

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

ПАТОГЕНЕЗ

Научно-практический журнал

Основан в 2003 году
Выходит 4 раза в год

Том 16, №1, 2018

ЯНВАРЬ—МАРТ

Главный редактор
КУБАТИЕВ А.А. (Москва)

Соредакторы
Дыгай А.М. (Томск), Корнева Е.А. (Санкт-Петербург), Морозов С.Г. (Москва)

Ответственные секретари
Карганов М.Ю., Литвицкий П.Ф., Малышев И.Ю. (Москва)

Редакционная коллегия

Арчаков А.И. (Москва), Афтанас Л.И. (Новосибирск), Баранов В.М. (Москва), Береговых В.В. (Москва), Бобрышев Ю.В. (Сидней, Австралия), Гинтер Е.К. (Москва), Грачев С.В. (Москва), Дауни Г.Ф. (Форт-Уэрт, США), Кашкин К.П. (Москва), Кжишковска Ю.Г. (Гейдельберг, Германия), Колесников С.И. (Москва), Кушлинский Н.Е. (Москва), Манухина Е.Б. (Форт-Уэрт, США), Нинкина Н.Н. (Кардифф, Великобритания), Новицкий В.В. (Томск), Пальцев М.А. (Москва), Панченко Л.Ф. (Москва), Петров В.И. (Волгоград), Пузырев В.П. (Томск), Ревешвили А.Ш. (Москва), Репин В.С. (Москва), Сандриков В.А. (Москва), Софронов Г.А. (Санкт-Петербург), Сухих Г.Т. (Москва), Тутельян В.А. (Москва), Угрюмов М.В. (Москва), Франк Г.А. (Москва), Черешнев В.А. (Екатеринбург), Чехонин В.П. (Москва), Шабалин В.Н. (Москва), Швец В.И. (Москва), Шляхто Е.В. (Санкт-Петербург), Юрков В.А. (Москва)

Зав. редакцией Иришкин Д.А.
Научный редактор Панкова Н.Б.
Технический редактор Комарова А.К.

Внимание авторов и читателей: рукописи и иллюстрации не возвращаются. При перепечатке материалов согласование с редакцией журнала «Патогенез» обязательно.
За содержание рекламных публикаций ответственность несет рекламодатель.
Журнал зарегистрирован в Федеральном агентстве по печати и массовым коммуникациям. Регистрационный номер ПИ № 77-12736 от 27 мая 2002 г. ISSN 2310-0435
Почтовый адрес редакции: 125315, Москва, а/я 9. e-mail: genius-media@mail.ru; тел.: +7 (495) 518-1451.
Формат 210x290 мм. Бумага офсетная.
Подписано в печать 20.03.2018. Тираж 300 экз. Отпечатано в типографии «ПКФ «СОЮЗ-ПРЕСС», Ярославль.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»
ООО Издательство «Гениус Медиа».

Federal State Budgetary Scientific Institution
«Institute of General Pathology and Pathophysiology»

PATHOGENESIS

Journal of Basic and Applied Medicine

Founded in 2003
Quarterly issue

Volume 16, №1, 2018

January—March

Editor-in-Chief
A.A. KUBATIEV (Moscow)

Co-editors
A.M. Dygay (Tomsk), E.A. Korneva (Saint-Petersburg), S.G. Morozov (Moscow)

Secretary
M.Yu. Karganov, P.F. Litvitsky, I.Yu. Malyshev (Moscow)

Editorial board
Archakov A.I. (Moscow), Aftanas L.I. (Novosibirsk), Baranov V.M. (Moscow), Beregovykh V.V. (Moscow), Bobryshev Y.V. (Sydney, Australia), Ginter E.K. (Moscow), Grachev S.V. (Moscow), Downey H.F. (Fort Worth, USA), Kashkin K.P. (Moscow), Kzhyshkowska J.G. (Heidelberg, Germany), Kolesnikov S.I. (Moscow), Kushlinskii N.E. (Moscow), Manukhina E.B. (Fort Worth, USA), Ninkina N.N. (Cardiff, United Kingdom), Novitskiy V.V. (Tomsk), Paltsev M.A. (Moscow), Panchenko L.F. (Moscow), Petrov V.I. (Volgograd), Puzyrev V.P. (Tomsk), Revishvili A.Sh. (Moscow), Repin V.S. (Moscow), Sandrikov V.A. (Moscow), Sofronov G.A. (Saint-Petersburg), Sukhikh G.T. (Moscow), Tutelian V.A. (Moscow), Ugriumov M.V. (Moscow), Frank G.A. (Moscow), Chereshnev V.A. (Ekaterinburg), Chekhonin V.P. (Moscow), Shabalin V.N. (Moscow), Shvets V.I. (Moscow), Shliakhto E.V. (Saint-Petersburg), Yurkiv V.A. (Moscow)

Publish Department chief Irishkin D.A.
Scientific editor Pankova N.B.
Technical editor Komarova A.K.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ОБЗОРЫ

- Васильев А.О., Ширяев А.А., Говоров А.В., Демин А.А.,
Окишев А.В., Сидоренков А.В., Пушкарь Д.Ю.
Биомаркеры в ранней диагностике рака предстательной железы 4
- Масальцев А.К., Бородулин В.Б.
Модели развития кальций-оксалатного и кальций-фосфатного
уролитиаза в условиях эксперимента 11
- Лямина Н.П., Карпова Э.С., Котельникова Е.В.
Маркеры ишемии миокарда: патофизиологическое обоснование
клинического применения 17

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Мелашенко О.Б., Меньяло М.Е., Мелашенко В.В.,
Газатова Н.Д., Гончаров А.Г., Селедцов В.И.
Прямые эффекты эритропоэтина на функциональные свойства
макрофагальных клеток человека 26
- Еськова А.Ю., Большакова О.В., Голубинская Е.П.,
Кубышкин А.В., Бессалова Е.Ю., Фомочкина И.И.
Регенерация глубоких резаных ран кожи
при различных вариантах местной терапии 34
- Затолокина М.А., Кузнецов С.Л.
К вопросу адаптации параневральных соединительнотканых
структур периферических нервов при повышенных
физических нагрузках или ограничении движений 42
- Иванова Е.А., Золотов Н.Н., Позднев В.Ф., Воронина Т.А.
Активность дипептидилпептидазы IV
при экссудативном воспалении у грызунов 51

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Першина О.В., Пахомова А.В., Ермакова Н.Н.,
Рыбалкина О.Ю., Крупин В.А., Пан Э.С., Ваизова О.Е.,
Кравченко А.И., Самойлова Ю.Г., Ротканк М.А.,
Дыгай А.М., Скурихин Е.Г.
Циркулирующие стволовые и прогениторные клетки как маркеры
воспаления, регенерации эндотелия и прогноза развития
сосудистых осложнений при метаболическом синдроме
и сахарном диабете 1 и 2 типа 58
- Байке Е.В., Уразова О.И.
Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия
у больных хроническим гнойным средним отитом 68

НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

- Бойко А.В., Геворков А.Р., Олтаржевская Н.Д.,
Швец В.И., Шашков С.В.
Применение биополимерных материалов
для направленного подведения лекарств в терапии сопровождения
лучевого лечения больных с опухолями головы и шеи 76

ЛЕКЦИИ

- Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б.
О регенерации мозга (Лекция II) 83

ИНФОРМАЦИЯ

- Правила оформления статей в журнале «Патогенез» 92

REVIEWS

- Vasilyev A.O., Shiryayev A.A., Govorov A.V., Demin A.A.,
Okishev A.V., Sidorenkov A.V., Pushkar D.Yu.
Biomarkers in early diagnosis of prostate cancer 4
- Masaltsev A.K., Borodulin V.B.
Models for development of calcium-oxalate and calcium-phosphate
uroolithiasis in experimental conditions 11
- Lyamina N.P., Karpova E.S., Kotelnikova E.V.
Markers of myocardial ischemia: pathophysiological substantiation
of clinical application. 17

EXPERIMENTAL RESEARCHES

- Melashchenko O.B., Meniailo M.E., Malashchenko V.V.,
Gazatova N.D., Goncharov A.G., Seledtsov V.I.
Directs effects of erythropoietin on functional properties
of human monocytes/macrophages 26
- Yeskova A.Yu., Bolshakova O.V., Golubinskaya Ye.P.,
Kubyshkin A.V., Bessalova Ye.Yu., Fomochkina I.I.
Regeneration of deep cut wounds of the skin
with different options of local treatment. 34
- Zatolokina M.A., Kuznetsov S.L.
On adaptation of paraneural, connective-tissue structures
of peripheral nerves to strenuous exercise
or limitation of movements 42
- Ivanova E.A., Zolotov N.N., Pozdnev V.F., Voronina T.A.
Alteration of dipeptidyl peptidase IV activity
in rodents with exudative inflammation 51

CLINICAL RESEARCHES

- Pershina O.V., Pakhomova A.V., Ermakova N.N.,
Rybalkina O.Yu., Krupin V.A., Pan E.S., Vaizova O.E.,
Kravchenko A.I., Samoilova J.G., Rotkang M.A.,
Dygai A.M., Skurikhin E.G.
Circulating stem and progenitor cells
as markers of inflammation, endothelial regeneration,
and prediction of vascular complications in metabolic syndrome
and type 1 and 2 diabetes mellitus 58
- Bayke E.V., Urazova O.I.
Lymphocyte-platelet adhesion
in patients with chronic suppurative otitis media 68

NEW TECHNOLOGIES

- Boyko A.V., Gevorkov A.R., Oltarzhenskaya N.D.,
Shvets V.I., Shashkov S.V.
Biopolymeric materials for targeted administration of drugs
in the therapy accompanying radiation treatment
of patients with head and neck tumor. 76

LECTURES

- Paltsyn A.A., Sviridkina N.B.
About regeneration of the brain (Lecture II) 83

INFORMATION

- Guidelines for Authors 92

УДК 616.65

Биомаркёры в ранней диагностике рака предстательной железы

Васильев А.О.¹, Ширяев А.А.¹, Говоров А.В.¹, Демин А.А.¹,
Окишев А.В.¹, Сидоренков А.В.², Пушкарь Д.Ю.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

² Городская клиническая больница имени С.И.Спасокукоцкого Департамента здравоохранения города Москвы. 127206, Москва, ул. Вучетича, д. 21

Высокие темпы развития методов лабораторной диагностики позволили внедрить в клиническую практику различные биомаркёры рака предстательной железы, однако по-прежнему одной из самых актуальных проблем остается сложность визуализации опухолевых очагов. Как следствие, биопсия предстательной железы выполняется часто лишь на основании повышенного уровня простат-специфического антигена и данных пальцевого ректального исследования, что далеко не всегда позволяет дифференцировать suspicious участки, и забор материала производится из стандартных зон. Существует альтернатива — биопсия под контролем МРТ, однако присущие временные и финансовые затраты накладывают существенные ограничения на широкое использование данной методики. Внедрение новых биомаркёров позволит создать персонализированный подход в диагностике, лечении и прогнозировании течения рака предстательной железы у каждого конкретного пациента.

Ключевые слова: рак предстательной железы, диагностика, скрининг, современные методы диагностики, методы ранней диагностики, биомаркёры.

Для цитирования: Васильев А.О., Ширяев А.А., Говоров А.В., Демин А.А., Окишев А.В., Сидоренков А.В., Пушкарь Д.Ю. Биомаркёры в ранней диагностике рака предстательной железы. Патогенез. 2018; 16(1): 4–10

DOI:

Для корреспонденции: Васильев Александр Олегович, e-mail: alexvasilyev@me.com

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 31.01.2018

Biomarkers in early diagnosis of prostate cancer

Vasilyev A.O.¹, Shiryayev A.A.¹, Govorov A.V.¹, Demin A.A.¹,
Okishev A.V.¹, Sidorenkov A.V.², Pushkar D.Yu.¹

¹ A.I.Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Delegatskaya Str. 20, Bld. 1, Moscow 127473, Russian Federation

² S.I.Spaskukotsky City Clinical Hospital, Vucheticha Str. 21, Moscow 127206, Russian Federation

Fast development of laboratory diagnostic methods has allowed introducing various biomarkers for detection of prostate cancer to clinical practice. However, difficulties in visualization of tumor foci remain one of the most urgent problems. As a result, prostatic biopsy is often performed only on a basis of elevated levels of prostate-specific antigen and data of rectal examination. These tests do not always allow to differentiate suspicious areas, and the material is taken from standard zones. An existing alternative is MRI-guided biopsy, but the related time and financial costs impose significant limitations on extensive use of this technique. Implementation of new biomarkers will create an individualized approach to diagnostics, treatment and prognosis of prostate cancer for each patient.

Key words: prostate cancer, diagnosis, screening, modern diagnostic methods, early diagnostic methods, biomarkers.

For citation: Vasilyev A.O., Shiryayev A.A., Govorov A.V., Demin A.A., Okishev A.V., Sidorenkov A.V., Pushkar D.Yu. [Biomarkers in early diagnosis of prostate cancer]. Patogenez [Pathogenesis]. 2018; 16(1): 4–10 (in Russian)

DOI:

For correspondence: Vasilyev Alexander Olegovich, e-mail: alexvasilyev@me.com

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received: 31.01.2018

Введение

Наметившаяся положительная тенденция по снижению смертности от рака предстательной железы (РПЖ) — примерно на 1—1,5% в год [1] — объясняется прогрессом как в изучении, профилактике, лечении, так и в выявлении рака. С момента открытия в 1987 г. и по сегодняшний день простат-специфический антиген (ПСА) остается самым часто используемым маркером в диагностике, стадировании, а также в послеоперационном мониторинге состояния пациентов, перенесших оперативное лечение по поводу РПЖ. Однако ПСА не является совершенным ввиду наличия большого количества ложноотрицательных результатов, неопределенных рамок референтных значений и отсутствия возможности достоверной оценки эффективности проведенного лечения. Повышение уровня ПСА может происходить как при наличии РПЖ, так и при других патологических состояниях, таких, как доброкачественная гиперплазия предстательной железы (ДГПЖ), острая задержка мочи, а также после ряда различных манипуляций и оперативных вмешательств [2].

Прогресс в молекулярной биологии, генетике и нанотехнологиях позволил внедрить в клиническую практику новые маркеры РПЖ, из которых наиболее перспективными и изученными являются -2proPSA , PSA3 и индекс здоровья простаты (PHI). Несмотря на это, вопросы гипердиагностики клинически незначимого РПЖ и позднего выявления агрессивных форм по-прежнему остаются важной проблемой онкоурологии [3, 4]. К концу 2017 г. было разработано большое количество более точных маркеров, таких как 4K тест, тест TMPRSS2-ERG, SChLAP1, SelectMDx, ConfirmMDx и ELAVL1 и другие. Данные маркеры могут быть актуальны при определении необходимости проведения первичной или повторной биопсии предстательной железы, а также при выявлении метастазирования и биохимического рецидива РПЖ. Ряд биомаркеров, выделенных из крови, мочи, эякулята или ткани предстательной железы, могут быть полезны в принятии решения относительно целесообразности биопсии, снижении частоты ненужных биопсий и выявлении клинически значимого рака. В данной статье приводится описание биомаркеров РПЖ, роль которых в диагностике заболевания была подтверждена проведенными клиническими исследованиями. Отдельный раздел статьи посвящен новейшим геномным маркерам РПЖ. Частично материалом данного раздела послужил прошедший в конце января 2018 г. в Амстердаме (Голландия) очередной конгресс ESOU (European Society of Oncological Urology).

Генетический биомаркер рака простаты PSA3 и тест ProgenSA

Одним из перспективных методов ранней неинвазивной диагностики РПЖ являются тест-системы, основанные на количественном анализе РНК-продукта гена PSA3 , гиперэкспрессия которого наблюдается при малигнизации ткани предстательной железы. В непораженных клетках предстательной железы и клетках доброкачественной гиперплазии ген PSA3 присутствует в минимальных количествах. РНК-продукт гена PSA3 может присутствовать в моче и эякуляте, что предусматривает использование данных биологических жидкостей для неинвазивной диагностики РПЖ [5]. Тест ProgenSA отражает уро-

вень PSA3 , обнаруженного в образцах мочи пациента после пальцевого ректального исследования (ПРИ). Показателем для взятия анализа PSA3 является наличие в анамнезе мужчины (старше 50 лет) одной или более биопсий предстательной железы с отрицательным результатом и сохраняющимся подозрением на РПЖ. Значение PSA3 ниже 25 свидетельствует о меньшей вероятности обнаружения РПЖ при последующей повторной биопсии простаты.

В то время как многочисленные исследования показывают, что PSA3 с большей точностью позволяет выявлять РПЖ при повторной биопсии по сравнению с oPSA и svPSA [6, 7], некоторые авторы подчеркивают эффективность PSA3 в диагностике клинически значимого рака при первичной биопсии [8, 9]. Проведя исследование с участием 859 мужчин, J. Wei с соавторами сообщили, что при значении PSA3 ниже или равном 20 у пациентов с первичной негативной биопсией можно избежать до 46% повторных биопсий при проценте пропущенных случаев клинически значимого РПЖ не более 3%. Однако при использовании того же порога PSA3 будет пропущено до 13% клинически значимого рака при первичной биопсии [10].

Было показано, что PSA3 не отражает ухудшения общего состояния или наличия осложнений у пациентов, находящихся под активным наблюдением или перенесших радикальную простатэктомию (РПЭ) [11, 12]. Результаты исследования F. Porpiglia и соавторов [13] в некоторой степени ограничивают диагностическую ценность PSA3 . Выполнив 120 пациентам, подходящим под активное наблюдение, РПЭ, авторы пришли к выводу, что предоперационное МРТ и определение PHI имели более высокую диагностическую ценность в выявлении клинически значимого рака по сравнению с PSA3 . Также установлено, что PHI превосходит PSA3 в прогнозировании клинически значимого РПЖ, обнаруженного в последующем при биопсии и РПЭ [14, 15]. Описанные примеры предопределяют применение PSA3 в сочетании с другими маркерами РПЖ и методами диагностики. Так, например, сочетанное использование PSA3 и мультипараметрической МРТ (мпМРТ), по мнению M. Fenstermaker и соавторов [16], значительно увеличивает частоту выявления клинически значимого РПЖ.

На основе PSA3 было разработано несколько номограмм, включая PCPTRC (Prostate Cancer Prevention Trial Risk Calculator). По мнению H. Dani и S. Loeb [17], использование подобной номограммы позволит избежать до 55% ненужных биопсий при доле пропущенных клинически значимых случаев РПЖ, не превышающей 2%.

Биохимические и геномные маркеры рака предстательной железы

Целесообразность внедрения в протоколы ранней диагностики РПЖ биохимических и геномных маркеров обусловлена сохраняющимся высоким процентом гипердиагностики заболевания. По мнению B. Djavan, к перспективным ДНК-маркерам, отвечающим за наследственную предрасположенность к РПЖ, может быть отнесен ряд мутированных генов — BRCA1, BRCA2, HOXB13 и MSH2, а сочетание PSA3 и онкогена ERG привело к разработке нового современного РНК-маркера — молекулярного PSA3 , получение которого возможно без ПРИ.

Повышение показателей мРНК (DLX1, HOXC6, KLK3) имеет значение в прогнозировании РПЖ (с суммой баллов по Глисону 7 и выше). У пациентов с высоким риском развития РПЖ и отрицательной биопсией в анамнезе FDA была одобрена комбинация PCA3 и TMPRSS2-ERG. Экзосомный анализ комбинации данных маркеров включен в руководства NCCN (National Comprehensive Cancer Network). Клиническая эффективность представленных маркеров еще не оценена, однако уже сейчас, по мнению автора, определение специфичности ДНК- и РНК-маркеров позволит активнее выявлять пациентов с высоким риском развития РПЖ, дифференцировать клинически значимый и клинически незначимый рак, что, в свою очередь, упростит и ускорит начало своевременной и правильно подобранной терапии [18]. Поиск новых биохимических маркеров позволил выделить гликопротеиновый простат-специфический мембранный антиген (PSMA), что привело к внедрению специальных PSMA-рентгенографических устройств с целью визуализации и выявления пораженных лимфатических узлов, в том числе интраоперационно [19].

ПроПСА и РН1

Простат-специфический антиген образуется из неактивного предшественника, который содержит основную последовательность из 7 аминокислот, известную как [-7]проПСА. Активация происходит посредством расщепления его основной последовательности 7 и более аминокислот с помощью калликреинов 2 и 4 с образованием зрелой молекулы ПСА из 237 аминокислот. Частичное расщепление этой основной последовательности приводит к появлению различных изоформ проПСА в зависимости от того, сколько аминокислот остаются связанными с молекулой ПСА. Чаще всего это [-4]проПСА, [-5]проПСА и [-2]проПСА. Было обнаружено, что вариант [-2]проПСА является наиболее устойчивым в сыворотке и распространенным среди изоформ проПСА [3, 4].

В 2009 г. D. Makarov и соавторы [20] показали, что анализ крови на [-2]проПСА позволяет определить, у каких пациентов может развиваться агрессивный РПЖ при активном наблюдении, а у каких можно прогнозировать появление так называемой «неблагоприятной» контрольной биопсии (выявление при контрольной биопсии аденокарциномы 7 и более баллов по Глисону, наличие 3 и более позитивных столбиков или выявление РПЖ в более 50% ткани любого столбика). На основании данного анализа был разработан индекс здоровья простаты — Prostate Health Index (РН1), математическая формула которого построена на различных соотношениях специфических биомаркеров (оПСА, свПСА и [-2]ПроПСА). РН1 представляется перспективным, неинвазивным биомаркером, который может повысить частоту обнаружения РПЖ и предоставить прогностическую информацию относительно имеющегося заболевания.

Многочисленные исследования продемонстрировали высокую эффективность РН1 по сравнению с оПСА и свПСА [21–23]. W. Catalona и соавторы [21] опубликовали результаты крупного мультицентрового исследования, в которое было включено 892 пациента, перенесших трансректальную биопсию предстательной железы. У всех пациентов отсутствовали изменения по данным ПРИ, а уровень оПСА был в интервале 2–10 нг/мл. Авторы сделали выводы, что чувствительность и специфичность РН1

(на основании площади ROC-кривых) превышает значения оПСА, свПСА, [-2]проПСА и %свПСА в диагностике клинически значимого РПЖ, а также сопряжены с более высоким баллом по шкале Глисона. Повышение экономической эффективности скрининга с помощью РН1 было подтверждено в многоцентровом проспективном исследовании, в которое было включено 658 мужчин с уровнем оПСА от 4 до 10 нг/мл [22]. В ходе работы было показано, что при пороговом значении РН1 28,6 диагноз РПЖ (сумма Глисона 3+4 и 4+3) будет пропущен лишь в 4,8% и 1,2% случаев. Тем не менее, более 30% пациентов с ДГПЖ смогут избежать повторной биопсии предстательной железы, в то время как при использовании оПСА количество данных пациентов не превышает 21,7%.

G. Lughezzani и соавторы [24] разработали номограмму с использованием таких критериев, как возраст, объем предстательной железы, ПРИ, предшествующие биопсии в анамнезе и РН1. По мнению авторов, использование данной номограммы превосходит базовое исследование с использованием только лишь одного оПСА и позволяет эффективнее прогнозировать клинически значимый рак. Внедрение РН1 в номограмму ERSPCRC (European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer Risk Calculator) также улучшило прогнозирование клинически значимого РПЖ (AUC 0,78 против 0,72, $p = 0,04$) [25].

В настоящее время анализ РН1 предоставляет прогностическую информацию как самостоятельный метод диагностики и скрининга. РН1 может быть полезным как для включения пациентов в группу активного наблюдения, так и для отслеживания динамики заболевания и определения показаний к проведению повторной биопсии [3].

4Kscore

4Kscore определяется по уровню четырех калликреинов в сыворотке крови: оПСА, свПСА, интактного ПСА и калликреина 2 в сочетании с клинической информацией (возраст, данные ПРИ, результат биопсии). 4Kscore позволяет прогнозировать риск наличия у пациента агрессивного РПЖ (сумма баллов по шкале Глисона 7 и более) [17].

D. Lin и соавторами [26] было проведено проспективное мультицентровое исследование (Catalan PASS), основной целью которого было сравнение эффективности 4Kscore и ПСА в прогнозировании РПЖ высокой степени злокачественности у больных, находящихся под активным наблюдением. Оценка конечного результата учитывала повышение суммарного балла по шкале Глисона (7 и более) после первичной биопсии. По результатам обследования 718 пациентов было показано, что использование 4Kscore позволяет с большей точностью прогнозировать повышение исходного балла Глисона (AUC 0,78 против 0,74) при второй биопсии. Сравнительная эффективность в прогнозировании повышении балла Глисона при последующих биопсиях не выявила преимуществ прогностической ценности 4Kscore по сравнению с ПСА (AUC 0,75 против 0,76).

Информативность 4Kscore в прогнозировании агрессивного РПЖ была оценена S. Zappala и соавторами [27]. Проспективное исследование было проведено в 26 урологических отделениях США с включением данных 1012 пациентов. 4Kscore был рассчитан для каждого пациента с учетом или без учета данных ПРИ. Влияние данных ПРИ на прогностическую ценность метода было оценено

при помощи площади под кривой (AUC-ROC); оценка конечного результата включала выявление РПЖ с суммой баллов по Глисон 7 и более. Агрессивный РПЖ был выявлен у 231 (23%) пациента, статистически значимой разницы между моделями 4Kscore с ПРИ и без ПРИ не было обнаружено (AUC 0,821 против 0,818).

Сравнительный анализ показал, что решение по поводу биопсии предстательной железы, принятое на основании данных 4Kscore, было ассоциировано с большей экономической выгодой за счет уменьшения количества «ненужных» биопсий по сравнению с группой больных, перенесших биопсию на основании одного лишь ПСА [28].

Эффективность 4Kscore была оценена в сравнении с некоторыми калькуляторами риска РПЖ, такими как PCPTRC 2.0 (Prostate Cancer Prevention Trial Risk Calculator) и ERSPC-RC 4 (European Research Screening Prostate Cancer Risk Calculator 4) [29]. В исследование был включен 51 пациент, перенесший биопсию предстательной железы (минимум 10 точек) с последующей оценкой биоптатов четырьмя независимыми морфологами. У 22 (43%) пациентов при патоморфологическом исследовании был выявлен РПЖ, из них у 5 (23%) — высокой степени злокачественности. Вероятность обнаружения РПЖ значительно различалась между 4Kscore, PCPTRC 2.0 и ERSPC-RC 4 ($p = 0,022$).

В проспективное рандомизированное исследование ProtecT (Prostate Testing for Cancer and Treatment) [30] было включено 6129 пациентов с уровнем оПСА 3 нг/мл и выше, перенесших биопсию простаты. В ходе проведенного исследования авторы пришли к выводу, что использование 4Kscore позволяет прогнозировать РПЖ высокой степени злокачественности (AUC 4Kscore 0,820, %свПСА 0,799 и оПСА 0,738, $p < 0,001$). Используя пороговое значение 4Kscore, равное 6%, возможно избежать до 43% «ненужных» биопсий, при пропуске только 11% случаев РПЖ высокой степени злокачественности.

TMPRSS2-ERG (T2:ERG)

TMPRSS2 представляет собой андрогенозависимый ген и является специфичным для РПЖ. В большом количестве ген определяется в моче после ПРИ, а также в образцах ткани предстательной железы после биопсии и РПЭ. В мультицентровом исследовании, включавшем данные 1312 мужчин, T2:ERG продемонстрировал большую диагностическую точность, чем оПСА. Сам по себе этот метод мало информативен, но в сочетании с ПСА (10 нг/мл и выше) и PSA3 T2:ERG в несколько раз увеличивает вероятность выявления РПЖ [31, 32].

Доступный для клинического применения тест MiPS (Mi-Prostate Score) был разработан для прогнозирования риска развития РПЖ. Данный тест включает в себя данные общего ПСА сыворотки крови, PSA3 и TMPRSS2-ERG. В 2016 г. S. Tomlins и соавторы [33] провели сравнительную оценку эффективности отдельных компонентов, входящих в состав теста MiPS, и PCPTRC в прогнозировании риска развития РПЖ. В исследование было включено 1244 пациента, у которых анализ мочи был собран после ПРИ. Было показано, что тест MiPS в значительной степени превосходит оПСА и PSA3 (AUC 0,747, $p < 0,001$), оПСА и T2:ERG (AUC 0,729, $p < 0,01$), а также оПСА (AUC 0,651, $p < 0,001$) в качестве единственного маркера РПЖ. Полученные данные были равноценны у пациентов с первичной и повторной биопсией. Ком-

бинация MiPS-PCPTRC позволяет избежать до 47% «ненужных» биопсий при пропущенных 1,0 — 2,3% случаев РПЖ.

MiPS является многообещающим и перспективным тестом для скрининга РПЖ, тем не менее, для окончательного внедрения данного теста в клиническую практику необходимо проведение сравнительных исследований с другими биомаркерами, такими, как PHI и 4Kscore.

SelectMDx

SelectMDx — это еще один коммерчески доступный тест, основанный на анализе двух генов мочи (HOXC6 и DLX1), используемый для выявления РПЖ высокой степени злокачественности (сумма Глисона 7 и более). Существующие рекомендации подразумевают его применение у пациентов, которым показана биопсия простаты или которые ранее имели отрицательные биопсии, несмотря на факторы риска РПЖ (изменения простаты по данным ПРИ, наследственный фактор или высокий уровень оПСА). Данный тест был разработан L. Van Neste и соавторами [34] и в последующем оценен в когорте из 386 пациентов. Авторами было показано, что до 42% биопсий можно было бы избежать, при этом было бы пропущено 2% случаев РПЖ с суммой баллов по шкале Глисона 7 и более.

ConfirmMDx

ConfirmMDx является тканевым биомаркером, в основе которого лежит оценка трёх биомаркеров, ассоциированных с РПЖ — GSTP1, APC и RASSF1. Данный маркер позволяет выявить клинически значимый РПЖ у пациентов с отрицательной биопсией. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что по уровню ConfirmMDx возможно прогнозировать риск обнаружения РПЖ при повторной биопсии с вероятностью до 90% [17].

В отличие от других коммерчески доступных маркеров, содержание которых оценивают в опухолевой ткани для принятия решения о необходимости лечения, ConfirmMDx является единственным маркером, с помощью которого можно прогнозировать вероятность РПЖ, исследуя при этом доброкачественную ткань. В рекомендациях NCCN (National Comprehensive Cancer Network) ConfirmMDx обозначен как дополнительный метод, позволяющий принять решение о целесообразности повторной биопсии. Тем не менее, на сегодняшний день отсутствуют исследования, сравнивающие ConfirmMDx с мпМРТ с позиций экономической выгоды [17, 35].

Эффективность ConfirmMDx в прогнозировании РПЖ была подтверждена в исследовании MATLOC (Великобритания — Бельгия), включавшем 483 пациента с отрицательными результатами биопсии в анамнезе [36]. Отрицательная прогностическая ценность составила 90%. В работе [35] отрицательная прогностическая ценность ConfirmMDx составила 88%; авторы также сообщили о 2,5-кратном увеличении риска выявления РПЖ у пациентов ($n = 320$) при повторной биопсии.

ELAVL1 и другие маркеры

ELAVL1 представляет собой РНК-связывающий белок, продуцируемый в различных тканях, в том числе предстательной железе, и являющийся независимым прогностическим биомаркером у больных РПЖ, показателем

неблагоприятного фенотипа опухоли либо раннего рецидива РПЖ после проведенного лечения [37].

Проведенные экспериментальные исследования *in vitro* на культуре клеток предстательной железы позволили открыть новые биомаркеры РПЖ. Доказана роль ряда белков человеческого организма, таких, как CD151, DIAPH3, Ruxp2 и многих других в ранней диагностике РПЖ, определении показаний к проведению повторной биопсии и риска развития агрессивного РПЖ [38].

Активное развитие протеомики в совокупности с лабораторной диагностикой привело к обнаружению более 200 потенциальных биомаркеров РПЖ. Каждый маркер РПЖ или тест, создаваемый на основе уже имеющихся маркеров, может быть классифицирован в группу диагностических (скрининговых) маркеров, прогностических или группу маркеров стратификации.

Заключение

Несмотря на высокие темпы развития методов лабораторной диагностики РПЖ, по-прежнему одной из самых актуальных проблем при выявлении рака остается сложность визуализации опухолевых очагов. Как следствие, биопсия предстательной железы выполняется часто лишь на основании повышенного уровня ПСА и данных пальцевого ректального исследования, что далеко не всегда позволяет четко дифференцировать suspicious участки, и забор материала производится из стандартных зон. Существует альтернатива — биопсия под контролем МРТ, однако присущие временные и финансовые затраты накладывают существенные ограничения на широкое использование данной методики.

Внедрение новых биомаркеров позволяет создать персонализированный подход в диагностике, лечении и прогнозировании течения РПЖ у каждого конкретного пациента. В связи с отсутствием стандартизированных алгоритмов использования, необходимой аппаратуры и специалистов, некоторые из перечисленных в данной статье методов ранней диагностики РПЖ остаются недоступными в широкой практике. Остальные, несмотря на высокую прогностическую ценность, зачастую имеют малую чувствительность и специфичность. Проведение мультицентровых клинических исследований, направленных на оценку актуальности и перспектив повсеместного внедрения в клиническую практику, позволит определить место новых методов диагностики РПЖ в ряду «золотого стандарта» наряду с определением уровня ПСА и биопсией предстательной железы под контролем ТРУЗИ.

