивали в камере Горяева (МиниМед, Россия) по стандартному протоколу с окраской трипановым синим [7].

Полимерные материалы

В работе исследовали любезно предоставленные ООО Репер-НН (Нижний Новгород) 4 вида образцов разных модификаций бис-ГМА по 24 единицы каждого вида (табл. 1). Полимер бисфенол-А-глицидилметакрилата (бис-ГМА) широко применяется в стоматологии и зарекомендовал себя как нетоксичный и высокостабильный материал. Интерес офтальмологов к нему связан с тем, что бис-ГМА, обладая высокими оптическими свойствами, имеет ряд технологических преимуществ перед другими имплантационными полимерами, уже использующимися в офтальмологии.

В качестве контроля использовали образцы полиметилметакрилата (ПММА) идентичных размеров (10,0 x 0,5 мм), предоставленные ООО НЭП МНТК «МГ» (Москва) в количестве 24 единиц. ПММА — прозрачный материал с высокой прочностью, стабильностью и слабо выраженной токсичностью, традиционно использующийся в офтальмологии, хорошо изучен как в клинике, так и в экспериментах на животных [8]. Образцы исследуемых материалов имели форму прозрачных шайб диаметром 10 мм и высотой 0,5 мм. Выбор формы и размеров образцов был опосредован размером лунок стандартного 24-луночного планшета для культивирования клеток.

Исследование биосовместимости полимерных материалов

Для оценки биосовместимости полимерных материалов каждый исследуемый образец помещали в лунку 24-луночного культурального планшета

(Corning, США), вносили по 20x10³ КЦ, объем среды в лунках доводили до 1 мл. Инкубировали в течение 6 сут. в стандартных условиях, смену среды проводили однократно на 3-и сут. культивирования. Планшеты с бис-ГМА составили 4 опытные группы («Бис-ГМА 1-4»). Планшет с образцами ПММА служил первой группой контроля («ПММА К1»). В качестве второго контроля использовали планшет с клетками, но без полимеров («К2») — клетки контактировали только с материалом культурального планшета — полистиролом (табл. 2).

Для оценки биотоксичности и биосовместимости полимерных материалов контролировали адгезию клеток и их пролиферацию. Клетки подсчитывали через каждые 24 ч в течение 6 сут. Количество клеток 4 лунок каждого планшета представляли как среднее (M) со средним квадратичным отклонением (σ). Материалы относили к тому или иному типу биологически совместимых в соответствии с принятыми определениями — по динамике клеточного роста, уровню инкапсуляции и физическим изменениям образцов материалов [3].

Статистический анализ проводили при помощи программного обеспечения Excel (Microsoft) и Statistica 7.0 (Statsoft). Уровень значимости статистических различий p принимали равным 0,05. В силу малых объемов отдельных выборок (n = 4) использовали критерий Уилкоксона.

Исследование внешнего состояния образцов полимерных материалов после культивирования

Полученные образцы материалов после культивирования ферментативно очищали от клеток и для визуальной оценки прозрачности материала исследова-

Таблица 1

Характеристика образцов бис-ГМА*

Группа	Состав
Бис-ГМА 1	2000Т-65%; бисГМА-14% МЭГ 14% МАК 7%
Бис-ГМА 2	6000Т 60% бензМА 25% ОМА 15%
Бис-ГМА 3	бисГМА 22,5% бензМА 22,5% 2000Т 45% ТГМ-3 10%
Бис-ГМА 4	бисГМА 43% бензМА 17% ТГМ-9 25% ОМА 15%

Примечание. * Сокращения, представленные в таблице: 2000Т — олигоуретанметакрилат марки 2000Т; 6000Т — олигоуретанметакрилат марки 6000Т; бис-ГМА — бисфенол-А-диглицидилметакрилат; МЭГ — монометакриловый эфир этиленгликоля; МАК — метакриловая кислота; бенза-МА — бензилметакрилат; ОМА — олигоуретанметакрилат.

Таблица 2

Распределение полимерных материалов по группам сравнения

Параметры	Бис-ГМА 1	Бис-ГМА 2	Бис-ГМА 3	Бис-ГМА 4	ПММА К1	К2
Количество лунок	24	24	24	24	24	24
Количество образцов	24	24	24	24	24	—
Количество КЦ на лунку	20 x10 ³	20 x10 ³	20 x10 ³	20 x10 ³	20 x10 ³	20 x10 ³

ли на фотометре Haze-Gard I (ВУК-Gardner, Германия), позволяющем изучать коэффициент общего пропускания (КОП). КОП представляет собой отношение проходящего света к падающему свету, зависит от свойств поглощения и отражения, и выражается в процентах. Исследование проводилось на базе ЭТП «Микрохирургия глаза».

Результаты и обсуждение

Качественная оценка роста и фенотипа клеток

Во всех исследуемых группах как на поверхности материалов, так и на поверхности культуральной посуды в течение эксперимента наблюдали пролиферативную активность КЦ, которые были представлены биполярными мезенхимоподобными клетками (рис. 1). Морфологически клетки опытных и контрольных групп не различались.

Иммуноцитохимическое окрашивание показало, что КЦ активно экспрессируют люмикан, кератокан и виментин, слабо экспрессируют кератан-сульфат, и не экспрессируют специфический маркер миофибробластов — гладкомышечный актин (рис. 2).

Количественные характеристики роста клеток

Количество делящихся КЦ на экспериментальных образцах и в контрольных группах в разные сроки культивирования представлены в табл. 3 и на рис. 2—3.

Сроки культивирования статистически значимо (критерий Уилкоксона) влияли на количество клеток в экспериментальных группах. При анализе кривой

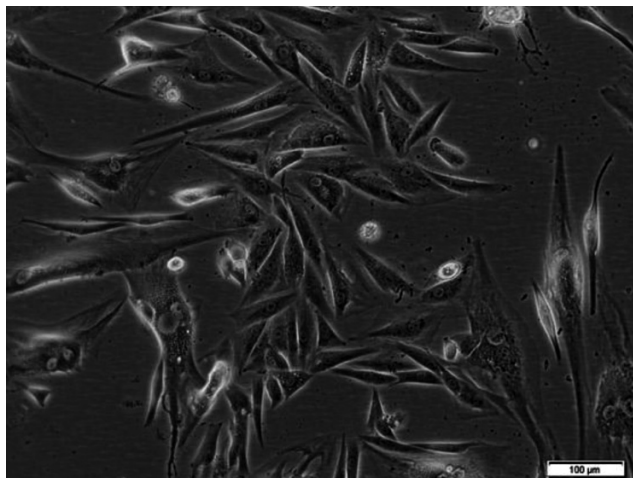


Рис. 1. Культура клеток кератоцитов пассажа 4, монослойная культура. Фазово-контрастная световая микроскопия ув. 100X

изменения количества кератоцитов (рис. 3) было выявлено, что в течение 1—2 сут. наблюдалась фаза адаптации (lag-фаза кривой роста). Максимальная скорость пролиферации КЦ приходилась на 2-е-4-е сут. культивирования (log-фаза), на 5-е—6-е сут. график выходил на фазу плато, при этом разница между количеством клеток на 5-е и 6-е сут. во всех группах сравнения становилась статистически незначимой (критерий Уилкоксона).

При сравнении количеств КЦ на конечном сроке культивирования наблюдали наименьшую активность

Таблица 3

Динамика изменения количества кератоцитов по группам сравнения, тыс. кл. на лунку

Сроки, сут.	Бис-ГМА 1	Бис-ГМА 2	Бис-ГМА 3	Бис-ГМА 4	ПММА К1	К2
1	18,62 ± 8,6	21,88 ± 4,2	12 ± 2,5	16,87 ± 3,5	13,7 ± 1,6	19,75 ± 1,0
2	45,3 ± 15,2	40,1 ± 6,5	30 ± 5,5	32,35 ± 7,3	31,9 ± 3,5	32,98 ± 3,1
3	72,31 ± 19,0	85,56 ± 13,6	42,88 ± 2,9	80,06 ± 13,4	117,9 ± 12,0	91,37 ± 11,3
4	151,75 ± 25,6	137,88 ± 10,3	76,19 ± 4,9	132,25 ± 23,3	184,9 ± 10,4	137,31 ± 13
5	262,75 ± 44,2	249,6 ± 46,8	122,13 ± 22,9	210,9 ± 29,0	256,4 ± 11,1	202,31 ± 20,3
6	279,25 ± 72,1	272,94 ± 80,0	181,69 ± 19,6	237,06 ± 28,8	290,06 ± 11,7	223,3 ± 30,1

Таблица 4

Коэффициент общего пропускания полимерных материалов

Полимерный материал	КОП до культивирования	КОП после культивирования
Бис-ГМА 1	85%	85%
Бис-ГМА 2	87%	87%
Бис-ГМА 3	92%	92%
Бис-ГМА 4	90%	90%
ПММА	92%	92%

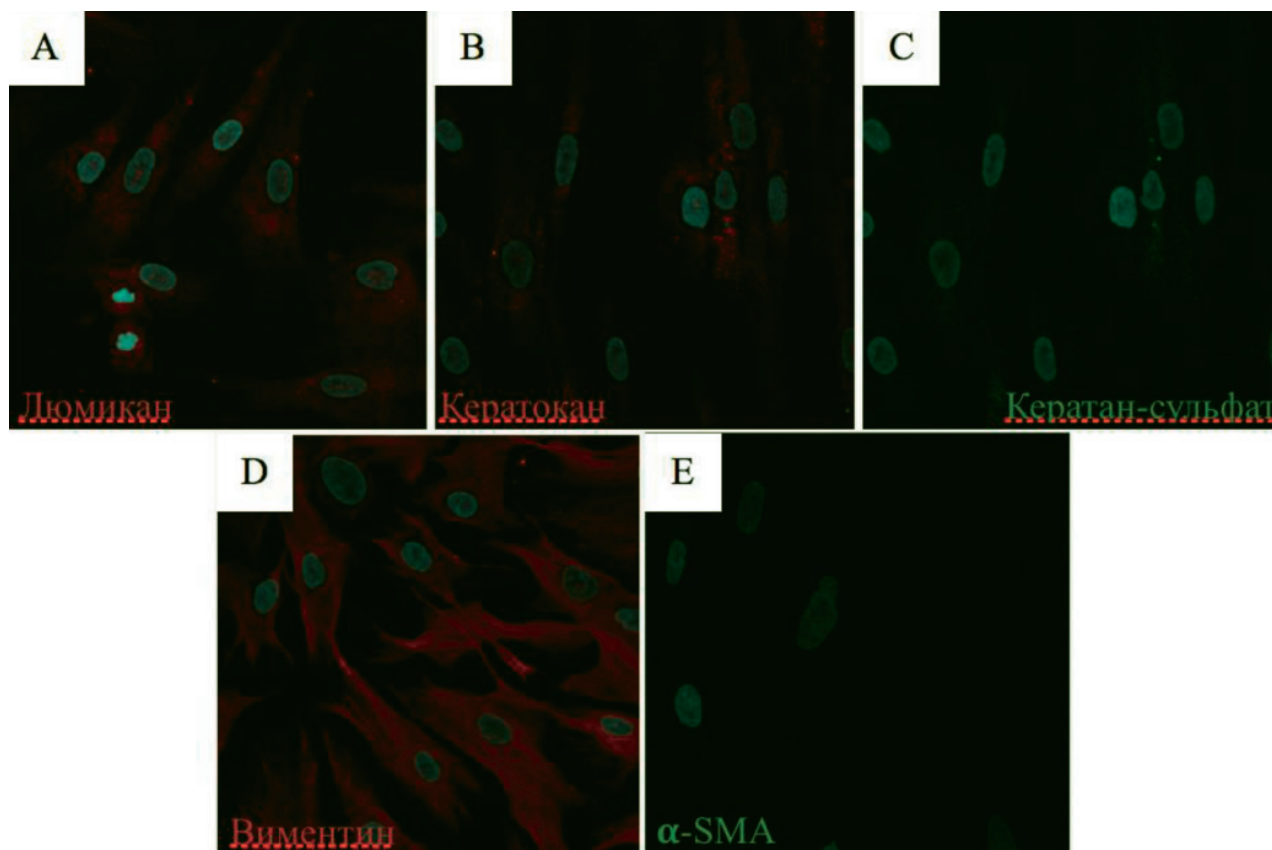


Рис. 2. Культура клеток кератоцитов пассаж 4, иммунофлуоресцентная окраска с антителами: А – Люмикан; В – Кератокан; С – Кератан-сульфат; Д – Виментин; Е – α -SMA. Окраска ядер Hoechst. Ув. 600X.