Список литературы

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. *Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году*. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ» Минздрава России, 2017.
2. Пушкарь Д.Ю., Говоров А.В., Сидоренков А.В., Прилепская Е.А., Ковылина М.В. *Ранняя диагностика рака предстательной железы. Методические рекомендации № 19*. М.: ООО Издательский дом «АБВ-пресс», 2015. 52 с.
3. Сидоренков А.В., Говоров А.В., Садченко А.В., Пушкарь Д.Ю. Диагностическая значимость [-2]proPSA и PHI (обзор литературы). *Онкоурология*. 2014; 4: 87-95.
4. Васильев А.О., Прилепская Е.А., Ковылина М.В., Говоров А.В., Садченко А.В., Сидоренков А.В., Пушкарь Д.Ю. Совре-

менные маркеры и гистологические особенности рака предстательной железы. *Урология*. 2016; 6: 164-6.

5. Bussemakers M.J., Van Bokhoven A., Verhaegh G.W., Smit F.P., Karthaus H.F., Schalken J.A., Debruyne F.M., Ru N., Isaacs W.B. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 1999; 59(23): 5975-9.
6. Haese A., de la Taille A., van Poppel H. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *Eur. Urol*. 2008; 54: 1081-8. DOI: 10.1016/j.eururo.2008.06.071.
7. Gittelman M.C., Hertzman B., Bailen J. PCA3 molecular urine test as a predictor of repeat prostate biopsy outcome in men with previous negative biopsies: a prospective multicenter clinical study. *J. Urol*. 2013; 190: 64-9. DOI: 10.1016/j.juro.2013.02.018.
8. Bradley L.A., Palomaki G.E., Gutman S. Comparative effectiveness review: prostate cancer antigen 3 testing for the diagnosis and management of prostate cancer. *J. Urol*. 2013; 190: 389-98. DOI: 10.1016/j.juro.2013.02.005.
9. Chevli K.K., Duff M., Walter P. Urinary PCA3 as a predictor of prostate cancer in a cohort of 3,073 men undergoing initial prostate biopsy. *J. Urol*. 2014; 191: 1743-8. DOI: 10.1016/j.juro.2013.12.005.
10. Wei J.T., Feng Z., Partin A.W. Can urinary PCA3 supplement PSA in the early detection of prostate cancer? *J. Clin. Oncol*. 2014; 32: 4066-2. DOI: 10.1200/JCO.2013.52.8505.
11. Salami S.S., Schmidt F., Laxman B., Regan M.M., Rickman D.S., Scherr D. Combining urinary detection of TMPRSS2:ERG and PCA3 with serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. *Urol. Oncol*. 2013; 31: 566-71. DOI: 10.1016/j.urolonc.2011.04.001.
12. Russo G.I., Regis F., Castelli T., Favilla V., Privitera S., Giardina R., Cimino S., Morgia G. A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of prostate health index and four-kallikrein panel score in predicting overall and high-grade prostate cancer. *Clinical Genitourinary Cancer*. 2017; 15(4): 429-39. DOI: 10.1016/j.clgc.2016.12.022.
13. Porpiglia F., Cantiello F., De Luca S. In-parallel comparative evaluation between multiparametric magnetic resonance imaging, prostate cancer antigen 3 and the Prostate Health Index in predicting pathologically confirmed significant prostate cancer in men eligible for active surveillance. *BJU Int*. 2016; 118: 527-34. DOI: 10.1111/bju.13318.
14. Seisen T., Roupert M., Brault D. Accuracy of the Prostate Health Index versus the urinary prostate cancer antigen 3 score to predict overall and significant prostate cancer at initial biopsy. *Prostate*. 2015; 75: 103-11. DOI: 10.1002/pros.22898.
15. Ferro M., Lucarelli G., Bruzzese D. Improving the prediction of pathologic outcomes in patients undergoing radical prostatectomy: the value of prostate cancer antigen 3 (PCA3), Prostate Health Index (phi) and sarcosine. *Anticancer Res*. 2015; 35(2): 1017-123. PMID:25667489
16. Fenstermaker M., Mendhiratta N., Bjurlin M.A. Risk stratification by urinary prostate cancer gene 3 testing before magnetic resonance imaging-ultrasound fusion-targeted prostate biopsy among men with no history of biopsy. *Urology*. 2017; 99: 174-9. DOI: 10.1016/j.urology.2016.08.022.
17. Dani H., Loeb S. The role of prostate cancer biomarkers in undiagnosed men. *Curr. Opin. Urol*. 2017; 27(3): 210-26. DOI: 10.1097/MOU.0000000000000384.
18. Djava B. Prostate cancer Reflex testing with serum, urine and tissue biomarkers: Which, when and how viable? 15th Meeting of the EAU Section of Oncological Urology. *European Urology Supplements*. 2018; 17(1): 1-4.
19. Maurer T. Tools for detection of node metastasis: PSMA guided surgery. 15th Meeting of the EAU Section of Oncological Urology. *European Urology Supplements*. 2018; 17(1): 46-7.
20. Makarov D.V., Isharwal S., Sokoll L.J., Landis P., Marlow C., Epstein J.I., Partin A.W., Carter H.B., Veltri R.W. Pro-prostate-specific antigen measurements in serum and tissue are associated with treatment necessity among men enrolled in expectant management for prostate cancer. *Clin. Cancer Res*. 2009; 150: 7316-21. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1263.
21. Catalona W.J., Partin A.W., Sanda M.G. A multicenter study of [-2]pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *J. Urol*. 2011; 185: 1650-5.
22. Loeb S., Sanda M.G., Broyles D.L. The Prostate Health Index selectively identifies clinically significant prostate cancer. *J. Urol*. 2015; 193: 1163-9. DOI: 10.1016/j.juro.2014.10.121.

23. De la Calle C., Patil D., Wei J.T. Multicenter evaluation of the Prostate Health Index to detect aggressive prostate cancer in biopsy naive men. *J. Urol.* 2015; 194: 65-72. DOI: 10.1016/j.juro.2015.01.091.

24. Lughezzani G., Lazzeri M., Haese A. Multicenter European external validation of a Prostate Health Index-based nomogram for predicting prostate cancer at extended biopsy. *Eur. Urol.* 2014; 66: 906-12. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.12.005.

25. Foley R.W., Maweni R.M., Gorman L. European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) risk calculators significantly outperform the Prostate Cancer Prevention Trial (PCPT) 2.0 in the prediction of prostate cancer: a multi-institutional study. *BJU Int.* 2016; 118: 706-13. DOI: 10.1111/bju.13437.

26. Lin D.W., Newcomb L.F., Brown M.D., Sjoberg D.D., Dong Y., Brooks J.D., Carroll P.R., Cooperberg M., Dash A., Ellis W.J., Fabrizio M., Gleave M.E., Morgan T.M., Nelson P.S., Thompson I.M., Wagner A.A., Zheng Y. Evaluating the Four Kallikrein Panel of the 4Kscore for Prediction of High-grade Prostate Cancer in Men in the Canary Prostate Active Surveillance Study. *Eur. Urol.* 2017; 72(3): 448-54. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.11.017.

27. Zappala S.M., Dong Y., Linder V., Reeve M., Sjoberg D.D., Mathur V., Roberts R., Okrongly D., Newmark J., Sant G., Steiner M. The 4Kscore blood test accurately identifies men with aggressive prostate cancer prior to prostate biopsy with or without DRE information. *Int. J. Clin. Pract.* 2017; 7(6): 122-8. DOI: 10.1111/ijcp.12943.

28. Voigt J.D., Dong Y., Linder V., Zappala S. Use of the 4Kscore test to predict the risk of aggressive prostate cancer prior to prostate biopsy: Overall cost savings and improved quality of care to the us healthcare system. *Rev. Urol.* 2017; 19(1): 1-10. DOI: 10.3909/riu0753

29. Borque-Fernando A., Esteban-Escano L.M., Rubio-Briñes J., Lou-Mercade A.C., Garcia-Ruiz R., Tejero-Sanchez A., Munoz-Rivero M.V., Cabanuz-Plo T., Alfaro-Torres J., Marquina-Ibanez I.M., Hakim-Alonso S., Mejia-Urbaz E., Gil-Fabra J., Gil-Martinez P., Alvarez-Alegret R., Sanz G., Gil-Sanz M.J. A Preliminary Study of the Ability of the 4Kscore test, the Prostate Cancer Prevention Trial-Risk Calculator and the European Research Screening Prostate-Risk Calculator for Predicting High-Grade Prostate Cancer. *Actas Urol. Esp.* 2016; 40(3): 155-63. DOI: 10.1016/j.acuro.2015.09.006.

30. Bryant R.J., Sjoberg D.D., Vickers A.J., Robinson M.C., Kumar R., Marsden L., Davis M., Scardino P.T., Donovan J., Neal D.E., Lilja H., Hamdy F.C. Predicting high-grade cancer at ten-core prostate biopsy using four kallikrein markers measured in blood in the ProtecT study. *J. Natl. Cancer Inst.* 2015; 107(7): djv095. DOI: 10.1093/jnci/djv095.

31. Tomlins S.A., Bjartell A., Chinnaiyan A.M., Jenster G., Nam R.K., Rubin M.A., Schalken J.A. ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice. *Eur. Urol.* 2009; 56(2): 275-86. DOI: 10.1016/j.eururo.2009.04.036.

32. Tomlins S.A., Aubin S.M., Siddiqui J. Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript stratifies prostate cancer risk in men with elevated serum PSA. *Sci. Transl. Med.* 2011; 3: 94ra72. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001970.

33. Tomlins S.A., Day J.R., Lonigro R.J., Hovelson D.H., Siddiqui J., Kunju L.P., Dunn R.L., Meyer S., Hodge P., Grosskopf J., Wei J.T., Chinnaiyan A.M. Urine TMPRSS2:ERG Plus PCA3 for Individualized Prostate Cancer Risk Assessment. *Eur. Urol.* 2016; 70(1): 45-53. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.04.039.

34. Van Neste L., Hendriks R.J., Dijkstra S. Detection of high-grade prostate cancer using a urinary molecular biomarker-based risk score. *Eur. Urol.* 2016; 70: 740-8. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.04.012.

35. Partin A.W., Van Neste L., Klein E.A. Clinical validation of an epigenetic assay to predict negative histopathological results in repeat prostate biopsies. *J. Urol.* 2014; 192: 1081-7. DOI: 10.1016/j.juro.2014.04.013.

36. Stewart G.D., Van Neste L., Delvenne P. Clinical utility of an epigenetic assay to detect occult prostate cancer in histopathologically negative biopsies: results of the MATLOC study. *J. Urol.* 2013; 189: 1110-6. DOI: 10.1016/j.juro.2012.08.219.

37. Melling N., Taskin B., Hube-Magg C., Kluth M., Minner S., Koop C., Grob T., Graefen M., Heinzer H., Tsourlakis M.C., Izbicki J., Wittmer C., Huland H., Simon R., Wilczak W., Sauter G., Steurer S., Schlomm T., Krech T. Cytoplasmic accumulation of ELAVL1 is an independent predictor of biochemical recurrence associated with genomic instability in prostate cancer. *Prostate.* 2016; 76(3): 259-72. DOI: 10.1002/pros.23120.

38. Hori S.S., Lutz A.M., Paulmurugan R., Gambhir S.S. A Model-Based Personalized Cancer Screening Strategy for Detecting Early-Stage Tumors Using Blood-Borne Biomarkers. *Cancer Res.* 2017; 77(10): 2570-84. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2904.

References

1. Kaprin A.D., Starinskii V.V., Petrova G.V. [Status of oncological care for the population of Russia in 2016]. Moscow: MSROI na PA Ger-tcen — Filial NMRCR MH RF, 2017. (In Russian)

2. Pushkar' D.Y., Govorov A.V., Sidorenkov A.V. Prilepskaya E.A., Kovilina M.V. [Early diagnostic of prostate cancer. Guidelines №19]. M.: Publishing house «ABV-press». 2015, 52 p. (In Russian)

3. Sidorenkov A.V., Govorov A.V., Sadchenko A.V., Pushkar' D.Y. [The diagnostic value of [-2]proPSA and PHI (review)]. *Onkourologiya [Oncology]*. 2014; 4: 87-95. (In Russian)

4. Vasil'yev A.O., Prilepskaya E.A., Kovilina M.V., Govorov A.V., Sadchenko A.V., Sidorenkov A.V., Pushkar' D.Y. [Modern markers and histological features of prostate cancer]. *Urologiya [Urology]*. 2016; 6: 164-6. (In Russian)

5. Bussemakers M.J., Van Bokhoven A., Verhaegh G.W., Smit F.P., Karthaus H.F., Schalken J.A., Debruyne F.M., Ru N., Isaacs W.B. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* 1999; 59(23): 5975-9.

6. Haese A., de la Taille A., van Poppel H. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *Eur. Urol.* 2008; 54: 1081-8. DOI: 10.1016/j.eururo.2008.06.071.

7. Gittelman M.C., Hertzman B., Bailen J. PCA3 molecular urine test as a predictor of repeat prostate biopsy outcome in men with previous negative biopsies: a prospective multicenter clinical study. *J. Urol.* 2013; 190: 64-. DOI: 10.1016/j.juro.2013.02.018.

8. Bradley L.A., Palomaki G.E., Gutman S. Comparative effectiveness review: prostate cancer antigen 3 testing for the diagnosis and management of prostate cancer. *J. Urol.* 2013; 190: 389-98. DOI: 10.1016/j.juro.2013.02.005.

9. Chevli K.K., Duff M., Walter P. Urinary PCA3 as a predictor of prostate cancer in a cohort of 3,073 men undergoing initial prostate biopsy. *J. Urol.* 2014; 191: 1743-8. DOI: 10.1016/j.juro.2013.12.005.

10. Wei J.T., Feng Z., Partin A.W. Can urinary PCA3 supplement PSA in the early detection of prostate cancer? *J. Clin. Oncol.* 2014; 32: 4066-472. DOI: 10.1200/JCO.2013.52.8505.

11. Salami S.S., Schmidt F., Laxman B., Regan M.M., Rickman D.S., Scherr D. Combining urinary detection of TMPRSS2:ERG and PCA3 with serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. *Urol. Oncol.* 2013; 31: 566-71. DOI: 10.1016/j.urolonc.2011.04.001.

12. Russo G.I., Regis F., Castelli T., Favilla V., Privitera S., Giardina R., Cimino S., Morgia G. A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of prostate health index and four-kallikrein panel score in predicting overall and high-grade prostate cancer. *Clinical Genitourinary Cancer.* 2016; S1558-7673(16)30368-8.

13. Porpiglia F., Cantiello F., De Luca S. In-parallel comparative evaluation between multiparametric magnetic resonance imaging, prostate cancer antigen 3 and the Prostate Health Index in predicting pathologically confirmed significant prostate cancer in men eligible for active surveillance. *BJU Int.* 2016; 118: 527-34. DOI: 10.1111/bju.13318.

14. Seisen T., Roupert M., Brault D. Accuracy of the Prostate Health Index versus the urinary prostate cancer antigen 3 score to predict overall and significant prostate cancer at initial biopsy. *Prostate.* 2015; 75: 103-11. DOI: 10.1002/pros.22898.

15. Ferro M., Lucarelli G., Bruzzese D. Improving the prediction of pathologic outcomes in patients undergoing radical prostatectomy: the value of prostate cancer antigen 3 (PCA3), Prostate Health Index (phi) and sarcosine. *Anticancer Res.* 2015; 35: 1017-23.

16. Fenstermaker M., Mendhiratta N., Bjurlin M.A. Risk stratification by urinary prostate cancer gene 3 testing before magnetic resonance imaging-ultrasound fusion-targeted prostate biopsy among men with no history of biopsy. *Urology.* 2017; 99: 174-9. DOI: 10.1016/j.urology.2016.08.022.

17. Dani H., Loeb S. The role of prostate cancer biomarkers in undiagnosed men. *Curr. Opin. Urol.* 2017; 27(3): 210-6. DOI: 10.1097/MOU.0000000000000384.

18. Djavan B. Prostate cancer Reflex testing with serum, urine and tissue biomarkers: Which, when and how viable? 15th Meeting of the EAU Section of Oncological Urology. *European Urology Supplements.* 2018; 17(1): 1-4.

19. Maurer T. Tools for detection of node metastasis: PSMA guided surgery. 15th Meeting of the EAU Section of Oncological Urology. *European Urology Supplements.* 2018; 17(1): 46-47.

20. Makarov D.V., Isharwal S., Sokoll L.J., Landis P., Marlow C., Epstein J.I., Partin A.W., Carter H.B., Veltri R.W. Pro-prostate-specific antigen measurements in serum and tissue are associated with treatment necessity among men enrolled in expectant management for pro-

state cancer. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15(10): 7316-21. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1263.

21. Catalona W.J., Partin A.W., Sanda M.G. A multicenter study of [2]pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *J. Urol.* 2011; 185: 1650-5.

22. Loeb S., Sanda M.G., Broyles D.L. The Prostate Health Index selectively identifies clinically significant prostate cancer. *J. Urol.* 2015; 193: 1163-9. DOI: 10.1016/j.juro.2014.10.121.

23. De la Calle C., Patil D., Wei J.T. Multicenter evaluation of the Prostate Health Index to detect aggressive prostate cancer in biopsy naive men. *J. Urol.* 2015; 194: 65-72. DOI: 10.1016/j.juro.2015.01.091.

24. Lughezzani G., Lazzeri M., Haese A. Multicenter European external validation of a Prostate Health Index-based nomogram for predicting prostate cancer at extended biopsy. *Eur. Urol.* 2014; 66: 906-12. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.12.005.

25. Foley R.W., Maweni R.M., Gorman L. European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) risk calculators significantly outperform the Prostate Cancer Prevention Trial (PCPT) 2.0 in the prediction of prostate cancer: a multi-institutional study. *BJU Int.* 2016; 118: 706-13. DOI: 10.1111/bju.13437.

26. Lin D.W., Newcomb L.F., Brown M.D., Sjoberg D.D., Dong Y., Brooks J.D., Carroll P.R., Cooperberg M., Dash A., Ellis W.J., Fabrizio M., Gleave M.E., Morgan T.M., Nelson P.S., Thompson I.M., Wagner A.A., Zheng Y. Evaluating the Four Kallikrein Panel of the 4Kscore for Prediction of High-grade Prostate Cancer in Men in the Canary Prostate Active Surveillance Study. *Eur. Urol.* 2017; 72(3): 448-54. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.11.017.

27. Zappala S.M., Dong Y., Linder V., Reeve M., Sjoberg D.D., Mathur V., Roberts R., Okrongly D., Newmark J., Sant G., Steiner M. The 4Kscore blood test accurately identifies men with aggressive prostate cancer prior to prostate biopsy with or without DRE information. *Int. J. Clin. Pract.* 2017; 71(6): 122-8. DOI: 10.1111/ijcp.12943.

28. Voigt J.D., Dong Y., Linder V., Zappala S. Use of the 4Kscore test to predict the risk of aggressive prostate cancer prior to prostate biopsy: Overall cost savings and improved quality of care to the us healthcare system. *Rev. Urol.* 2017; 19(1): 1-10.

29. Borque-Fernando A., Esteban-Escano L.M., Rubio-Briónes J., Lou-Mercade A.C., Garcia-Ruiz R., Tejero-Sanchez A., Muñoz-Rivero M.V., Cabanuz-Plo T., Alfaro-Torres J., Marquina-Ibanez I.M., Hakim-Alonso S., Mejía-Urbaz E., Gil-Fabra J., Gil-Martínez P., Avarez-Alegret R., Sanz G., Gil-Sanz M.J. A Preliminary Study of the Ability of the 4Kscore test, the Prostate Cancer Prevention Trial-Risk Calculator and the European Research Screening Pro-

state-Risk Calculator for Predicting High-Grade Prostate Cancer. *Actas Urol. Esp.* 2016; 40(3): 155-63. DOI: 10.1016/j.acuro.2015.09.006.

30. Bryant R.J., Sjoberg D.D., Vickers A.J., Robinson M.C., Kumar R., Marsden L., Davis M., Scardino P.T., Donovan J., Neal D.E., Lilja H., Hamdy F.C. Predicting high-grade cancer at ten-core prostate biopsy using four kallikrein markers measured in blood in the ProtecT study. *J. Natl. Cancer Inst.* 2015; 107(7): djv095. DOI: 10.1093/jnci/djv095.

31. Tomlins S.A., Bjartell A., Chinnaiyan A.M., Jenster G., Nam R.K., Rubin M.A., Schalken J.A. ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice. *Eur. Urol.* 2009; 56(2): 275-86. DOI: 10.1016/j.eururo.2009.04.036.

32. Tomlins S.A., Aubin S.M., Siddiqui J. Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript stratifies prostate cancer risk in men with elevated serum PSA. *Sci. Transl. Med.* 2011; 3: 94ra72. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001970.

33. Tomlins S.A., Day J.R., Lonigro R.J., Hovelson D.H., Siddiqui J., Kunju L.P., Dunn R.L., Meyer S., Hodge P., Grosskopf J., Wei J.T., Chinnaiyan A.M. Urine TMPRSS2:ERG Plus PCA3 for Individualized Prostate Cancer Risk Assessment. *Eur. Urol.* 2016; 70(1): 45-53. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.04.039.

34. Van Neste L., Hendriks R.J., Dijkstra S. Detection of high-grade prostate cancer using a urinary molecular biomarker-based risk score. *Eur. Urol.* 2016; 70: 740-8. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.04.012.

35. Partin A.W., Van Neste L., Klein E.A. Clinical validation of an epigenetic assay to predict negative histopathological results in repeat prostate biopsies. *J. Urol.* 2014; 192: 1081-7. DOI: 10.1016/j.juro.2014.04.013.

36. Stewart G.D., Van Neste L., Delvenne P. Clinical utility of an epigenetic assay to detect occult prostate cancer in histopathologically negative biopsies: results of the MATLOC study. *J. Urol.* 2013; 189: 1110-6. DOI: 10.1016/j.juro.2012.08.219.

37. Melling N., Taskin B., Hube-Magg C., Kluth M., Minner S., Koop C., Grob T., Graefen M., Heinzer H., Tsourlakis M.C., Izbicki J., Wittmer C., Huland H., Simon R., Wilczak W., Sauter G., Steuer S., Schlomm T., Krech T. Cytoplasmic accumulation of ELAVL1 is an independent predictor of biochemical recurrence associated with genomic instability in prostate cancer. *Prostate.* 2016; 76(3): 259-72. DOI: 10.1002/pros.23120.

38. Hori S.S., Lutz A.M., Paulmurugan R., Gambhir S.S. A Model-Based Personalized Cancer Screening Strategy for Detecting Early-Stage Tumors Using Blood-Borne Biomarkers. *Cancer Res.* 2017; 77(10): 2570-84. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2904.

Сведения об авторах:

Васильев Александр Олегович — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры урологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ширяев Арсений Александрович — ординатор кафедры урологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Говоров Александр Викторович — доктор медицинских наук, профессор кафедры урологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Демин Арсений Андреевич — аспирант кафедры урологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Окишев Артем Вячеславович — аспирант кафедры урологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Сидоренков Александр Владимирович — кандидат медицинских наук, врач-уролог Городской клинической больницы имени С.И.Спасокукоцкого Департамента здравоохранения города Москвы

Пушкарь Дмитрий Юрьевич — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой урологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

УДК 616.613-003.7-02

Модели развития кальций-оксалатного и кальций-фосфатного уролитиаза в условиях эксперимента

Масальцев А.К., Бородулин В.Б.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И.Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 410012, Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112

Мочекаменная болезнь занимает одно из ведущих мест в структуре урологических заболеваний, что позволяет отнести данное заболевание к разряду социально значимых заболеваний. Причём на долю камней, представленных оксалатами кальция, приходится 72%, доля фосфатов кальция составляет 14,7% от общего количества камней почек. Целью настоящей работы является исследование экспериментальных моделей мочекаменной болезни для выявления сходства и различия подобных процессов, протекающих у экспериментальных животных и в организме человека. В данной обзорной статье рассматриваются патофизиологические модели развития мочекаменной болезни при введении оксалата, этиленгликоля, гидроксипролина и гликолевой кислоты. Рассматриваются модели формирования кальциевого почечного камня в зависимости от наличия нефрокальциноза, нефролитиаза или наличия одновременно этих двух метаболических состояний у грызунов.

Ключевые слова: мочекаменная болезнь, фосфаты, оксалаты, экспериментальные модели мочекаменной болезни.

Для цитирования: Масальцев А.К., Бородулин В.Б. Модели развития кальций-оксалатного и кальций-фосфатного уролитиаза в условиях эксперимента. Патогенез. 2018; 16(1): 11–16

DOI:

Для корреспонденции: Масальцев Александр Константинович, e-mail: masalcev_aleksandr@mail.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 25.12.2017

Models for development of calcium-oxalate and calcium-phosphate urolithiasis in experimental conditions

Masaltsev A.K., Borodulin V.B.

V.I.Razumovsky Saratov State Medical University, Bolshaya Kazachya Str. 112, Saratov 410012, Russian Federation

Urolithiasis takes one of leading places among urological diseases, which allows attributing this disease to the category of socially significant diseases. Calcium oxalates account for 72% and calcium phosphates — 14.7% of all kidney stones. The aim of this study was to evaluate experimental models of urolithiasis to identify similarities and differences in similar processes occurring in experimental animals and humans. In this review, we focused on pathophysiological models for development of urolithiasis using administration of oxalate, ethylene glycol, hydroxyproline, and glycolic acid. We addressed modeling the formation of kidney calcium stones in rodents depending on the presence of nephrocalcinosis, nephrolithiasis or both.

Key words: urolithiasis, phosphates, oxalates, experimental models of urolithiasis.

For citation: Masaltsev A.K., Borodulin V.B. [Models for development of calcium-oxalate and calcium-phosphate urolithiasis in experimental conditions]. Patogenez [Pathogenesis]. 2018; 16(1): 11–16 (in Russian)

DOI:

For correspondence: Masaltsev Alexander Konstantinovich, e-mail: masalcev_aleksandr@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received: 25.12.2017

Введение

Мочекаменная болезнь (МКБ) занимает одно из ведущих мест в структуре урологических заболеваний в мире — 8% от общей популяции людей [1], что позволяет отнести данное заболевание к разряду социально значимых заболеваний. Необходимо отметить, что на долю камней, представленных оксалатами кальция, приходится 72%, доля фосфатов кальция составляет 14,7% от общего количества камней почек [2].

В настоящее время существуют различные точки зрения на патогенетические механизмы развития камней в почечной паренхиме. Ряд авторов делает акцент на существенную роль лизоцима и лактоферрина, которые обнаруживаются в органическом матрикссе камней поджелудочной железы, простаты и почек [3] и могут принимать активное участие в формировании и кристаллизации моногидратов оксалата. Другие авторы высказывают пред-

положение об участии минерал-органических наночастиц, которые формируются в почечных канальцах и могут выступать в качестве центров кристаллизации в процессе формирования камней [4]. Некоторыми авторами рассматривался индекс относительной перенасыщенности мочи, отражающий некоторый возможный потенциал к кальций-оксалатному литогенезу [5].

Повышение концентрации кальция в крови и в моче связывают с нарушением синтеза и метаболизма витамина D3 [6]. В свою очередь, гиперкальциурия может привести к развитию гиперфосфатурии и способствовать отложению камней-фосфатов в почечных лоханках [7].

В экспериментальных исследованиях на мышах было установлено, что этиленгликоль, особенно в присутствии хлорида аммония, оказывает нефротоксическое действие и вызывает повреждение почечных канальцев различной степени тяжести, которое впоследствии способствует образованию почечных камней. Гидроксипролин является прекурсором этиленгликоля и нарушение обмена этой важной аминокислоты, входящей в состав коллагена, также может приводить к развитию мочекаменной болезни [8–12].

Одним из основных генетических маркеров уролитиаза в настоящее время рассматривают ген фермента гидроксилазы-24 цитохрома CYP24A1, который метаболизирует витамин D [13].

Для профилактики и лечения мочекаменной болезни в настоящее время используют такие препараты, как остеопонтин, богатый аминокислотой аспаратом, и цитрат, один из ключевых метаболитов цикла трикарбоновых кислот [14].

В то же время, выяснение молекулярных процессов, лежащих в основе формирования камней в почках, а также выявление молекулярных биомаркеров, которые могли бы отражать процессы формирования камней разного состава и структуры, наряду с поиском надежных инструментальных методов исследования состава и структуры почечных камней, для более глубокого понимания патогенетических механизмов их формирования, является актуальной темой исследования для патологической физиологии.

Мочекаменная болезнь — заболевание многофакторное, и, в основном, считается связанным с факторами окружающей среды и диетой [1, 2]. Следует отметить, что среди кристаллов оксалата кальция кристаллическая форма моногидрата оксалата кальция зависит от концентрации в моче оксалата, тогда как кристаллическая форма дигидрата оксалата кальция в основном определяется концентрацией в моче кальция. Соли кальция в виде минерализованных отложений могут быть расположены в почечных чашках и лоханке, а также в медуллярных собирательных протоках [15]. Таким образом, увеличение концентрации кальция в моче, хотя и является необходимым условием, не объясняет многообразия локализации кальциевых камней в почках [16].

Было разработано несколько моделей на животных для исследования механизма формирования оксалата кальция при мочекаменной болезни у грызунов и свиней [17]. Большинство исследований было проведено на грызунах из-за простоты экспериментального материала, хотя моделирование мочекаменной болезни у данных животных приводит в основном к развитию нефрокальциноза, а не нефролитиаза. Удивительно, но очень мало иссле-

дований было проведено на трансгенных мышах для изучения ранних механизмов формирования камней в почечной паренхиме.

Рассмотрим модели формирования кальциевого почечного камня в зависимости от наличия нефрокальциноза, нефролитиаза или наличия одновременно этих двух метаболических состояний у грызунов.

Патофизиологические модели развития мочекаменной болезни при введении оксалата

Введение оксалата калия (1,5 моль/л) подкожно-осмотическим мини-насосом индуцирует нефрокальциноз у самцов крыс [18, 19]. Гипероксалурия обнаруживается в первый день, в то время как внутривисцеральные отложения двулучепреломляющих кристаллов присутствуют в основном в канальцах на 14-й день без симптомов почечной недостаточности. Интересно, что морфология почек является нормальной, хотя присутствуют локализованные области воспаления. В некоторых очаговых точках присутствуют трубчатые обломки разрушенных канальцев с вакуолизацией цитоплазмы, также обнаруживается незначительное количество регенерирующих канальцев. Во время адсорбции кристаллов в почечной паренхиме значительно увеличивается концентрация таких белков, как остеопонтин (OPN), фактор некроза опухоли (TNF) и белка почечных повреждений (KIM), что указывает на сдвиг гомеостаза обменных процессов в почечной паренхиме в сторону воспалительных явлений [18].

Также у самцов крыс одна инъекция раствора оксалата натрия (7 мг/100 г веса тела) вызывает гипероксалурию и формирование кристаллов CaO_2 в канальцах [20]. Кристаллы CaO_2 агрегируют в трубчатом просвете, что приводит к закупорке и расширению просвета, с некрозом трубчатых клеток [20].

Патофизиологические модели развития мочекаменной болезни при участии этиленгликоля, гидроксипролина и гликолевой кислоты

Введение этиленгликоля (ЭГ) является хорошо известной моделью нефрокальциноза: ЭГ метаболизируется в гликолят, глиоксилат и оксалат, что приводит к появлению кристаллов СОМ как в моче, так и в почках [21]. У крыс, получающих питьевую воду с добавкой ЭГ (0,75 об. %/Об.), развивается гипероксалурия и гиперкальциурия через один день после инициации [22].

Также индуцируется появление некоторых макромолекул, таких как OPN, бикунин или белок Tamm-Horsfall (TH), которые могут ингибировать или способствовать кальцификации [23]. Следует отметить, что метаболиты гликолята и глиоксилата, по-видимому, изменяют нормальный канальцевый эпителий, с последующей кристаллизацией солей [22]. ЭГ модель в настоящее время используется для изучения молекул связывания кристаллов, клиренса и релевантности нескольких макромолекулярных ингибиторов, таких, как OPN [22, 24, 25].

Гидроксипролин (Нур) является предшественником оксалата. В физиологических условиях Нур сначала метаболизируется в митохондриях в глиоксилат и далее метаболизируется до глицина с помощью аланинглиоксилата аминотрансферазы (AGT) или до гли-

колята с помощью гликолят-редуктазы. Наконец, гликолят окисляется до оксалата лактатдегидрогеназой (ЛДГ) [26, 27].

Обращает на себя внимание, что после 28-дневных дозровок у всех крыс развиваются отложения CaO_2 как в мозговых, так и в корковых канальцах, с некоторыми бляшками и камнями в сосочках [28]. В этой модели отложения кристаллов отмечаются признаки воспаления и повреждения почечных канальцев; OPN также обнаруживается в канальцах, окружающих кристаллы. Гиперкальциурия не является обязательной для почечных отложений CaO_2 .

Внутрибрюшинное введение гидроксипролина у крыс (2,5 г/кг) приводит к массивному отложению оксалата кальция в почечной паренхиме в течение 24 часов с развитием острой почечной недостаточности, увеличением объема и массы почек, воспалением и отеками [29].

У мышей при введении гидроксипролина обнаруживается белок Tamm-Horsfall, который синтезируется почечными канальцами и выделяется с мочой. [30, 31]. ТН считается ингибитором нефролитиаза, действующим против роста и агрегации кристаллов [1]. Действительно, мыши в возрасте от 2 до 4 месяцев имеют кристаллические отложения, расположенные в медуллярных собирающих протоках [32]. Дополнительная обработка витаминами D и EG (1% в питьевой воде) в течение одного месяца приводит к увеличению отложений кристаллов, особенно в восходящем отделе петли Генле, где ТН обычно экспрессируется. Эта модель демонстрирует физиологическую значимость белка ТН в профилактике нефрокальциноза. Некоторые исследования показывают, что присутствие Ca^{2+} -связывающих доменов и отрицательно заряженных силилированных остатков объясняет свойство ингибирования ТН-кристаллов [33].

Мыши, нокаутные по генам белков ко-транспортёров натрий/неорганический фосфат (Na/P), расположенных в проксимальных канальцах, которые опосредуют 60–70% повторной абсорбции неорганического фосфата [34] и играют главную роль в поддержании его гомеостаза, гипофосфатемичны из-за утечки неорганического фосфата через почечные канальцы, которая, в свою очередь, увеличивает синтез кальцитриола, приводя к возникновению гиперкальциурии [35].

Первичная гипероксалурия у мышей является моногенным заболеванием, в результате дефицита ферментов печени. В первичной гипероксалурии 1-го типа обнаруживается недостаточность аланин-глиоксилат-аминотрансферазы, которая катализирует превращение глиоксилата в глицин в физиологических условиях. В гипероксалурии 2-го типа два фермента являются дисфункциональными (глиоксилат-редуктаза и гидроксипируват-редуктаза), которые обычно катализируют восстановление глиоксилата до гликолята и гидроксипирувата до D-глицерата [26]. Следовательно, повышается содержание глиоксилата, который в конечном итоге окисляется до оксалата [36] и ответственен за массивную гипероксалурию, ведущую к нефрокальцинозу у человека. У мышей с дефицитом глиоксилат-редуктазы (GR), гидроксипируват-редуктазы (GRHPR), аланин-глиоксилат-аминотрансферазы (AGT KO), или нокаутированных по данным генам, развивается недостаточная утилизация глиоксилата [36], причем нефрокальциноз встречается только у 25% мышей, нокаутированных по

гену, отвечающему за синтез и активность фермента гидроксипируват-редуктазы (GRHPR). Однако после введения НуР (1% в рационе) в течение одного месяца у всех мышей, нокаутных по гену GRHPR развился тяжёлый нефрокальциноз, в то время как у мышей, нокаутных по гену аланин-глиоксилат-аминотрансферазы (AGT KO), нефрокальциноз развился только у 20% особей.

Гиперкальциурия присутствует у многих пациентов с почечными камнями (40%) и часто считается идиопатической. Гиперкальциурия приводит к пересыщению мочи солями Ca^{2+} и таким образом увеличивает факторы риска развития кальциевого камня [1, 37]. Генетически гиперкальциурические камнеобразующие крысы (GHS) имеют экскрецию кальция с мочой в 8–10 раз выше нормальных значений. Bushinsky D.A. с соавторами показали, что гиперкальциурия возникает по 3 механизмам: (1) увеличенное всасывание кальция в кишечнике; (2) снижение кальциевой канальцевой Ca^{2+} -реабсорбции (зависимой от кальциевого сенсора); и (3) повышенная резорбция кости [37]. Действительно, после 18 недель жизни у всех крыс GHS развиваются почечные камни. Обращает на себя внимание, что, когда животных кормят стандартным 1–2% кальциевым питанием, камни в основном, состоят из апатита (CaHPO_4), поскольку перенасыщение мочи CaHPO_4 развивается быстрее, чем перенасыщение CaO_2 [38]. И наоборот, дополнительная диетическая добавка НуР 5% вызывает образование камней CaO_2 [39] с кристаллическими отложениями, главным образом в контакте с клетками уротелия. Интересно, что, подобно трубчатым клеткам, окружающим кристаллы, некоторые клетки уротелия, контактирующие с кристаллами, действительно пролиферируют и также экспрессируют высокие уровни OPN [40]. Таким образом, эта модель очень близка к почечнокаменной болезни человека, поскольку не наблюдается нефрокальциноз, хотя очень редкие и рассеянные отложения кристаллов могут быть обнаружены в почечной паренхиме.

В отличие от крыс, у мышей в основном развивается нефрокальциноз после введения НуР в питьевой воде.

Введение самцам крыс линии Wistar гликолевой кислоты в течение 4 недель приводит к гипероксалурии и трубчатым кристаллам CaO_2 как внутри коры, так и мозгового вещества почки, но также и в полостях малого таза [41].

Патофизиологические модели развития мочекаменной болезни при дефиците витамина B6

Дефицит витамина B6 также является фактором, провоцирующим развитие камней в почках. Фермент печени аланин-глиоксилат-аминотрансфераза, который играет ключевую роль в превращении глиоксилата (предшественника оксалата) в глицин, зависит от витамина B6. Таким образом, дефицит витамина B6 вызывает его дисфункцию [42]. Действительно, дефицит витамина B6 приводит к гипероксалурии и гипоцитратурии. Экскреция оксалата в моче увеличивается в течение 2 часов после внутривенного введения гидроксипирувата у крыс с дефицитом витамина B6. У этих крыс появляются как оксалатные отложения кальция в канальцах, бляшки на

сосочках, так и камни в почечных лоханках, и мочевом пузыре [43, 44].

Патофизиологические модели развития мочекаменной болезни при операциях на тонком кишечнике

Резекция тонкой кишки (IR) у людей может приводить к массивной гипероксалурии и нефролитиазу из-за повышенной абсорбции оксалата в кишечнике [45, 46]. Действительно, CaO_2 -нефролитиаз возникает у 15–30% пациентов после хирургического шунтирования [47]. Кроме того, эти пациенты имеют тенденцию к хронической дегидратации из-за потери воды и соли при диарее, что приводит к уменьшению объема мочи. У этих пациентов также уменьшается абсорбция и, следовательно, уменьшается выделение мочи, цитрата и магния, которые обычно действуют как ингибиторы кристаллизации CaO_2 [46].

Резекция кишечника (дистальные отделы подвздошной кишки), проведенная на самцах крыс, которых кормили индивидуально низкокальциевой и высокооксалатной диетой (0,02% кальция, 18% липида, 1% оксалата натрия), воспроизводит гипероксалурию, гипоцитратурию и нефрокальциноз (на 4-м месяце) [48]. Таким образом, эта модель очень похожа на гипероксалурию у пациентов с нефрокальцинозом и нефролитиазом.

Заключение

Представленные к рассмотрению и анализу экспериментальные патофизиологические модели мочекаменной болезни у животных дают достаточно ясное представление о возможных механизмах развития мочекаменной болезни в экспериментальных условиях. Показаны отличия между развитием камней в почках на фоне нефрокальциноза, нефролитиаза или наличия одновременно этих двух метаболических состояний у грызунов.

Рассмотрены патофизиологические модели развития мочекаменной болезни при введении оксалата, этиленгликоля, гидроксипролина и гликолевой кислоты. Показана роль индукции некоторых макромолекул, таких, как OPN, бикунин или белок Tamm-Horsfall (TH), которые могут ингибировать процесс камнеобразования в почках или способствовать кальцификации почечной паренхимы. Следует отметить, что метаболиты гликолята и глиоксилата, по-видимому, изменяют нормальный канальцевый эпителий с его последующей кальцификацией. Выявлено значение ряда ферментов, ответственных за превращение глиоксилата в глицин, в гликолят или оксалат, таких, как аланин-глиоксилат-аминотрансферазы, которая катализирует превращение глиоксилата в глицин в физиологических условиях, глиоксилат-редуктазы и гидроксипируват-редуктазы, которые обычно катализируют восстановление глиоксилата до гликолята и гидроксипирувата до D-глицерата. Резекция кишечника (дистальные отделы подвздошной кишки), проведенная на самцах крыс, воспроизводит гипероксалурию, гипоцитратурию и нефрокальциноз и, таким образом, эта модель очень похожа на гипероксалурию у пациентов с нефрокальцинозом и нефролитиазом.

Список литературы

1. Daudon M., Jungers P. *Lithiase urinaire*. 2nd ed. Flammarion: Medecine-sciences; 2012. 1-19 p.
2. Bilbault H., Haymann J.P. Experimental models of renal calcium stones in rodents. *World J. Nephrol.* 2016; 5(2): 189-94. DOI: 10.5527/wjn.v5.i2.189
3. Farmanesh S., Chung J., Sosa R.D., Kwak J.H., Karande P., Rimer J.D. Natural promoters of calcium oxalate monohydrate crystallization. *J. Am. Chem. Soc.* 2014; 136 (36): 12648-57. DOI: 10.1021/ja505402r.
4. Martel J., Wu C.Y., Young J.D. Translocation of mineralo-organic nanoparticles from blood to urine: a new mechanism for the formation of kidney stones? *Nanomedicine (Lond)*. 2016; 11(18): 2399-404. DOI: 10.2217/nmm-2016-0246.
5. Голованов С.А., Сивков А.В., Анохин Н.В., Дрожжева В.В. Подходы к оценке литогенности мочи у пациентов с оксалатным уролитиазом. *Экспериментальная и клиническая урология*. 2015; 2: 72-9.
6. Letavernier E., Verrier C., Goussard F., Perez J., Huguet L., Haymann J.P., Baud L., Bazin D., Daudon M. Calcium and vitamin D have a synergistic role in a rat model of kidney stone disease. *Kidney Int.* 2016; 90(4): 809-17. DOI: 10.1016/j.kint.2016.05.027.
7. Bushinsky D.A., Parker W.R., Asplin J.R. Calcium phosphate supersaturation regulates stone formation in genetic hypercalcemic stone-forming rats. *Kidney Int.* 2000; 57(2): 550-60. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2000.00875.x
8. Gao S., Yang R., Peng Z., Lu H., Li N., Ding J., Cui X., Chen W., Dong X. Metabolomics analysis for hydroxy-L-proline-induced calcium oxalate nephrolithiasis in rats based on ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Sci. Rep.* 2016; 6: 30142. DOI: 10.1038/srep30142
9. Daggulli M., Utangac M.M., Dede O., Bodakci M.N., Hatipoglu N.K., Penbegul N., Sancaktutar A.A., Bozkurt Y., Soyomez H., Potential biomarkers for the early detection of acute kidney injury after percutaneous nephrolithotripsy. *Ren. Fail.* 2016; 38(1): 151-6. DOI: 10.3109/0886022X.2015.1073494.
10. Dede O., Dagguli M., Utangac M., Yuksel H., Bodakci M.N., Hatipoglu N.K., Sancaktutar A.A., Penbegul N. Urinary expression of acute kidney injury biomarkers in patients after RIRS: it is a prospective, controlled study. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(5): 8147-52.
11. Che M., Xie B., Xue S., Dai H., Qian J., Ni Z., Axelsson J., Yan Y. Clinical usefulness of novel biomarkers for the detection of acute kidney injury following elective cardiac surgery. *Nephron Clin. Pract.* 2010; 115(1): 66-72. DOI: 10.1159/000286352
12. Baldwin F., Sran H. Delayed ethylene glycol poisoning presenting with abdominal pain and multiple cranial and peripheral neuropathies: a case report. *J. Med. Case Rep.* 2010; 4: 220. DOI: 10.1186/1752-1947-4-220.
13. Taylor E.N., Hoofnagle A.N., Curhan G.C. Calcium and phosphorus regulatory hormones and risk of incident symptomatic kidney stones. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2015; 10(4): 667-75. DOI: 10.2215/CJN.07060714
14. De Yoreo J.J., Qiu S.R., Hoyer J.R. Molecular modulation of calcium oxalate crystallization. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006; 291(6): 1123-31. DOI: 10.1152/ajprenal.00136.2006
15. Fabris A., Anglani F., Lupo A., Gambaro G. Medullary sponge kidney: state of the art. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2013; 28: 1111-9. DOI: 10.1093/ndt/gfs505
16. Viers B.R., Lieske J.C., Vrtiska T.J., Herrera Hernandez L.P., Vaughan L.E., Mehta R.A., Bergstralh E.J., Rule A.D., Holmes D.R., Krambeck A.E. Endoscopic and histologic findings in a cohort of uric acid and calcium oxalate stone formers. *Urology*. 2015; 85: 771-6. DOI: 10.1016/j.urology.2014.12.036
17. Sivalingam S., Nakada S.Y., Sehgal P.D., Crenshaw T.D., Penniston K.L. Dietary hydroxyproline induced calcium oxalate lithiasis and associated renal injury in the porcine model. *J. Endourol.* 2013; 27: 1493-8. DOI: 10.1089/end.2013.0185
18. Marengo S.R., Chen D., MacLennan G.T., Resnick M.I., Jacobs G.H. Minipump induced hyperoxaluria and crystal deposition in rats: a model for calcium oxalate urolithiasis. *J. Urol.* 2004; 171: 1304-8. DOI: 10.1097/01.ju.0000101046.39244.44
19. Khan S.R., Finlayson B., Hackett R.L. Experimental induction of crystalluria in rats using mini-osmotic pumps. *Urol. Res.* 1983; 11: 199-205.
20. Khan S.R., Finlayson B., Hackett R.L. Experimental calcium oxalate nephrolithiasis in the rat. Role of the renal papilla. *Am. J. Pathol.* 1982; 107: 59-69.

21. McMartin K. Are calcium oxalate crystals involved in the mechanism of acute renal failure in ethylene glycol poisoning? *Clin. Toxicol. (Phila)*. 2009; 47: 859-69. DOI: 10.3109/15563650903344793

22. Vervaeke B.A., D'Haese P.C., De Broe M.E., Verhulst A. Crystalluric and tubular epithelial parameters during the onset of intratubular nephrocalcinosis: illustration of the 'fixed particle' theory in vivo. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009; 24: 3659-68. DOI: 10.1093/ndt/gfp418

23. Khan S.R. Animal models of kidney stone formation: an analysis. *World J. Urol.* 1997; 15: 236-43.

24. Vervaeke B.A., Verhulst A., Dauwe S.E., De Broe M.E., D'Haese P.C. An active renal crystal clearance mechanism in rat and man. *Kidney Int.* 2009; 75: 41-51. DOI: 10.1038/ki.2008.450

25. Tsuji H., Shimizu N., Nozawa M., Umekawa T., Yoshimura K., De Velasco M.A., Uemura H., Khan S.R. Osteopontin knock-down in the kidneys of hyperoxaluric rats leads to reduction in renal calcium oxalate crystal deposition. *Urolithiasis.* 2014; 42: 195-202. DOI: 10.1007/s00240-014-0649-0

26. Jiang J., Johnson L.C., Knight J., Callahan M.F., Riedel T.J., Holmes R.P., Lowther W.T. Metabolism of [¹³C5] hydroxyproline in vitro and in vivo: implications for primary hyperoxaluria. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2012; 302: 637-43. DOI: 10.1152/ajpgi.00331.2011

27. Knight J., Jiang J., Assimos D.G., Holmes R.P. Hydroxyproline ingestion and urinary oxalate and glycolate excretion. *Kidney Int.* 2006; 70: 1929-34. DOI: 10.1038/sj.ki.5001906

28. Khan S.R., Glenton P.A., Byer K.J. Modeling of hyperoxaluric calcium oxalate nephrolithiasis: experimental induction of hyperoxaluria by hydroxy-L-proline. *Kidney Int.* 2006; 70: 914-23. DOI: 10.1038/sj.ki.5001699

29. Tawashi R., Cousineau M., Sharkawi M. Calcium oxalate crystal formation in the kidneys of rats injected with 4-hydroxy-L-proline. *Urol. Res.* 1980; 8: 121-7.

30. Kumar S., Muchmore A. Tamm-Horsfall protein—uromodulin (1950-1990). *Kidney Int.* 1990; 37: 1395-401.

31. Aggarwal K.P., Narula S., Kakkar M., Tandon C. Nephrolithiasis: molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators. *Biomed Res. Int.* 2013; 2013: 292953. DOI: 10.1155/2013/292953

32. Mo L., Huang H.Y., Zhu X.H., Shapiro E., Hasty D.L., Wu X.R. Tamm-Horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation. *Kidney Int.* 2004; 66: 1159-66. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2004.00867.x

33. Devuyst O., Dahan K., Pirson Y. Tamm-Horsfall protein or uromodulin: new ideas about an old molecule. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005; 20: 1290-4. DOI: 10.1093/ndt/gfh851

34. Gmaj P., Murer H. Cellular mechanisms of inorganic phosphate transport in kidney. *Physiol. Rev.* 1986; 66: 36-70. DOI: 10.1152/physrev.1986.66.1.36

35. Chau H., El-Maadawy S., McKee M.D., Tenenhouse H.S. Renal calcification in mice homozygous for the disrupted type IIa Na/Pi cotransporter gene Npt2. *J. Bone Miner Res.* 2003; 18: 644-57. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.4.644

36. Knight J., Holmes R.P., Cramer S.D., Takayama T., Salido E. Hydroxyproline metabolism in mouse models of primary hyperoxaluria. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2012; 302: 688-93. DOI: 10.1152/ajprenal.00473.2011

37. Bushinsky D.A., Frick K.K., Nehrke K. Genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2006; 15: 403-18. DOI: 10.1097/01.mnh.0000232881.35469.a9

38. Bushinsky D.A., Parker W.R., Asplin J.R. Calcium phosphate supersaturation regulates stone formation in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Kidney Int.* 2000; 57: 550-60. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2000.00875.x

39. Bushinsky D.A., Asplin J.R., Grynepas M.D., Evan A.P., Parker W.R., Alexander K.M., Coe F.L. Calcium oxalate stone formation in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Kidney Int.* 2002; 61: 975-87. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2002.00190.x

40. Evan A.P., Bledsoe S.B., Smith S.B., Bushinsky D.A. Calcium oxalate crystal localization and osteopontin immunostaining in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Kidney Int.* 2004; 65: 154-61. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2004.00396.x

41. Ogawa Y., Yamaguchi K., Morozumi M. Effects of magnesium salts in preventing experimental oxalate urolithiasis in rats. *J. Urol.* 1990; 144: 385-9.

42. Holmes R.P., Assimos D.G. Glyoxylate synthesis, and its modulation and influence on oxalate synthesis. *J. Urol.* 1998; 160: 1617-24.

43. Andrus S.B., Gershoff S.N., Faragalla F.F., Prien E.L. Production of calcium oxalate renal calculi in vitamin B6-deficient rats. Study of the influence of urine pH. *Lab. Invest.* 1960; 9: 7-27.

44. Di Tommaso L., Tolomelli B., Mezzini R., Marchetti M., Cenacchi G., Foschini M.P., Mancini A.M. Renal calcium phosphate and oxalate deposition in prolonged vitamin B6 deficiency: studies on a rat model of urolithiasis. *BJU Int.* 2002; 89: 571-5.

45. Bhasin B., Urekli H.M., Atta M.G. Primary and secondary hyperoxaluria: Understanding the enigma. *World J. Nephrol.* 2015; 4: 235-244. DOI: 10.5527/wjn.v4.i2.235

46. Worcester E.M. Stones from bowel disease. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2002; 31(4): 979-99.

47. O'Connor R.C., Worcester E.M., Evan A.P., Meehan S., Kuznetsov D., Laven B., Sommer A.J., Bledsoe S.B., Parks J.H., Coe F.L., Grynepas M., Gerber G.S. Nephrolithiasis and nephrocalcinosis in rats with small bowel resection. *Urol. Res.* 2005; 33(2): 105-15. DOI: 10.1007/s00240-004-0460-4

48. Khan S.R., Glenton P.A. Experimental induction of calcium oxalate nephrolithiasis in mice. *J. Urol.* 2010; 184: 1189-96. DOI: 10.1016/j.juro.2010.04.065

References

1. Daudon M., Jungers P. *Lithiase urinaire*. 2nd ed. Flammarion: Medecine-sciences; 2012. 1-19 p.

2. Bilbault H., Haymann J.P. Experimental models of renal calcium stones in rodents. *World J. Nephrol.* 2016; 5(2): 189-94. DOI: 10.5527/wjn.v5.i2.189

3. Farmanesh S., Chung J., Sosa R.D., Kwak J.H., Karande P., Rimer J.D. Natural promoters of calcium oxalate monohydrate crystallization. *J. Am. Chem. Soc.* 2014; 136 (36): 12648-57. DOI: 10.1021/ja505402r.

4. Martel J., Wu C.Y., Young J.D. Translocation of mineralo-organic nanoparticles from blood to urine: a new mechanism for the formation of kidney stones? *Nanomedicine (Lond)*. 2016; 11(18): 2399-404. DOI: 10.2217/nnm-2016-0246.

5. Golovanov S.A., Sivkov A.V., Anohin N.V., Drozhzheva V.V. [Approaches to the urine lithogenicity assessment in patients with oxalate urolithiasis]. *Eksperimental'naya i klinicheskaya urologiya [Experimental and clinical urology]*. 2015; 2: 72-9. (in Russian)

6. Letavernier E., Verrier C., Goussard F., Perez J., Huguet L., Haymann J.P., Baud L., Bazin D., Daudon M. Calcium and vitamin D have a synergistic role in a rat model of kidney stone disease. *Kidney Int.* 2016; 90(4): 809-17. DOI: 10.1016/j.kint.2016.05.027.

7. Bushinsky D.A., Parker W.R., Asplin J.R. Calcium phosphate supersaturation regulates stone formation in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Kidney Int.* 2000; 57(2): 550-60. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2000.00875.x

8. Gao S., Yang R., Peng Z., Lu H., Li N., Ding J., Cui X., Chen W., Dong X. Metabolomics analysis for hydroxy-L-proline-induced calcium oxalate nephrolithiasis in rats based on ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Sci. Rep.* 2016; 6: 30142. DOI: 10.1038/srep30142

9. Daggulli M., Utangac M.M., Dede O., Bodakci M.N., Hatipoglu N.K., Penbegul N., Sancaktutar A.A., Bozkurt Y., Soylemez H., Potential biomarkers for the early detection of acute kidney injury after percutaneous nephrolithotripsy. *Ren. Fail.* 2016; 38(1): 151-6. DOI: 10.3109/0886022X.2015.1073494.

10. Dede O., Daggulli M., Utangac M., Yuksel H., Bodakci M.N., Hatipoglu N.K., Sancaktutar A.A., Penbegul N. Urinary expression of acute kidney injury biomarkers in patients after RIRS: it is a prospective, controlled study. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(5): 8147-52.

11. Che M., Xie B., Xue S., Dai H., Qian J., Ni Z., Axelsson J., Yan Y. Clinical usefulness of novel biomarkers for the detection of acute kidney injury following elective cardiac surgery. *Nephron Clin. Pract.* 2010; 115(1): 66-72. DOI: 10.1159/000286352

12. Baldwin F, Sran H. Delayed ethylene glycol poisoning presenting with abdominal pain and multiple cranial and peripheral neuropathies: a case report. *J. Med. Case Rep.* 2010; 4: 220. DOI: 10.1186/1752-1947-4-220.

13. Taylor E.N., Hoofnagle A.N., Curhan G.C. Calcium and phosphorus regulatory hormones and risk of incident symptomatic kidney stones. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2015; 10(4): 667-75. DOI: 10.2215/CJN.07060714

14. De Yoreo J.J., Qiu S.R., Hoyer J.R. Molecular modulation of calcium oxalate crystallization. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2006; 291(6): 1123-31. DOI: 10.1152/ajprenal.00136.2006
15. Fabris A., Anglani F., Lupo A., Gambaro G. Medullary sponge kidney: state of the art. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2013; 28: 1111-9. DOI: 10.1093/ndt/gfs505
16. Viers B.R., Lieske J.C., Vrtiska T.J., Herrera Hernandez L.P., Vaughan L.E., Mehta R.A., Bergstralh E.J., Rule A.D., Holmes D.R., Krambeck A.E. Endoscopic and histologic findings in a cohort of uric acid and calcium oxalate stone formers. *Urology.* 2015; 85: 771-6. DOI: 10.1016/j.urology.2014.12.036
17. Sivalingam S., Nakada S.Y., Sehgal P.D., Crenshaw T.D., Penniston K.L. Dietary hydroxyproline induced calcium oxalate lithiasis and associated renal injury in the porcine model. *J. Endourol.* 2013; 27: 1493-8. DOI: 10.1089/end.2013.0185
18. Marengo S.R., Chen D., MacLennan G.T., Resnick M.I., Jacobs G.H. Minipump induced hyperoxaluria and crystal deposition in rats: a model for calcium oxalate urolithiasis. *J. Urol.* 2004; 171: 1304-8. DOI: 10.1097/01.ju.0000101046.39244.44
19. Khan S.R., Finlayson B., Hackett R.L. Experimental induction of crystalluria in rats using mini-osmotic pumps. *Urol. Res.* 1983; 11: 199-205.
20. Khan S.R., Finlayson B., Hackett R.L. Experimental calcium oxalate nephrolithiasis in the rat. Role of the renal papilla. *Am. J. Pathol.* 1982; 107: 59-69.
21. McMartin K. Are calcium oxalate crystals involved in the mechanism of acute renal failure in ethylene glycol poisoning? *Clin. Toxicol. (Phila.)* 2009; 47: 859-69. DOI: 10.3109/15563650903344793
22. Vervaeke B.A., D'Haese P.C., De Broe M.E., Verhulst A. Crystalluric and tubular epithelial parameters during the onset of intratubular nephrocalcinosis: illustration of the 'fixed particle' theory in vivo. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009; 24: 3659-3668. DOI: 10.1093/ndt/gfp418
23. Khan S.R. Animal models of kidney stone formation: an analysis. *World J. Urol.* 1997; 15: 236-43.
24. Vervaeke B.A., Verhulst A., Dauwe S.E., De Broe M.E., D'Haese P.C. An active renal crystal clearance mechanism in rat and man. *Kidney Int.* 2009; 75: 41-51. DOI: 10.1038/ki.2008.450
25. Tsuji H., Shimizu N., Nozawa M., Umekawa T., Yoshimura K., De Velasco M.A., Uemura H., Khan S.R. Osteopontin knockdown in the kidneys of hyperoxaluric rats leads to reduction in renal calcium oxalate crystal deposition. *Urolithiasis.* 2014; 42: 195-202. DOI: 10.1007/s00240-014-0649-0
26. Jiang J., Johnson L.C., Knight J., Callahan M.F., Riedel T.J., Holmes R.P., Lowther W.T. Metabolism of [¹³C5] hydroxyproline in vitro and in vivo: implications for primary hyperoxaluria. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2012; 302: 637-43. DOI: 10.1152/ajpgi.00331.2011
27. Knight J., Jiang J., Assimos D.G., Holmes R.P. Hydroxyproline ingestion and urinary oxalate and glycolate excretion. *Kidney Int.* 2006; 70: 1929-34. DOI: 10.1038/sj.ki.5001906
28. Khan S.R., Glenton P.A., Byer K.J. Modeling of hyperoxaluric calcium oxalate nephrolithiasis: experimental induction of hyperoxaluria by hydroxy-L-proline. *Kidney Int.* 2006; 70: 914-23. DOI: 10.1038/sj.ki.5001699
29. Tawashi R., Cousineau M., Sharkawi M. Calcium oxalate crystal formation in the kidneys of rats injected with 4-hydroxy-L-proline. *Urol. Res.* 1980; 8: 121-7.
30. Kumar S., Muchmore A. Tamm-Horsfall protein—uromodulin (1950-1990). *Kidney Int.* 1990; 37: 1395-1401.
31. Aggarwal K.P., Narula S., Kakkar M., Tandon C. Nephrolithiasis: molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators. *Biomed Res. Int.* 2013; 2013: 292953. DOI: 10.1155/2013/292953
32. Mo L., Huang H.Y., Zhu X.H., Shapiro E., Hasty D.L., Wu X.R. Tamm-Horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation. *Kidney Int.* 2004; 66: 1159-66. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2004.00867.x
33. Devuyst O., Dahan K., Pirson Y. Tamm-Horsfall protein or uromodulin: new ideas about an old molecule. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2005; 20: 1290-4. DOI: 10.1093/ndt/gfh851
34. Gmaj P., Murer H. Cellular mechanisms of inorganic phosphate transport in kidney. *Physiol. Rev.* 1986; 66: 36-70. DOI: 10.1152/physrev.1986.66.1.36
35. Chau H., El-Maadawy S., McKee M.D., Tenenhouse H.S. Renal calcification in mice homozygous for the disrupted type IIa Na/Pi cotransporter gene Npt2. *J. Bone Miner Res.* 2003; 18: 644-57. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.4.644
36. Knight J., Holmes R.P., Cramer S.D., Takayama T., Salido E. Hydroxyproline metabolism in mouse models of primary hyperoxaluria. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2012; 302: 688-93. DOI: 10.1152/ajprenal.00473.2011
37. Bushinsky D.A., Frick K.K., Nehrke K. Genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2006; 15: 403-18. DOI: 10.1097/01.mnh.0000232881.35469.a9
38. Bushinsky D.A., Parker W.R., Asplin J.R. Calcium phosphate supersaturation regulates stone formation in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Kidney Int.* 2000; 57: 550-60. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2000.00875.x
39. Bushinsky D.A., Asplin J.R., Grynmas M.D., Evan A.P., Parker W.R., Alexander K.M., Coe F.L. Calcium oxalate stone formation in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Kidney Int.* 2002; 61: 975-87. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2002.00190.x
40. Evan A.P., Bledsoe S.B., Smith S.B., Bushinsky D.A. Calcium oxalate crystal localization and osteopontin immunostaining in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Kidney Int.* 2004; 65: 154-61. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2004.00396.x
41. Ogawa Y., Yamaguchi K., Morozumi M. Effects of magnesium salts in preventing experimental oxalate urolithiasis in rats. *J. Urol.* 1990; 144: 385-9.
42. Holmes R.P., Assimos D.G. Glyoxylate synthesis, and its modulation and influence on oxalate synthesis. *J. Urol.* 1998; 160: 1617-24.
43. Andrus S.B., Gershoff S.N., Faragalla F.F., Prien E.L. Production of calcium oxalate renal calculi in vitamin B6-deficient rats. Study of the influence of urine pH. *Lab. Invest.* 1960; 9: 7-27.
44. Di Tommaso L., Tolomelli B., Mezzini R., Marchetti M., Cenacchi G., Foschini M.P., Mancini A.M. Renal calcium phosphate and oxalate deposition in prolonged vitamin B6 deficiency: studies on a rat model of urolithiasis. *BJU Int.* 2002; 89: 571-5.
45. Bhasin B., Urekli H.M., Atta M.G. Primary and secondary hyperoxaluria: Understanding the enigma. *World J. Nephrol.* 2015; 4: 235-44. DOI: 10.5527/wjn.v4.i2.235
46. Worcester E.M. Stones from bowel disease. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2002; 31(4): 979-99.
47. O'Connor R.C., Worcester E.M., Evan A.P., Meehan S., Kuznetsov D., Laven B., Sommer A.J., Bledsoe S.B., Parks J.H., Coe F.L., Grynmas M., Gerber G.S. Nephrolithiasis and nephrocalcinosis in rats with small bowel resection. *Urol. Res.* 2005; 33(2): 105-5. DOI: 10.1007/s00240-004-0460-4
48. Khan S.R., Glenton P.A. Experimental induction of calcium oxalate nephrolithiasis in mice. *J. Urol.* 2010; 184: 1189-96. DOI: 10.1016/j.juro.2010.04.065

Сведения об авторах

Масальцев Александр Константинович — соискатель кафедры биохимии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И.Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Бородулин Владимир Борисович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И.Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации

УДК 616-084

Маркёры ишемии миокарда: патофизиологическое обоснование клинического применения

Лямина Н.П., Карпова Э.С., Котельникова Е.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского»
Министерства здравоохранения Российской Федерации.
410012, Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112

Распространенность сердечно-сосудистых заболеваний с проявлениями ишемии диктует необходимость поиска методов, которые позволяют выявлять ишемию на ранних этапах ее развития, что дает возможность более эффективного лечения, корректирования состояния больных и предупреждения возможных осложнений. В современной клинической практике для диагностики ишемической болезни сердца применяется множество методов различных по своей достоверности и информативности. Одним из перспективных методов ранней диагностики ишемической болезни сердца является идентификация биохимических и молекулярных маркеров, которые чувствительны и специфичны для ишемического повреждения миокарда на ранних сроках в отсутствие некроза и повышения маркеров клеточного повреждения кардиомиоцитов. Использование биомаркеров ранней диагностики ишемии является перспективным подходом к решению комплексной задачи безопасного кардиомониторинга больных с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями. Благодаря определению достаточно простых, но вместе с этим высокочувствительных и специфичных маркеров ишемии миокарда и кардиопротекции можно значительно повысить эффективность оказания медицинской помощи.

Ключевые слова: маркеры ишемии, ишемическое повреждение, кардиоспецифичность.

Для цитирования: Лямина Н.П., Карпова Э.С., Котельникова Е.В. Маркёры ишемии миокарда: патофизиологическое обоснование клинического применения. Патогенез. 2018; 16(1): 17–25
DOI:

Для корреспонденции: Лямина Надежда Павловна, e-mail: lyana_n@mail.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 21.12.2017

Markers of myocardial ischemia: pathophysiological substantiation of clinical application

Lyamina N.P., Karpova E.S., Kotelnikova E.V.