деления клеток в группе Бис-ГМА № 3, а наибольшую — в группах Бис-ГМА № 1, № 2 и в группе сравнения ПММА К1. Результаты статистически значимы. В группе Бис-ГМА № 4 не было отмечено однозначной тенденции к усилению или ослаблению пролиферации по сравнению с группой контроля К2.

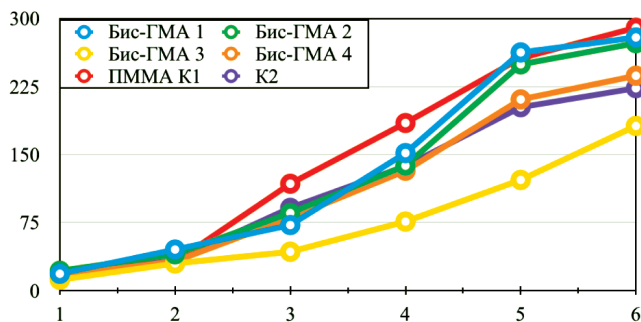


Рис. 3. Кривая изменения количества кератоцитов в экспериментальных группах в контрольные сроки.

Внешнее состояние образцов полимерных материалов после культивирования

При световой микроскопии (ув. X10) и исследовании на фотометре Haze-Gard I было выявлено, что внешние характеристики и прозрачность всех образцов не отличались от исходного состояния до культивирования (табл. 4).

КЦ в культуре 4-го пассажа обладали характерными внешними признаками мезенхимных клеток и экспрессировали клеточные маркеры, типичные для КЦ. На протяжении всего эксперимента наблюдался устойчивый рост деления КЦ во всех группах. Ни один из исследованных образцов полимерных материалов не подавлял пролиферацию клеток и не проявлял признаков токсичности, в противном случае графики клеточного роста носили бы нисходящий характер.

По окончании наблюдения не было отмечено ни геометрических, ни оптических изменений структуры образцов, следовательно, ни один из исследованных материалов не являлся быстро биodeградируемым.

Таким образом, в силу слабо выраженной адгезии и пролиферации КЦ полимер бис-ГМА № 3 может быть рекомендован для изготовления роговичных оптических имплантатов-линз, требующих максимально длительного сохранения прозрачности. Полимеры бис-ГМА № 1 и № 2 могут быть рекомендованы для изготовления роговичных имплантов, требующих максимально выраженной иммобилизации в стромальной ткани роговицы (внутрироговичные укрепляющие сегменты, опорные элементы кератопротеза, биоискусственная роговица).

References

1. Treushnikov VM, Viktorova EA Fundamentals of the creation of biocompatible and biostable polymer implants (review). *Sovremennye tehnologii v meditsyni*. 2015; 7(3): 149-71. (in Russian)
2. Williams DF, Dictionary of Biomaterials Liverpool: Liverpool University Press; 1999

3. Hench L., Jones D. *Biomaterials, artificial organs and tissue engineering*. [Biomaterialy, iskystvennyye organy I inzhiniring tkaney]. Moscow: Technosfera; 2007. (in Russian)

4. Malyugin B.E., Borzenok S.A., Mushkova I.A., Ostrovskiy D.S., Popov I.A., Shkandina Yu.V. Investigation on the intracorneal lens material biocompatibility using the model of the corneal stromal cell culture. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2017; 19 (1): 74-81. (in Russian)

5. Danihelova M, Veverka M, Sturdik E, Jantova S. Antioxidant action and cytotoxicity on HeLa and NIH-3T3 cells of new quercetin derivatives. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013; 6(4): 209-16.

6. West-Mays J.A., Dwivedi D.J. The keratocyte: Corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2006; 38(10): 1625-31.

7. Freshni R.Ya. *Culture of animal cells. Practical guidance: Trans. with English*. [Kultura zhivotnykh kletok. Prakticheskoe rukovodstvo: per. s angl.]. Moscow; Binom, 2010. (in Russian)

8. Cardona H. Nut and bolt mushroom transcorneal keratoprosthesis. *American Journal of Ophthalmology*. 1969; 68 (4): 604-12.

Сведения об авторах:

Островский Дмитрий Сергеевич, аспирант, лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП; лаборант, лаб. трансплантологии и клеточной биологии Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГБАУ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

Борзенко Сергей Анатольевич, доктор мед. наук, проф., акад. РАЕН, зав. Центром фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России; проф. каф. глазных болезней ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России

Сабурова Ирина Николаевна, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. клеточной биологии и патологии развития ФГБНУ НИИОПП; профессор каф. общей патологии и патофизиологии ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России

Малюгин Борис Эдуардович, доктор мед. наук, проф., акад. РАЕН, заместитель генерального директора ФГАУ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

Мушкова Ирина Альфредовна, доктор мед. наук, зав. отделом рефракционной лазерной хирургии ФГАУ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

Репин Вадим Сергеевич, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, гл. науч. сотр. лаб. Клеточной биологии и патологии развития; ФГБНУ НИИОПП, проф. каф. общей патологии и патофизиологии ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России; гл. науч. сотр. лаб. трансплантологии и клеточной биологии Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГАУ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России

© Коллектив авторов, 2018
УДК 616-092.9

Крыжановский С.А.¹, Цорин И.Б.¹, Ионова Е.О.¹, Столярук В.Н.¹, Вититнова М.Б.¹,
Барчуков В.В.¹, Мирошкина И.А.¹, Сорокина А.В.¹, Кожевникова Л.М.², Дурнев А.Д.¹

Трансляционная модель хронической сердечной недостаточности у крыс

¹ ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

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

Цель исследования — разработка трансляционной модели хронической сердечной недостаточности (ХСН) у крыс, позволяющей, с одной стороны, изучить тонкие механизмы, лежащие в основе данной патологии, а с другой стороны, выявить новые биомаркеры для поиска и изучения механизма действия инновационных лекарственных средств. **Методика.** Использован комплекс эхокардиографических, морфологических, биохимических и молекулярно-биологических исследований, позволяющий оценивать и дифференцировать этапы формирования ХСН. **Результаты.** Динамические эхокардиографические исследования показали, что ХСН формируется через 90 дней после воспроизведения переднего трансмурального инфаркта миокарда. К этому времени у животных основной группы отмечается статистически значимое по сравнению со 2-ми сут. после воспроизведения экспериментального инфаркта миокарда снижение ФВ левого желудочка сердца (соответственно $55,9 \pm 1,4$ и $63,9 \pm 1,6\%$, $p = 0,0008$). Снижение насосной функции сердца (на 13% по сравнению со 2-ми сут. после операции и на ~40% по сравнению с интактными животными) сопровождается увеличением КСР и КДР (соответственно с $2,49 \pm 0,08$ до $3,91 \pm 0,17$ мм, $p = 0,0002$, и с $3,56 \pm 0,11$ до $5,20 \pm 0,19$ мм, $p = 0,0001$), то есть к этому сроку развивается сердечная недостаточность. Результаты эхокардиографических исследований подтверждены данными морфометрии миокарда, продемонстрировавшими дилатацию правого и левого желудочков сердца. Параллельно проведенные гистологические исследования свидетельствуют о наличии патогномичных для данной патологии изменений миокарда (постинфарктный кардиосклероз, компенсаторная гипертрофия кардиомиоцитов, очаги исчезновения поперечной исчерченности мышечных волокон и т.д.) и признаков венозного застоя в легких и печени. Биохимические исследования выявили значимое увеличение концентрации в плазме крови биохимического маркера ХСН — мозгового натрийуретического пептида. Данные молекулярно-биологических исследований позволяют говорить о наличии гиперактивности ренин-ангиотензин-альдостероновой и симпатoadреналовой систем, играющих ключевую роль в патогенезе ХСН. **Заключение.** Разработана трансляционная модель ХСН у крыс, воспроизводящая основные клинико-диагностические критерии этого заболевания. Показано наличие корреляции между морфометрическими, гистологическими, биохимическими и молекулярными маркерами прогрессирующей ХСН и эхокардиографическими диагностическими признаками, что позволяет использовать неинвазивный метод эхокардиографии, характеризующий состояние внутрисердечной гемодинамики, в качестве основного критерия оценки наличия/отсутствия данной патологии.

Ключевые слова: трансляционная модель, крысы, хроническая сердечная недостаточность, эхокардиография, морфология, мозговой натрийуретический пептид, экспрессия рецепторов.

Для цитирования: Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Ионова Е.О., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Барчуков В.В., Мирошкина И.А., Сорокина А.В., Кожевникова Л.М., Дурнев А.Д. Трансляционная модель хронической сердечной недостаточности у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(2): 136—148.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.136-148

Для корреспонденции: Крыжановский Сергей Александрович, доктор мед. наук, зав. лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», e-mail: SAK-538@yandex.ru.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.12.2017

Kryzhanovskii S.A.¹, Tsorin I.B.¹, Ionova E.O.¹, Stolyaruk V.N.¹, Vititnova M.B.¹,
Barchukov V.V.¹, Miroshkina I.A.¹, Sorokina A.V.¹, Kozhevnikova L.M.², Durnev A.D.¹

A translational model of chronic heart failure in rats

¹ V.V. Zakusov Institute of Pharmacology, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

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

Aim. Development of a translational model for chronic heart failure (CHF) in rats to identify new biotargets for finding and studying mechanisms of innovative drug effect in this disease. **Methods.** A set of echocardiographic, morphological, biochemical, and molecular methods was used to evaluate and differentiate stages of CHF development. **Results.** Dynamic echocardiographic studies showed that CHF developed in 90 days after anterior transmural myocardial infarction. By that time, left ventricular ejection fraction was significantly decreased in animals of the main group compared with rats studied on day 2 after experimental myocardial infarction ($55.9 \pm 1.4\%$ vs. $63.9 \pm 1.6\%$, respectively, $\rho < 0.0008$). The decrease in heart's pumping function (by 13% compared with day 2 after infarction and by approximately 40% compared to intact animals) was associated with increased ESD and EDD (from 2.49 ± 0.08 to 3.91 ± 0.17 mm, $\rho = 0.0002$, and from 3.56 ± 0.11 to 5.20 ± 0.19 mm, respectively, $\rho = 0.0001$); therefore, heart failure developed by that time. The results of echocardiographic studies were confirmed by myocardial morphometry, which demonstrated dilatation of both right and left ventricles. Paralleled histological studies indicated presence of the changes pathognomonic for this myocardial pathology (postinfarction fibrosis, compensatory hypertrophy of cardiomyocytes, foci of disappeared transverse striation of muscle fibers, etc.) and signs of venous congestion in lungs and liver. Biochemical studies demonstrated a significant increase in plasma concentration of brain natriuretic peptide, a biochemical marker of CHF. Results of molecular studies suggested hyperactivity of the renin-angiotensin-aldosterone and sympathoadrenal systems, which play a key role in the pathogenesis of CHF. **Conclusions.** A translational model of CHF in rats was developed, which reproduced major clinical and diagnostic criteria for this disease. Morphometric, histological, biochemical, and molecular markers for progressive CHF were correlated with echocardiographic diagnostic signs, which allows using this echocardiographic, noninvasive method characterizing the intracardiac hemodynamics as a major criterion for the presence / absence of this pathology.