V.I.Razumovsky Saratov State Medical University, Bolshaya Kazachiya Str. 112, Saratov 410012, Russian Federation

Prevalence of cardiovascular diseases with manifestations of ischemia dictates requirement for methods for early detection of ischemia, which provides more effective treatment, correction of patient's condition, and prevention of possible complications. In modern clinical practice, a variety of methods is used for detection of IHD, which differ in their reliability and informativeness. One of promising methods for early diagnosis of coronary heart disease is identification of biochemical and molecular markers that are sensitive and specific for early ischemic damage of the myocardium in the absence of necrosis and increased markers of cardiomyocyte injury. The use of biomarkers for early diagnosis of ischemia is a promising approach to solving the complex problem of safe cardiomonitring in patients with different cardiovascular diseases. By identifying rather simple but at the same time highly sensitive and specific markers for myocardial ischemia and cardioprotection, the efficiency of medical care can be significantly improved.

Key words: markers of ischemia, ischemic injury, cardiac specificity

For citation: Lyamina N.P., Karpova E.S., Kotelnikova E.V. [Markers of myocardial ischemia: pathophysiological substantiation of clinical application]. Patogenez [Pathogenesis]. 2018; 16(1): 17–25 (in Russian)

DOI:

For correspondence: Lyamina Nadezda Pavlovna, e-mail: lyana_n@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

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

Acknowledgments.

Received: 21.12.2017

Актуальность информативных маркеров в оценке ранней ишемии миокарда

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают прочные лидирующие позиции в общей структуре смертности, формируя наряду с внешними причинами (травмы, отравления) основное бремя преждевременной смертности в России. Так, в 2015 году более половины всех смертей в России были от ССЗ [1]. Течение большинства ССЗ сопровождается обратимыми и необратимыми, остро развивающимися и хронически протекающими состояниями ишемии миокарда. Нарушение доставки кислорода и субстратов метаболизма провоцирует развитие ишемии миокарда, смену аэробного метаболизма на анаэробный, нарушение перфузии тканей, что, в свою очередь, приводит к энергетическому голоданию клеток, и к накоплению соединений, которые раздражают нервные окончания в миокарде (недоокисленные продукты, биологически активные вещества) [2]. Импульсы от нервных окончаний достигают сердечного сплетения, симпатических ганглиев, далее передаются в гипоталамус и к коре головного мозга. Формируются болевые ощущения, которые соответствуют клиническим проявлениям стенокардии. Эта серия взаимосвязанных патологических процессов получила название «ишемический каскад» [3]. Однако часто эпизоды транзиторной кратковременной ишемии трудно диагностировать, так как нередки случаи безболевой ишемии миокарда, когда пациент не замечает симптомов, когда не возникает классических приступов стенокардии или ее эквивалентов (одышка, аритмия, внезапно резко выраженная слабость, головокружение и др.), в том числе и при физической нагрузке [4]. Стертость клинической картины, или «немые» эпизоды ишемии, чаще всего связаны со сниженной чувствительностью интракардиальных нервных окончаний, вследствие диабетической нейропатии, токсического действия некоторых цитостатиков, перенесенного инфаркта миокарда (ИМ). Причинами могут быть нарушение чувствительности внутрисердечных нервных окончаний, когда поражаются симпатические нервные волокна, являющиеся основным путем передачи болевой импульсации [3, 5]. Ощущение ишемических коронарных болей зависит также от модуляции сигналов, инициируемых ишемией, во внутренних ганглиях сердца, ганглиях средостения. Местное воздействие на внутренние кардиальные нейроны ряда медиаторов ряда (брадикинин, ацетилхолин, субстанция Р, аденозин и др.), также изменяет активность внутренних нейронов сердца [3]. Кроме того, в нарушении формирования ноцицептивного потока играет роль уменьшение числа и чувствительности внутрисердечных рецепторов к аденозину, который выделяется при ишемии миокарда и является главным стимулятором болевых рецепторов [3, 6].

Таким образом, как показывают исследования, у довольно значительного числа больных страдающих ССЗ, клинические симптомы ишемии могут носить атипичный характер. Неинвазивные методики диагностики могут верифицировать ишемические симптомы, однако диагностика их может быть отсроченной по времени и иметь определенные трудности, а несвоевременная диагностика и длительная миокардиальная ишемия, как известно, приводит к необратимому повреждению и гибели кардиомиоцитов [7]. В тоже время, методы неинвазивной инструментальной диагностики позволяют с высокой степе-

ню достоверности подтвердить уже факт наличия кардиальной патологии, оценить последствия и предсказать возможные исходы заболевания. В связи с этим биохимические маркеры превосходят методы инструментального обследования в ранней превентивной диагностике ишемических изменений, когда еще можно избежать необратимого повреждения миокарда [7]. Ранняя и своевременная верификация ишемии является важной клинической задачей, она необходима для улучшения качества медицинской помощи больным и повышения эффективности терапии, в том числе на этапах восстановительного лечения. Определяя биохимические маркеры ишемии, появляется возможность верифицировать ишемическое повреждение миокарда в отсутствие развития некроза и повышения уровня маркеров необратимого повреждения кардиомиоцитов, что является важным для клиницистов. Поэтому, использование биохимических маркеров является перспективным подходом в решении данной задачи, что, в свою очередь, позволяет проведение безопасного кардиомониторинга больных с ССЗ, и особенно после перенесенного кардиохирургического вмешательства и на этапах кардиореабилитации.

В качестве ранних индикаторов ишемии у больных ССЗ могут быть использованы такие биомаркеры, как миоглобин, ИМА, НСЖК, БСЖК, N-про-МНП и белок HSP 70 [7], каждый из которых имеет свои преимущества и доказанные позиции в детекции ранней ишемии миокарда перед другими маркерами и позволяет своевременно выявлять пациентов с высоким риском развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий еще до развития клинических симптомов [7].

Современное воззрение на предикцию ишемии миокарда биомаркерами

Сегодня в кардиологической практике появилось большое количество новых перспективных биохимических маркеров, особый интерес и важность из которых представляют биохимические маркеры, которые доказали свою чувствительность и специфичность в оценке предикции острой ишемии. Это, несомненно, повышает выявляемость и раннюю диагностику острых коронарных событий, и дает возможность их использования в различных областях кардиологической практики. Идентификация биохимических маркеров, которые чувствительны и специфичны как для некроза, так и для ишемии может быть клинически ценным методом кардиомониторинга у больных с ССЗ.

Развитие ишемии миокарда сопровождается выходом из поврежденных кардиомиоцитов в кровь различных кардиоспецифических маркеров. Согласно своей локализации в кардиомиоците, кардиоспецифические маркеры подразделяются на цитозольные, цитозольные+структурные и структурные [8]. Местонахождение маркера в клетке оказывает существенное влияние на скорость его выхода из поврежденного кардиомиоцита. Цитозольные белки, к которым относится миоглобин, креатинфосфокиназа, белок связывающий жирные кислоты (БСЖК), рано выходят в кровоток, и при этом их появление зависит от реперфузии зоны повреждения. Для выхода в кровь структурных белков (тропонина ТnT и ТnI) требуется активации протеолитических ферментов, которые разрушают внутриклеточный сократительный аппарат клетки.

Это длительный процесс, и такие маркеры обнаруживаются гораздо позже цитозольных маркеров и остаются повышенными продолжительное время. Реперфузия зоны ишемии не оказывает значительного влияния на уровень содержания кардиоспецифических маркеров [8, 9].

Известный ранний маркер ишемии белок миоглобин легко диффундирует через мембраны поврежденных мышечных клеток, так как является низкомолекулярным протеином [10]. Концентрация миоглобина в сыворотке крови у пациентов, при острой ишемии повышается через 2 часа после возникновения симптомов [10]. Миоглобин в неизменном виде выводится с мочой и через 24 часа с момента начала заболевания исчезает из кровотока. Миоглобин является достаточно чувствительным, но недостаточно специфичным маркером, определение миоглобина в крови не может использоваться как единственный тест в диагностике ишемии миокарда. Необходимо динамическое определение миоглобина — не менее 2 раз за 2 часа. Диагностически значимым уровнем миоглобина считается увеличение его концентрации до 20 нг/мл/ч. Однако факт наличия в большом количестве миоглобина в скелетной мускулатуре и зависимость его концентрация в крови от функции почек ограничивают его применение для диагностики острого инфаркта миокарда (ОИМ) [11].

Неоценимым вкладом в развитие кардиологии была разработка и внедрение в клиническую практику тропониновых тестов, которые существенно улучшили диагностику, стратификацию риска, оценку ближайшего и отдаленного прогноза у больных с острым коронарным синдромом (ОКС). Определение компонентов тропонинового комплекса кардиомиоцитов — ТнТ и ТнI — отражает даже минимальное повреждение миокарда и обладает высокой диагностической ценностью для ОИМ: по многим данным чувствительность достигает 100% при определении через 12–14 часов от начала ангинозных болей, специфичность тоже высока: 85–100% [11]. По этой причине тестирование кардиальных тропонинов с 2000 года считается «золотым стандартом» среди биохимических методов диагностики ОИМ. Кроме того, их высокая специфичность и чувствительность во многом послужили поводом для пересмотра современной диагностики ОИМ [7].

При ишемическом повреждении миокарда тропонины поступают в периферический кровоток за счет двух механизмов. При обратимом ишемическом повреждении нарушается целостность мембраны кардиомиоцитов, что ведет к высвобождению тропонинов, содержащихся в цитозоле. Если повреждение становится необратимым, активация протеолитических ферментов и внутриклеточный ацидоз приводят к разрушению контрактильного аппарата с последующим высвобождением связанных тропонинов.

Повышение концентрации тропонинов в крови определяется через 4,5–5 часов после начала симптомов и диагностически значимые уровни тропонина ТнI и ТнТ достигаются через 12–24 часа. Процесс высвобождения ТнI имеет однофазный характер, а ТнТ — практически двухфазный, что обусловлено большим содержанием его цитоплазматической фракции [12]. На 7-й день от начала заболевания содержание тропонина ТнI возвращается в референтные пределы, диапазон диагностической значимости тропонина ТнТ сохраняется в системном кровотоке более длительно — до 14 дней. Однако, несмотря на высокую чувствительность и специфичность, тропонины оста-

ются только лучшим кардиоспецифическим маркером некроза миокарда, т.е. необратимой фазы повреждения кардиомиоцитов [13].

Существенный прогресс в детекции ишемии на ранних стадиях был достигнут благодаря разработке высокочувствительных тропониновых тестов (hs cTnI). Hs cTnI тесты способны выявлять очень низкие концентрации Тп в крови — 2–5 нг/л, hs-cTn — до 0,01 нг/л, что позволило выявлять более точно ишемию миокарда, диагностировать заболевание на ранней обратимой стадии, проводить своевременные и эффективные лечебные мероприятия, существенно снижая частоту сердечно-сосудистых осложнений и смертность больных [14]. Однако повышение чувствительности сопровождается снижением специфичности теста. Небольшое повышение hs cTnI более 99-го перцентилля было обнаружено не только при острой ишемии, но также при других патологиях: стабильной стенокардии, хронической сердечной недостаточности, хронической болезни почек, сахарном диабете [15, 16, 17].

Отличить повышение hs cTnI, обусловленное ишемией, от неишемического можно лишь при серийной измерении уровня hs cTnI. При ишемическом повреждении для повышения hs cTnI характерно нарастание или снижение уровня маркера в динамике, такое изменение hs cTnI наблюдают в течение нескольких часов при ОКС. При неишемическом увеличении маркера регистрируется устойчиво повышенный уровень hs cTnI. Кроме того, было обнаружено, что Тп выявляются в крови не только у больных с ишемическими состояниями, но также у части практически здоровых лиц [18]. В настоящее время известно несколько механизмов появления Тп в крови у здоровых лиц, основные из них: изменение интенсивности метаболических процессов в кардиомиоцитах в процессе обновления; высвобождение через неповрежденные клеточные мембраны мелких фрагментов, образующихся при протеолитическом разрушении Тп; повышение проницаемости сарколеммы кардиомиоцитов при транзиторной ишемии миокарда; ускоренный апоптоз кардиомиоцитов, микронекроз миоцитов в связи с ишемическим и воспалительным процессами [19, 20].

То есть, интерес к поиску биомаркеров, способных выявить ишемию в ранние и очень ранние сроки до развития ее клинических проявлений не теряет актуальности.

В связи с быстрой интеграцией кардиореабилитации в национальное здравоохранение важным для клинической практики является выделение биомаркеров для больных ишемической болезнью сердца (ИБС), участвующих в программах физической реабилитации, и специфичных именно для ишемии, которые точно выявляют ишемическое повреждение миокарда на ранних сроках в отсутствие некроза и повышения уровня сердечного тропонина.

Не менее перспективным биомаркером, способным предсказывать начало острых коронарных событий на доклинической стадии их развития, является ишемией модифицированный альбумин (ИМА). При развитии ишемии происходит деструкция N-терминального участка молекулы альбумина, который в норме является местом связывания для тяжелых металлов [21]. Вследствие ацидоза, гипоксии, свободнорадикального повреждения, дефекта энергозависимых мембран концентрация ИМА в крови повышается, при этом число мест для связывания

кобальта уменьшается. Свободный кобальт может реагировать с хромогеном (дитиотреитол), полученный в результате этой реакции комплекс может быть измерен с помощью количественного хроматографического анализа. Таким образом, фактически определение содержания ИМА оценивается по степени снижения кобальт-связывающей способности (КСС) сыворотки крови [21]. Поэтому определение ИМА является чувствительным маркером ишемии миокарда. Согласно данным литературы концентрация ИМА повышается через 6—10 минут от момента развития ишемии, и возвращается к исходному уровню в период до 6 часов, причем происходит это до детектируемого повышения сердечного тропонина, КК-МВ или миоглобина [21]. Определение уровня ИМА через 6—12 часов после развития ишемии уже не информативно и предсказательное отрицательное значение ИМА теста снижается у больных, которые не прошли обследование непосредственно в этот временной интервал после ишемического эпизода [22].

Существует достаточно большое количество публикаций, в которых показано преимущество ИМА теста в представлении ценной прогностической информации о ишемических изменениях до развития некроза миокарда у тропонин-отрицательных пациентов [21]. Кроме того, высокая прогностическая ценность отрицательного результата ИМА делает его исключительно полезным для использования в комплексе с кардиальным Тн и инструментальными исследованиями для диагностики ОИМ при наличии коронарной симптоматики.

В исследование М. Sinha и соавт. 2004 года было включено 208 пациентов с диагнозом острый коронарный синдром [23]. Окончательный диагноз устанавливался на основании данных физикального осмотра, анамнеза, серийного измерения тропонина Т и медицинских записей. Чувствительность КСС альбумина в отношении ишемического генеза боли в груди составила 82%, специфичность — 46%, прогностическая ценность отрицательного результата — 59%, прогностическая ценность положительного результата — 72%. Чувствительность КСС альбумина была намного выше при комбинации с уровнем тропонина Т и данными электрокардиограммы, выявляя 95% пациентов с болью в груди ишемического генеза. Проведенный метаанализ показал, высокую чувствительность КСС альбумина в диагностике острого коронарного синдрома. Этот показатель имеет прогностическую ценность только для отрицательного результата в те сроки, когда тест на тропонин не информативен [23]. Таким образом, невысокая специфичность затрудняет его использование вне комплекса с традиционными биомаркерами. Анализ многочисленных исследований показал, что изменения КСС сыворотки крови связано не только с ишемической модификацией альбумина, так как альбумин относится к тем плазменным белкам, который легко подвергается модификации по различным причинам [24]. АВС тест, используемый для определения ИМА, является косвенным анализом КСС альбумина, но альбумин является не единственным сывороточным белком, способным связывать ионы двухвалентных металлов. Кроме того, есть ряд патологий, для которых свойственны качественные изменения белкового спектра сыворотки крови, что необходимо учитывать при интерпретации результатов анализа общей кобальт-связывающей способности сыворотки крови. Уровень ИМА может повышаться на терминальной

стадии заболеваний почек, при инсульте, опухолях, острой инфекции, циррозе; не нарастает при аутоиммунных заболеваниях, гипоксии, травме, ишемии скелетных мышц. Таким образом, АСВ-тест считается перспективным диагностическим тестом в детекции ишемии, но вопрос о возможности его применения в клинической практике остается открытым для клиницистов [24, 25].

Широко обсуждаемым в настоящее время индикатором ранних ишемических изменений являются несвязанные свободные жирные кислоты (НСЖК). При ишемическом повреждении происходит нарушение метаболизма НСЖК, что ведет к возрастанию их концентрации как в кардиомиоците, так и в крови. Увеличение образования и окисления НСЖК в кардиомиоцитах при ишемии снижает эффективность работы сердца, приводит к нарушению синтеза АТФ, увеличению производства АФК, следствием чего является окислительный стресс и гибель кардиомиоцитов. В физиологических условиях уровень НСЖК в крови может повышаться и снижаться очень быстро, период полужизни НСЖК составляет 4—8 минут. Референтные значения концентрации НСЖК у взрослых 0,1—0,6 ммоль/л [26]. У пациентов с ССЗ и коронарными жалобами наблюдается отчетливое повышение уровня НСЖК. В ряде исследований было показано, что при ишемии концентрация НСЖК повышается независимо от наличия или отсутствия некроза миокарда, тестируемого по повышению концентрации тропонина I (сTnI) [27]. В клинических работах показано, что оценка уровня НСЖК — более чувствительный показатель степени ишемии, чем электрокардиографическое измерение, так как в половине случаев высокие уровни НСЖК не всегда сопровождаются ишемическими изменениями сегмента ST.

Таким образом, НСЖК являются чувствительным маркером дисфункции миокарда на ранних сроках, но при этом НСЖК характеризуются низкой кардиоспецифичностью. Уровень НСЖК в плазме в течение суток может изменяться, в частности, после каждого дневного приема пищи уровень НСЖК в плазме снижается, так как инсулин угнетает липолиз адипозных клеток, в результате которого и образуются НСЖК. В ночное время уровень НСЖК в плазме возрастает. Определение уровня НСЖК следует проводить строго натощак, что ограничивает его применение в клинической практике, в том числе и на этапах кардиореабилитации. Оценивая степень ишемии при физической реабилитации, измерение уровня НСЖК следует проводить до и после физических тренировок. Физические нагрузки усиливают липолиз жиров в жировой ткани. Вклад жиров в энергетику мышечной деятельности возрастает по мере увеличения продолжительности мышечных нагрузок малой и умеренной интенсивности. Уже с начала выполнения такой работы и до тех пор, пока ее интенсивность не достигнет уровня 60—70% минутного потребления кислорода и начала накопления молочной кислоты, скорость мобилизации и утилизации НСЖК повышается. При высокой интенсивности физических нагрузок скорость использования НСЖК мышцами падает, а скорость мобилизации ее продолжает оставаться высокой, в результате чего и концентрация НСЖК в плазме остается повышенной [7]. Многочисленные результаты недавних исследований четко указывают, что большинство пациентов, страдающих ожирением, метаболическим синдромом и сахарным диабетом второго типа (СД2), имеют повышенные уровни НСЖК. То есть, НСЖК не

являясь кардиоспецифичным маркером, пока не могут быть рекомендованы как единственный способ детекции ишемии, но могут быть использованы в совокупности с другими биомаркерами для ее идентификации [28].

Одним из новых и многообещающих биомаркеров ранней ишемии (до появления морфологических признаков некроза миокарда) является сердечный белок, связывающий жирные кислоты — кардио БСЖК. Белки, связывающие жирные кислоты, это класс малых цитоплазматических белков (приблизительно 12—16 кДа), которые присутствуют в различных типах клеток и играют важную роль во внутриклеточной утилизации жирных кислот [29]. При повреждении клеток белок, связывающий жирные кислоты (FABP), из-за своих небольших размеров, быстро выходит из поврежденных клеток, что приводит к возрастанию его концентрации в крови и моче. Существует как минимум 6 различных типов FABP, каждый из которых специфически экспрессируется в определенных типах тканей. Так, например, выделяют сердечную изоформу FABP (сБСЖК, h-FABP, FABP3), которая по своему аминокислотному составу отличается от других известных форм белка, и эти отличия делают возможным селективное определение h-FABP в крови больного с использованием иммунохимических методов [29].

Однако в процессе исследования локализации сердечной изоформы FABP, было обнаружено, что h-FABP существует не только в сердце. Различные количества h-FABP обнаружены в скелетных мышцах, печени, почках, надпочечниках, легких, кишечнике и мозге [30]. Поэтому его концентрация в сыворотке может быть повышена, например, при воспалительных заболеваниях кишечника и при ишемическом поражении кишечника, что очень сильно снижает ценность h-FABP как маркера ишемии миоцитов. Концентрация h-FABP в различных тканях очень сильно варьирует. Например, было показано, что соотношение концентрации h-FABP в сердечной и скелетной мышцах составляет примерно 20:1, единственная мышца, в которой относительно большее количество h-FABP — это диафрагма (примерно 25% от сердечного). В почке содержится в 10 раз меньше h-FABP, чем в сердце. В кишечнике, печени, легких содержание h-FABP очень незначительное [29].

Впервые предложение об использовании сердечного h-FABP в качестве маркера инфаркта миокарда (ИМ) было высказано Глатцом (Glatz) и его коллегами в 1988 году. Через некоторое время в литературе появились данные о том, что h-FABP можно использовать также и для диагностики нестабильной стенокардии [30].

Достоинства h-FABP как маркера ишемии заключаются, во-первых, в его кардиоспецифичности вследствие максимальной концентрации его в кардиомиоцитах (0,5 мг/г). Во-вторых, h-FABP, в отличие от других биомаркеров ишемии, имеет низкий молекулярный вес и уже на стадии циркуляторной гипоксии и последующей гибели миокарда, которая предшествует ишемическому цитолизу, быстро попадает в кровоток. У пациентов с ОКС можно определить диагностически значимое повышение уровня h-FABP уже через 2—3 ч после развития клинических симптомов заболевания.

Уровень FABP в сыворотке крови не меняется с возрастом и не зависит от времени суток. Кинетика повышения уровня h-FABP в крови позволяет детектировать увеличение его концентрации уже через 30 минут после по-

явления ангинозных болей, достигая максимума через 6—8 часов, в течение 12—24 часов уровень h-FABP снижается до нормальных значений [31]. По данным исследований, проведенных в последнее время, установлено, что h-FABP в первые 3—6 часов после начала ангинозного приступа по чувствительности и специфичности превосходит тропонины, миоглобин, и креатинкиназу. Это дает возможность использовать FABP для диагностирования повторных инфарктов, возникающих у больного через короткий промежуток времени после первого приступа. Использование ЭКГ и измерения концентрации тропонинов считается малоинформативным ввиду изменений, сохранившихся со времени предыдущего ИМ [32].

Диагностическая ценность определения h-FABP как маркера ишемии миокарда снижается в связи с непродолжительным диагностическим окном (1—24 часа после возникновения болей в груди) и его преимущественное выведение из организма почками, что может привести к неверному интерпретированию высоких значений белка у больных со сниженной ренальной функцией [32]. Тем не менее, указанные недостатки могут быть преодолены путем одновременного использования поздних и более специфичных маркеров, таких как кардиоспецифичный тропонин I (сTnI) и показателей оценки функции почек [33].

Согласно результатам ряда исследований, мозговой натрийуретический пептид (МНП) имеет диагностическое значение не только для диагностики хронической сердечной недостаточности, но и может служить маркером распространенности и прогрессирования ишемии у больных ОКС. Основным триггером секреции МНП является повышение внутрижелудочкового давления, изменение подвижности миокарда и повышение напряжения стенки миокарда при ишемических эпизодах [34].

Согласно исследованиям GUSTO-IV установлено, что острая миокардиальная ишемия провоцирует выработку натрийуретических пептидов в первые 24 часа, а примерно через 80 часов от начала болевого синдрома уровень N-про-МНП нормализуется [35].

При долгосрочном периоде наблюдения определение повышенных концентраций N-про-МНП у больных ИБС отражает развившуюся систолическую и диастолическую дисфункцию, сопровождающуюся повышенным напряжением стенок и ремоделированием левого желудочка [36]. Результаты исследований, проведенных у пациентов с диастолической дисфункцией, свидетельствовали о том, что повышение концентрации N-про-МНП наблюдается и при изолированном нарушении диастолического расслабления левого желудочка (чувствительность 75%). Была выявлена достоверная связь между уровнем белка в плазме и постоянной во времени извольюмического расслабления, и этот уровень был значимо более высоким у лиц с нарушенной релаксацией левого желудочка [36]. Это может служить достоверным критерием ранней диагностики сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса левого желудочка. Кроме того, стойкое повышение уровня натрийуретического пептида в крови является независимым показателем, предсказывающим риск развития декомпенсации и смерти у пациентов с сердечной недостаточностью (СН), независимо от величины фракции выброса левого желудочка [36]. После эпизодов ОКС без некроза кардиомиоцитов, пациенты с высоким уровнем NT-pro BNP в период 24 и 96 часов

после ангинозного приступа имеют высокий риск неблагоприятных патологических изменений, возникновения повторной ишемии, развития СН, инфаркта миокарда и должны быть отнесены к группе высокого риска развития кардиоваскулярных осложнений. Поэтому мониторинг уровня NT-про BNP в динамике обеспечивает контроль клинического статуса пациента, позволяет диагностировать дисфункцию левого желудочка раньше, чем появятся клинико-инструментальные признаки ее, ухудшение симптомов СН, и своевременно проводить оптимизацию терапии, снижая тем самым количество декомпенсаций симптомов сердечной недостаточности и неблагоприятных событий у больных высокого риска.

Однако к повышению уровня МНП могут привести не только ишемическая дисфункция миокарда. Повышение уровня N-про-МНП может быть у больных с нефротическим синдромом, острой почечной недостаточностью, сахарном диабете, у больных с циррозом печени, не следует забывать и о состояниях, которые также могут влиять на концентрацию N-про-МНП пожилой возраст, тахикардия, гипертрофия левого желудочка [37].

Так как ишемия миокарда сопровождается гипоксией, значительной активацией процессов свободнорадикального окисления, накоплением токсичных продуктов перекисного окисления липидов, повреждением регуляторных систем антиокислительной защиты, нарушением нормального функционирования электронтранспортных цепей мембранных комплексов клетки, все это инициирует синтез белков теплового шока («heat-shock» — HSP) при ишемии [38]. Поэтому в качестве оценочного маркера ишемии может претендовать белок HSP 70, который в настоящее время имеет ряд уникальных позиций в оценке ишемии. Синтез HSP 70 резко увеличивается в ответ на разнообразные повреждения клеток, и в течение короткого времени достигает диагностически значимого уровня до момента развития необратимого повреждения клетки. Образованию HSP 70 предшествует синтез de novo мРНК HSP70 теплового шока, который наступает в первые 3—5 мин стрессового воздействия, а концентрация соответствующего белка резко возрастает в клетке уже через 15 мин после стрессового воздействия. Синтез HSP 70 достигает своего пика в течение первых 2,5 часов и поддерживается на высоком уровне 6—8 часов, через 24 часа после действия стрессорного стимула синтез HSP 70 значительно уменьшается [38]. Кроме того, существует адаптивный подъем концентрации HSP 70, который, как показали Zhu и соавт., ассоциирован с низким риском развития сердечно-сосудистых событий, от высвобождения молекул HSP 70 из поврежденных кардиомиоцитов [39]. В ряде исследований было показано, что кратковременные эпизоды окклюзий коронарных артерий с интервалами реперфузии существенно повышали толерантность миокарда к последующим, более длительным ее эпизодам ишемии, что приводило к снижению частоты развития инфаркта миокарда, снижению риска возникновения жизнеугрожающих аритмий [39]. HSP в этой ситуации выступают как потенциальные антиоксиданты, повышающие устойчивость тканей к ишемии и реперфузии, служат проявлением цитопротекторных свойств [40]. Поэтому этот маркер в клинической практике целесообразнее использовать для оценки адаптации к ишемии и развития адаптивной кардиопротекции. Появление его в системном кровотоке свидетельствует о повреждении клетки.

Внеклеточный уровень HSP 70 коррелирует с уровнем маркеров некроза миокарда тропонином и КК-МВ. То есть, определение данного маркера в системном кровотоке говорит о необратимости клеточного повреждения, что не позволяет его использовать для диагностики ишемии на ранних сроках, с другой стороны экстраклеточный HSP 70 является индикатором формирования цитопротективных свойств, что дает возможность использования его у больных ИБС на этапах кардиореабилитации для оценки формирования кардиопротективных эффектов [41].

Таким образом, мультимаркерный подход в детекции ишемии, повышает диагностическую чувствительность и предсказательную ценность данных маркеров. Отражая патофизиологические процессы при ишемии, биомаркеры представляют клиническую ценность в диагностике ишемии на самых ранних стадиях, в отсутствии клинических проявлений, что является очень важным для клинической практики.

Заключение

Распространенность ССЗ, патогенетическую основу которых составляет ишемическое повреждение сердечной мышцы, диктует необходимость поиска ранних и наиболее чувствительных биомаркеров транзиторной ишемии миокарда с целью эффективного ведения больного и снижения развития тяжелых осложнений. Анализ многочисленных экспериментальных и клинических исследований показал, что определение маркеров ишемии дает возможность с высокой точностью выявлять патологию сердечной мышцы на начальных, обратимых стадиях патологического процесса. Несмотря на это, сегодня биохимические маркеры неоправданно редко применяются в кардиологической практике, и имеют как правило рутинное использование лишь для диагностики тромбоза легочной артерии, некроза миокарда, системных заболеваний соединительной ткани. Хотя раннее выявление ишемии, а также обнаружение ее у больных с бессимптомным, скрытым течением ИБС, неоспоримо может принести больному ощутимую пользу, так как позволяет клиницисту проводить своевременно лечебные воздействия по оптимизации кислородного снабжения ишемизированной ткани тогда, когда они являются наиболее эффективными.

Поэтому использование биохимических маркеров ранней диагностики ишемии является перспективным подходом к решению комплексной задачи безопасного кардиомониторинга больных с различными ССЗ в клинической практике, а также на этапе реабилитации. Использование высокочувствительных и специфичных маркеров ишемии миокарда в клинической практике может реально значительно повысить эффективность оказания медицинской помощи.

Список литературы

1. Папанова Е., Тимонин С. Смертность от болезней системы кровообращения в России и Москве в свете мировых тенденций. *Московская медицина*. 2017; 4(19): 57-64.
2. Калинин Н.В. Влияние триметазида на безболевою ишемию миокарда и диастолическую функцию левого желудочка у пациентов, получающих антрациклиновые антибиотики. *Вестник неотложной и восстановительной медицины*. 2006; 2: 195-198.

3. Абдрахманова А.И., Амиров Н.Б., Сайфуллина Г.Б. Безболевая ишемия миокарда (обзор литературы). *Вестник современной клинической медицины*. 2015; 8(6): 103-115.
4. Гуревич М.А. Безболевая ишемия миокарда: вопросы патогенеза и лечения. *Consilium medicum*. 2007; 11: 13-17.
5. Ватутин Н.Т., Калинин Н.В., Кетинг Е.В. Безболевая ишемия миокарда. *Практическая ангиология*. 2010; 1(30). Режим доступа: <http://angiology.com.ua/article/279.htm> Дата обращения: 29.11.2017
6. Митьковская Н.П., Патеюк И.В. Безболевая ишемия миокарда: патофизиологические особенности, прогностическое значение. *Медицинский журнал*. 2007; 4(22): 12-15.
7. Лямина Н.П., Карпова Э.С. Претендентные маркеры эффективности и безопасности физической кардиореабилитации больных ишемической болезнью сердца. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016; 5-1: 54-60.
8. Гайрабекова Ф.Р., Чичкова М.А. Динамика фракций МВ-креатинфосфокиназы и тропонина Т в сыворотке крови у пациентов с ишемической болезнью сердца до и после стентирования коронарных артерий. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 2: 17.
9. Чичков Ю.М., Гайрабекова Ф.Р. Динамика острофазового ответа как диагностический маркер синдрома «малых поврежденных миокарда» до и после стентирования коронарных артерий. *Сердечно-сосудистые заболевания*. 2013; 14(6): 283.
10. Tang W.H., Francis G.S., Morrow D.A., Newby L.K., Cannon C.P., Jesse R.L., Storrow A.B., Christenson R.H. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical utilization of cardiac biomarker testing in heart failure. *Clin. Biochem*. 2008; 41(4-5): 210-221. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2007.07.002
11. Морозов Ю.А., Дементьева И.И., Чарная М.А., Палюлина М.В., Исаева А.М., Гладышева В.Г. Интерпретация результатов определения тропонина Т и миоглобина после реваскуляризации миокарда. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. 2008; 1(3): 21-24.
12. Вельков В.В. Революция в кардиологии; высокочувствительное измерение кардиальных тропонинов: «тропонин-отрицательных больше нет». *Клинико-лабораторный консилуим*. 2011; 40(4): 24-43.
13. Вельков В.В. Третье всеобщее определение инфаркта миокарда: решающее значение высокочувствительных тропонинов. *Клинико-лабораторный консилуим*. 2013; 47(4): 12-28.
14. Кремнева Л.В., Суплотов С.Н., Шалаев С.В. Оценка высокочувствительных тестов на тропонин в диагностике острого коронарного синдрома. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2016; 12(2): 204-209.
15. Korosoglou G., Lehrke S., Muller D., Hosch W., Kauczor H.U., Humpert P.M., Giannitis E., Katus H.A. Determinants of troponin release in patients with stable coronary artery disease: Insight from CT angiography characteristics of atherosclerotic plaque. *Heart*. 2011; 97: 823-831. DOI: 10.1136/hrt.2010.193201
16. Rubin J., Matsushita K., Ballantyne C.M., Hoogeveen R., Coresh J., Selvin E. Chronic hyperglycemia and subclinical myocardial injury. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012; 59(5): 484-489. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.10.875
17. Pascual-Figal D.A., Casas T., Ordóñez-Lianes J., Manzano-Fernandez S., Bonaque J.C., Boronat M., Muñoz-Esparza C., Valdes M., Januzzi J.L. Highly sensitive troponin T for risk stratification of acutely destabilized heart failure. *Am. Heart J.* 2012; 163(96): 1002-1010. DOI: DOI: 10.1016/j.ahj.2012.03.015
18. Jaffe A.S. Troponin — past, present and future. *Curr. Prob. Cardiol.* 2012; 37(6): 209-228. DOI: 10.1016/j.cpcardiol.2012.02.002
19. Lippi G., Montagnana M., Gervellin G. High sensitive troponin immunoassays: navigating between the scylla and charybdis. *Adv. Clin. Chem.* 2012; 58: 1-29.
20. Ndrepepa G., Braun S., Mehili J., Birkmeier K.A., Byrne R.A., Ott I., Hosl K., Schulz S., Fusaro M., Pache J., Hausleiter J., Laugwitz K.L., Massberg S., Seyfarth M., Schomig A., Kastrati A. Prognostic value of sensitive troponin T in patients with stable and unstable angina and undetectable conventional troponin. *Am. Heart J.* 2011; 161: 68-75. DOI: 10.1016/j.ahj.2010.09.018
21. Быкова А.А., Думикян А.Ш., Азизова О.А., Пирязев А.П., Сергиенко В.И., Сыркин А.Л. Прогностическое значение кобальтсвязывающей способности альбумина в плазме крови у пациентов с острым коронарным синдромом. *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия*. 2014; 7(6): 4-8.
22. Dawie J., Chawla R., Worku Y., Azazh A. Diagnosis of ischemic heart disease using CK-MB, troponin-I and ischemia modified albumin. *Ethiop. Med. J.* 2011; 49(1): 25-33.
23. Sinha M.K. Role of «Ischemia modified albumin» a new biochemical marker of myocardial ischemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg. Med.* 2004; 3-4.
24. Литус Е.А., Зайцев В.Г., Островский О.В. Разработка протокола определения кобальтсвязывающей способности сыворотки у пациентов с возможной ишемией миокарда. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2008; 9: 51.
25. Lyamina N.P., Kotelnikova E.V., Karpova E.S., Senchikhin V.N., Lipchanskaya T.P., Lyamina S.V., Downey H.F., Manukhina E.B. A New Physical Rehabilitation Program Based on Adaptation to Myocardial Ischemia is Cardioprotective for Patients With Ischemic Heart Disease: A Manifestation of Ischemic Preconditioning? *Circulation*. 2013; 128: A14121.
26. Lopaschuk G.D., Ussher J.R., Folmes C.D., Jaswal J.S., Stanley W.C. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol. Rev.* 2010; 90(1): 207-258. DOI: 10.1152/physrev.00015.2009
27. Apple F.S. Clinical biomarkers of cardiac injury: cardiac troponins and natriuretic peptides. *Toxicol. Pathol.* 2006; 34(1): 91-93. DOI: 10.1080/01926230500431368
28. Лямина Н.П., Котельникова Е.В., Бизяева Е.А., Карпова Э.С. Подходы, потенцирующие кардиопротективный эффект внестационарных физических тренировок, у больных ишемической болезнью сердца после коронарного стентирования при многососудистом поражении. *Кардиология*. 2014; 10: 19-25.
29. Сальников А.С., Сорокина Н.Н., Рукавишников М.Ю., Офицеров В.И. Белок, связывающий жирные кислоты — серологический маркер поражения миокарда. *Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2012; 32(1): 86-92.
30. Haltern G., Peiniger S., Bufe A., Reiss G., Gulker H., Schefold T. Comparison of usefulness of heart-type fatty acid binding protein versus cardiac troponin T for diagnosis of acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 2010; 105(1): 1-9. DOI: 10.1016/j.amjcard.2009.08.645
31. Naroo G., Ali S., Butros V. Elevated heart-type fatty acid binding protein predicts early myocardial injury and aids in the diagnosis of non-ST elevation myocardial infarction. *Hong Kong J. Emergency Med.* 2009; 16: 141-147.
32. Colli A., Josa M., Pomar J., Mestres C.A., Gherli T. Heart fatty acid binding protein in the diagnosis of myocardial infarction: where do we stand today? *Cardiology*. 2007; 108(1): 4-10. DOI: 10.1159/000095594
33. Viswanathan K., Kilcullen N., Morrell C., Thistlethwaite S.J., Sivanathan M.U., Hassan T.B., Barth J.H., Hall A.S. Heart-type fatty acid binding protein predicts long-term mortality and re-infarction in consecutive patients with suspected acute coronary syndrome who are troponin-negative. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010; 55(23): 2590-2598. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.12.062
34. Медведева Е.А. Применение биомаркеров для диагностики, прогнозирования и управляемой терапии хронической сердечной недостаточности. *Сибирское медицинское обозрение*. 2017; 4(106): 105-114. DOI: 10.20333/2500136-2017-4-105-114
35. Бурнашева Г.А., Напалков Д.А. Натрийуретические пептиды: использование в современной кардиологии. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2015; 70(5): 568-572. DOI: 10.15690/vramn.v70.i5.1443
36. Александрова Е.Б., Сидоренко Б.А. Мозговой натрий уретический пептид в ранней диагностике хронической сердечной недостаточности у пациентов с сохраненной фракцией выброса левого желудочка. *Кардиология*. 2012; 52(11): 27-32.
37. Копица Н.П. Прогностическая ценность мозгового натрийуретического паптида у больных острым коронарным синдромом. *Международный медицинский журнал*. 2011; 17(1): 54-57.
38. Малышев И.Ю. *Стресс-белки в биологии и медицине*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 176 с.
39. Лямина Н.П., Котельникова Е.В., Карпова Э.С., Бизяева Е.А., Лямина С.В. Адаптация к гипоксии и ишемическое preconditionирование: патофизиологические и клинические аспекты кардиопротекции у больных с коронарной патологией. *CardioComatka*. 2015; 6(3): 27-32.
40. Князькова Л.Г., Могутнова Т.А., Ломиворотова Л.В., Бобшко В.А., Ломиворотов В.Н. Хирургический стресс и белки теплового шока HSP70 при операциях аортокоронарного шунтирования. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2010; 1: 41-43.

41. Lyamina N., Karpova E., Lyamina S., Kotelnikova E., Sencikhin V., Lipchanskaya T. Molecular markers of ischemia in myocardial cardioprotection assessment in physical rehabilitation programs in cardiac patients. *Eur. Heart J.* 2017; 38(Suppl. 1): ehx504.P3427. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx504.P3427

References

1. Papanova E., Timonin S. [Mortality from diseases of the circulatory system in Russia and Moscow in the light of world trends]. *Moskovskaya medicina [Moscow Medicine]*. 2017; 4(19): 57-64. (in Russian)
2. Kalinkina N.I. [Effect of Trimetazidine on myocardial ischemia and left ventricular diastolic function in patients receiving anthracycline antibiotics]. *Vestnik neotloznoi i vosstanovitelnoi mediciny [Bulletin of emergency and restorative medicine]*. 2006; 2: 195-198. (in Russian)
3. Abdrakhmanova A.I., Amirov N.B., Saifullina G.B. [Silent myocardial ischemia (literature review)]. *Vestnik sovremennoi klinicheskoi mediciny [Bulletin of contemporary clinical medicine]*. 2015; 8(6): 103-115. (in Russian)
4. Gurevich M.A. [Painless myocardial ischemia: pathogenesis and treatment issues]. *Consilium medicum [Consilium medicum]*. 2007; 11: 13-17. (in Russian)
5. Vatutin N.T., Kalinkina N.I., Keting E.V. [Pain-free myocardial ischemia]. *Prakticheskaya angiologiya [Practical angiology]*. 2010; 1(30). Available at: <http://angiology.com.ua/article/279.htm> Retrieved: 29.11.2017 (in Russian)
6. Mit'kovskaya N.P., Pateyuk I.V. [Painless myocardial ischemia: pathophysiological characteristics, prognostic of value]. *Medicinskii zhurnal [Medical journal]*. 2007; 4(22): 12-15. (in Russian)
7. Lyamina N.P., Karpova E.S. [Claimed markers of effectiveness and safety of physical cardiorehabilitation patients with heart disease]. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamentalnykh issledovaniy [International journal of applied and fundamental research]*. 2016; 5-1: 54-60. (in Russian)
8. Gayrabekova F.R., Chichkova M.A. [Dynamics of fractions of MB-creatin phosphokinase and troponin T in serum in patients with coronary heart disease before and after stenting of the coronary arteries]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya [Modern problems of science and education]*. 2015; 2: 17. (in Russian)
9. Chichkov Yu.M., Gayrabekova F.R. [The dynamics of the acute-phase response as a diagnostic marker of the syndrome of «minor myocardial damage» before and after stenting of coronary arteries]. *Serdechno-sosudistye zabolevaniya [Cardiovascular disease]*. 2013; 14(6): 283. (in Russian)
10. Tang W.H., Francis G.S., Morrow D.A., Newby L.K., Cannon C.P., Jesse R.L., Storrow A.B., Christenson R.H. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical utilization of cardiac biomarker testing in heart failure. *Clin. Biochem.* 2008; 41(4-5): 210-221. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2007.07.002
11. Morozov Y.A., Dementiev I.I., Chernaya M.A., Palyulina M.V., Isaeva A.M., Gladysheva V.G. [Interpretation of the results of troponin t and myoglobin determination after myocardial revascularization]. *Kardiologiya i serdechno-sosudistaya hirurgiya [Cardiology and cardiovascular surgery]*. 2008; 1(3): 21-24. (in Russian)
12. Velkov V.V. [Revolution in cardiology; highly sensitive measurement of cardiac troponin: «troponin-negative no more»]. *Kliniko-laboratornyi konsilium [Clinical and laboratory consultation]*. 2011; 40(4): 24-43. (in Russian)
13. Velkov V.V. [The third universal definition of myocardial infarction is the crucial knowledge of highly sensitive troponins]. *Kliniko-laboratornyi konsilium [Clinical and laboratory consultation]*. 2013; 47(4): 12-28. (in Russian)
14. Kremneva L.V., Suplotov S.N., Shalaev S.V. [Assessment of highly sensitive tests for troponin in the diagnosis of acute coronary syndrome]. *Racional'naya farmakoterapiya v kardiologii [Rational pharmacotherapy in cardiology]*. 2016; 12 (2): 204-209. (in Russian)
15. Korooglou G., Lehrke S., Muller D., Hosch W., Kauczor H.U., Humpert P.M., Giannitsis E., Katus H.A. Determinants of troponin release in patients with stable coronary artery disease: Insight from CT angiography characteristics of atherosclerotic plaque. *Heart*. 2011; 97: 823-831. DOI: 10.1136/hrt.2010.193201
16. Rubin J., Matsushita K., Ballantyne C.M., Hoogeveen R., Coresh J., Selvin E. Chronic hyperglycemia and subclinical myocardial injury. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012; 59(5): 484-489. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.10.875

17. Pascual-Figal D.A., Casas T., Ordóñez-Lianes J., Manzano-Fernández S., Bonaque J.C., Boronat M., Muñoz-Esparza C., Valdes M., Januzzi J.L. Highly sensitive troponin T for risk stratification of acutely decompensated heart failure. *Am. Heart J.* 2012; 163(96): 1002-1010. DOI: 10.1016/j.ahj.2012.03.015
18. Jaffe A.S. Troponin — past, present and future. *Curr. Prob. Cardiol.* 2012; 37(6): 209-228. DOI: 10.1016/j.cpcardiol.2012.02.002
19. Lippi G., Montagnana M., Gervellin G. High sensitive troponin immunoassays: navigating between the scylla and charybdis. *Adv. Clin. Chem.* 2012; 58: 1-29.
20. Ndrepepa G., Braun S., Mehili J., Birkmeier K.A., Byrne R.A., Ott I., Hosl K., Schulz S., Fusaro M., Pache J., Hausleiter J., Laugwitz K.L., Massberg S., Seyfarth M., Schomig A., Kastrati A. Prognostic value of sensitive troponin T in patients with stable and unstable angina and undetectable conventional troponin. *Am. Heart J.* 2011; 161: 68-75. DOI: 10.1016/j.ahj.2010.09.018
21. Bykov A.A., Domican A.S., Azizova O.A., Piryazev A.P., Sergienko V.I., Syrkin A.L. [Prognostic value koblitskaya ability of albumin in blood plasma in patients with acute coronary syndrome]. *Kardiologiya i serdechno-sosudistaya hirurgiya [Cardiology and cardiovascular surgery]*. 2014; 7(6): 4-8. (in Russian)
22. Dawie J., Chawla R., Worku Y., Azazh A. Diagnosis of ischemic heart disease using CK-MB, troponin-I and ischemia modified albumin. *Ethiop. Med. J.* 2011; 49(1): 25-33.
23. Sinha M.K. Role of «Ischemia modified albumin» a new biochemical marker of myocardial ischemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg. Med.* 2004; 3-4.
24. Litus E.A., Zaitsev V.G., Ostrovsky O.V. [Development of a Protocol for determination of cobalt binding capacity of serum in patients with possible myocardial ischemia]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika [Clinical laboratory diagnostics]*. 2008; 9: 51 (in Russian)
25. Lyamina N.P., Kotelnikova E.V., Karpova E.S., Sencikhin V.N., Lipchanskaya T.P., Lyamina S.V., Downey H.F., Manukhina E.B. A New Physical Rehabilitation Program Based on Adaptation to Myocardial Ischemia is Cardioprotective for Patients With Ischemic Heart Disease: A Manifestation of Ischemic Preconditioning? *Circulation*. 2013; 128: A14121.
26. Lopaschuk G.D., Ussher J.R., Folmes C.D., Jaswal J.S., Stanley W.C. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol. Rev.* 2010; 90(1): 207-258. DOI: 10.1152/physrev.00015.2009
27. Apple F.S. Clinical biomarkers of cardiac injury: cardiac troponins and natriuretic peptides. *Toxicol. Pathol.* 2006; 34(1): 91-93. DOI: 10.1080/01926230500431368
28. Lyamina N.P., Kotelnikova E.V., Bizyaeva E.A., Karpova E.S. [Approaches potentiating cardioprotective effect in non-stationary physical training in patients coronary heart disease in coronary stenosis with multivessel disease]. *Kardiologiya [Cardiology]*. 2014; 10: 19-25. (in Russian)
29. Salnikov A.S., Sorokina N.N., Rukavishnikov M.Yu., Ofitserov V.I. [Protein binding fatty acids-serological marker of myocardial injury]. *Byulleten' Sibirskogo otdeleniya Rossijskoi akademii medicinskih nauk [Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences]*. 2012; 32(1): 86-92. (in Russian)
30. Haltern G., Peiniger S., Bufer A., Reiss G., Gulker H., Schefold T. Comparison of usefulness of heart-type fatty acid binding protein versus cardiac troponin T for diagnosis of acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 2010; 105(1): 1-9. DOI: 10.1016/j.amjcard.2009.08.645
31. Naroo G., Ali S., Butros V. Elevated heart-type fatty acid binding protein predicts early myocardial injury and aids in the diagnosis of non-ST elevation myocardial infarction. *Hong Kong J. Emergency Med.* 2009; 16: 141-147.
32. Colli A., Josa M., Pomar J., Mestres C.A., Gherli T. Heart fatty acid binding protein in the diagnosis of myocardial infarction: where do we stand today? *Cardiology*. 2007; 108(1): 4-10. DOI: 10.1159/000095594
33. Viswanathan K., Kilcullen N., Morrell C., Thistlethwaite S.J., Sivanathan M.U., Hassan T.B., Barth J.H., Hall A.S. Heart-type fatty acid binding protein predicts long-term mortality and re-infarction in consecutive patients with suspected acute coronary syndrome who are troponin-negative. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010; 55(23): 2590-2598. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.12.062
34. Medvedeva E.A. [Application of biomarkers for diagnosis, prognosis and controlled therapy of chronic heart failure]. *Sibirskoe medicinskoe obozrenie. [Siberian medical review]*. 2017; 4(106): 105-114. DOI: 10.20333/2500136-2017-4-105-114 (in Russian)
35. Burnasheva G.A., Napalkov D.A. [Natriuretic peptides: use in modern cardiology]. *Vestnik Rossijskoi akademii medicinskih nauk*.

[*Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*]. 2015; 70(5): 568-572 DOI: 10.15690/vramn.v70.i5.1443 (in Russian)

36. Alexandrova E.B, Sidorenko B.A. [Brain sodium uretic peptide in early diagnosis of chronic heart failure in patients with preserved left ventricular ejection fraction]. *Kardiologiya [Cardiology]*. 2012; 52 (11): 27-32. (in Russian)

37. Koptsa N.P. [Prognostic value of brain natriuretic peptide in patients with acute coronary syndrome]. *Mezhdunarodnyi medicinskiy zhurnal [International medical journal]*. 2011; 17(1): 54-57. (in Russian)

38. Malyshev I.Yu. [*Stress proteins in biology and medicine*]. М.: GEOTAR-Media; 2012. 176 p. (in Russian)

39. Lyamina N.P, Kotelnikova E.V, Karpova E.S., Bizyaeva E.A., Lyamina S.V. [Adaptation to hypoxia and ischemic preconditioning:

pathophysiological and clinical aspects of cardioprotection in patients with coronary pathology]. *CardioSomatica [Cardiosomatics]*. 2015; 6(3): 27-32. (in Russian)

40. Knyazkova L.G., Mogutnova T.A., Lomivorotova L.V., Boboshko V.A., Lomivorotov V.N. [Surgical stress and the heat shock proteins HSP70 at operations of coronary artery bypass surgery]. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokirurgiya [Pathology of blood circulation and cardiac surgery]*. 2010; 1: 41-43. (in Russian)

41. Lyamina N., Karpova E., Lyamina S., Kotelnikova E., Senchikhin V., Lipchinskaya T. Molecular markers of ischemia in myocardial cardioprotection assessment in physical rehabilitation programs in cardiac patients. *Eur. Heart J.* 2017; 38(Suppl. 1): ehx504.P3427. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx504.P3427

Сведения об авторах

Лямина Надежда Павловна — доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по науке Научно-исследовательского института кардиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Карпова Элла Станиславовна — кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца Научно-исследовательского института кардиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского»

Котельникова Елена Владимировна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела артериальной гипертензии Научно-исследовательского института кардиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского»

УДК 616-092

Прямые эффекты эритропоэтина на функциональные свойства макрофагальных клеток человека

Мелашенко О.Б., Меньяло М.Е., Мелашенко В.В., Газатова Н.Д., Гончаров А.Г., Селедцов В.И.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Министерства образования и науки Российской Федерации. 236041, Калининград, ул. Александра Невского, д. 14

Цель. Исследовали прямые эффекты эритропоэтина (erythropoietin, Epo) на функциональную активность моноцитов/макрофагов (Мц/Мф) человека *in vitro*. **Методы.** Популяцию CD14⁺ клеток получали из мононуклеарных клеток (МНК) крови человека методом позитивной магнитной колоночной сепарации. Мц/Мф культивировали без липополисахарида (ЛПС) или с ЛПС в течение 24 ч. Мембранную экспрессию CD14 (гликозилфосфатидилинозитол-связанный белок), CD16 (низкоафинный Fc-рецептор), CD119 (рецептор интерферона-γ), CD124 (рецептор интерлейкина-4) и CD197 (хемокиновый рецептор CCR7) оценивали методом проточной цитофлуорометрии. Содержание фактора некроза опухоли-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α), интерлейкина-1β (interleukin-1β, IL-1β), IL-6 и IL-10 в культуральных супернатантах определяли иммуноферментным методом. **Результаты.** Показано, что Epo достоверно снижал количество CD14⁺, CD124⁺ и CD197⁺ клеток, но не CD16⁺ клеток среди неактивированных Мф. Epo также заметно уменьшал количество CD197⁺ клеток, но не CD14⁺, CD124⁺ и CD197⁺ клеток, среди Мф, активированных ЛПС. Кроме того, Epo был способен умеренно усиливать продукцию интерлейкина-1β (interleukin-1β, IL-1β) и IL-6, неактивированными Мф и, наоборот, снижать продукцию этих цитокинов, осуществляемую активированными Мф. В то же время, Epo не оказывал существенного влияния на макрофагальную продукцию TNF-α и IL-10. **Заключение.** Направленность и выраженность регуляторных эффектов Epo на функции Мц/Мф зависят от активационного состояния этих клеток.

Ключевые слова: эритропоэтин, макрофаг, липополисахарид, цитокин, иммунорегуляция.

Для цитирования: Мелашенко О.Б., Меньяло М.Е., Мелашенко В.В., Газатова Н.Д., Гончаров А.Г., Селедцов В.И. Прямые эффекты эритропоэтина на функциональные свойства макрофагальных клеток человека. Патогенез. 2018; 16(1): 26—33

DOI:

Для корреспонденции: Селедцов Виктор Иванович, e-mail: seledtsov@rambler.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках госзадания Минобрнауки РФ № 20.5562.2017/8.9.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 19.12.2017

Directs effects of erythropoietin on functional properties of human monocytes/macrophages

Melashchenko O.B., Meniailo M.E., Malashchenko V.V., Gazatova N.D., Goncharov A.G., Seledtsov V.I.

Immanuel Kant Baltic Federal University, A. Nevskogo Str. 14, Kaliningrad 236041, Russian Federation

Aim. We studied direct effects of erythropoietin (Epo) on the function of human monocytes/macrophages (Mc/Mphs) *in vitro*. **Methods.** CD14-positive cells were isolated from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by positive magnetic separation. Mc/Mphs were cultured without or with lipopolysaccharide (LPS) for 24 hours. Membrane expression of CD14 (membrane glycosylphosphatidylinositol-bound protein), CD16 (low-affinity Fc receptor), CD119 (interferon-γ receptor), CD124 (interleukin-4 receptor), and CD197 (chemokine receptor CCR7) was evaluated by flow cytometry. The content of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), IL-6 and IL-10 in culture supernatants was determined by the enzyme immunoassay. **Results.** Epo was found to significantly reduce the amount of CD14⁺, CD124⁺ and CD197⁺ cells, but not CD16⁺ and CD119⁺ cells, among non-activated Mphs. Epo also detectably reduced the content of CD197⁺ cells, but not CD14⁺, CD124⁺ and CD197⁺ cells, among LPS-activated Mphs. In addition, Epo was able to moderately increase the production of interleukin-1β (IL-1β) and IL-6 by non-activated Mphs and, vice versa, to reduce the production of these cytokines by activated Mphs. At the same time, Epo did not significantly affect the Mph production of TNF-α and IL-10. **Conclusion.** Direction and intensity of regulatory effects of Epo on Mph functions depend on the activation status of these cells.

Keywords: erythropoietin, macrophage, lipopolysaccharide, cytokine, immunoregulation.

For citation: Melashchenko O.B., Meniailo M.E., Malashchenko V.V., Gazatova N.D., Goncharov A.G., Seledtsov V.I. [Directs effects of erythropoietin on functional properties of human monocytes/macrophages] Patogenez [Pathogenesis]. 2018; 16(1): 26—33 (In Russian).

DOI:

For correspondence: Seledtsov Victor Ivanovich, e-mail: seledtsov@rambler.ru

Funding. The work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation No. 20.5562.2017 / 8.9.

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

Received: 19.12.2017

Введение

Эритропоэтин (Еро) — гемопоэтин с молекулярной массой 34 кДа, играющий основополагающую роль в поддержании эритропоэза [1]. Еро в основном продуцируется интерстициальными фибробластами почек и перисинусоидальными клетками печени [2]. В ответ на гипоксию продуцировать Еро в умеренных количествах способны клетки разных органов и тканей организма [3]. Реализацию своих эритропоэтических функций Еро осуществляет посредством связывания со специфическим мембранным мономерным рецептором (ЕроR) [4]. В отличие от мономерного эритроидного ЕроR, рецептор Еро, экспрессирующийся на неэритроидных клетках, представляет собой димер, состоящий из мономерного ЕроR (α -цепь) и β -цепи, является общей для рецепторов IL-3, IL-5 и гранулоцит-макрофагального фактора (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-SCF) [5]. После взаимодействия Еро с ЕроR происходит активация янус киназы 2 (JAK2), которая фосфорилирует множественные остатки тирозина в цитоплазматическом домене ЕроR и связанные с ним внутриклеточные сигнальные молекулы [6]. Эти взаимодействия поддерживают клеточную жизнеспособность и антиапоптотические процессы в клетке [7, 8]. Мембранная экспрессия ЕроR выявлена не только на эритроидных клетках, но также на эндотелиальных клетках, мегакариоцитах, нейронах [9]. В условиях тканевой ишемии показан тканепротективный эффект на сердечную мышцу [10], на ткань почки [11] и нервную ткань [12]. Также установлено, что Еро стимулирует процесс заживления ран [13].

Широкий спектр клеточных продуцентов Еро и повсеместная распространенность ЕроR в тканях организма подразумевают его вовлеченность в метаболические тканевые процессы, непосредственно не связанные с центральным гемопозом. Иммунная система не является исключением в этом отношении. Экспрессия ЕроR обнаружена на моноцитах/макрофагах (Мц/Мф), дендритных клетках и лимфоцитах [9, 14]. Важно, что активированные Мф способны негативно влиять на эритропоэз за счет продукции провоспалительных цитокинов, таких, как фактор некроза опухоли- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) и интерлейкин-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) [15].

В литературе описаны как про- так и противовоспалительные эффекты Еро [16, 17]. Показаны как иммуностимулирующие [18], так и иммуносупрессивные свойства этого цитокина [19]. В разных экспериментальных моделях показано, что экзогенный Еро способен ослаблять аутоиммунное воспаление [18, 20]. Есть основания полагать, что макрофагальные клетки, экспрессирующие ЕроR и чувствительные к действию Еро, являются важными элементами в механизме действия Еро, как на врожденный, так и на адаптивный иммунитет. В этой работе мы исследовали прямые эффекты Еро на функциональную активность Мц/Мф, выделенных из крови здоровых доноров и показали их зависимость от активационного состояния макрофагальных клеток.

Материалы и методы

Материалом для исследования служила венозная гепаринизированная кровь (20 мл), взятая стандартным методом из локтевой вены 11 условно здоровых доноров (мужчин и женщин в возрасте от 21 до 40 лет) с помощью стандартных вакуумных систем «BD Vacutainer™» («Greiner-bio-one», Австрия). Все доноры подписывали информированное согласие.

Выделение Мц/Мф. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из крови посредством центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографин (Ficoll-Paque™ Premium sterile solution, GE Healthcare, США), плотность $1,077 \pm 0,001$ g/ml). Подсчет клеток проводили на счетчике клеток Z2 (Beckman Coulter, США). CD14⁺ клетки выделяли из взвеси МНК методом позитивной магнитной колоночной сепарации (MS Columns, Miltenyi Biotec, Германия) с использованием суперпарамагнитных частиц, конъюгированных с антителами к молекуле CD14 (MicroBeads, Miltenyi Biotec, Германия), согласно инструкции производителя. Чистоту и жизнеспособность CD14⁺ клеток оценивали на проточном цитофлуориметре (Accuri C6, BD Biosciences, США) с использованием анти-CD14 антител, конъюгированных с PerCP (eBioscience, США) и раствора пропидиум иодида (PI) (eBioscience, США).

Культивирование клеток. Выделенные CD14⁺ клетки культивировали 24 часа в бессывороточной среде Tech-MACS (Miltenyi Biotec) в 24-луночных планшетах в концентрации $1,0 - 1,5 \times 10^6$ кл/мл. В качестве активатора использовали бактериальный ЛПС из *Salmonella typhi* (Пирогенал, МЕДГАМАЛ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. ГАМАЛЕИ, Россия) в концентрации 1 мкг/мл. Рекомбинантный Еро человека (Эпокрин, Россия) добавляли в клеточные пробы в концентрации 0.1; 1.0; или 10.0 MU/ml в начале культивирования.

Проточная цитофлуориметрия. Экспрессию мембранных молекул оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием коктейля антител, конъюгированных с флуоресцентными метками: CD14-PerCP (eBioscience, США), CD16-FITC, CD119-PE, CD124-APC и CD197-AF488 (BioLegend, США). Настройку цветовой компенсации проводили с помощью одноцветных контролей. Для выставления границ зоны позитива и учета неспецифического связывания использовали неокрашенный контроль и FMO-контроль. Уровень неспецифического фонового сигнала учитывали с помощью изотип контролей (Iso IgG2a, κ — APC, PE, AF488 и Iso IgG1, κ — FITC, PE, BioLegend, США).

Иммуноферментный анализ. Концентрации IL-10, IL-6, IL-1 β и TNF- α в культуральных супернатантах определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих тест-систем (Вектор Бест, Россия). Анализ осуществляли на автоматическом иммуноферментном анализаторе (ChemWell 2910, Awareness Technology Inc., США).

Статистика. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences, США). Полученные результаты оценивали методами статистического описания и проверки статистических гипотез. Анализировали выборку с помощью гипотезы нормальности распределения (Колмогорова—Смирнова). В качестве средневывборочной характеристики использовали медиану (Me), первый и третий квартили (Q1; Q3). Для оценки статистической достоверности исследуемых выборок использовали непараметрический критерий Вилкоксона для зависимых выборок, не подчиняющихся нормальному закону распределения. Различия считались значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты исследования

На рис. 1 представлена использованная нами стратегия гейтирования, которая позволяла идентифицировать CD14⁺, а также CD16⁺, CD119⁺, CD124⁺ и CD197⁺ клетки среди Мц/Мф.

Чистота выделенных из МНК CD14⁺ клеток составила 97,9 (93,6; 99,2)%, их исходная жизнеспособность составляла 95,4 (94,0; 99,5)%. Инкубация 24 часа способствовала снижению, как общего количества клеток, так и их жизнеспособности примерно на 10% (данные не показаны).

CD14 — гликозилфосфатидилинозитол-связанный белок, экспрессируется на макрофагах, действует как ко-рецептор для бактериального ЛПС [21]. Мы нашли, что Еро в двух концентрациях (1.0 и 10.0 MU/ml) снижал содержание CD14-позитивных клеток среди прокультивированных 24 ч неактивированных Мц/Мф (табл. 1, рис. 2). CD16 является низкоафинным Fc-рецептором, который обеспечивает вовлечение иммунокомпетентных клеток в процесс антителозависимой цитотоксичности [22]. Как показано в табл. 1, Еро не оказывал существенного влияния на экспрессию CD16, выявляемую на неактивированных Мф.

CD119 является рецептором к интерферону- γ (interferon- γ , IFN- γ), который при взаимодействии с соответствующим лигандом запускает механизм классической,

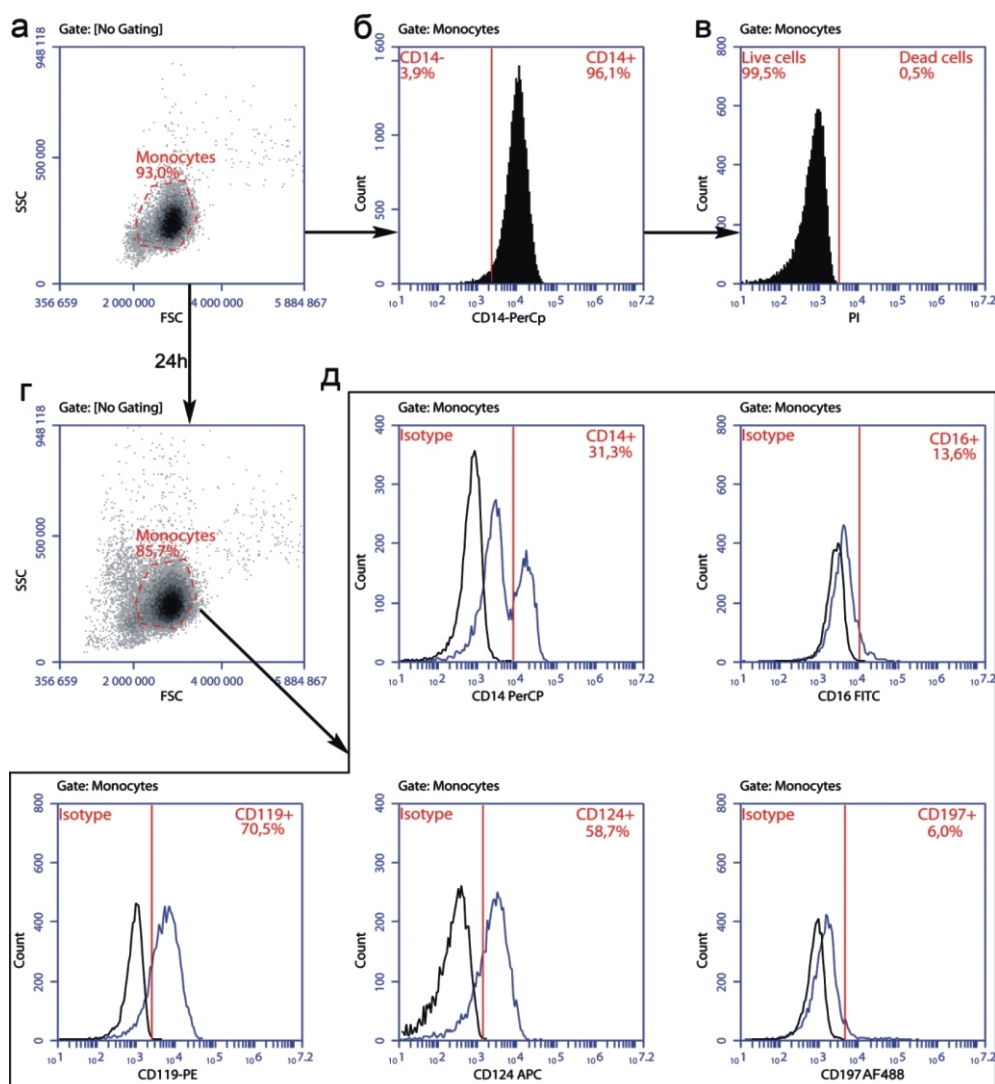


Рис. 1. Алгоритм цитометрического анализа моноцитов/макрофагов при определении их фенотипа: а — распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию до инкубации; б — содержание CD14⁺ клеток до инкубации; в — жизнеспособность клеток, определяемая по окрашиванию PI: зона позитива — мертвые, зона негатива — живые; г — распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию после инкубации 24 часа; д — содержание CD14⁺ клеток; содержание CD16⁺ клеток; содержание CD119⁺ клеток; содержание CD124⁺ клеток; содержание CD197⁺ клеток/

провоспалительной (M1) активации Мц/Мф [23]. Согласно данным, представленным в табл. 1, Еро не оказывал существенного влияния на экспрессию CD119 на неактивированных Мф.