Keywords: translational model; rats; chronic heart failure; echocardiography; morphology; brain natriuretic peptide; receptor expression.

For citation: Kryzhanovskii S.A., Tsorin I.B., Ionova E.O., Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., Barchukov V.V., Miroshkina I.A., Sorokina A.V., Kozhevnikova L.M., Durnev A.D. Translational model of chronic cardiac failure in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(2): 136—148. (in Russian).
DOI: 10.25557/0031-2991.2018.02.136-148

For correspondence: Kryzhanovskii Sergey Alexandrovich, Doctor of Medical Sciences, Head of Laboratory of pharmacological screening, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», e-mail: SAK-538@yandex.ru

Information about authors:

Kryzhanovskii S.A. — 0000-0003-2832-4739

Tsorin I.B. — 0000-0002-3988-7724

Ionova E.O. — 0000-0003-0154-722X

Stolyaruk V.N. — 0000-0002-4779-427X

Vititnova M.B. — 0000-0002-7407-7516

Barchukov V.V. — 0000-0003-4229-3107

Kozhevnikova L.M. — 0000-0002-1323-6472

Miroshkina I.A. — 0000-0002-3208-198X

Sorokina A.V. — 0000-0002-9600-7244

Durnev A.D. — 0000-0003-0218-8580

Acknowledgements. The study had not sponsorship.

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

Received 25.12.2017

Введение

Развитие современной медицинской науки невозможно без разработки и внедрения в повседневную практику экспериментальных трансляционных моделей, в достаточной мере отображающих наблюдаемую в клинике ситуацию. Такого рода модели должны репродуцировать клиническую патологию, быть легко воспроизводимыми, относительно недорогими и, что не менее важно, иметь ключевой диагностический признак, позволяющий независимым методом судить о полномасштабном формировании у животного моделируемого патологического процесса. Последнее является обязательным, поскольку позволяет объективно, без использования травматических процедур, установить наличие у животного моделируемой патологии и в случае подтверждения результата приступить к экспериментальной терапии с целью создания новых высокоэффективных лекарственных средств.

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) — сложный клинический синдром, который является исходом практически любого сердечно-сосудистого заболевания. Согласно данным ВОЗ, распространенность ХСН в общей популяции составляет 1,5—2%, а среди лиц старше 65 лет — 6—10%, и, несмотря на значительные успехи в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, распространенность ХСН не только не снижается, но неуклонно возрастает. По данным Фраммингемского исследования (Framingham Heart Study), средняя 5-летняя смертность во всей популяции больных ХСН (с учетом начальных и умеренных стадий) составляет 65% для мужчин и 47% — для женщин [1, 2]. В Российской Федерации, согласно результатам эпидемиологических исследований ЭПОХА-О-ХСН и ЭПОХА-ХСН, распространенность ХСН I-IV функционального класса составила 7% (7,9 млн чел.) от общего числа населения [3]. Примерно половина больных ХСН умирает в течение первых 4 лет с момента верификации диагноза, а в тяжелых случаях — столько же в течение первого года, и это происходит, несмотря на повсеместное внедрение в широкую медицинскую практику самых эффективных на современном этапе лекарственных средств: ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента, β -блокаторов, антагонистов альдостерона и т.д. [4]. В настоящее время единственным эффективным способом лечения декомпенсированной ХСН является пересадка сердца [5]. Таким образом, разработка и внедрение легко воспроизводимой трансляционной модели ХСН, несомненно, является актуальной.

При анализе литературы, посвященной моделированию ХСН на крысах, в базе данных PubMed на запрос «heart failure rats model» были получены ссылки на 2497 научных статей. Далее слепым ме-

тодом из них было отобрано и проанализировано 25 статей, опубликованных в период с 2000 по 2017 гг., а также 9 обзоров литературы, посвященных моделированию сердечно-сосудистой патологии у лабораторных животных. Как следует из результатов проведенного анализа, ХСН на мелких лабораторных животных воспроизводят различными способами. Для этой цели используют гиперослеповую [6] и метиониновую [7] диеты; кардиотоксические агенты — антибиотик антрациклинового ряда доксирубицин [8, 9], пирролизидиновый алкалоид монокроталин [10]; неактивный β -адреностимулятор изопротеренол [11, 12]; коарктацию грудного или абдоминального отделов аорты [8, 13, 14]. Однако в большинстве случаев моделирование ХСН производят путем одномоментной перевязки коронарной артерии [14—16]. Реже для этой цели используют окклюзию с последующей реперфузией коронарной артерии [17]. Нет и единого подхода как к срокам формирования ХСН, так и к критериям оценки наличия или отсутствия моделируемой патологии, что затрудняет сопоставление результатов в исследованиях различных авторов. Сроки формирования ХСН вне зависимости от способа моделирования варьируют от 10 до 70 дней [6—13, 15—17], преимущественно 28—36 [8] или 48—56 дней [6, 15]. Как правило, о наличии/отсутствии ХСН судят по состоянию инотропной функции левого желудочка сердца, которую оценивают или при помощи эхокардиографии [6, 16], или измеряют dp/dt в левом желудочке сердца [9]. Помимо этого, в ряде случаев оценивают уровень содержания в плазме крови биохимического маркера ХСН — мозгового натрийуретического пептида [10, 11] и/или биохимического маркера повреждения миокарда — тропонина I [11]. Также оценивают массу миокарда и проводят морфометрическую оценку размеров сердца [6]. Однако обращает на себя внимание тот факт, что авторы исследований не приводят каких-либо убедительных аргументов по поводу выбранных ими сроков формирования ХСН, используя в качестве основополагающего критерия уровень сократимости миокарда. Такой подход представляется достаточно спорным, поскольку хорошо известно, что ХСН представляет собой многофакторный симптомокомплекс, включающий в себя, помимо собственно снижения сократительной способности сердца, дилатацию его полостей, деструктивные изменения миокарда, поражение органов-мишеней, гиперактивность ренин-ангиотензин-альдостероновой и симпатoadреналовой систем и т.д. [18]. Следует также отметить, что в проанализированных исследованиях оценка состояния инотропной функции сердца как основного критерия наличия/отсутствия ХСН, а также биохимических

и/или каких-либо других показателей, как правило, проводится только в конечной временной точке эксперимента, то есть динамика формирования ХСН не отслеживается.

Цель настоящего исследования — разработка трансляционной модели ХСН у крыс, воспроизводящей основные клинико-диагностические критерии этого заболевания: эхокардиографические признаки (снижение сократительного статуса миокарда, дилатация левого желудочка сердца), морфометрические и гистологические признаки, характеризующие состояние сердца при сформировавшейся ХСН, уровень в плазме крови биохимических маркеров ХСН (мозговой натрийуретический пептид) и экспрессии рецепторов, участвующих в процессах патологического ремоделирования миокарда (AT1A-R и β -AR), а также гистологические признаки повреждения органов-мишеней (печень, легкие).

Методика

Животные

Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах массой 160—180 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животных содержали в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/ЕЕС)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утвержденными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Экспериментальный протокол

Поскольку из данных литературы и собственных наблюдений следует, что наиболее эффективным и близким к клинической ситуации способом воспроизведения ХСН является перманентное лигирование коронарной артерии [19—21], для моделирования ХСН использовали одномоментную перевязку левой коронарной артерии непосредственно в месте ее выхода из-под ушка сердца [22]. Ложнооперированным животным подводили лигатуру под коронарную артерию. На 2-е сут. после воспроизведения инфаркта миокарда проводили эхокардиографические исследо-

вания и в дальнейший эксперимент отбирали только тех животных, у которых диагностировался передний трансмуральный инфаркт миокарда.

Критерием формирования постинфарктной ХСН было статистически значимое по сравнению со 2-ми сут. после перевязки коронарной артерии снижение фракции выброса + дилатация левого желудочка сердца.

Эхокардиографические исследования

Наркотизированных животных (кетамин, 100 мг/кг) фиксировали в положении на спине на операционном столике. Измерения проводили в условиях закрытой грудной клетки и спонтанного дыхания в одномерном М- и двухмерном В-модальных режимах при положении датчика эхокардиографа в парастернальной позиции по длинной оси сердца. В М-модальном режиме оценивали конечно-систолический (КСР) и конечно-диастолический (КДР) размеры левого желудочка сердца, затем по методу Teichholz рассчитывали фракцию выброса (ФВ), фракцию укорочения (ФУ), конечно-систолический объем (КСО), конечно-диастолический объем (КДО) левого желудочка. Оценку показателей проводили как минимум по пяти последовательным сердечным циклам. Все измерения выполняли в соответствии с Рекомендациями Американского общества и Европейской ассоциации по эхокардиографии. В работе использовали цифровой ультразвуковой эхокардиограф DP-6600 (Mindray, Китай) с электронным микроконвексным датчиком 65C15EA (6,5/8,0 МГц). Оценку состояния внутрисердечной гемодинамики проводили на 2-е, 7-е, 14-е, 30-е, 60-е и 90-е сут. после воспроизведения инфаркта миокарда.

Морфологические исследования

Морфологическую оценку состояния миокарда, легких и печени производили у животных по окончании последнего эхокардиографического исследования. Для этих целей животных декапитировали, сердце, легкие и печень извлекали и фиксировали в 10%-ном забуференном растворе формалина и обрабатывали по общепринятым в гистологии методам для дальнейшего морфометрического и гистологического изучения. Парафиновые срезы (5 мкм) окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами с последующей докраской 1%-м водным раствором эозина. Микроскопию осуществляли в проходящем свете (микроскоп Nikon eclipse 55i, увеличение x100, x200, x400, Япония). Гистологические срезы сердец фотографировали, сохраняли в формате Jpeg и анализировали с помощью программы Adobe Photoshop CS5, оценивая толщину стенок, площадь желудочков и их полостей. Морфометрические измерения проводили на поперечном срединном срезе сердца.

Биохимические исследования

По окончании последнего эхокардиографического исследования у животных из бедренной вены забирали кровь для иммуферментного определения содержания в плазме мозгового натрийуретического пептида (brain natriuretic peptide — BNP). Определение содержания BNP проводили с помощью автоматического биохими-

ческого и иммуферментного анализатора «Chem Well 2910 Combi» (США). В работе использовали набор для иммуферментного определения BNP у крыс RMP900 (R&D Systems, США).

Молекулярно-биологические исследования

Для молекулярных исследований забирали образцы миокарда левого желудочка. Образцы отмывали от крови в изотоническом растворе натрия хлорида при +4°С, после чего их помещали в раствор RNAlater (Ambion, США) и хранили до выделения РНК при температуре -20°С. Ткани, извлеченные из раствора RNAlater, гомогенизировали в жидком азоте. Выделение тотальной РНК осуществляли с помощью набора GeneJet (ThermoScientific) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию суммарной РНК в образцах определяли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Для предотвращения контаминации геномной ДНК выделенную суммарную РНК обрабатывали ДНКазой I. Добавив все компоненты, смесь инкубировали при 37°С в течение 30 мин. Фермент инактивировали нагреванием при 65°С в течение 10 мин, предварительно добавив 25 мМ ЭДТА, из расчета 1 мкл на 10 мкл реакционной смеси, для предотвращения гидролиза РНК в процессе нагревания. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием гексамерных Random праймеров и обратной транскриптазы M-MuLV в составе набора RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (США) в соответствии с протоколом производителя. Для амплификации фрагментов кДНК исследуемых генов и генов «домашнего хозяйства» использовали наборы специфических праймеров и универсальный набор реактивов для проведения ПЦР «в реальном времени» (ПЦР-РВ) фирмы «Евроген» (Россия), содержащий референтный краситель ROX. В качестве гена «домашнего хозяйства» был использован ген β-актина. Праймеры для генов были предоставлены ООО «ДНК-Синтез» с дополнительным праймером-зондом, содержащим флуоресцентный краситель FAM и его «тушитель» BHQ1. ПЦР-РВ проводили в 96-луночном ПЦР-планшете («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) на амплификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Предварительную обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения, прилагаемого к прибору. Дальнейшая обработка проводилась с использованием алгоритма 2-ΔΔCt. Расчет уровня матричной РНК (мРНК) проводили с использованием алгоритма delta-delta(Ct), в основу которого положены относительные изменения пороговых циклов (Ct) исследуемого и референтного гена в опытных и контрольных образцах.

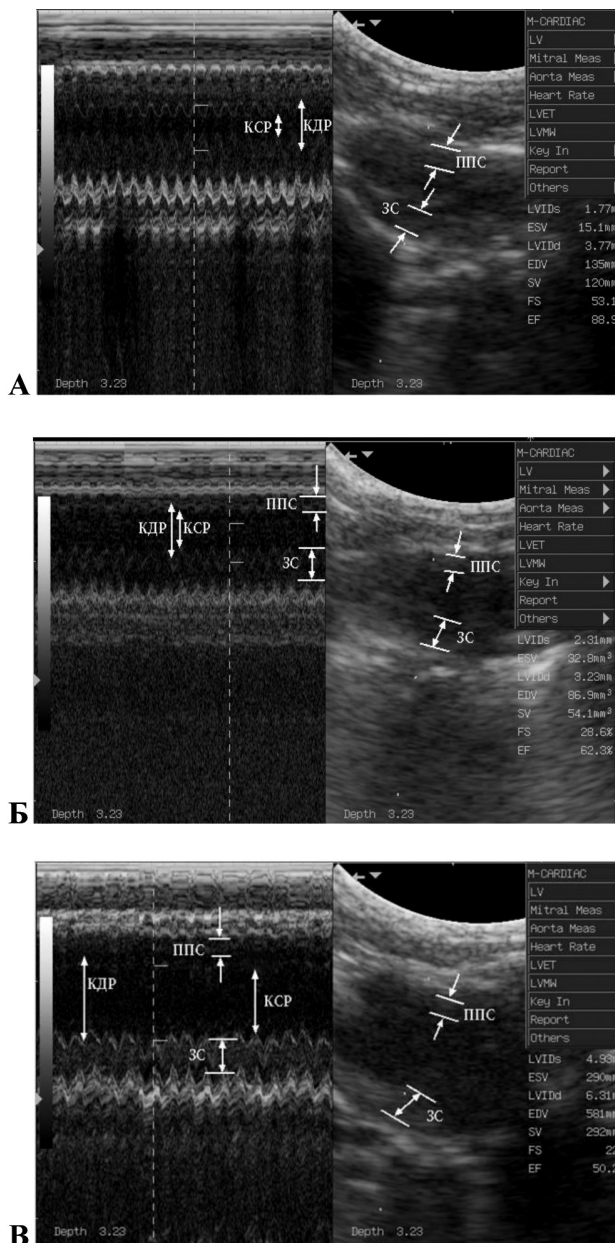


Рис. 1. Эхокардиограммы крыс: А — интактное животное; Б — 2-е сут. после воспроизведения переднего трансмурального ИМ; В — 90-е сут. после воспроизведения ИМ (животные со сформировавшейся ХСН); КДР — конечно-диастолический размер, КСР — конечно-систолический размер; ППС — передняя стенка; ЗС — задняя стенка левого желудочка сердца.

Статистические исследования

Для анализа динамики изменений эхокардиографических показателей использовали дисперсионный анализ повторных измерений с последующей обработкой методом множественных сравнений по Ньюмену—Кейлсу. Для определения статистической значимости различий между ложнооперированными и опытными крысами использовали *t*-критерий Стьюдента для независимых выборок. При проведении гистологического анализа проводили балльное шкалирование гидрофильной дистрофии печени и венозного застоя в легких. Данные, измеренные с помощью одинарной шкалы, обрабатывали с помощью критерия Манна—Уитни, результаты выражали в виде медиан, нижнего и верхнего квартилей. При оценке данных молекулярных исследований использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия между показателями считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение*Эхокардиографические исследования*

Результаты тестовых эхокардиографических исследований, выполненных на интактных животных перед их рандомизацией по группам, свидетельствуют о том, что показатели, характеризующие состояние внутрисердечной гемодинамики у включенных в экс-

перимент животных, колеблются в пределах физиологической нормы (рис. 1, А): конечно-систолический размер (КСР) — 1,60—2,31 мм; конечно-диастолический размер (КДР) — 3,35—4,18 мм; фракция укорочения (ФУ) — 47,8—59,1% и фракция выброса (ФВ) — 86,4—94,2%.

У ложнооперированных животных ($n = 8$) на 2-е сут. после операции величины, характеризующие состояние внутрисердечной гемодинамики, не отличались от исходных (табл. 1). Величины КСР, КДР, ФУ и ФВ существенно не изменялись и в дальнейшем на протяжении всего периода наблюдения (3 мес.).

У животных основной группы ($n = 12$) на 2-е сут. после воспроизведения инфаркта миокарда (в эту группу включены только животные с документально подтвержденным передним трансмуральным инфарктом миокарда) зарегистрированы существенные изменения в состоянии систолической функции левого желудочка сердца (табл. 1, рис. 1, Б) — статистически значимое по сравнению с ложнооперированными животными увеличение КСР и уменьшение ФВ, тогда как КДР у животных основной группы и ложнооперированных крыс практически не различался. Эти данные свидетельствуют о том, что у животных уже со 2-х сут. начинает формироваться систолическая сердечная недостаточность.

Таблица 1

Изменения кардиогемодинамики, возникающие в условиях сердечной недостаточности, вызванной экспериментальным инфарктом миокарда у крыс

Условия	Показатель	Сроки после операции, сутки			
		2	30	60	90
Ложнооперированные, $n = 8$	Конечно-систолический размер, мм	1,67 ± 0,10	1,76 ± 0,14 $p_1 = 0,622$	1,85 ± 0,18 $p_1 = 0,561$	1,88 ± 0,19 $p_1 = 0,619$
	Конечно-диастолический размер, мм	3,55 ± 0,13	3,63 ± 0,15 $p_1 = 0,920$	3,64 ± 0,20 $p_1 = 0,971$	3,83 ± 0,22 $p_1 = 0,646$
	Фракция укорочения, %	52,9 ± 1,5	51,6 ± 1,4 $p_1 = 0,401$	49,2 ± 1,5 $p_1 = 0,075$	50,9 ± 1,2 $p_1 = 0,395$
	Фракция выброса, %	88,6 ± 1,8	87,6 ± 1,7 $p_1 = 0,606$	85,7 ± 1,9 $p_1 = 0,455$	87,1 ± 1,6 $p_1 = 0,726$
ХСН, $n = 12$	Конечно-систолический размер, мм	2,49 ± 0,08 $p = 0,0018$	3,05 ± 0,12 $p = 0,0001$ $p_1 = 0,002$	3,36 ± 0,15 $p = 0,0001$ $p_1 = 0,0001$	3,91 ± 0,17 $p = 0,0001$ $p_1 = 0,0002$
	Конечно-диастолический размер, мм	3,56 ± 0,11 $p = 0,984$	4,21 ± 0,13 $p = 0,076$ $p_1 = 0,0146$	4,63 ± 0,17 $p = 0,0007$ $p_1 = 0,0002$	5,20 ± 0,19 $p = 0,0002$ $p_1 = 0,0001$
	Фракция укорочения, %	30,0 ± 1,3 $p = 0,0001$	27,9 ± 1,2 $p = 0,0001$ $p_1 = 0,164$	27,7 ± 1,3 $p = 0,0002$ $p_1 = 0,284$	25,1 ± 1,0 $p = 0,0001$ $p_1 = 0,0105$
	Фракция выброса, %	63,9 ± 1,6 $p = 0,0001$	60,6 ± 1,5 $p = 0,0001$ $p_1 = 0,094$	60,1 ± 1,6 $p = 0,0002$ $p_1 = 0,136$	55,9 ± 1,4 $p = 0,0001$ $p_1 = 0,0008$

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm m$; n — число животных в группе; p указано по отношению к ложнооперированным животным, p_1 — по отношению к уровню 2-х сут. после операции

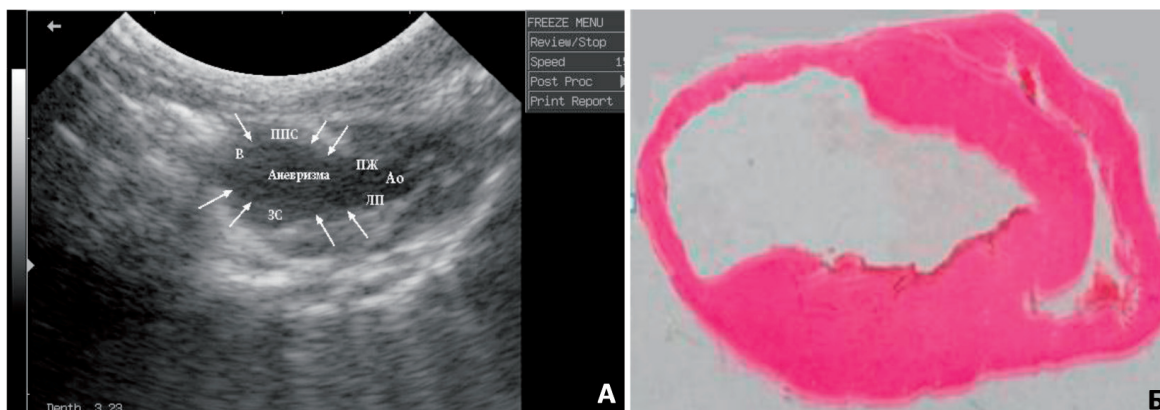


Рис. 2. Аневризма левого желудочка сердца. А – эхограмма; Б – макропрепарат. ППС – передняя стенка, ЗС – задняя стенка левого желудочка сердца, Ао – аорта, ЛП – левое предсердие, ПЖ – правый желудочек, В – верхушка сердца.