CD124 относится к 1 типу рецепторов IL-4. Связывание этого рецептора с соответствующим лигандом способствует M2 альтернативной активации Мф, которая ослабляет их воспалительную активность [24]. Полученные нами данные указывают на способность Еро заметно снижать содержание CD124⁺ клеток среди неактивированных Мф (табл. 1, рис. 2).

CD197 (CCR7) является рецептором двух лигандов хемокинов группы С-С, которые выделяются стромальными клетками Т-зон лимфатических узлов. Связывание этих хемокинов с CCR7 на Мц/Мф стимулирует их миграцию в Т-зависимые зоны лимфоидных органов, где эти клетки активно вовлекаются в адаптивный иммуногенез [25]. Как показано в табл. 1 и на рис. 2, Еро был способен заметно снижать содержание CD197⁺ клеток среди неактивированных Мф.

Согласно полученным данным, активация Мц/Мф ЛПС не оказывала существенного влияния на содержание CD16⁺ и CD119⁺ клеток, но приводила к снижению относительного количества CD14⁺ (с 27,3 (11,2; 38,4) до 10,1 (8,4; 20,3), $p < 0,05$) и CD124⁺ клеток (с 52,1 (44,6; 62,8) до 46,8 (45,2; 55,8), $p < 0,05$) и повышала содержание CD197⁺ (с 6,2 (2,0; 10,9) до 7,9 (4,2; 12,1), $p < 0,05$). Как показано в табл. 2, Еро снижал содержание CD197⁺ клеток среди активированных Мф, не оказывая существенного влияния на экспрессию всех других исследованных маркеров.

В последующих экспериментах мы оценили влияние Еро на макрофагальную продукцию TNF- α , IL-1 β , IL-6 и IL-10. TNF- α — провоспалительный фактор, который играет чрезвычайно важную роль в развитии противомикробных и аутоиммунных реакций. IL-1 β обладает не только провоспалительной, но и лейкопоз-стимулирующей активностью [26]. IL-6 — медиатор острой фазы воспаления [27]. IL-10 является противовоспалительным медиатором, обладающим иммуносупрессорной активностью [28]. Согласно данным, представленным в табл. 3, культивирование Мц/Мф в присутствии Еро (10,0 МУ/мл) заметно усиливало секрецию ими IL-1 β и IL-6, но не на TNF- α и IL-10.

Вызываемая ЛПС активация Мц/Мф приводила к выраженному кратному увеличению секреции всех исследованных цитокинов. Как показано в табл. 4, Еро был способен снижать осуществляемую активированными макрофагами продукцию IL-1 β , IL-6, в меньшей степени — IL-10, но не TNF- α .

Обсуждение

Как и гранулоциты, Мф обладают высокой фагоцитарной активностью. В сравнении с гранулоцитами, Мф являются более долгоживущими. Они сами способны презентировать антигенные пептиды Т-клеткам, а также дифференцироваться в антиген-презентирующие дендритные клетки. Таким образом, Мф представляет собой ключевой элемент, связующий механизмы врожденного и адаптивного иммунитета.

Таблица 1

Содержание CD14⁺ CD16⁺, CD119⁺, CD124⁺, CD197⁺ (%) клеток среди неактивированных Мф

Маркер	Еро (МУ/ml)			
	0,0	0,1	1,0	10,0
CD14	27,3 (11,2-38,4)	26,5 (10,1-35,3)	21,6 (6,8-34,0) *	14,8 (11,9-35,1) *
CD16	12,8 (5,2-21,8)	11,8 (4,4-24,9)	10,5 (4,2-26,8)	14,0 (5,2-23,9)
CD119	78,5 (77,7-82,3)	77,2 (76,0-79,7)	78,3 (74,8-81,8)	74,3 (69,0-81,9)
CD124	52,1 (44,6-62,8)	49,3 (44,6-63,7)	48,6 (43,6-57,8) *	50,6 (41,1-57,3) *
CD197	6,2 (2,0-10,9)	5,2* (1,6-9,5)	4,6 (1,4-8,6) *	5,7 (1,9-11,7)

Примечание. Здесь и далее данные представлены в виде Ме (Q1; Q3); * — $p < 0,05$ в сравнении с клетками, культивированными без Еро, выделено жирным шрифтом.

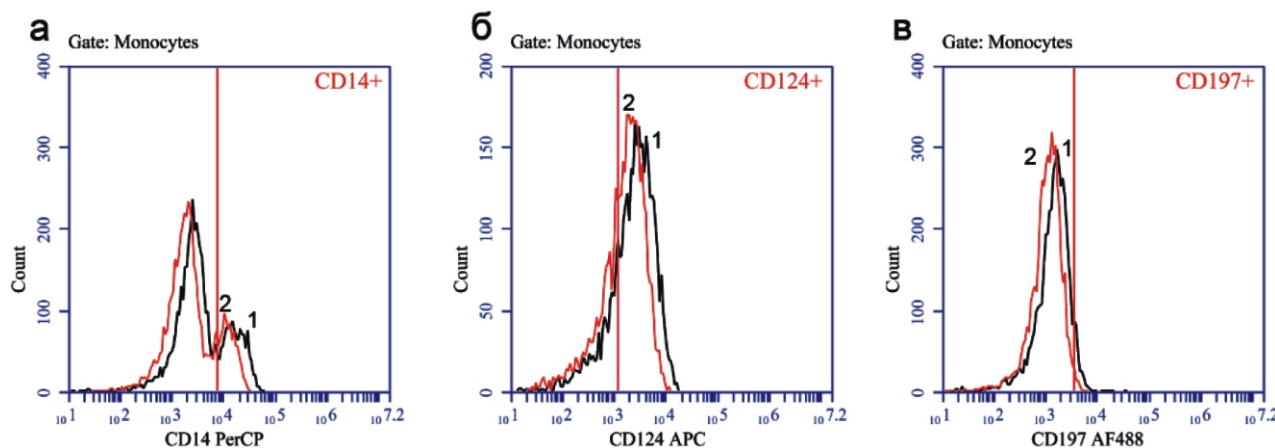


Рис. 2. Содержание CD14⁺ (а), CD124⁺ (б) и CD197⁺ (в) клеток среди неактивированных Мц/Мф.

1 — Мц/Мф, культивированные без Еро;
2 — Мц/Мф, культивированные с Еро (1 МУ/ml).

Еро играет чрезвычайно важную роль в адаптации организма к изменяющимся условиям внешней среды. Кровотечение или другие факторы, приводящие к гипоксии тканей, стимулируют продукции Еро. Еро-плейотропный цитокин обладает как гемопоэтической, так и негемопоэтической активностью [29]. Адаптивные эффекты Еро на прямую затрагивают иммунную систему.

Ранее мы [30] и другие авторы [31] показали способность Еро прямо супрессировать провоспалительные реакции Т-лимфоцитов. Убедительно показано свойство Еро супрессировать опосредуемые патогенными Т-клетками аутоиммунные реакции [31]. Вместе с тем, имеются данные о позитивном влиянии Еро на адаптивный антителогенез [32, 33]. Также описаны провоспалительные эффекты Еро, связанные с усилением активности фермента NO-оксидазы и стимуляции продукции TNF α [16, 34]. Показана способность Еро поддерживать дифференцировки Мф в зрелые дендритические клетки [35]. Согласно данным, представленным в нашей статье, Еро способен снижать экспрессию CD14, CD124 и CD197, но не CD16, на неактивированных Мф и только CD197 на активированных Мф. Эти данные, по-видимому, отражают тенденцию снижения чувствительности прокультивированных с Еро макрофагальных клеток к действию иммуноактивных молекул. Таким образом, Еро мог бы сдержи-

вать вовлечение макрофагальных клеток в адаптивный иммуногенез и в целом увеличивать порог чувствительности иммунной системы к влиянию антигенного микроокружения. С другой стороны, в наших экспериментах Еро умеренно стимулировал осуществляемую неактивированными Мф продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6. Возможно, этот эффект Еро направлен на создание цитокинового микроокружения (фона), необходимого для своевременного развития иммунных реакций, индуцируемых иммуногенными антигенными воздействиями. В то же время, продемонстрированный в нашем исследовании негативный эффект Еро на продукцию провоспалительных цитокинов активированными Мф, вместе с данными, предполагающими негативное влияние Еро на миграционную активность Мф, указывает на вовлеченность Еро в негативную регуляцию иммуногенеза, которая может быть направлена на предотвращение развития избыточных тканедеструктивных иммунных реакций. Эти результаты в полной мере согласуются с данными, указывающими на способность Еро супрессировать активность NF- κ B в активированных Мф [19]. Интересно, что в наших экспериментах Еро прямо не влиял на макрофагальную продукцию TNF- α . Отсюда можно предположить, что ранее описанные эффекты Еро на продук-

Таблица 2

Содержание CD14⁺ CD16⁺, CD119⁺, CD124⁺, CD197⁺ (%) клеток среди активированных Мф

Маркер	Еро (MU/ml)			
	0,0	0,1	1,0	10,0
CD14	10,1 (8,4; 20,3)	15,3 (7,5; 24,0)	14,3 (7,5; 25,8)	15,8 (7,6; 21,1)
CD16	12,9 (5,6; 20,7)	11,5 (4,2; 24,1)	11,3 (3,9; 20,4)	11,7 (4,7; 41,1)
CD119	74,9 (59,2; 83,0)	77,4 (69,0; 83,4)	76,9 (70,2; 82,4)	75,2 (68,9; 83,0)
CD124	46,8 (45,2; 55,8)	47,8 (44,8; 58,6)	47,1 (44,6; 58,3)	54,0 (45,4; 60,8)
CD197	7,9 (4,2; 12,1)	6,6 (3,9; 11,2) *	6,2 (3,5; 10,8) *	7,2 (4,0; 11,1) *

Примечание. * — $p < 0,05$ в сравнении с клетками, активированными ЛПС в отсутствие Еро, выделено жирным шрифтом.

Таблица 3

Продукция цитокинов (пг/мл) неактивированными макрофагальными клетками

Цитокин	Без Еро	С Еро (10.0 MU/мл)
TNF- α	18,2 (0,0; 160,1)	29,8 (0,0; 523,3)
IL-1 β	48,9 (0,0; 198,6)	70,2 (0,0; 150,0) *
IL-6	48,0 (9,0; 437,6)	94,5 (20,0; 882,0) *
IL-10	<10,0	<10,0

Примечание. * — $p < 0,05$ в сравнении с неактивированными клетками, без добавления Еро, выделено жирным шрифтом.

Таблица 4

Продукция цитокинов (пг/мл) активированными макрофагальными клетками

Цитокин	Еро (MU/ml)			
	0,0	0,1	1,0	10,0
TNF-a	1255,8 (928,4; 1798,5)	1157,0 (693,5; 1696,4)	1431,4 (823,1; 1928,2)	1411,8 (754,6; 1981,5)
IL-1b	474,6 (370,8; 621,0)	455,7 (319,2; 592,8)	342,6 (257,4; 636,6) *	426,6 (293,4; 555,6) *
IL-6	12097 (9939; 17697)	13000 (9532; 14393)	11500 (6486; 13231) *	10666 (5547; 11657) *
IL-10	131,4 (114,6; 229,2)	139,8 (75,0; 196,8)	148,2 (108,0; 170,4)	109,2 (100,8; 177,3) *

Примечание. * — $p < 0,05$ в сравнении с клетками, активированными ЛПС в отсутствие Еро, выделено жирным шрифтом.

цию TNF- α [16, 19, 30] были, скорее всего, опосредованными. В целом, полученные нами данные указывают то, что направленность и выраженность эффектов Еро на функциональную активность Мф могут зависеть от активационного состояния этих клеток.

В настоящее время складывается консенсус по целесообразности применения Еро в лечении аутоиммунных расстройств. Наиболее эффективным его использование представляется в период обострения заболевания. В пользу этого указывают следующие данные. Во-первых Еро способен прямо снижать активность патогенных Т-клеток; во-вторых, Еро может негативно влиять на миграционную и цитокин-продуцирующую активность активированных Мф; в третьих, Еро улучшает клиренс апоптотического материала, и, тем самым, снижает аутоантигенную стимуляцию иммунной системы [32]; в четвертых, Еро обладает выраженным ткане(цито)протективным эффектом, то есть он обладает антиапоптотической активностью и стимулирует регенерацию поврежденных органов и тканей; и, наконец, в пятых, Еро стимулирует эритропоэз и тем самым противодействует развитию анемии, которая является неизбежным спутником хронических воспалительных процессов.

Список литературы

1. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern. Med.* 2004; 43(8): 649-659.
2. Ifeanyi O.E. A review on Erythropoietin. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 2015; 2(4): 35-47.
3. Tamura T., Aoyama M., Ukai S., Kakita H., Sobue K., Asai K. Neuroprotective erythropoietin attenuates microglial activation, including morphological changes, phagocytosis, and cytokine production. *Brain Res.* 2017; 1662: 65-74. DOI:10.1016/j.brainres.2017.02.023
4. Brines M., Grasso G., Fiordaliso F., Sfracteria A., Ghezzi P., Fratelli M., Latini R., Xie Q.W., Smart J., Su-Rick C.J., Pobre E., Diaz D., Gomez D., Hand C., Coleman T., Cerami A. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common β -subunit heteroreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(41): 14907-14912. DOI: 10.1073/pnas.0406491101
5. Nairz M., Sonnweber T., Schroll A., Theurl I., Weiss G. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation. *Microbes Infect.* 2012; 14(3): 238-246. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.10.005
6. Ueda F., Tago K., Tamura H., Funakoshi-Tago M. Three tyrosine residues in the erythropoietin receptor are essential for janus kinase 2 V617F mutant-induced tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 2017; 292(5): 1826-1846. DOI: 0.1074/jbc.M116.749465
7. Solling C. Organ-protective and immunomodulatory effects of erythropoietin-an update on recent clinical trials. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2012; 110(2): 113-121. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00820.x
8. Watanabe M., Lundgren T., Saito Y., Cerami A., Brines M., Ostenson C.G., Kumagai-Braesch M. A nonhematopoietic erythropoietin analogue, ARA 290, inhibits macrophage activation and prevents damage to transplanted islets. *Transplantation.* 2016; 100(3): 55462. DOI: 10.1097/TP.0000000000001026
9. Lisowska K.A., Bryl E., Witkowski J.M. Erythropoietin receptor is detectable on peripheral blood lymphocytes and its expression increases in activated T lymphocytes. *Haematologica.* 2011; 96(3): 12-13. DOI: 10.3324/haematol.2010.038414
10. Arcasoy M.O. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br. J. Haematol.* 2008; 141(1): 14-31. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07014.x
11. Chen X., Wang C.C., Song S.M., Wei S.Y., Li J.S., Zhao S.L., Li B. The administration of erythropoietin attenuates kidney injury induced by ischemia/reperfusion with increased activation of Wnt/ β -catenin signaling. *J. Formos. Med. Assoc.* 2015; 114(5): 430-437. DOI: 10.1016/j.jfma.2015.01.007
12. Siren A.L., Fratelli M., Brines M., Goemans C., Casagrande S., Lewczuk P., Keenan S., Gleiter C., Pasquali C., Capobianco A., Mennini T., Heumann R., Cerami A., Ehrenreich H., Ghez-

zi P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98(7): 4044-4049. DOI: 10.1073/pnas.051606598

13. Haroon Z.A., Amin K., Jiang X., Arcasoy M.O. A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *Am. J. Pathol.* 2003; 163(3): 993-1000. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63459-1

14. Lifshitz L., Tabak G., Gassmann M., Mittelman M., Neumann D. Macrophages as novel target cells for erythropoietin. *Haematologica.* 2010; 95(11): 1823-1831. DOI: 10.3324/haematol.2010.025015

15. Jelkmann W.E., Fandrey J., Frede S., Pagel, H. Inhibition of erythropoietin production by cytokines. *Ann. NY Acad. Sci.* 1994; 718(1): 300-311.

16. Poulsen T.D., Andersen L.W., Steinbruchel D., Gotze J.P., Jorgensen O.S., Olsen N.V. Two large preoperative doses of erythropoietin do not reduce the systemic inflammatory response to cardiac surgery. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2009; 23(3): 316-323. DOI: 10.1053/j.jvca.2008.08.018

17. Pesce M., Felaco P., Franceschelli S., Speranza L., Grilli A., De Lutiis M.A., Ferrone A., Sirolli V., Bonomini M., Felaco M., Patruno, A. Effect of erythropoietin on primed leucocyte expression profile. *Open Biol.* 2014; 4(6): 140026. DOI: 10.1098/rsob.140026

18. Nairz M., Sonnweber T., Schroll A., Theurl I., Weiss G. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation. *Microbes Infect.* 2012; 14(3): 238-246. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.10.005

19. Yuan R., Maeda Y., Li W., Lu W., Cook S., Dowling P. Erythropoietin: a potent inducer of peripheral immuno/inflammatory modulation in autoimmune EAE. *PLoS One.* 2008; 3(4): e1924. DOI: 10.1371/journal.pone.0001924

20. Moransard M., Bednar M., Frei K., Gassmann M., Ogunshola O.O. Erythropoietin reduces experimental autoimmune encephalomyelitis severity via neuroprotective mechanisms. *J. Neuroinflammation.* 2017; 14(1): 202. DOI: 10.1186/s12974-017-0976-5

21. Kitchens R.L. Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. *Chem. Immunol.* 2000; 74: 61-82. PMID:10608082

22. Yeap W.H., Wong K.L., Shimasaki N., Teo E.C., Quek J.K., Yong H.X., Diong C.P., Bertolotti A., Linn Y.C., Wong S.C. CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci. Rep.* 2016; 6: 34310. DOI: 10.1038/srep34310

23. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* 2014; 6: 13. DOI: 10.12703/P6-13

24. Nelms K., Keegan A.D., Zamorano J., Ryan J.J., Paul W.E. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17(1): 701-738. DOI: 10.1146/annurev.immunol.17.1.701

25. Forster R., Davalos-Misslitz A.C., Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8(5): 362-371. DOI: 10.1038/nri2297

26. Saperstein S., Chen L., Oakes D., Pryhuber G., Finkelstein J. IL-1 β augments TNF- α -mediated inflammatory responses from lung epithelial cells. *J. Interferon. Cytokine. Res.* 2009; 29(5): 273-284. DOI: 10.1089/jir.2008.0076

27. Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011; 1813(5): 878-888. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034

28. Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* 2008; 180(9): 5771-5777. PMID:18424693

29. Korzeniewski S.J., Pappas A. Endogenous erythropoietin. *Vitam. Horm.* 2017; 105: 39-56. DOI: 10.1016/bs.vh.2017.03.003

30. Todosenko N.M., Shmarov V.A., Malashchenko V.V., Menailo M.E., Melashchenko O.B., Gazatova N.D., Goncharov A.G., Seledtsov V.I. Erythropoietin exerts direct immunomodulatory effects on the cytokine production by activated human T-lymphocytes. *Int. Immunopharmacol.* 2016; 36: 277-281. DOI: 10.1016/j.inimp.2016.05.006

31. Wood M.A., Goldman N., DePierri K., Somerville J., Riggs J.E. Erythropoietin increases macrophage-mediated T cell suppression. *Cell. Immunol.* 2016; 306: 17-24. DOI: 10.1016/j.celimm.2016.05.004

32. Liu Y., Luo B., Han F., Li X., Xiong J., Jiang M., Yang X., Wu Y., Zhang Z. Erythropoietin-derived nonerythropoietic peptide

ameliorates experimental autoimmune neuritis by inflammation suppression and tissue protection. *PLoS One*. 2014; 9(3): e90942. DOI: 10.1371/journal.pone.0090942

33. Nagashima T., Yokohama A., Nagai K., Kasamatsu T., Gotoh N., Iriuchishima H., Sekigami T., Saitoh T., Handa H., Tsukamoto N., Murakami H. Short-term administration of recombinant human erythropoietin decreases B cell number in human peripheral blood. *Transfus. Apher. Sci.* 2018; [Epub ahead of print]. DOI: 10.1016/j.transci.2018.01.009

34. Toba H., Kojima Y., Wang J., Noda K., Tian W., Kobara M., Nakata, T. Erythropoietin attenuated vascular dysfunction and inflammation by inhibiting NADPH oxidase-derived superoxide production in nitric oxide synthase-inhibited hypertensive rat aorta. *E. J. Pharmacol.* 2012; 691(1-3): 190-197. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.07.018

35. Rocchetta F., Solini S., Mister M., Mele C., Cassis P., Norris M., Remuzzi G., Aiello S. Erythropoietin enhances immunostimulatory properties of immature dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 165(2): 202-210. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04417.x

References

1. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Intern. Med.* 2004; 43(8): 649-659.

2. Ifeanyi O.E. A review on Erythropoietin. *Int. J. Adv. Red. Biol. Sci.* 2015; 2(4): 35-47.

3. Tamura T., Aoyama M., Ukai S., Kakita H., Sobue K., Asai K. Neuroprotective erythropoietin attenuates microglial activation, including morphological changes, phagocytosis, and cytokine production. *Brain Res.* 2017; 1662: 65-74. DOI:10.1016/j.brainres.2017.02.023

4. Brines M., Grasso G., Fiordaliso F., Sfracteria A., Ghezzi P., Fratelli M., Latini R., Xie Q.W., Smart J., Su-Rick C.J., Pobre E., Diaz D., Gomez D., Hand C., Coleman T., Cerami A. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common β -subunit heteroreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(41): 14907-14912. DOI: 10.1073/pnas.0406491101

5. Nairz M., Sonnweber T., Schroll A., Theurl I., Weiss G. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation. *Microbes Infect.* 2012; 14(3): 238-246. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.10.005

6. Ueda F., Tago K., Tamura H., Funakoshi-Tago M. Three tyrosine residues in the erythropoietin receptor are essential for janus kinase 2 V617F mutant-induced tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 2017; 292(5): 1826-1846. DOI: 0.1074/jbc.M116.749465

7. Solling C. Organ-protective and immunomodulatory effects of erythropoietin—an update on recent clinical trials. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2012; 110(2): 113-121. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00820.x

8. Watanabe M., Lundgren T., Saito Y., Cerami A., Brines M., Ostenson C.G., Kumagai-Braesch M. A nonhematopoietic erythropoietin analogue, ARA 290, inhibits macrophage activation and prevents damage to transplanted islets. *Transplantation.* 2016; 100(3): 554-62. DOI: 10.1097/TP.0000000000001026

9. Lisowska K.A., Bryl E., Witkowski J.M. Erythropoietin receptor is detectable on peripheral blood lymphocytes and its expression increases in activated T lymphocytes. *Haematologica.* 2011; 96(3): 12-13. DOI: 10.3324/haematol.2010.038414

10. Arcasoy M.O. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br. J. Haematol.* 2008; 141(1): 14-31. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07014.x

11. Chen X., Wang C.C., Song S.M., Wei S.Y., Li J.S., Zhao S.L., Li B. The administration of erythropoietin attenuates kidney injury induced by ischemia/reperfusion with increased activation of Wnt/ β -catenin signaling. *J. Formos. Med. Assoc.* 2015; 114(5): 430-437. DOI: 10.1016/j.jfma.2015.01.007

12. Siren A.L., Fratelli M., Brines M., Goemans C., Casagrande S., Lewczuk, P., Keenan S., Gleiter C., Pasquali C., Capobianco A., Mennini T., Heumann R., Cerami A., Ehrenreich H., Ghezzi P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98(7): 4044-4049. DOI: 10.1073/pnas.051606598

13. Haroon Z.A., Amin K., Jiang X., Arcasoy M.O. A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *Am. J. Pathol.* 2003; 163(3): 993-1000. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63459-1

14. Lifshitz L., Tabak G., Gassmann M., Mittelman M., Neumann D. Macrophages as novel target cells for erythropoietin. *Haema-*

tologica 2010; 95(11): 1823-1831. DOI: 10.3324/haematol.2010.025015

15. Jelkmann W.E., Fandrey J., Frede S., Pagel, H. Inhibition of erythropoietin production by cytokines. *Ann. NY Acad. Sci.* 1994; 718(1): 300-311.

16. Poulsen T.D., Andersen L.W., Steinbruchel D., Gotze J.P., Jorgensen O.S., Olsen N.V. Two large preoperative doses of erythropoietin do not reduce the systemic inflammatory response to cardiac surgery. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2009; 23(3): 316-323. DOI: 10.1053/j.jvca.2008.08.018

17. Pesce M., Felaco P., Franceschelli S., Speranza L., Grilli A., De Lutis M. A., Ferrone A., Sirolli V., Bonomini M., Felaco M., Patruno, A. Effect of erythropoietin on primed leucocyte expression profile. *Open Biol.* 2014; 4(6): 140026. DOI: 10.1098/rsob.140026

18. Nairz M., Sonnweber T., Schroll A., Theurl I., Weiss G. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation. *Microbes Infect.* 2012; 14(3): 238-246. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.10.005

19. Yuan R., Maeda Y., Li W., Lu W., Cook S., Dowling P. Erythropoietin: a potent inducer of peripheral immuno/inflammatory modulation in autoimmune EAE. *PLoS One.* 2008; 3(4): e1924. DOI: 10.1371/journal.pone.0001924

20. Moransard M., Bednar M., Frei K., Gassmann M., Ogunshola O.O. Erythropoietin reduces experimental autoimmune encephalomyelitis severity via neuroprotective mechanisms. *J. Neuroinflammation.* 2017; 14(1): 202. DOI: 10.1186/s12974-017-0976-5

21. Kitchens R.L. Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides. *Chem. Immunol.* 2000; 74: 61-82. PMID:10608082

22. Yeap W.H., Wong K.L., Shimasaki N., Teo E.C., Quek J.K., Yong H.X., Diong C.P., Bertolotti A., Linn Y.C., Wong S.C. CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci. Rep.* 2016; 6: 34310. DOI: 10.1038/srep34310

23. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* 2014; 6: 13. DOI: 10.12703/P6-13

24. Nelms K., Keegan A.D., Zamorano J., Ryan J.J., Paul W.E. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17(1): 701-738. DOI: 10.1146/annurev.immunol.17.1.701

25. Forster R., Davalos-Miszlitz A.C., Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8(5): 362-371. DOI: 10.1038/nri2297

26. Saperstein S., Chen L., Oakes D., Pryhuber G., Finkelstein J. IL-1 β augments TNF- α -mediated inflammatory responses from lung epithelial cells. *J. Interferon. Cytokine. Res.* 2009; 29(5): 273-284. DOI: 10.1089/jir.2008.0076

27. Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011; 1813(5): 878-888. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034

28. Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* 2008; 180(9): 5771-5777. PMID:18424693

29. Korzeniewski S.J., Pappas A. Endogenous erythropoietin. *Vitam. Horm.* 2017; 105: 39-56. DOI: 10.1016/bs.vh.2017.03.003

30. Todosenko N.M., Shmarov V.A., Malashchenko V.V., Meniailo M.E., Melashchenko O.B., Gazatova N.D., Goncharov A.G., Seledtsov V.I. Erythropoietin exerts direct immunomodulatory effects on the cytokine production by activated human T-lymphocytes. *Int. Immunopharmacol.* 2016; 36: 277-281. DOI: 10.1016/j.in-timp.2016.05.006

31. Wood M.A., Goldman N., DePierri K., Somerville J., Riggs J.E. Erythropoietin increases macrophage-mediated T cell suppression. *Cell. Immunol.* 2016; 306: 17-24. DOI: 10.1016/j.cellimm.2016.05.004

32. Liu Y., Luo B., Han F., Li X., Xiong J., Jiang M., Yang X., Wu Y., Zhang Z. Erythropoietin-derived nonerythropoietic peptide ameliorates experimental autoimmune neuritis by inflammation suppression and tissue protection. *PLoS One.* 2014; 9(3): e90942. DOI: 10.1371/journal.pone.0090942

33. Nagashima T., Yokohama A., Nagai K., Kasamatsu T., Gotoh N., Iriuchishima H., Sekigami T., Saitoh T., Handa H., Tsukamoto N., Murakami H. Short-term administration of recombinant human erythropoietin decreases B cell number in human peripheral blood. *Transfus. Apher. Sci.* 2018; [Epub ahead of print]. DOI: 10.1016/j.transci.2018.01.009

34. Toba H., Kojima Y., Wang J., Noda K., Tian W., Kobara M., Nakata, T. Erythropoietin attenuated vascular dysfunction and inflammation by inhibiting NADPH oxidase-derived superoxide production in nitric oxide synthase-inhibited hypertensive rat aorta. *E. J. Pharmacol.* 2012; 691(1-3): 190-197. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.07.018

35. Rocchetta F., Solini S., Mister M., Mele C., Cassis P., Noris M., Remuzzi G., Aiello S. Erythropoietin enhances immunostimulatory properties of immature dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 165(2): 202-210. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04417.x

Сведения об авторах

Мелашенко Ольга Борисовна — научный сотрудник центра медицинских биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Министерства образования и науки Российской Федерации

Меняйло Максим Евгеньевич — младший научный сотрудник центра медицинских биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Министерства образования и науки Российской Федерации

Малашенко Владимир Владимирович — инженер-исследователь центра медицинских биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Министерства образования и науки Российской Федерации

Газатова Наталья Динисламовна — научный сотрудник центра медицинских биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Министерства образования и науки Российской Федерации

Гончаров Андрей Геннадьевич — кандидат медицинских наук, доцент, директор центра медицинских биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Министерства образования и науки Российской Федерации

Селедцов Виктор Иванович — доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник центра медицинских биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Министерства образования и науки Российской Федерации

УДК: 616-001.4+611-018.1

Регенерация глубоких резаных ран кожи при различных вариантах местной терапии

Еськова А.Ю.¹, Большакова О.В.², Голубинская Е.П.²,
Кубышкин А.В.², Бессалова Е.Ю.², Фомочкина И.И.²

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

² Медицинская академия имени С.И.Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского». 295000, Симферополь, б-р Ленина, д. 5/7

Актуальность. Глубокие резаные раны являются одной из наиболее распространенных травм при авариях и, по-прежнему, остаются глобальной проблемой общественного здравоохранения. Несмотря на многочисленные успехи в терапии ран, все еще существует необходимость поиска и разработки новых препаратов для их местного лечения. **Цель** — определить возможности применения местной терапии трансглутаминазой микробного происхождения (МТГ) с вспомогательной экспериментальной субстанцией авторской фитوماзи при моделировании полнослойных резаных ран на основании изучения особенностей морфогенеза регенераторных процессов кожи. **Методы.** В эксперименте на 150 белых мышах самцах исследована динамика регенераторных процессов кожи в группах: без лечения; при использовании препарата Солкосерил и авторской фитوماзи; а также ее комбинации с ферментом МТГ в различных концентрациях. Применяли комплекс морфологических методов, направленных на изучение структуры кожи на органном, тканевом, клеточном и субклеточном уровнях организации: макроскопический метод — для описания и измерения размеров повреждений; гистологические методы на светооптическом уровне — для качественной оценки морфологических преобразований кожи; метод трансмиссионной электронной микроскопии — для выявления ультраструктурных преобразований различных клеток эпидермиса и дермы. **Результаты.** Наиболее эффективным препаратом для заживления полнослойных резаных ран по итогам визуальной оценки и гистологического исследования является комбинация фитوماзи с МТГ в концентрации 0,1%, что подтверждается остановкой кровотечения и образованием фибринового сгустка в 3 раза быстрее, чем в других экспериментальных и контрольной группах; ранним началом эпителизации (на 3 сутки эксперимента), окончательным завершением регенераторных процессов к 10 суткам, что свидетельствует о перспективах использования трансглутаминаз в хирургии и эстетической медицине. **Заключение.** Применение инновационной методики местной терапии глубоких резаных ран кожи ферментом микробной трансглутаминазой с вспомогательной экспериментальной субстанцией авторской фитوماзи характеризуется ранним началом эпителизации, что свидетельствует о перспективах использования трансглутаминаз в хирургии и эстетической медицине. В то же время, механизмы репарации должны быть дополнительно исследованы в серии клинических испытаний.

Ключевые слова: кожа, рана, регенерация, клетки соединительной ткани, трансглутаминаза микробного происхождения.