Близкая картина зарегистрирована и к концу 1-го мес. от момента воспроизведения экспериментального инфаркта миокарда (табл. 1). Отмечается статистически значимое по сравнению со 2-ми сут. после операции увеличение КСР. Вместе с тем, существенных изменений КДР и ФВ левого желудочка сердца не происходит.

Через 2 мес. у животных основной группы состояние внутрисердечной гемодинамики претерпевает существенные негативные изменения: у них начинает формироваться дилатационная постинфарктная сердечная недостаточность (табл. 1). Об этом, в частности, свидетельствует не только статистически значимое динамическое увеличение КСР за месяц, но и статистически значимое по сравнению со 2-ми сут. после воспроизведения экспериментального инфаркта миокарда увеличение КДР. Однако ФВ левого желудочка сердца по сравнению как со 2-ми сут., так и со сроком 1 мес. после операции практически не меняется (табл. 1). Эти наблюдения

свидетельствуют о том, что выявленные к этому времени изменения геометрии левого желудочка носят компенсаторный характер, позволяющий поддерживать насосную функцию сердца на относительно удовлетворительном уровне: снижение ФВ по сравнению с интактными животными менее 30%, а со 2-ми сут. после операции — в пределах 5%.

Через 3 мес. после воспроизведения инфаркта миокарда у животных основной группы отмечается статистически значимое по сравнению со 2-ми сут. снижение ФВ левого желудочка сердца (табл. 1, рис. 1, В). Снижение насосной функции сердца (на 13% по сравнению со 2-ми сут. после операции и на ~40% по сравнению с интактными животными) сопровождается дальнейшим динамическим увеличением КСР и КДР, что свидетельствует о развитии к этому сроку сердечной недостаточности.

Следует также отметить, что к этому периоду наблюдения у 4 из 12 животных формируется постин-

Таблица 2

Морфометрические показатели сердца крыс в условиях ХСН (90-е сут. после операции)

Показатель	Крысы с ХСН, n = 9	Ложнооперированные животные, n = 8
Площадь полости левого желудочка, мм ²	30,09 ± 1,92 p = 0,00015	18,24 ± 1,24
Относительная, площадь полости левого желудочка, %	32,54 ± 1,71 p = 0,00023	21,88 ± 1,35
Максимальный диаметр левого желудочка, мм	7,84 ± 0,39 p = 0,00049	5,85 ± 0,19
Минимальный диаметр левого желудочка, мм	5,00 ± 0,28 p = 0,00462	3,81 ± 0,20
Толщина передней стенки левого желудочка, мм	1,36 ± 0,14 p = 0,00001	2,63 ± 0,13
Толщина межжелудочковой перегородки, мм	1,86 ± 0,22 p = 0,03078	2,52 ± 0,05

Примечание. Данные представлены в виде M ± m; n — число животных в группе; p указано по отношению к ложнооперированным животным.

фарктная аневризма передней стенки левого желудочка сердца (рис. 2, А).

Таким образом, результаты динамического эхокардиографического исследования свидетельствуют о том, что у животных основной группы к концу 3-го мес. во всех случаях формируется постинфарктная сердечная недостаточность, течение которой в 33% случаев отягощено развитием постинфарктной аневризмы передней стенки левого желудочка сердца.

Результаты эхокардиографических исследований напрямую коррелируют с данными морфометрии. Так, если размеры левого желудочка сердца у ложнооперированных животных находятся в пределах анатомической нормы (табл. 2, рис. 3, А), то у животных основной группы выявлена статистически значимая дилатация его полости. Площадь левого желудочка сердца у животных основной группы почти в 2 раза больше, чем у ложнооперированных (табл. 2, рис. 3, Б).

Гистологические исследования

Сердце

Визуально сердца животных основной группы увеличены в размерах и по своей форме значительно отличались от сердец ложнооперированных животных, поскольку имели не конусообразную, а шаровидную форму, полости левого и правого желудочков расширены. Миокард животных основной группы дряблой консистенции с глинистым оттенком. В передней стенке левого желудочка сердца определялся трансмуральный рубец неправильной геометрической формы. У животных с аневризмой визуализируется мешковидное выпячивание истонченной стенки левого желудочка сердца, миокард левого желудочка сердца за пределами аневризмы утолщен (рис. 2, Б). При микроскопическом исследовании миокарда желудочков у животных основной группы выявляются очаги исчезнове-

ния поперечной исчерченности мышечных волокон, волнообразная деформация, вакуолизация и фрагментация кардиомиоцитов (рис. 4.1).

Помимо этого у животных основной группы по сравнению с ложнооперированными статистически значимо ($p = 0,001$) увеличено количество кардиомиоцитов, содержащих мелкие ядра, что свидетельствует о преобладании в миокарде этих животных дистрофических процессов.

Полученные результаты морфогистологического анализа макро- и микропрепаратов сердец животных основной группы, с одной стороны, свидетельствуют о наличии компенсаторной гипертрофии миокарда, протекающей на фоне постинфарктного кардиосклероза, с другой стороны, наблюдаемые параллельно с гипертрофией миокарда дилатация полостей и исчезновение поперечной исчерченности части кардиомиоцитов свидетельствуют о снижении их сократительной способности.

Легкие

Визуально легкие животных основной группы увеличены в размерах, имеют более плотную консистенцию и бурый оттенок легочной ткани по сравнению с ложнооперированными животными. Также отмечается расширение легочных вен.

При микроскопическом исследовании легочной ткани животных основной группы показано, что, в отличие от ложнооперированных, капилляры межальвеолярных перегородок переполнены кровью, в альвеолах множественные диапедезные кровоизлияния (рис. 4.П), обуславливающие начало формирования патогномичного для венозного застоя в легких гемосидероза.

При проведении балльного шкалирования интенсивности кровенаполнения легких было показано, что у животных основной группы, по сравнению с ложно-

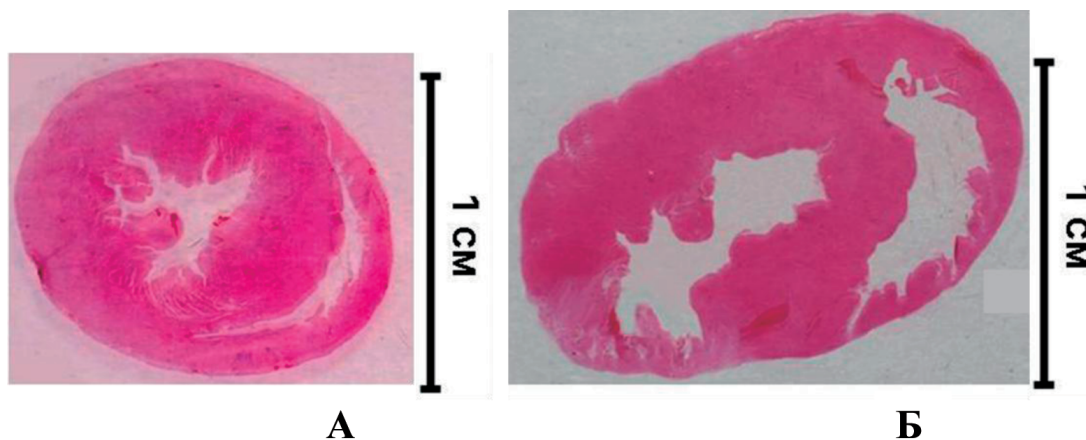


Рис. 3. Макропрепараты сердца крыс: А – intactные животные, Б – животные со сформировавшейся ХСН (90-е сутки после воспроизведения ИМ).

оперированными, проявления венозного застоя и эритростаза статистически значимо выше ($p = 0,02$).

Печень

Визуально печень животных основной группы, увеличена в размерах, края закруглены. На разрезе ткань более плотная, поверхность разреза имеет се-

ро-желтый оттенок с темно-красными вкраплениями — патогномоничная для венозного застоя «мускатная печень». При микроскопическом исследовании печени животных основной группы выявлено полнокровие, расширение центральных вен и прилегающих к ним синусоидов, отмечены очаги кровоизлияний, дисконфракции печеночных балок, значительная

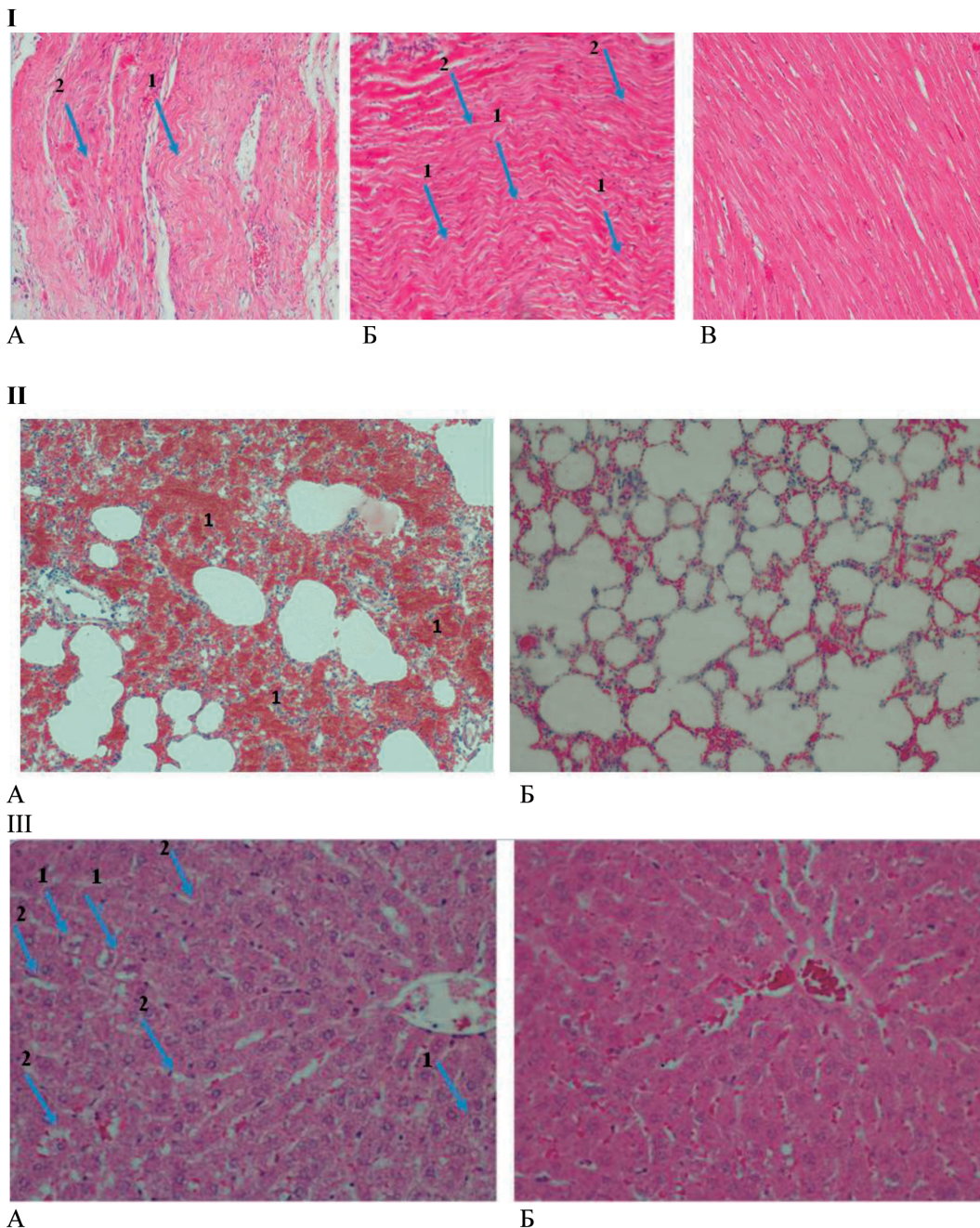


Рис. 4. Гистологическая картина миокарда (I), легких (II) и печени (III) у животных с ХСН. Окраска галлоцианин-эозином, x10.

I: А — ХСН, зона инфаркта; Б — ХСН, периинфарктная зона; В — ложнооперированные.

1 — волнообразная деформация кардиомиоцитов; 2 — исчезновение поперечной исчерченности мышечных волокон.

II: А — ХСН; Б — ложнооперированные. 1 — переполненные кровью капилляры.

III: А — ХСН; Б — ложнооперированные. 1 — гидропическая дистрофия гепатоцитов; 2 — отек перисинусоидальных пространств Диссе.

часть гепатоцитов имела нечеткие контуры (рис. 4.ИИ). Полнокровие и отек периферических долек печени был менее выражен.

Было проведено балльное шкалирование интенсивности гидрофильной дистрофии печени. Показано, что у животных основной группы по сравнению с ложнооперированными интенсивность гидрофильной дистрофии статистически значимо выше ($p = 0,001$).

Таким образом, результаты морфогистологического анализа макро- и микропрепаратов тканей печени и легких животных основной группы свидетельствуют о наличии у них хронического венозного полнокровия, характерного для ХСН.

Биохимические исследования

В качестве биохимического маркера ХСН использовали BNP. BNP преимущественно секретируется кардиомиоцитами желудочков и в настоящее время рассматривается как «золотой стандарт» в диагностике ХСН [23]. Показано, что у животных через 3 мес. после перевязки коронарной артерии концентрация BNP в плазме крови статистически значимо ($p = 0,014$) выше, чем у ложнооперированных (рис. 5). Увеличение содержания BNP (на 35%) в плазме крови животных основной группы является дополнительным свидетельством развития у животных ХСН.

Молекулярно-биологические исследования

Хорошо известно, что ренин-ангиотензин-альдостероновая (РААС) и симпатoadреналовая (САС) системы занимают одно из ведущих мест в патогенезе ХСН [24, 25]. В условиях сформировавшейся ХСН эти системы, действуя синергично, инициируют активацию ряда патологических внутриклеточных сигнальных каскадов, ответственных, в частности, за снижение инотропной функции, аритмогенез и ремоделирование сердечной мышцы.

Известно, что ангиотензин II (АТII) в ишемизированном миокарде выступает в качестве модулятора ремоделирования, способствуя развитию гипертрофии и/или фиброза миокарда [26, 27]. АТII в кардиомиоцитах реализует свои внутриклеточные эффекты преимущественно за счет активации АТ1А-R. Показано, что в постинфарктном периоде как в инфарктной зоне, так и в неповрежденных отделах сердца уровень экспрессии АТ1-R существенно выше, чем АТ2-R [28].

О состоянии РААС и САС судили по уровню экспрессии АТ1А-R и β -адренорецепторов (β -AR). Показано, что у животных основной группы через 3 мес. после перевязки коронарной артерии уровень мРНК АТ1А-R более чем на 40% превышает тако-

вой, зафиксированный у ложнооперированных животных (рис. 6, А).

Еще в 1995 г. было продемонстрировано, что в постинфарктном периоде как в перинфарктной зоне, так и в неповрежденных отделах сердца уровень экспрессии мРНК для АТ1-R существенно выше, чем таковой для АТ2-R [28]. Показано, что активация АТ1-R влечет за собой гипертрофию кардиомиоцитов, стимулирует синтез внеклеточного матрикса, гиперплазию гладкомышечных клеток коронарных артерий и увеличение их жесткости [29].

Установлено, что АТ1-R индуцируют экспрессию β -трансформирующего фактора (TGF β 1), посредством которого и реализуется гипертрофический рост кардиомиоцитов [30]. Активация сигнального каскада от рецепторов TGF β 1 также увеличивает транслокацию белков Smad в ядро и транскрипцию генов таких белков как коллаген, фибронектин и фактор роста

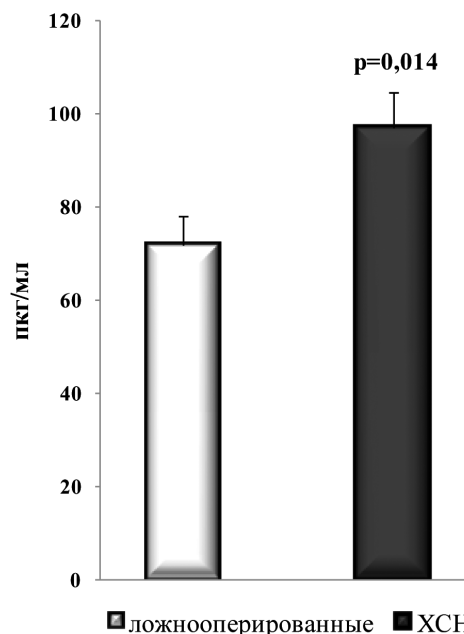


Рис. 5. Содержание BNP в плазме крови крыс через 3 мес. после воспроизведения инфаркта миокарда.

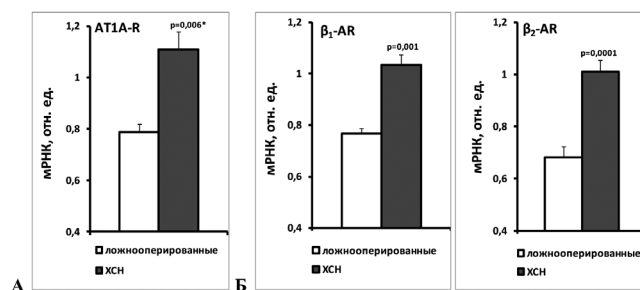


Рис. 6. Увеличение уровня мРНК АТ1А-R (А), β_1 - и β_2 -AR (Б) в левом желудочке сердца крыс с ХСН.

соединительной ткани (CTGF) [31]. Таким образом, индуцируемые в условиях ХСН АТII/TGF β 1 аутокринно-паракринные клеточные ответы в сердечных фибробластах, миокардиальном интерстиции и кардиомиоцитах вызывают гипертрофию миокарда.

АТ1-R также является мощным медиатором окислительного стресса и ROS-опосредованной сигнализации, что является одним из пагубных последствий активации RAS. Реактивные формы кислорода (ROS) играют важную роль в прогрессировании сердечно-сосудистых дисфункций и хронической сердечной недостаточности [32].

Уровень экспрессии генов β 1-AR и β 2-AR у животных основной группы через 3 мес. после перевязки коронарной артерии превышал таковой у ложнопереоперированных животных соответственно на 35 и 48% (рис. 6, Б); различия статистически значимы — $p = 0,001$ и $p = 0,0001$. Увеличение мРНК β -AR, по-видимому, является следствием хронической активации симпатического отдела вегетативной нервной системы, патогномичной для ХСН. На фоне снижения инотропной функции сердца (на 40%) увеличение экспрессии β -AR, вероятно, является ответной реакцией на десенситизацию этих рецепторов, характерную для ХСН [33]. Полученные данные также свидетельствуют о том, что к концу 3-го мес. после перевязки коронарной артерии начинает формироваться характерный для ХСН феномен обратной регуляции (down и up-regulation) — снижение плотности β 1- и увеличение плотности β 2-AR, встроенных в клеточную мембрану кардиомиоцитов.

Роль β -AR в регуляции деятельности сердца хорошо известна. Встроенные в клеточную мембрану кардиомиоцитов β 1-AR сопряжены с Gs сигнальными белками. В физиологических условиях их активация инициирует положительный инотропный, лузитропный и хронотропный эффекты. Однако при ХСН избыточная стимуляция β 1-AR и последующая активация PI3K-Akt-GSK-3 β сигнального пути инициирует гипертрофию, апоптоз, а в ряде случаев и некроз кардиомиоцитов; способствует ремоделированию сердца, что, собственно, и лежит в основе патогенеза этого заболевания [34]. В экспериментах *in vivo*, выполненных на трансгенных мышцах, показано, что гиперэкспрессия β 1-AR приводит к гипертрофии, фиброзу и апоптозу кардиомиоцитов в течение первых недель после рождения. В дальнейшем у этих животных в течение нескольких месяцев формируется ХСН, по своим функциональным и гистологическим характеристикам близкая к таковой, наблюдаемой при дилатационной кардиомиопатии у человека [35]. Продолжительность жизни трансгенных мышей значительно меньше, чем контрольных животных.

Если увеличение экспрессии β 1-AR при ХСН ответственна за формирование патологических изменений миокарда, то наблюдаемая, в том числе и в наших экспериментах, гиперэкспрессия β 2-AR, сопряженных не только с Gs, но и с Gi сигнальными белками, носит компенсаторный характер. В исследованиях на трансгенных мышцах было продемонстрировано, что повышенная экспрессия β 2-AR в условиях ХСН не только улучшает функцию желудочков, но и уменьшает гипертрофию миокарда [36]. Этот кардиопротективный эффект опосредуется Gi сигнальными белками [37]. В более поздних исследованиях было показано, что трансфекция Adv- β 2AR в кардиомиоциты, выделенные из сердец собак с ХСН, увеличивала содержание цАМФ и улучшала их сократительную функцию [38].

Можно полагать, что увеличение в миокарде животных через 3 мес. после перевязки коронарной артерии экспрессии генов АТ1A-R и β -AR свидетельствует об активации РААС и САС, играющих ключевую роль в патогенезе ХСН.

Заключение

Таким образом, разработана трансляционная модель ХСН у крыс, воспроизводящая основные клинико-диагностические критерии этого заболевания (снижение сократимости и дилатация желудочков сердца, признаки венозного застоя, увеличение в плазме биохимических маркеров, гиперэкспрессия АТ1A-R и β -AR). Установлена корреляция между морфометрическими, гистологическими, биохимическими и молекулярными маркерами прогрессирующей ХСН и эхокардиографическими диагностическими признаками, что позволяет использовать неинвазивный метод эхокардиографии, характеризующий состояние внутрисердечной гемодинамики, в качестве основного критерия оценки наличия/отсутствия данной патологии. Помимо этого, эхокардиография дает возможность в динамике оценивать этапы формирования этого патологического процесса. Разработанная трансляционная модель позволяет не только изучать тонкие механизмы, лежащие в основе этого патологического процесса, но и создает фундаментальную базу для поиска и доклинического изучения новых оригинальных лекарственных средств для профилактики и лечения ХСН.

References

1. Mahmood S.S., Levy D., Vasan R.S., Wang T.J. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. 2014; 383(9921): 999-1008.
2. Levy D., Kenchaiah S., Larson M.G., Benjamin E.J., Kupka M.J., Ho K.K., Murabito J.M., Vasan R.S.

Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. 2002; 347(18): 1397-402.

3. Fomin I.V. Chronic heart failure in the Russian Federation: what we know today and what should be done. *Rossijskij kardiologicheskij zhurnal*. 2016; 8 (136): 7-13.