Для цитирования: Еськова А.Ю., Большакова О.В., Голубинская Е.П., Кубышкин А.В., Бессалова Е.Ю., Фомочкина И.И. Регенерация глубоких резаных ран кожи при различных вариантах местной терапии. Патогенез. 2018; 16(1): 34–41

DOI:

Для корреспонденции: Фомочкина Ирина Ивановна, e-mail: fomochkina_i@mail.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности: Авторы выражают благодарность за предоставленное оборудование гистологической лаборатории с иммуногистохимией и электронной микроскопией (сканер Aperio CS2) Центра коллективного пользования «Молекулярная биология» Медицинской академии им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского».

Поступила: 12.10.2017

Regeneration of deep cut wounds of the skin with different options of local treatment

Yeskova A.Yu.¹, Bolshakova O.V.², Golubinskaya Ye.P.²,
Kubyshekin A.V.², Bessalova Ye.Yu.², Fomochkina I.I.²

¹ I.M.Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Bldg. 2, Moscow 119991, Russian Federation

² S.I.Georgievsky Medical Academy of the V.I.Vernadsky Crimean Federal University.

Bulvar Lenina 5/7, Simferopol 295000, Russian Federation

Background. Deep cut wounds are one of the most common injuries in accidents and still remain a global public health problem. Despite much success in treatment of wounds searching for and developing new medicines for local treatment are still relevant. The study objective was to test a possibility of local treatment with microbial transglutaminase (MTG) supplemented with an auxiliary experimental substance of the author's herbal ointment by studying morphogenesis of skin regenerative processes on a model of full-thickness cut wounds. **Methods.** We studied the dynamics of skin regenerative processes using the following groups: no treatment; a standard treatment with the medicine Solcoseryl in combination with the author's ointment; the ointment alone; and the ointment in combinations with the enzyme MTG at different concentrations. A set of morphological methods was used for studying the skin structure at organ, tissue, cell, and subcellular levels in experiments on 150 white male mice. The methods included macroscopic description and measurement of skin lesions; histological methods at the light-optical level for qualitative evaluation of skin morphologic changes; and transmission electron microscopy for identifying ultrastructural transformations of different epidermal and dermal cells. **Results.** Visual evaluation and histological study showed that the most effective treatment for healing of full-thickness cut wounds was 0.1% MTG as evidenced by arrest of bleeding and formation of a fibrin clot, which occurred three times faster than in other experimental and control groups; an early onset of epithelialization on day 3 of the experiment; and the completion of regenerative processes by day 10, which suggested prospective benefits of using transglutaminases in surgery and aesthetic medicine. **Conclusions.** The innovative local treatment of deep cut wounds of the skin with microbial transglutaminase supplemented with an auxiliary experimental substance of the author's herbal ointment is characterized by an early onset of epithelialization, which suggested prospective benefits of using transglutaminases in surgery and aesthetic medicine. At the same time, mechanisms of reparation need further investigation in clinical trials.

Key words: skin, wound, regeneration, connective tissue cells, enzyme microbial transglutaminase.

For citation: Yeskova A.Yu., Bolshakova O.V., Golubinskaya Ye.P., Kubyshkin A.V., Bessalova Ye.Yu., Fomochkina I.I. [Regeneration of deep cut wounds of the skin with different options of local treatment]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(1): 34–41 (in Russian)

DOI:

For correspondence: Fomochkina Iryna Ivanovna, e-mail: fomochkina_i@mail.ru.

Funding. The study had no sponsorship.

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

Acknowledgments: The authors are grateful for the provided histological laboratory equipment with immunohistochemistry and electron microscopy (scanner Aperio CS2) of the Center for Collective Use, «Molecular Biology» of S.I. Georgievsky Medical Academy of the V.I. Vernadsky Crimean Federal University.

Received: 12.10.2017

Введение

Раны являются одним из видов повреждений, чрезвычайно распространённых как в мирное, так и в военное время [1]. В подавляющем большинстве всех раневых повреждений фиксируются резаные раны [2]. Несмотря на достижения молекулярной биологии, возможности лабораторного синтеза факторов роста клеток, современного уровня развития тканевой инженерии, проблема восстановления утраченного кожного покрова при повреждениях различной этиологии до сих пор по-прежнему актуальна. Развитие биофармацевтики и биомедицины — одна из основных тенденций на мировом рынке биотехнологий [3]. Поиск новых недорогих в производстве биотехнологических лекарственных средств, предназначенных для коррекции раневого процесса и лечения ран, представляется актуальным и своевременным [4, 5]. Одним из перспективных направлений является использование трансглутаминаз (ТГ) — ферментов, образующих прочные химические связи, в клетках и межклеточном веществе. ТГ микробного происхождения (МТГ) представляют наибольший практический интерес для расширения возможностей хирургии в области лечения ран. В связи с этим, *цель исследования* — определить возможности применения местной терапии МТГ с вспомогательной экспериментальной субстанцией авторской фитوماзи при моделировании полнослойных резаных ран на основании изучения особенностей морфогенеза регенераторных процессов кожи.

Материалы и методы исследования

Эксперимент выполнен на 150 взрослых самцах белых мышей в возрасте 90 суток с массой тела 18–20 г. Содержание животных и эксперимент проводили в соответствии с международными нормами; на проведение работы было получено разрешение комитета по этике ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского» (протокол № 2 от 11 сентября 2015 г.) [6]. Болезненные манипуляции (нанесение раны, выведение животных из эксперимента) проводили под 3–5% ингаляционным наркозом изофлурана. Выбрасывали шерсть в межлопаточной области, по трафарету наносили контуры раны размером 1,0 x 1,0 см и с помощью анатомических ножниц с закруглёнными концами и хирургического пинцета, выделяли полнослойный кожный лоскут до собственной фасции. Операцию проводили в стерильных условиях. Все раны оставались открытыми до окончания опыта. Ранозаживление оценивали на 1, 3, 5, 7, 10 и 21 день. Мышам подопытных групп (n = 120) сразу же после операции и в дальнейшем ежедневно на поверхность раны наносили по 0,2 г мази в зависимости от принадлежности к определённой серии. С целью изучения эффективности заживления полнослойных ран при использовании различных экспериментальных комплексов в качестве препарата сравнения выбрали Солкосерил — стандартизированный депротеинизированный диализат крови телят. Период заживления ран в различных группах мышей вели по-разному: в группах сравнения 1) без лечения (n = 30) или 2) с использованием общепринятого препарата Солкосерил (n = 30); в группах инноваци-

онной терапии мышей лечили местно с использованием 3) авторской фитомазы ($n = 30$) или комбинацией фитомазы с ферментом МТГ в двух различных концентрациях — 4) 0,1% ($n = 30$) и 5) 0,03% ($n = 30$). Контролем для всех экспериментальных серий служили лабораторные животные без лечения на аналогичных этапах исследования (группа 1). На каждом из пяти этапов (3, 5, 7, 10 и 21 день) выводили из эксперимента по 6 особей в каждой из пяти серий для морфологических исследований. Контуры резаной раны 1 раз в два дня зарисовывали на прозрачной плёнке. Плёнку сканировали на приборе UmaxAstra, 4500. Statistica 10 позволила рассчитать площадь в динамике.

Применен комплекс морфологических методов исследования. После декапитации под наркозом, у мышей выделяли кожный лоскут на границе со здоровой тканью. После макроскопического описания, брали фрагмент кожи для гистологического исследования, его фиксировали в 10% нейтральном формалине, проводили через батарею спиртов восходящей концентрации и заключали в парафин, по общепринятым методикам. Срезы 4—5 мкм окрашивали обзорными методами — гематоксилином и эозином и пикрофуксином по Ван Гизону. Для исследования и получения цифровых фотографий микропрепаратов использовали лабораторный микроскоп Leica DM2000 (Германия) с фотокамерой. До того, как поместить кожный лоскут в 10% раствор формалина, из него выделяли кусочек объемом 1 мм³ для электронной микроскопии. Пробоподготовку проводили по стандартной методике: фиксация в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере с pH 7,2—7,4 на протяжении 12 часов при температуре 4°C, промывка в 0,1 М фосфатном буфере 3 раза по 10, 20, 30 минут, дофиксация 1% раствором тетраоксида осмия на 0,1 М фосфатном буфере 1,5—2 часа. Обезвоживание материала осуществляли в спиртах возрастающей концентрации, затем заливали в смесь эпоксидных смол с полимеризацией в термостате. Из блоков смол на ультрамикротоме ЛКБ-460 изготавливали полутонкие срезы толщиной 0,5—1,5 мкм, которые окрашивали толуидиновым синим по общепринятой методике. Также готовили ультратонкие срезы с окраской уранилацетатом и цитратом свинца. Срезы просматривали и фотографировали на трансмиссионном электронном микроскопе РЕМ-106.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием рекомендуемых статистических методик с помощью пакета прикладной программы Statistica (StatSoft Inc. США, версия 10.0). Для анализа вида распределений применялись критерии Шапиро—Уилка и Лиллиефорса, межгрупповые различия оценивали с помощью F-критерия в процедуре дисперсионного анализа ANOVA.

Проанализировав лечебные свойства различных растений, распространенных на территории Российской Федерации, мы пришли к заключению, что наиболее перспективными для создания фитопрепарата отечественного производства могут быть экстракты трав, обладающих выраженным ранозаживляющим, противовоспалительным и ангиопротекторным действием: зверобоя продырявленного, вероники лекарственной, лопуха, чернокорня лекарственного. Кроме того, яичное масло, масло виноградных косточек и лепестков белой лилии в комбинации с яичным маслом и пчелиным воском. Эти составляющие, помимо репаративного эффекта, могут обеспечить высокую плас-

тичность мази и биодоступность действующих компонентов в кожу и подлежащие ткани. Таким образом, комбинация данных веществ в авторской фитомазе может обеспечить комплексный подход в лечении раневого процесса кожных покровов с учетом фаз его развития и профилактики возможных осложнений. Данная мазь изготовлена авторами и использована как эффективное самостоятельное средство и база для включения фермента трансглутаминазы (использовали порошок «ЭлайТ-актив100») в различных концентрациях как метода инновационной терапии. Введение фермента МТГ делает структуру мази гелеобразной, что удобно для использования уже на первом этапе ранозаживления. МТГ является нетоксичным вспомогательным технологическим веществом. Рекомендуемая дозировка 0,03—0,10% по отношению к общей массе. В соответствии с постановлением (ЕС) № 1272/2008 максимальное содержание трансглутаминазы в конечной смеси, при котором она попадает под определение «опасного вещества», должно превышать 1%. По свидетельству о государственной регистрации RU.77.99.88.009.E.011298.07.12 от 11.07.2012 г., порошок «ЭлайТ-актив 100» произведён в соответствии с документами Российской Федерации ТУ 9199-049-48470548-07 с изменениями №№ 1-4; изготовитель (производитель) — ЗАО «Компания Милорд» (Московская область); соответствует единым санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору в Российской Федерации — Протоколы исследований экспертного заключения НИИ питания РАМН №72/Э-1086/и-12 от 14.06.2012 г., ТИ.

Результаты и их обсуждение

Морфология раневого процесса показала типичную смену фаз: альтерация, регенерация и реорганизация рубца с эпителизацией. При заживлении ран вторичным натяжением выявлена синхронизация процессов созревания грануляционной ткани и эпителизации, лежащая в основе раневой контракции. Микроскопические изменения носят стереотипный характер, однако имеют различную степень выраженности и динамику смены альтеративных процессов на репаративные. На ранних этапах изменения у всех животных имела место поверхностная зона альтерации с очаговыми отложениями фибрина. В подлежащих и окружающих тканях — зона обширных кровоизлияний, геморрагической инфильтрации и отека, кроме того — полнокровие сохраненных сосудов, с наличием периваскулярных лейкоцитарных и круглоклеточных инфильтратов. На поздних этапах развиваются и созревают соединительнотканые элементы, происходит эпителизация.

Морфологические особенности заживления резаных ран у мышей контрольной группы, не получавших местной терапии

Макроскопически у животных контрольной группы на третьи сутки с поверхности раны выделяется серозный или серозно-геморрагический экссудат. Гистологически выражены альтеративные процессы: наличие лейкоцитарно-некротического детрита либо струпа на поверхности раны, обширные поля некроза, диффузная инфильтрация лейкоцитами и нейтрофилами с тенденцией к распространению в глубележащие ткани. Большинство сосудов гиперемированы либо запустевают, могут быть парализи-

чески расширены. В участках сохранного эпидермиса по периферии от раневого канала определяется акантоз, в сосочковом слое дермы — образование коллагеновых волокон при разрушении эластического каркаса.

На пятые сутки выявлено уменьшение выраженности экссудативных проявлений и преобладание пролифератив-

ных процессов, что выражается очищением поверхности раны, появлением грануляций, образованием молодой соединительной ткани, коллагеновых волокон, появлением булавовидных утолщений нервных волокон. Сохранившиеся воспалительные явления проявляются в виде гиперемии, диффузной лейкоцитарной инфильтрации глубоких

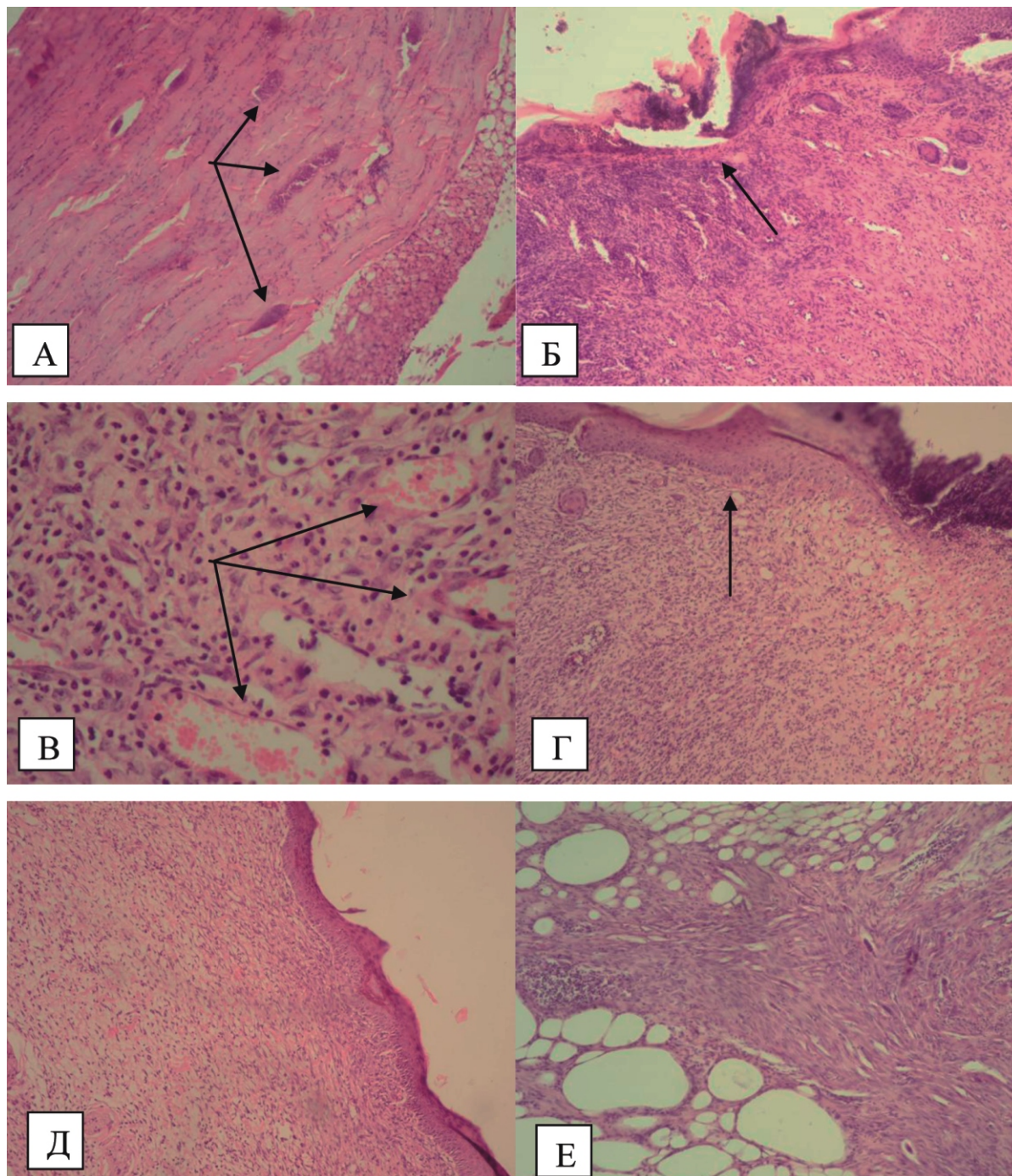


Рис. 1. Морфологическая характеристика ран мышей различных групп при изучении методом световой микроскопии. Окраска гематоксилином и эозином. А, Б, Г, Д — ув. 40, В, Е — ув. 100.

А — 5-е сутки, контроль, микроабсцессы мышечной ткани (стрелки), некроз жировой клетчатки;

Б — 7-е сутки, контроль, частичное отторжение струпа «подрастающим» эпителием (стрелка). Грануляционная ткань с диффузной лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией;

В — 3-и сутки, фитомазь, грануляционная ткань с диффузной инфильтрацией лейкоцитами, макрофагами, фибробластами, множество сосудов (стрелки);

Г — 5-е сутки, МТГ 0,03%, краевая эпителизация раневого дефекта (стрелка), разрастание грануляционной ткани;

Д — 10-е сутки, МТГ 0,1%, полная эпителизация рубцовой ткани;

Е — 10-е сутки, Солкосерил, сформированная плотная рубцовая ткань с очаговыми лимфоцитарными инфильтратами.

слоев дермы, иногда с формированием микроабсцессов в мышечной ткани, выраженного отека (рис. 1, А).

На седьмые сутки после ранения прогрессируют репаративные изменения. Гистологическая картина характеризуется процессами разрастания грануляционной ткани с явлениями нарушения кровообращения и диффузной лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией, большим количеством макрофагов и фибробластов. Начинается эпителизация: во всех случаях определяется отторжение струпа и пролиферация мальпигиева слоя эпидермиса (рис. 1, Б). Процесс очищения раны и созревания соединительной ткани длится долго: начальные признаки эпителизации в краях раны определяются на 10-е сутки. В поздние сроки, на 21-й день, завершенная эпителизация имеется лишь у 40% животных, дифференцировка эпителиального регенерата неравномерная. Замедленное отторжение струпа сочетается с воспалением и нарушением кровообращения в дне раны.

Морфологические особенности заживления резаных ран у мышей подопытной группы, получавших лечение Солкосерилом

На третьи сутки отделяемого из раны нет. Воспалительный процесс сопровождается начальными явлениями регенерации эпидермиса с сохранением признаков экссудативно-пролиферативных реакций в более глубоких слоях кожи. На пятые сутки наблюдается инверсия воспалительных проявлений в сторону пролиферации. К седьмым суткам у большинства животных отмечается уменьшение гиперемии и отека по периферии раневого канала; рана сухая, без отделяемого, края неправильной формы, стянуты светло-розовой тканью. Микроскопически определяется нарастание количества и плотности хаотично переплетающихся коллагеновых волокон, с большим количеством фибробластов, макрофагов и лимфоцитов между ними. Сосуды паралитически расширены, часть с явлениями периваскулярного очагового отека. Происходит эпителизация ран. У большинства мышей раны заживают первичным натяжением. В 15% наблюдений — через нагноение с образованием рубцов на 10—21-е сутки (рис. 1, Е).

Морфологические особенности заживления резаных ран у мышей подопытной группы, получавших лечение авторской фитомазью

К третьим суткам после проведения эксперимента выявлены альтеративные проявления: наличие обширной зоны отложения фибрина на поверхности с четким демаркационным валом, состоящим из большого количества лейкоцитов и нейтрофилов, а также начальные признаки регенерации мальпигиевого слоя эпидермиса по периферии раневого канала (рис. 1, В). В подлежащих тканях — умеренно выраженный отек, очаговые полиморфно-клеточные инфильтраты дермы. Характерен рост тонкостенных капилляров, окруженных большим количеством лимфоцитов, плазмочитов, макрофагов, а также фибробластов с формированием тонких хаотично направленных коллагеновых волокон.

К пятым суткам у большинства животных отмечается уменьшение гиперемии и отека по периферии раневого канала: рана сухая, без отделяемого, края неправильной звездчатой формы, к седьмым суткам стянуты выступающей светло-розовой рубцовой тканью. На 7-е сутки про-

исходит формирование десмосом и активная эпителизация раны (рис. 2, Б). На 10—21-е сутки репаративные процессы в большинстве случаев совпадают с таковыми в группе с использованием мази Солкосерил и в среднем имеют тенденцию к завершению на 10-е сутки. На ультраструктурном уровне выявлено отсутствие плотных контактов между клетками. Наличие области раны, свободной от эпителиального покрова, стимулирует пролиферацию и миграцию эпидермальных клеток. Кератиноциты, прилегающие к области повреждения, участвуют в процессе раневого заживления. Действуют на пролиферацию и миграцию фибробластов и продукцию компонентов межклеточного матрикса.

Морфологические особенности заживления резаных ран у мышей подопытной группы, получавших лечение авторской фитомазью с МТГ 0,1%

Важной особенностью острого периода у мышей из групп, где применяли МТГ в разных концентрациях, является быстрая остановка кровотечения (не более 1,5—2,5 минут) в сравнении с другими экспериментальными группами (не менее 5 минут). В указанных группах отмечается образование плотных фибриновых масс сразу после нанесения препарата, после визуально отмечается уменьшение отека окружающих тканей с сохранением выраженной гиперемии по периферии раневого канала.

На третьи сутки струп отсутствует, а раневая поверхность выполнена грануляционной тканью розово-красного цвета. Отмечается наличие поверхностной зоны альтеративных изменений с наличием умеренно выраженного отека подлежащей клетчатки, гиперемии сосудов с очаговой паравазальной лейкоцитарной инфильтрацией либо краевым внутрисосудистым «стоянием» лейкоцитов. У всех животных определяется отложение большого количества фибрина, который фактически заполняет раневую дефект.

Основным качественным отличием репаративных процессов на третьи сутки после эксперимента является наличие обширных зон разрастания большого количества тонкостенных сосудов капиллярного типа с наличием активных фибробластов, продуцирующих тонкие хаотично направленные коллагеновые волокна. Следует отметить появление в умеренно выраженном очаговом клеточном инфильтрате большого числа макрофагов и лимфоцитов. Во всех микропрепаратах исследуемой группы в ранние сроки определяется появление начальных признаков эпителизации в виде пролиферации эпидермоцитов базального слоя к центру раневого канала, что выражается в «подрастании» многослойного плоского эпителия под струпом с последующим его отделением.

Наиболее значимым показателем эффективности заживления на 5-е сутки является значительное уменьшение площади раны (таблица). На пятые сутки, в отличие от мышей других групп, гистологическая картина характеризуется преобладанием третьей фазы заживления раневого процесса, дифференцировкой сосудов, определяется большое количество все еще разнонаправленных коллагеновых волокон, с незначительным количеством фиброцитов. Характерно синхронное развитие эпителиального и соединительнотканного регенератов с их дифференцировкой.

На седьмые сутки развитие соединительной ткани достигает максимальной скорости по сравнению с другими

группами мышей. На электронограммах выявляются зрелые элементы клеток и межклеточного вещества (рис. 2, А, В). Присутствуют как фибробласты высокой степени дифференцировки, так и малодифференцированные клетки. Дифференцированные фибробласты имеют отростчатую форму. Ядра клеток просветлены, в них преобладает эухроматин, а гетерохроматин располагается небольшими тонкими участками вдоль кариолеммы и в виде мелких кариосом. Ядра фибробластов имеют многочисленные инвагинации. Интенсивно электронноплотные ядрышки прилегают к кариолемме, которая содержит много ядерных пор. Перинуклеарное пространство небольшое, равномерной ширины, а наружная ядерная мембрана густо покрыта рибосомами. Цитоплазма содержит небольшие округлые и овальные митохондрии, имеющие просветленный матрикс и короткие редкие кристы. В цитоплазме обнаруживаются также отдельные мелкие везикулы с электронноплотным содержимым.

Малодифференцированные фибробласты имеют округлую форму без отростков. Ядра клеток овальной

формы, а гетерохроматин занимает большую площадь, чем в дифференцированных фибробластах. В цитоплазме обнаруживается большое количество свободных рибосом. Эндоплазматическая сеть и митохондрии развиты слабо. Клетки сохраняют способность к пролиферации и начинают осуществлять синтез компонентов межклеточного вещества — коллагена и гликозаминогликанов. Способность юных фибробластов к направленной миграции определяет их важную роль в репаративных процессах, в частности, в заживлении ран [7–10]. Отмечаются признаки активации белкового синтеза: инвагинации ядра, преобладание эухроматина, прилегание ядрышек к кариолемме, хорошее развитие гранулярной эндоплазматической сети, большое содержание полисом в гиалоплазме, просветленный матрикс митохондрий. В межклеточном веществе отмечается большое количество коллагеновых волокон и секреторных гранул различной электронной плотности. Среди фибробластов выявлены клетки в стадии митоза, что свидетельствует о высокой пластичности соединительной ткани. Встречаются одиночные молодые

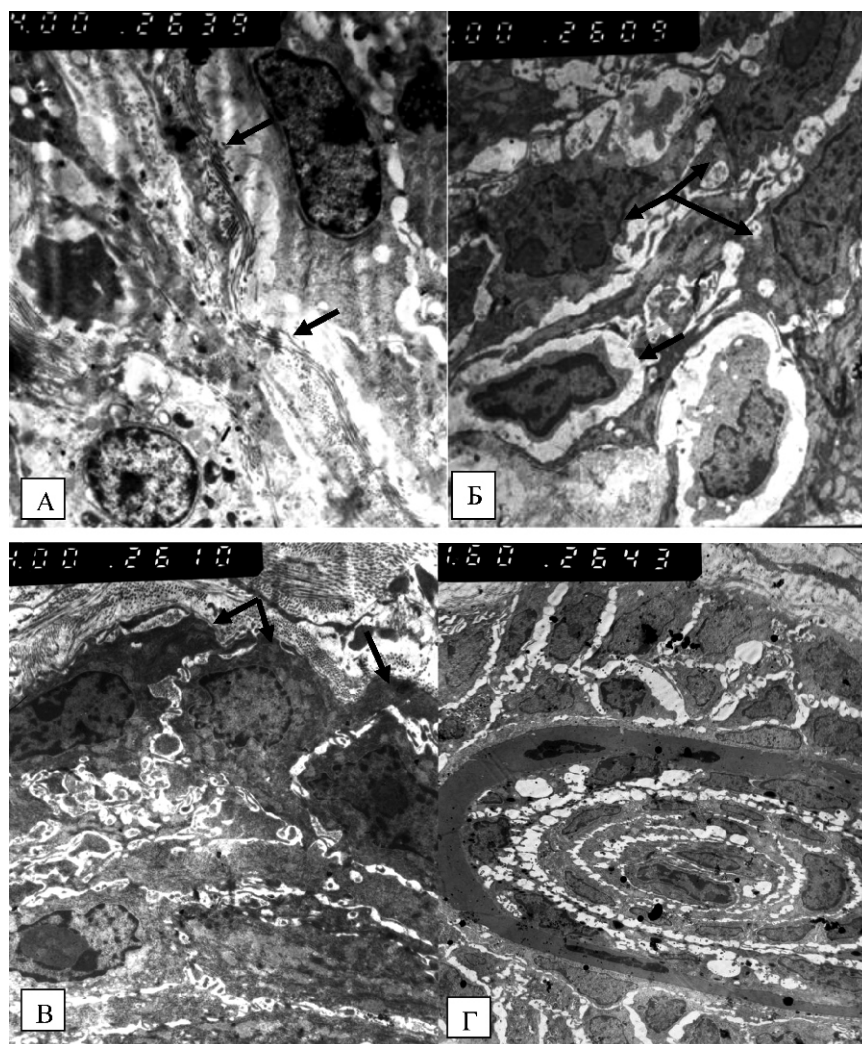


Рис. 2. Морфологическая характеристика кожи мышей различных групп при изучении методом трансмиссионной электронной микроскопии. Ув. 4000: А — 7-е сутки, фитомазь, в фрагменте эпидермиса и дермы происходит формирование десмосом (стрелки)%; Б — 7-е сутки, МТГ 0,1%, группа фибробластов различной степени дифференцировки (стрелки) — сверху дифференцированные, внизу — молодой фибробласт; В — 7-е сутки, МТГ 0,1%, группа дифференцированных фибробластов (стрелки), с признаками функциональной активации синтетических процессов — коллагеновые волокна в верхней части рисунка, над стрелками; Г — 14-е сутки, МТГ 0,1%, Волос типичного строения — полноценная эпителизация с восстановлением волосяного покрова.

Динамика площади раневой поверхности в эксперименте

Группы	День эксперимента (площадь раны, см ²)					
	1 (M ± m)	3 (M ± m)	5 (M ± m)	7 (M ± m)	10 (M ± m)	21 (M ± m)
Контроль (n = 30)	1,00 ± 0,10	1,39 ± 0,10	1,39 ± 0,10	1,19 ± 0,08	0,90 ± 0,07	0,01 ± 0,02
Солкосерил (n = 30)	1,00 ± 0,10	1,29 ± 0,08	1,12 ± 0,09	0,82 ± 0,07	0,31 ± 0,06	0,00 ± 0,02
Фитомазь (n = 30)	1,00 ± 0,06	1,11 ± 0,07*	0,91 ± 0,08*	0,71 ± 0,06*	0,21 ± 0,05*	0,00 ± 0,02
МТГ 0,1% (n = 30)	1,00 ± 0,08	0,82 ± 0,08*	0,50 ± 0,06*	0,20 ± 0,05*	0,01 ± 0,09*	—
МТГ 0,03% (n = 30)	1,00 ± 0,01	0,99 ± 0,01*	0,79 ± 0,07*	0,40 ± 0,06*	0,12 ± 0,07*	0,01 ± 0,03

Примечание. * p<0,05 — достоверность различий по отношению к контролю; n — количество животных; M — среднее значение; m — среднеквадратичное отклонение

клетки с крупным лопастным ядром. Их цитоплазма умеренно просветлена, содержит мелкие митохондрии обычной структуры или с частично разрушенными кристами, отмечена некоторая обедненность органеллами. Появление таких фибробластов можно рассматривать как результат активации клеточной регенерации. Кроме молодых клеток, на электронограмме находятся фибробласты с признаками активного белкового синтеза: крупные ядрышки, инвагинации ядра, преобладание эухроматина, большое количество ядерных пор, хорошее развитие гранулярной эндоплазматической сети.

У большей части животных данной группы тенденция к полному заживлению видна уже к 10-м суткам эксперимента (рис. 1, Д). На 14-е сутки происходит восстановление волосяного покрова (рис. 2, Г).

Морфологические особенности заживления резаных ран у мышей подопытной группы, получавших лечение авторской фитомазью с МТГ 0,03%

В группе с применением средства МТГ-0,03% на третьи сутки определяются участки отслоения плотного струпа, на месте которого визуализируются поля разрастания мелкозернистой грануляционной ткани розового цвета. Отделяемое из раны отсутствует. Сохраняются явления отека и гиперемии окружающих тканей. На пятые сутки (как и в группе с использованием фитомази) продолжают процессы разрастания грануляционной ткани — активный рост сосудов микроциркуляторного русла, по-прежнему гиперемированных, с выступающими в просвет эндотелиоцитами, обширные зоны разрастания тонких разнонаправленных коллагеновых волокон. Что касается раневой поверхности, то в большинстве препаратов указанных групп определяется процесс пролиферации базального слоя эпидермиса по краям раны, что проявляется в виде «подрастания» эпидермиса под струп с последующим его отделением (рис. 1, Г). На десятые сутки у 100% животных в группах с применением фитомази и фермента 0,03% достигнуто заживление с образованием хорошо заметного неправильной формы рубца, хотя в гистопрепаратах сохраняются признаки инфильтративно-пролиферативных реакций в глубоких слоях дермы.

Одной из главных характеристик визуальной оценки заживления раневой поверхности является динамическое

изменение линейных размеров раны. Особо важным представляется достоверное, по отношению к контрольной группе, изменение площади раневой поверхности у животных с применением местной терапии, начиная с третьих суток эксперимента, особенно у группы с применением в качестве терапии препарата МТГ 0,1% (таблица). Нами не использованы рамки, подшиваемые к коже для предотвращения контракции, связанной с развитием миофибробластов на 4—5 сутки, особенно при заживлении вторичным натяжением. Это необходимо учитывать при анализе табличных данных: разнородность цифровых показателей, связанная с разными способами заживления ран (первичным и вторичным натяжением) в разных группах.

Заключение

Таким образом, при изучении морфологии кожных ран у животных каждой группы все показатели регенераторного процесса характеризуются межгрупповой вариабельностью изменений и в пределах одной группы и в разные сроки эксперимента. В некоторых случаях имеет место выраженная индивидуальная изменчивость типичного хода процесса ранозаживления. Различия в группах касаются: сроков и характера очищения ран от струпа, сроков и качества развития соединительнотканного и эпителиального регенератов, степени выраженности воспалительного процесса, расстройств кровообращения при текущей регенерации.

Однако полученные результаты позволяют считать, что наиболее эффективным препаратом для заживления полнослойных резаных ран кожи по итогам визуальной оценки и гистологического исследования является МТГ-0,1%, что подтверждено быстрой остановкой кровотечения и образованием фибринового сгустка, ранним началом эпителизации на 3-и сутки эксперимента, окончательным завершением регенераторных процессов к 10-м суткам. Начальная эпителизация в других группах наступает позже: не ранее 5 суток в группе с аппликацией препарата МТГ-0,03% и на 7-е сутки при применении фитомази и Солкосерила. Репаративные процессы характеризуются синхронным развитием эпителиального и соединительнотканного регенератов с их дифференцировкой.