4. Ferrero P., Iacovoni A., D'Elia E., Vaduganathan M., Gavazzi A., Senni M. Prognostic scores in heart failure — Critical appraisal and practical use. *Int. J. Cardiol*. 2015; 188: 1-9.

5. Sanchez-Enrique C., Jorde U.P., Gonzalez-Costello J. Heart transplant and mechanical circulatory support in patients with advanced heart failure. 2017; 70(5): 371-81.

6. Ono T., Kamimura N., Matsuhashi T., Nagai T., Nishiyama T., Endo J. et al. The histone 3 lysine 9 methyltransferase inhibitor chaetocin improves prognosis in a rat model of high salt diet-induced heart failure. 2017; 7: 39752.

7. Liu B., Ma S., Wang T., Zhao C., Li Y., Yin J. et al. A novel rat model of heart failure induced by high methionine diet showing evidence of association between hyperhomocysteinemia and activation of NF-kappaB. *Am. J. Transl. Res*. 2016; 8(1): 117-24.

8. Cappetta D., Esposito G., Coppini R., Piegari E., Russo R., Ciuffreda L.P. et al. Effects of ranolazine in a model of doxorubicin-induced left ventricle diastolic dysfunction. *Br. J. Pharmacol*. 2017; 174(21): 3696-712.

9. Chen T., Hu Y.Q., Deng L.R., Gong Z.P., Yu X.Q. Effects of polysaccharides extracted from *Zhu Zi Shen* (rhizoma *panacis majoris*) on oxidative stress and hemodynamics in rats with adriamycin-induced chronic heart failure. *J. Tradit. Chin. Med*. 2011; 31(3): 235-40.

10. Pasini E., Cargnioni A., Pastore F., Razzetti R., Bongrani S., Gitti G.L., . Effect of nolomirole on monocrotaline-induced heart failure. *Pharmacol. Res*. 2004; 49(1): 1-5.

11. Zhou R., Ma P., Xiong A., Xu Y., Wang Y., Xu Q. Protective effects of low-dose rosuvastatin on isoproterenol-induced chronic heart failure in rats by regulation of DDAH-ADMA-NO pathway. *Cardiovasc. Ther*. 2017; 35(2): e12241.

12. Zhang X., Cheng H.J., Zhou P., Kitzman D.W., Ferrario C.M., Li W.M., Cheng C.P. Cellular basis of angiotensin-(1-7)-induced augmentation of left ventricular functional performance in heart failure. 2017; 236: 405-12.

13. Ku H.C., Lee S.Y., Wu Y.A., Yang K.C., Su M.J. A model of cardiac remodeling through constriction of the abdominal aorta in rats. *J. Vis. Exp*. 2016; (118): e54818.

14. Camacho P., Fan H., Liu Z., He J.Q. Small mammalian animal models of heart disease. 2016; 6(3): 70-80.

15. Belkina L.M., Usacheva M.A., Smirnova E.A., Popkova E.V., Saltykova V.A. Particularities of the postinfarction heart failure development in animal with different pattern of autonomic regulation. *Patogenez*. 2008; 6(1): 57-63.

16. Kim H.S., No C.W., Goo S.H., Cha T.J. An Angiotensin receptor blocker prevents arrhythmogenic left atrial remodeling in a rat post myocardial infarction induced heart failure model. *J. Korean Med. Sci*. 2013; 28(5): 700-8.

17. Lassen T.R., Nielsen J.M., Johnsen J., Ringgaard S., Botker H.E., Kristiansen S.B. Effect of paroxetine on left ventricular remodeling in an in vivo rat model of myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol*. 2017; 112(3): 26.

18. McMurray J.J., Adamopoulos S., Anker S.D., Auricchio A., Bohm M. et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Associati-

on (HFA) of the ESC. *Eur. J. Heart Fail*. 2012; 14 (80): P. 803-69.

19. Kazachenko A.A., Okovityj S.V., Kulikov A.N., Ivkin D.Yu., Shustov E.B. Experimental modeling of chronic heart failure. *Biomeditsina*. 2013; (3): 41-8.

20. Halapas A., Papalois A., Stauropoulou A., Philippou A., Pissimissis N., Chatzigeorgiou A., Kamper E., Koutsilieris M. In vivo models for heart failure research. 2008; 22(6): 767-80.

21. Goldman S., Raya T.E. Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. 1995; 1(2): 169-77.

22. Selye A. I., Bajuaz E., Crasso S., Nendell P. Simple technic for surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology*. 1960; 11: 398-407.

23. Mareev V.Yu., Ageev F.T., Arutyunov G.P., Koroteev A.V., Mareev Yu.V., Ovchinnikov A.G. i dr. National recommendations of SCDs, RCS and RSMS on diagnosis and treatment of CHF (fourth revision). *Serdechnaya nedostatochnost'*. 2013; 14(7): 379-472.

24. Antoine S., Vaidya G., Imam H., Villarreal D. Pathophysiologic mechanisms in heart failure: role of the sympathetic nervous system. *Am. J. Med. Sci*. 2017; 353(1): 27-30.

25. Tannenbaum S., Sayer G.T. Advances in the pathophysiology and treatment of heart failure with preserved ejection fraction. *Curr. Opin. Cardiol*. 2015; 30(3): 250-8.

26. De Smet H.R., Menadue M.F., Oliver J.R., Phillips P.A. Endothelin ETA receptor antagonism does not attenuate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in vivo in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2003; 30(4): 278-83.

27. Dasgupta, Zhang, 2011 Dasgupta C, Zhang L. Angiotensin II receptors and drug discovery in cardiovascular disease. *Drug. Discov. Today*. 2011; 16: 22-34.

28. Nio Y., Matsubara H., Murasawa S., Kanasaki M, Inada M. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin. Invest*. 1995; 95(1): 46-54.

29. Grothusen A., Divchev D., Luchtefeld M, Schieffer B. Angiotensin II type 1 receptor blockade: high hopes sent back to reality? *Minerva Cardioangiol*. 2009; 57(6): 773-85.

30. Schultz Jel.J., Witt S.A., Glascock B.J., Nieman M.L., Reiser P.J., Nix S.L., Kimball T.R., Doetschman T. TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J Clin. Invest*. 2002; 109(6): 787-96.

31. Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ. Res*. 2010; 106(11): 1675-80.

32. Huang C.Y., Chen J.Y., Kuo C.H., Pai P.Y., Ho T.J., Chen T.S., Tsai F.J., Padma V.V., Kuo W.W., Huang C.Y. Mitochondrial ROS-induced ERK1/2 activation and HSF2-mediated AT1 R upregulation are required for doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Cell. Physiol*. 2017; 233(1): 463-75.

33. Avdonin P.V., Kozhevnikova L.M. The regulation of the expression and functional activity of G-protein coupled receptors. Violation of these processes in pathologies. *Biologicheskie membrany: Zhurnal membrannoy i kletchnoy biologii*. 2007; 24(1): 4-31. (in Russian)

34. Morisco C., Zebrowski D.C., Vatner D.E., Vatner S.F., Sadoshima J. Beta-adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the beta(1)-subtype in the rat heart. *J Mol. Cell. Cardiol*. 2001; 33(3): 561-73.

35. Bisognano J.D., Weinberger H.D., Bohlmeyer T.J., Pende A., Raynolds M.V., Sastravaha A., Roden R., Asa-

no K., Blaxall B.C., Wu S.C., Communal C., Singh K., Colucci W., Bristow M.R., Port D.J. Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2000; 32(5): 817-30.

36. Dorn G.W. 2nd, Tepe N.M., Lorenz J.N., Koch W.J., Liggett SB. Low- and high-level transgenic expression of beta2-adrenergic receptors differentially affect cardiac hypertrophy and function in Galphaq-overexpressing mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96(11): 6400-5.

37. Xiao R.P., Zhang S.J., Chakir K., Avdonin P., Zhu W., Bond R.A., Balke C.W., Lakatta E.G., Cheng H.

Enhanced G(i) signaling selectively negates beta2-adrenergic receptor (AR)—but not beta1-AR-mediated positive inotropic effect in myocytes from failing rat hearts. *Circulation.* 2003; 108(13): 1633-9.

38. Gong H., San Y., Wang L., Lv Q., Chen L. The effects and possible mechanism of β 2AR gene expression in cardiocytes of canines with heart failure. *Exp. Ther. Med.* 2017; 14(1): 539-46.

Сведения об авторах:

Крыжановский Сергей Александрович, доктор мед. наук, зав. лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»

Цорин Иосиф Борисович, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»

Ионова Екатерина Олеговна, мл. науч. сотр. лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»

Столярук Валерий Николаевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»

Вититнова Марина Борисовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»

Барчуков Владимир Валерьевич, науч. сотр. лаб. фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»

Мирошкина Ирина Александровна, науч. сотр. лаб. лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»

Сорокина Александра Валериановна канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»

Кожевникова Любовь Михайловна доктор мед. наук, зав. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Дурнев Андрей Дмитриев, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, директор ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»

ИНФОРМАЦИОННОЕ ПИСЬМО – 2-я АКАДЕМИЯ АУТОИММУНИТЕТА, 21-23 СЕНТ. 2018 Г., СПБГУ

Глубокоуважаемые коллеги,

В рамках выполнения постановления № 220 и договора 14.W03.31.0009 о выделении гранта Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых, **в Санкт-Петербургском государственном университете 21–23 сентября 2018 г. будет проведено уникальное научно-образовательное мероприятие: «2-я Академия аутоиммунитета».**

Цикл лекций по иммунологии и клинической медицине аутоиммунных заболеваний прочтут **ведущие ученые мира**, среди которых – крупнейший патолог, профессор Калифорнийского университета (США) *Абул Аббас*, выдающийся иммунолог профессор Тель-Авивского университета (Израиль) и Санкт-Петербургского университета *Иегуда Шенфельд* и другие лидеры в области фундаментальных и прикладных аспектов аутоиммунитета из Бельгии, Бразилии, Великобритании, Германии, Греции, Израйля, Италии и России.

Будут детально рассмотрены **новейшие достижения в патофизиологии, клинике и лечении аутоиммунных заболеваний. Современный общий курс иммунологии проф. Абула Аббаса предваряет специальную медицинскую часть программы.**

Приглашаем к участию студентов, аспирантов, ординаторов, научных работников, преподавателей, врачей и других специалистов системы здравоохранения.

Академия будет официально признана учебным мероприятием непрерывного медицинского образования как в странах Евросоюза UEMS-EACCME®, так и в РФ – Координационным советом по развитию непрерывного медицинского и фармацевтического образования Минздрава, что позволит дипломированным специалистам-участникам получить **сертификаты и баллы повышения квалификации.**

Все обучающиеся *СПбГУ*, а также студенты-медики вузов России имеют возможность регистрироваться и участвовать в работе Академии **бесплатно**. Для дипломированных специалистов из России и стран СНГ установлены **льготные условия регистрации**. Подробно об Академии можно узнать на портале СПбГУ, на её сайте:

<https://events.spbu.ru/events/autoimmunity2018>

Регистрация участников производится здесь:

<https://events.spbu.ru/events/anons/autoimmunity-2018/registration.html>

Организации и фирмы, планирующие участвовать в выставке, обращаются сюда:

<https://events.spbu.ru/events/anons/autoimmunity-2018/support.html>

Место проведения Академии: Здание “Двенадцати Коллегий» СПбГУ, Актовый зал. Университетская набережная. д. 7/9., 2 этаж. Санкт-Петербург, Россия.

Прошу распространить информацию об этом научно-образовательном событии среди Ваших коллег и учеников, в тех научных, медицинских и образовательных учреждениях, где Вы трудитесь, в научных и профессиональных обществах, членами которых Вы состоите.

Добро пожаловать в Санкт-Петербург!

С наилучшими пожеланиями



Леонид Павлович Чурилов

Со-президент 2-й Академии аутоиммунитета, зав. кафедрой патологии, зам. руководителя лаборатории мозаики аутоиммунитета СПбГУ.

ИНФОРМАЦИОННОЕ ПИСЬМО – 2-я АКАДЕМИЯ АУТОИММУНИТЕТА, 21-23 СЕНТ. 2018 Г., СПБГУ

St. Petersburg University

Autoimmunity

2nd Saint Petersburg Academy of Autoimmunity

We are very proud to invite you to the 2ND Saint Petersburg Academy of Autoimmunity (SPBAA 2018), which will be an international teaching event in the beautiful and glorious city of Saint Petersburg on **21-23 September 2018**. SPBAA 2018 offers you the chance to combine science, medicine, art and pleasure, and we look forward to welcoming you to Saint Petersburg.

Autoimmunity Network
The Autoimmunity Network is a dynamic community of more than 4000 physicians, immunologists, rheumatologists & researchers who share the common goal of exchanging knowledge about autoimmune diseases. Members of the community have the opportunity to network with colleagues, attend well established and successful annual congresses, and take advantage of the added benefit of being part of a vibrant online social network?

Scientific Program
Sessions will include:

- Basic autoimmunity
- Updates on autoimmune diseases
- Diagnostic aspects of autoimmune diseases
- Novel therapies in autoimmune diseases
- Novelties in autoimmunity
- Pearls in autoimmunity
- Autoimmunity - towards the 3rd millennium
- Factors involved in autoimmunity

Committees
Academy Co-Presidents
Prof. Yehuda Shoenfeld
Tel Aviv, Israel, Saint Petersburg, Russia

Prof. Leonid Churilov
Saint Petersburg, Russia

Prof. Arnon Afek
Tel Aviv, Israel

Prof. Abul Abbas
University of California San Francisco (USA)

SPBCA 2018

1st Saint Petersburg Academy of Autoimmunity

7/9 Universitetskaya Emb.,
St Petersburg 199034, Russia

TEL AVIV UNIVERSITY



Санкт-Петербургский
государственный
университет

2-я Академия аутоиммунитета

новейшие достижения в клинике и лечении аутоиммунных заболеваний



Расписание и научная программа

21-23 сентября 2018 г., Санкт-Петербург, Россия



ПРЕЗИДЕНТЫ:

Иегуда Шенфельд, Леонид Чурилов, Арнон Афек, Абул Аббас



СОПРЕДСЕДАТЕЛИ:

**Вадим Мазуров, Елена Корнева, Ора Шовман, Елена Захарова,
Сергей Лапин, Ховард Амитал, Петр Яблонский**

Академия проводится в рамках реализации постановления Правительства РФ №220 и договора № 14.W03.31.0009 о выделении гранта Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых.

ПЯТНИЦА, 21 сентября 2018 г.

**Сессия D1-1: Основы трансляционной иммунологии для аутоиммунологов.
Абул Аббас (США)**

Время	Тема
12:00-12:30	Введение в иммунологию и аутоиммунитет
12:30-13:30	Врожденный иммунитет
13:30-14:30	Представление антигенов и ГКГС

14:30-15:00	Кофе-брейк, выставка
-------------	----------------------

Время	Тема
15:00-16:00	Активация Т-клеток, ко-стимуляция и регуляция
16:00-17:00	Субпопуляции CD4-Т-клеток
17:00-17:30	Вопросы, обсуждение

СУББОТА, 22 сентября 2018 г.

**Сессия D2-1: Основы трансляционной иммунологии для аутоиммунологов
Абул Аббас (США)**

Время	Тема
08:30-09:30	Активация В-клеток и выработка антител
09:30-10:30	Т-клеточная толерантность и регуляция

10:30-11:00	Кофе-брейк, выставка
-------------	----------------------

Время	Тема
11:00-11:30	Механизмы аутоиммунитета
11:30-12:30	Иммунотерапия рака
12:30-13:00	Вопросы и обсуждение

13:00-14:00	Обеденный перерыв, выставка
-------------	-----------------------------

Сессия D2-2: Основы учения об аутоиммунитете

Сопредседатели: Ховард Амитал, Веерле Сомерс

Время	Лектор	Страна	Тема
14:00-14:30	Иегуда Шенфельд	Израиль, Россия	Мозаика аутоиммунитета
14:30-15:00	Глеб Слободин	Израиль	Врожденный иммунитет и аутоиммунитет
15:00-15:30	Клаудио Лунарни	Италия	Инфекции и аутоиммунитет
15:30-16:00	Элиас Туби	Израиль	T-reg и B-reg и их влияние на аутоиммунные заболевания

16:00-16:30	Кофе-брейк, выставка
-------------	----------------------

Сессия D2-3: Новое об аутоиммунных болезнях

Сопредседатели: Борис Гильбурд, Елена Корнева

Время	Лектор	Страна	Тема
16:30-17:00	Веерле Сомерс	Бельгия	Современные представления о рассеянном склерозе
17:00-17:30	Атанасиос Циуфас	Греция	Синдром Шёгрена в эпоху точной медицины
17:30-18:00	Ора Шовман	Израиль	СКВ: новые способы лечения

ВОСКРЕСЕНЬЕ, 23 сентября 2018 г.

Сессия D3-1: Аспекты диагностики аутоиммунных заболеваний

Сопредседатели: Петр Яблонский, Элиас Туби

Время	Лектор	Страна	Тема
08:30-09:00	Александра Балбир	Израиль	Системная склеродермия – новые проблемы
09:00-09:30	Маттиас Шнайдер	Германия	СКВ: ранняя диагностика и прогностические факторы
09:30-10:00	Инна Гайдукова	Россия	Плеврорегочные проявления у больных с СКВ и антифосфолипидным синдромом
10:00-10:30	Борис Гильбурд	Израиль, Россия	Мультиплексная технология

10:30-11:00	Кофе-брейк, выставка		
-------------	----------------------	--	--

Сессия D3-2: Новое об аутоиммунитете

Сопредседатели: Сергей Лапин, Жизель Годдард

Время	Лектор	Страна	Тема
11:00-11:30	Ховард Амитал	Израиль	Новое лечение: биотерапия, биоаналоги, малые молекулы
11:30-12:00	Бат-Шеба Порат	Израиль	Конопля и аутоиммунитет
12:00-12:30	Анна Старшинова	Россия	Саркоидоз как аутоиммунное расстройство
12:30-13:00	Мириам Бланк	Израиль, Россия	Гигиеническая теория, гельминты и аутоиммунитет

13:00-14:00	Обеденный перерыв, выставка		
-------------	-----------------------------	--	--

Сессия D3-3: Жемчужины аутоиммунитета

Сопредседатели: Димитриос Богданос, Анна Старшинова

Время	Лектор	Страна	Тема
14:00-14:30	Деннис МакГонагл	Великобритания	Ингибиторы контрольной точки и аутоиммунитет
14:30-15:00	Сергей Лапин	Россия	Лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний
15:00-15:30	Роджер Леви	Бразилия	Ингибирование В-клеток при СКВ и других системных аутоиммунных заболеваниях
15:30-16:00	Жизель Годдард	Израиль	Внутривенные иммуноглобулины и аутоиммунные болезни

16:00-16:30	Кофе-брейк, выставка		
-------------	----------------------	--	--

Сессия D3-4: Факторы аутоиммунитета

Сопредседатели: Елена Захарова, Роджер Леви

Время	Лектор	Страна	Тема
16:30-17:00	Димитриос Богданос	Греция	Молекулярная мимикрия и аутоиммунитет
17:00-17:30	Абдулла Ватад	Великобритания	ASIA-синдром
17:30-18:00	Карло Селми	Италия	Роль пола, генов и окружающей среды в определении подверженности аутоиммунным заболеваниям и их тяжести

Академия проводится в рамках реализации постановления Правительства РФ №220 и договора № 14.W03.31.0009 о выделении гранта Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых.

INFORMATION LETTER – 2nd ACADEMY OF AUTOIMMUNITY, 21-23 SEPTEMBER 2018, SAINT PETERSBURG STATE UNIVERSITY

Dear colleagues,

As part of the implementation of Resolution No. 220 and the contract 14.W03.31.0009 on the allocation of a grant from the Government of the Russian Federation for state support of scientific research conducted under the leadership of leading scientists, a unique scientific and educational event will be held **at the St. Petersburg State University on 21-23 September: "The Second Academy of Autoimmunity"**. The cycle of lectures on Immunology, Pathophysiology and Clinical Medicine of autoimmune diseases will be delivered by the world's leading scientists, among them the renown pathologist, **Professor of the University of California Abul R. Abbas**, an outstanding immunologist at the University of Tel-Aviv (Israel) and St. Petersburg University **Professor Yehuda Shenfeld** and other leaders in the field of fundamental and applied aspects of autoimmunity from Belgium, Brazil, Britain, Germany, Greece, Israel, Italy and Russia. The latest achievements in Pathophysiology, clinics and treatment of autoimmune diseases will be considered in detail. The current general course of Immunology from Professor Abul K. Abbas anticipates the special medical part of the programme. We invite students, postgraduates, residents, researchers, teachers, medical doctors and other specialists of the healthcare system to participate in this outstanding educational and scientific event in the beautiful historical city of Saint Petersburg. **The Academy will be officially recognized as a training event for continuous medical education** in the countries of the European Union – by UEMS-EACCME® and in the Russian Federation by the Coordinating Council for the Development of Continuous Medical and Pharmaceutical Education of the Ministry of Health, which will allow graduates to receive appropriate certificates and score-credits. All trainees of any educational programme at Saint Petersburg State University, as well as any medical student of a Russian university, have the opportunity to register and participate in the Academy's work for free. *For graduates from Russia and CIS countries, preferential conditions for registration are established, as well as for citizens of the countries officially listed by World Bank Country Classification as the low-income ones.* **More information about the Academy can be found on website:**

<https://events.spbu.ru/events/autoimmunity2018?lang=Eng>

Registration of participants is open here:

<https://events.spbu.ru/events/anons/autoimmunity-2018/participation.html>

Organizations and companies planning **to participate in the exhibition** are contacted here:

<https://events.spbu.ru/events/anons/autoimmunity-2018/support.html>

The venue of the 2nd Academy of Autoimmunity is: *Aula Magna. The building of the "12 Collegua" of St. Petersburg State University, Universitetskaya embankment, Bld 7/9., 2nd floor. Saint-Petersburg, Russia.* I ask you to disseminate information about this scientific and educational event among your colleagues and students, in the research, medical and educational institutions where you work, in the scientific and professional societies of which you are a member. **Welcome to Saint Petersburg for "Mundial of Autoimmunology"!**

Best regards



Leonid P. Churilov

Co-President of Academy, Chairman of Pathology Dept, Deputy-Head of the Laboratory of Mosaic of Autoimmunity, Saint Petersburg State University. Full Member of International Academy of Science (Health and Ecology).