Список литературы

1. Привольнев В.В., Пасхалова Ю.С., Родин А.В., Мишиш В.А. Местное лечение ран и раневой инфекции по результатам анонимного анкетирования хирургов России. *Раны и раневые инфекции*. 2016; 3(1): 19-24. DOI:10.17650/2408-9613-2016-3-1-19-24.
2. Блатун Л.А. Местное медикаментозное лечение ран. Проблемы и новые возможности их решения. *Consilium medicum. Хирургия. (Прил.)* 2007; (1): 9-15.
3. Обзор рынка биотехнологий в России и оценка перспектив его развития. Frost and Sullivan; 2014. URL: https://www.rvc.ru/upload/iblock/e21/20141020_Russia_Biotechnology_Market_fin.pdf (дата обращения 12.10.2017).
4. Яремчук, А.А., Хишова О.М., Половко Н.П. Обоснование состава многокомпонентной мази для лечения гнойных ран в первой фазе раневого процесса. *Вестник фармации*. 2012; 6: 39-46.
5. Шаматкова С.В. Оптимизация регенерационных процессов в мягких тканях. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2013; 4 (8): 60-3.
6. Мишалов В.Д., Чайковский Ю.Б., Твердохлеб И.В. О правовых, законодательных, этических нормах и требованиях при выполнении научных морфологически исследований. *Морфология*. 2007; 1(2): 108-15.
7. McCarty S.M., Percival S.L. Proteases and Delayed Wound Healing. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. 2013; 2(8): 438-47. DOI: 10.1089/wound.2012.0370
8. Алексеева Н.Т. Отдаленные результаты регенераторного процесса в коже при заживлении асептических ран. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2012; (2): 15-7.
9. Мнихович М.В., Еремин Н.В., Фомина Л.В., Мигляс В.Г. Межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия при заживлении ран (лекция). *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2013; 2(2): 63-72.
10. Алексеева Н.Т., Никитюк Д.Б., Ключкова С.В. Гистохимическая характеристика эпидермиса при заживлении кожных ран под действием различных региональных факторов. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2016; 6(3): 10-4.

Сведения об авторах

Еськова Александрина Юрьевна — клинический ординатор кафедры пластической хирургии, соискатель кафедры общей и клинической патофизиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Большакова Ольга Владимировна — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры гистологии и эмбриологии Медицинской академии имени С.И.Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского»

Голубинская Елена Петровна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии с секционным курсом Медицинской академии имени С.И.Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского»

Кубышкин Анатолий Владимирович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей и клинической патофизиологии Медицинской академии имени С.И.Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского»

Бессалова Евгения Юрьевна — доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории Медицинской академии имени С.И.Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского»

Фомочкина Ирина Ивановна — доктор медицинских наук, профессор кафедры общей и клинической патофизиологии Медицинской академии имени С.И.Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского»

References

1. Privol'nev V.V., Paskhalova Y.S., Rodin A.V., Mitish V.A. [Local treatment for wounds and wound infection according to the results of an anonymous survey of surgeons in Russia]. *Ranyi i ranevyye infektsii. Zhurnal imeni prof. B.M. Kostyuchenka [Wounds and wound infections]*. 2016; 3(1): 19-24. DOI: 10.17650/2408-9613-2016-3-1-19-24. (In Russian)
2. Blatun L.A. [Local medication of wounds. Problems and new opportunities of its treatment]. *Consilium Medicum. Khirurgiya [Consilium Medicum. Surgery]*. 2007; (1): 9-15. (In Russian)
3. *The review of the market of biotechnologies in Russia and an assessment of prospects of its development*. Frost, Sullivan; 2014. URL: https://www.rvc.ru/upload/iblock/e21/20141020_Russia_Biotechnology_Market_fin.pdf (Retrieved: 12.10.2017) (In Russian)
4. Yaremchuk, A.A, Khishova O.M, Polovko N.P. [Substantiation of the composition of multicomponent ointment for treatment of purulent wounds in the first phase of the wound process]. *Vestnik farmatsii [Bulletin of Pharmacy]*. 2012; 6: 39-46. (In Russian)
5. Shamatkova S.V. [Optimization of regeneration processes in soft tissues]. *Zhurnal anatomii i gistopatologii [Journal of Anatomy and Histopathology]*. 2013; 4 (8): 60-3. (In Russian)
6. Mishalov V.D., Chaykovsky I.V., Tverдохлеб Yu.B. [On legal, legislative and ethical norms and conditions in the performance of scientific morphological studies]. *Morfologiya [Morphology]*. 2007; 1(2): 108-15. (In Russian)
7. McCarty S.M., Percival S.L. Proteases and Delayed Wound Healing. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*. 2013; 2(8): 438-47. DOI: 10.1089/wound.2012.0370
8. Alexeeva N. T. [Long-term results of skin regeneration process in healing of aseptic wounds]. *Zhurnal anatomii i gistopatologii [Journal of Anatomy and Histopathology]*. 2012; (2): 15-7. (In Russian)
9. Mnihovich M.V., Yeremin N.V., Fomina L.V., Miglyas V.G. [Intercellular and cell-matrix interactions in wound healing (lecture)]. *Zhurnal anatomii i gistopatologii [Journal of Anatomy and Histopathology]*. 2013; 2(2): 63-72. (In Russian)
10. Alexeeva N.T., Nikityuk D.B., Klochkova S.V. [Histochemical characteristics of the epidermis in the healing of cutaneous wounds under the influence of various regional factors]. *Krymskiy zhurnal eksperimental'noy i klinicheskoy meditsini [Crimean Journal of Experimental and Clinical Medicine]*. 2016; 6(3): 10-4. (In Russian)

УДК: 808(075.8)

К вопросу адаптации параневральных соединительнотканых структур периферических нервов при повышенных физических нагрузках или ограничении движений

Затолокينا М.А.¹, Кузнецов С.Л.²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 305041, Курск, ул. К. Маркса, д. 3

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Актуальность. Параневральные соединительнотканые структуры, образованные совокупностью фасциально-клетчаточных пространств и волокнистых образований и расположенные между эпиневрием и эпимизиом прилежащих мышц, крайне тесно морфофункционально взаимосвязаны с нервным стволом. Однако, данных об адаптационных возможностях параневральных структур в условиях разной интенсивности двигательной активности конечности, в литературе недостаточно. **Целью** данной работы явилось изучение реактивных изменений параневральных структур периферических нервов ветвей плечевого сплетения в условиях повышенной и пониженной двигательной активности грудной конечности и определение их адаптационного резерва. **Методы.** Морфологическое изучение параневральных соединительнотканых структур периферических нервов ветвей плечевого сплетения было проведено на 700 органокомплексах, состоящих из нервных стволов, кровеносных сосудов, окружающих мышц и соединительной ткани. Полученные микропрепараты окрашивали гематоксилином и эозином, по Маллори, по Ван Гизону, альциановым синим, проводили иммуногистохимическое исследование и морфометрию. **Результаты.** В параневральных соединительнотканых структурах реактивные изменения были менее выражены, чем в эпиневррии. В частности, при гипокинезии в эпиневррии уменьшение объема долек белой жировой ткани происходило в начале эксперимента, а в фасциально клетчаточных пространствах параневрия к окончанию исследования. В клеточном составе абсолютное большинство приходилось на долю клеток фибробластического ряда, при этом количество клеток-резидентов было большим в параневральных структурах. При гиперкинезии, большее количество фибробластов и фиброцитов было выявлено в эпиневррии, а макрофагов и тучных клеток в параневральной ткани. По данным иммуногистохимического исследования в условиях гипокинезии степень пролиферативной активности клеток, находящихся в G1-, G2-, S- и M-фазах клеточного цикла, начиная с 21 суток эксперимента, была в 1,3 раза выше в параневральной соединительнотканной ткани, чем в эпиневральной. В условиях гиперкинезии, на фоне увеличения значений индекса пролиферативной активности, большее количество клеток, экспрессирующих Ki-67, визуализировалось в эпиневррии, что свидетельствовало об активно протекающей клеточной пролиферации и незавершенности процесса адаптации эпиневральных структур, в сравнении с параневральными соединительноткаными структурами. **Заключение.** Полученные в работе данные свидетельствуют о более выраженном адаптационном резерве параневральных соединительнотканых структур, чем в эпиневральной соединительной ткани, как в условиях гипокинезии, так и в условиях гиперкинезии.

Ключевые слова: параневральные соединительнотканые структуры, гипокинезия, гиперкинезия, индекс пролиферативной активности Ki-67, тучные клетки.

Для цитирования: Затолокينا М.А., Кузнецов С.Л. К вопросу адаптации параневральных соединительнотканых структур периферических нервов при повышенных физических нагрузках или ограничении движений. Патогенез. 2018; 16(1): 42—50

DOI:

Для корреспонденции: Затолокينا Мария Алексеевна, e-mail: marika1212@mail.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 18.09.2017

On adaptation of paraneural, connective-tissue structures of peripheral nerves to strenuous exercise or limitation of movements

Zatolokina M.A.¹, Kuznetsov S.L.²

¹ Kursk Medical State University, Karla Marksa Str. 3, Kursk 305041, Russian Federation

² I.M.Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str. 8, Bldg. 2, Moscow 119991, Russian Federation

Paraneural connective-tissue structures consisting of a combination of fascial-cell spaces and fibrous formations and located between the epineurium and epimysis of adjacent muscles are extremely closely morphologically related with the neural stem. However, data on the adaptive capabilities of the paraneural structures under conditions of different intensity of the motor activity of the limb are not enough in the literature. The aim of this work was to study the reactive changes in the paraneural structures of the peripheral nerves of the branches of the brachial plexus under conditions of increased and decreased motor activity of the thoracic extremity and the determination of their adaptive reserve. Methods. The morphological study of reactive changes in paraneural connective tissue structures of peripheral nerves performed on a model of thoracic limb hyperkinesia or hypokinesia showed that adaptive processes were more clearly pronounced in paraneural structures than in the epineurium. Results. According to the immunohistochemical study in hypokinesia, the degree of proliferative activity of cells in G1, G2, S, and M phases of the cell cycle was 1.3 times higher in the paraneural connective tissue than in the epineural tissue starting from the 21st day of experiment. In hyperkinesia associated with the increasing index of proliferative activity, a greater number of cells expressing Ki-67 was visualized in the epineurium than in paraneural connective tissue structures. Conclusion. The data obtained in the work indicate a more pronounced adaptive reserve of the paraneural connective tissue structures than in the epineural connective tissue, both in hypokinesia and in hyperkinesia.

Key words: paraneural connective tissue structures, hypokinesia, hyperkinesia, proliferative activity index Ki-67, mast cells.

For citation: Zatulokina M.A., Kuznetsov S.L. [On adaptation of paraneural, connective-tissue structures of peripheral nerves to strenuous exercise or limitation of movements]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(1): 42–50 (in Russian)

DOI:

For correspondence: Zatulokina Mariya Alekseeva, e-mail marika1212@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received: 18.09.2017

Введение

Определенным резервом адаптации к действию факторов внешней среды обладают все биологические ткани организма. На внешнее воздействие ткани живых организмов отвечают реакциями приспособительного характера, т.е. проявляют реактивность как свойство адаптивности живых систем. При этом проводниковый и стромальный компоненты периферических нервов не являются исключением. В литературных источниках отечественных и зарубежных авторов представлено достаточное количество данных о структурно-функциональных особенностях в норме и патологии проводникового компонента периферических нервов и окружающих их соединительнотканых оболочках, таких, как: эндо-, пери- и эпинеурии [1–3]. Относительно строения, функциональной роли и возможного механизма работы параневральных соединительнотканых структур (ПСС), данные единичные и разрозненные [4, 5]. Остается открытым вопрос об адаптационных возможностях параневральных структур к повышенным физическим нагрузкам или ограничению движений. Решение указанных проблем позволит получить не только, новые фундаментальные данные о параневральных структурах, но и возможность управлять этими структурами для сокращения сроков реабилитации после травм или оперативных вмешательств на стволах периферических нервов в практической медицине.

Целью данной работы явилось изучение реактивных изменений ПСС периферических нервов ветвей плечевого сплетения в области средней трети плеча в экспериментально созданных условиях повышенной и пониженной двигательной активности грудной конечности и определение их адаптационного резерва.

Материалы и методы исследования

Экспериментальное исследование было выполнено на крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г. Перед началом эксперимента лабораторные животные в течение двух недель находились на карантине в условиях вивария Курского государственного медицинского университета. Все манипуляции с позвоночными животными проведены в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), с правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003) и законом «О защите животных от жестокого обращения» гл. V, ст. 104679-ГД от 01.12.1999 г.

Данная работа выполнена в соответствии с основным планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России и имеет номер государственной регистрации АААА-А16-116040760097-1.

Лабораторные животные (175 особей) были разделены на три группы, одна группа (70 животных) содержалась в условиях гипокинезии, вторая группа (70 животных) находилась в условиях гиперкинезии и третья группа составила (35 животных) контроль. Условия гипокинезии создавались путем помещения крыс в гипокинетические камеры (патент РФ на полезную модель (№82085 от 20.04.2009 г. «Гипокинетическая камера для мелких лабораторных животных»)). Условия гиперкинезии были реализованы путем ежедневного пребывания (плавания) животных в воде, продолжительностью 180 мин. Подопытных животных выводили из эксперимента на 7-е, 14-е, 21-е, 30-е, 45-е, 60-е и 90-е сутки от начала исследования по 10 особей и 2–3 контрольных животных соответствен-

но для каждой подгруппы. Для изучения изменений параневральных соединительнотканых структур периферических нервов ветвей плечевого сплетения, проводили отсечение передних (грудных) конечностей по плечевому суставу и в области средней трети плеча по латеральной поверхности иссекали органокомплекс, состоящий из мышц, кровеносных сосудов и нервных стволов с окружающей соединительной тканью. Всего для исследования было получено 700 органокомплексов.

Для морфологического изучения реактивных изменений параневральной соединительной ткани, в области средней трети плеча на латеральной поверхности, с использованием микрораспатора (рационализаторское предложение № 1762-07 от 20.05.2007 г.), проводили иссечение нервно-мышечного органокомплекса. Из полученных органокомплексов, используя препаровальный столик (патент РФ №166216 от 30 марта 2015 г. «Препаровальный столик для топографо-анатомического изучения и взятия материала для гистологического исследования»), изготавливали образцы размерами 10x10 мм, которые фиксировали погружением в 10% раствор формалина (рН 7,2—7,4) при комнатной температуре в течение 10 суток. Затем, материал заливали в парафин по стандартной методике, используя предложенные способы: «Способ удаления излишков парафина из металлических кассет» № 1764-07 от 18.05.2007 г. и «Способ распределения гистологического материала, залитого в парафин на деревянных блоках» № 1908-10 от 19.03.2010 г. Микротомировали и изготавливали поперечные гистологические срезы сосудисто-нервных пучков (СНП) с окружающими мышцами. Для обзорного изучения структурной организации СНП, срезы окрашивали гематоксилином и эозином; для изучения морфологических особенностей соединительной ткани, образующей оболочки нервов, в том числе и параневральные структуры — по Маллори, пикрофуксином по Ван Гизону и альтиановым синим для выявления тучных клеток.

Окрашенные гистологические препараты микрофотографировали и фотографировали с помощью оптической системы, состоящей из микроскопа Leica CME и окуляр камеры DCM-510 на увеличениях x100 и x400 крат с документированием снимков в программе FUTURE WINJOE, входящей в комплект поставки окуляр-камеры.

В поперечных гистологических срезах, используя «Способ визуализации морфологических структур с использованием макрофотографий» №1907-10 от 19.03.2010 г., при световой микроскопии, изучали топографические особенности наличие и степень развития параневральных соединительнотканых структур. На микрофотографиях, с помощью программы Imago J, измеряли: площадь поперечного сечения сосудисто-нервных пучков, нервных стволов, площадь соединительной ткани, толщину общего фасциального футляра и отходящих стропных элементов, толщину эндоневрия, периневрия. В соединительной ткани эпиневирия и параневральных структур проведена количественно-качественная оценка клеточного компонента. В популяции тучных клеток, используя классификацию Д.П. Линдера 1976 г. и 1980 г., и способ оценки тучных клеток Г.В. Порядина 1991 г., было выделено четыре типа тучных клеток. Вычисляя отношение количества дегранулированных клеток к общему количеству анализированных клеток, рассчитывали индекс дегрануляции.

Для оценки степени пролиферативной активности клеток эпи- и параневральной соединительной ткани при разной степени двигательной активности грудной конечности был использован иммуногистохимический метод (ИГХ), который проводили в соответствии со стандартными протоколами системы визуализации Ultra-Vision Quanto Peroxidaza Quanto и ДАБ Quanto. Использовали моноклональные антитела к маркеру клеточной пролиферации Ki-67 (Thermo Fisher Scientific), позволяющие выделить клетки, находящиеся в активной фазе клеточного цикла. Для проведения ИГХ парафиновые срезы толщиной 5—6 мкм располагали на предметных стеклах (Super Frost Plus), предварительно обработанные поли-L-лизинном, и высушивали в течение 12 часов при $t = 37^{\circ}\text{C}$. Затем регидратировали и осуществляли демаскировку антигенов кипячением образцов в 0,01 М цитратном буфере (рН 6.0) на водяной бане. Для инактивации эндогенной пероксидазы на срезы наносили 1—3% раствор H_2O_2 в течение 10 мин. Инкубацию с первичными кроличьими антителами Ki-67 (M3060, SP6, 1:200, «Dako») проводили при комнатной температуре в течение часа. Визуализацию результатов после иммуногистохимической реакции с моноклональными кроличьими антителами осуществляли с помощью непрямого стрептавидин-биотинового пероксидазного метода («Dako», LSAB+Kit, HRP), в качестве хромогенного субстрата был использован раствор диаминобензидина («Dako», Liquid DAB+). С целью визуализации всех клеток соединительной ткани докрашивали ядра гематоксилином. Для исключения незначительных отклонений в ходе иммуногистохимической реакции все этапы выполнялись одновременно, использовались одни и те же буферные растворы, инкубационные смеси и растворы антител. Все временные промежутки были одинаковыми. Учет результатов проводили при микроскопии x400 крат. Регистрировали клетки, осуществляющие экспрессию белка Ki-67. Подсчет количества Ki-67 позитивных клеток проводили на 100 клеток при анализе не менее 10 полей зрения. Индекс пролиферативной активности (индекс Ki-67) вычисляли как соотношение количества специфически окрашенных ядер к общему количеству всех ядер и выражали в процентах.

Статистическую обработку полученных цифровых данных выполняли в соответствии с современными представлениями о правилах математической обработки данных медицинских исследований [6, 7]. Все массивы данных были проверены на соответствие нормальному распределению, по результатам проверки был использован непараметрический критерий — U-критерий Манна—Уитни. Учитывая допустимый для экспериментальных медико-биологических исследований уровень $p < 0,05$, для подтверждения статистической гипотезы был выбран именно такой уровень значимости. Для описания выборочной совокупности данных использовали средние значения со стандартной ошибкой средних показателей ($M \pm SE$), как традиционную для гистологических исследований форму.

Результаты и обсуждение

Адаптация грудной конечности к определенной функции влечет за собой морфологические перестройки различных систем конечности, в том числе и нервной. Усилив или ослабив определенную адаптацию конечности

(например, локомоция в воде — ежедневное плавание в течение 180 мин или ограничение подвижности в результате пребывания в гипокинетической камере) и проследив за изменениями в структуре нерва, можно судить о том, за какую функцию ответственна та или иная структура и какова ее роль в целом. Именно такое сочетание эксперимента с морфологическим исследованием и позволило определить структурно-функциональные особенности ПСС в условиях гипо- и гиперкинезии.

Выбор белых лабораторных крыс в качестве экспериментальных животных, был обоснован достаточной степенью развития ПСС и хорошей их визуализацией у представителей отряда грызуны, по данным ранее проведенного исследования [8, 9]. Наиболее ярко выраженные изменения были выявлены в нерве разгибателей, что и послужило основанием для дальнейшего изучения пролиферативной активности клеток (определяли Ki-67 положительные клетки) ПСС и эпиневерия в сравнительном аспекте.

Проведенное морфологическое исследование показало, что нерв разгибателей был образован 5 нервными пучками на правой конечности и 4 на левой конечности. Форма СНП была веретеновидной, в области «брюшка» располагался самый крупный нервный пучок, площадь поперечного сечения которого составила $0,508 \pm 0,001 \text{ мм}^2$ и $0,541 \pm 0,001 \text{ мм}^2$ на правой и левой конечности соответственно. На периферии СНП визуализировались крупные кровеносные сосуды и мелкие нервные пучки разного диаметра, площадь которых варьировала от $0,046 \pm 0,000 \text{ мм}^2$ до $0,149 \pm 0,001 \text{ мм}^2$ на правой конечности и от $0,050 \pm 0,001 \text{ мм}^2$ до $0,135 \pm 0,001 \text{ мм}^2$ на левой конечности. Площадь поперечного сечения СНП была больше на правой конечности и составила — $3,059 \pm 0,012 \text{ мм}^2$, на левой — $2,755 \pm 0,004 \text{ мм}^2$ ($p < 0,05$). Площадь, занимаемая окружающей соединительной тканью, была в 1,2 раза больше справа, при этом значение соотношения площади нер-

вной ткани к соединительной было в 1,3 раза меньше, чем в нервах сгибателей. Выявленное асимметричное преобладание площади поперечного сечения СНП является проявлением билатеральной асимметрии в строении периферических нервов в области средней трети плеча.

Структуры параневрия хорошо визуализируются. Все компоненты СНП окружены общим фасциальным футляром (FF), толщина которого достоверно ($p < 0,05$) больше в 1,4 раза, чем в нервах сгибателей (FF разгибателей справа = $4,67 \pm 0,013 \text{ мкм}$, слева = $4,08 \pm 0,001 \text{ мкм}$ и FF сгибателей справа = $3,43 \pm 0,001 \text{ мкм}$ и слева = $2,96 \pm 0,004 \text{ мкм}$). Отличием в строении ПСС в сравнении с нервами сгибателей, является достоверно большее количество белой жировой ткани с тенденцией к слиянию в дольки. Нервные пучки покрыты периневрием, с хорошо выраженной послойностью. Толщина периневрия, без достоверных отличий между конечностями составила $5,234 \pm 0,015 \text{ мкм}$ и $5,562 \pm 0,012 \text{ мкм}$ на левой и правой конечности соответственно. В соединительной ткани эпиневерия, расположенной между нервными пучками, визуализировались мелкие кровеносные сосуды и нервные стволы. В межпучковом эпиневерии волокна соединительной ткани расположены более рыхло и хаотично, чем в наружном надпучковом эпиневерии. Соединительная ткань эпиневерия плавно переходит в окружающую нерв, параневральную соединительную ткань, волокна которой более структурированы и упорядочены.

В условиях эксперимента, ограничение двигательной активности грудной конечности при нахождении животных в гипокинетической камере приводило к существенным структурным перестройкам в соединительнотканых невральных оболочках. В условиях гипокинезии, происходило постепенное снижение площади поперечного сечения СНП (S_{снп}), нервных стволов (S_{нп}), окружающей соединительной ткани (S_{ст}) и толщины периневрия (d_п). Динамика изменений данных показателей представлена в табл. 1.

Таблица 1

Динамика изменения площади поперечного сечения сосудисто-нервного пучка (S_{снп}), нервной ткани (S_{нп}), окружающей соединительной ткани (S_{ст}) и толщины периневрия (d_п) нерва разгибателей в условиях гипокинезии

Сроки наблюдения	Правый нерв разгибателей				Левый нерв разгибателей			
	S _{снп}	S _{нп}	S _{ст}	d _п	S _{снп}	S _{нп}	S _{ст}	d _п
Контроль	1,552 ± 0,01	0,060 ± 0,01	1,492 ± 0,01	5,234 ± 0,01	1,626 ± 0,01	0,049 ± 0,01	1,577 ± 0,01	5,287 ± 0,01
7 сут. (n = 10)	1,355 ± 0,01*	0,057 ± 0,01	1,325 ± 0,01*	4,888 ± 0,01	1,441 ± 0,01	0,047 ± 0,01	1,399 ± 0,01	5,558 ± 0,01
14 сут. (n = 10)	1,374 ± 0,01*	0,048 ± 0,01	1,298 ± 0,01*	4,658 ± 0,01	1,430 ± 0,01	0,042 ± 0,01	1,383 ± 0,01	4,959 ± 0,01
21 сут. (n = 10)	0,924 ± 0,01*#	0,044 ± 0,01	0,879 ± 0,01*#	4,468 ± 0,01*	1,187 ± 0,01*#	0,037 ± 0,01	1,154 ± 0,01*	4,870 ± 0,01
30 сут. (n = 10)	0,892 ± 0,01*	0,023 ± 0,01	0,868 ± 0,01*	4,267 ± 0,01*	1,014 ± 0,01*#	0,036 ± 0,01	0,977 ± 0,01*	4,669 ± 0,01
45 сут. (n = 10)	0,891 ± 0,01*	0,053 ± 0,01	0,838 ± 0,01*	3,575 ± 0,01*#	0,944 ± 0,01*#	0,032 ± 0,01	0,915 ± 0,01*#	4,372 ± 0,01*#
60 сут. (n = 10)	0,859 ± 0,01*	0,042 ± 0,01	0,816 ± 0,01*	3,173 ± 0,01*#	0,835 ± 0,01*#	0,029 ± 0,01	0,798 ± 0,01*#	3,969 ± 0,01*
90 сут. (n = 10)	0,857 ± 0,01*	0,039 ± 0,01	0,817 ± 0,01*	2,864 ± 0,01*#	0,748 ± 0,01*#	0,026 ± 0,01	0,722 ± 0,01*#	3,035 ± 0,01*#

Примечание. * — $p < 0,05$ при сравнении с данными в контроле, # — $p < 0,05$ при сравнении с предыдущей точкой тестирования (по критерию Манна—Уитни).

Морфометрический анализ структур нерва разгибателей выявил статистически значимое ($p < 0,05$) снижение площади поперечного сечения СНП в 2 раза на левой конечности и в 1,8 раза на правой, преимущественно за счет уменьшения площади окружающей соединительной ткани в 2 раза. Толщина периневрия к окончанию эксперимента уменьшилась в 1,7 раза на левой конечности и в 1,8 раза на правой конечности. Следует отметить, что максимальное снижение (в 1,3 раза на левой конечности и в 2 раза на правой конечности) площади поперечного сечения нервных пучков происходило в промежутке между 21-ми и 30-ми сутками эксперимента.

В окружающем нервные пучки эпиневррии и ПСС наблюдалось уменьшение количества белой жировой ткани, уплотнение расположения коллагеновых волокон, увеличение количества клеток в единице площади среза. Общий фасциальный футляр, окружающий все компоненты СНП, хорошо визуализирован, фасциально-клетчаточные пространства, заполненные дольками белой жировой ткани, уменьшались в объеме, при этом количество мелких кровеносных сосудов на единицу площади среза возрастало (рис. 1).

В клеточном компоненте преобладали фибробласты, фиброциты и тучные клетки. Необходимо отметить, что на фоне абсолютного преобладания в поле зрения клеток-резидентов на всех сроках эксперимента, динамика изменения количественного состава была различной. Так, в ПСС количество фибробластов имело тенденцию к увеличению до 30-х суток, затем происходило уменьшение их числа, что вполне объяснимо снижением пролиферативной активности клеток при гипокинезии. Количество фиброцитов увеличивалось в 1,2 раза к 30-м суткам эксперимента, а затем происходило уменьшение их числа от общего количества клеток. При этом в поле зрения визуализировалось большое количество макрофагов и тучных клеток, значения которых на 21-е сутки являлись диаметрально противоположными, затем происходило снижение количества макрофагов на фоне полуторакратного преобладания тучных клеток.

В волокнистой соединительной ткани эпиневррии наблюдаемое увеличение клеток фибробластического ряда было статистически не значимым, при этом, их относительное количество на всех сроках эксперимента было значимо меньше, чем в параневральной соединительной ткани. Показатель соотношения клеток-резидентов к нерезидентам был в 1,3 раза меньше, в сравнении со значениями в ПСС. Интересно отметить, что количество макрофагов, в сравнении с параневральной тканью, на фоне меньшего их числа, имело тенденцию роста до 21-х суток эксперимента, а затем происходило резкое снижение их количества в 3,3 раза к окончанию эксперимента (на 21-е сутки количество макрофагов составило 10% от общего клеточного состава, на 90-е сутки — 3%). Подсчет количества тучных клеток в начале эксперимента выявил тотальную дегрануляцию мастоцитов в эпиневррии. По истечении месяца массивная дегрануляция наблюдалась в ПСС. В поле зрения на начальных сроках эксперимента преобладали тучные клетки в стадии накопления секрета — 0 тип. Затем, начиная с 30-х суток эксперимента, преобладали тучные клетки в стадии дегрануляции (I, II и III типы). В эпиневррии на указанном сроке, картина была диаметрально противоположной.

Наблюдаемое в параневррии, в условиях гипокинезии, двукратно меньшее количества тучных клеток (ТК в параневррии на 7-е сутки составило 9% от общего количества клеток, на 14-е сутки — 10%; ТК в эпиневррии на 7-е сутки составило 20% от общего количества клеток, на 14-е сутки — 21%), свидетельствующее о массивной дегрануляции, является адаптационной реакцией ПСС на действие экстремальных факторов, в данном случае, на гипокинезию. Учитывая стимулирующее влияние тучных клеток на усиление синтеза коллагена фибробластами, вполне объяснимо полученное нами при гипокинезии большее (в 1,5 раза) количество фибробластов в ПСС, чем в эпиневррии. По данным Е.О. Баглай (2015) стимулирующее влияние тучных клеток на процессы фиброза обусловлено активацией функции фибробластов [10]. Выделенные мастоцитами вещества при дегрануляции потенцируют митотические процессы в фибробластах. При действии экстремальных факторов ответ тучных клеток носит как системный характер, так может и проявляться хорошо выраженной местной реакцией в виде тотальной дегрануляции [11].

Выявленное большее содержание макрофагов (в 1,5 раза) на начальных сроках гипокинезии в ПСС при сравнении с эпиневрием также свидетельствует о более активно протекающих процессах пролиферации в ПСС. По данным Н.Т. Алексеевой (2012), макрофаги стимулируют пролиферацию клеток посредством секреции различных цитокинов, которые регулируют скорость размножения и характер дифференцировки клеток, в том числе и фибробластов [12—14].

Степень пролиферативной активности клеток, находящихся в G1, G2, S и M-фазах клеточного цикла, начиная с 21-х суток эксперимента, имела статистически значимые отличия между эпиневрием и ПСС. Так, на 30-е сутки индекс пролиферации (ИП) в эпиневррии был ниже на левой конечности на 23%, на правой на 22% соответственно. Через полтора месяца от начала эксперимента ИП в эпиневррии также был ниже на 23% слева и 22% справа. К окончанию эксперимента разница составляла 19% слева и 33% справа соответственно.

Оценивая пролиферативную активность клеток соединительнотканых невральных оболочек, следует отметить, что в ПСС на всех сроках эксперимента, в условиях гипокинезии, была выше, чем в эпиневррии в 1,3 раза. Ди-

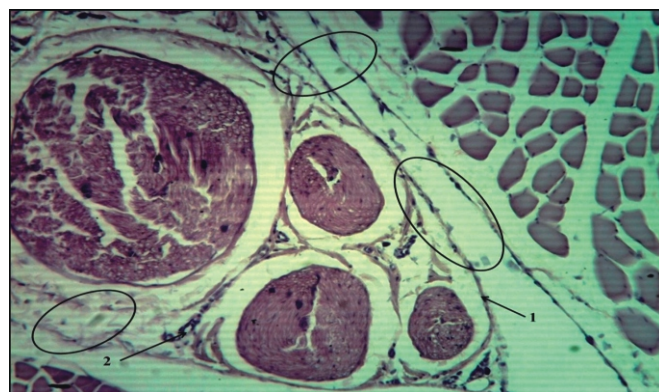


Рис. 1. Микрофотография нерва разгибателей и параневральных соединительнотканых структур в области средней трети плеча в условиях гипокинезии на 14-е сутки. Стрелками обозначены: 1 — общий фасциальный футляр, 2 — сосуды параневрия. Овалом обозначены параневральные соединительнотканые структуры. Окрашено гематоксилином и эозином. Ув. x200.

динамика изменения индекса пролиферативной активности клеток в эпи- и параневральной соединительной ткани нерва разгибателей в области средней трети плеча представлена на рис. 2.

На представленной диаграмме хорошо выражена динамика изменений индекса пролиферативной активности клеток соединительной ткани эпиневрива и ПСС. Более активно процессы пролиферации протекают в ПСС, о чем свидетельствуют значимо большие индексы пролиферации в сравнении с эпиневрием. Следует отметить, что скорость пролиферации клеток соединительной ткани, как ПСС, так и эпиневрива имела обратно пропорциональную направленность длительности эксперимента. К завершению эксперимента (на 90 сутки) индекс пролиферации снизился в параневрии в 1,5 раза, а в эпиневриве в 1,9 раза, что может свидетельствовать о более высокой степени адаптационных возможностей ПСС.

В условиях повышенной двигательной активности грудной конечности — гиперкинезии, площадь поперечного сечения СНП на правой конечности увеличилась в 1,5 раза, на левой конечности в 2,3 раза. Наблюдаемые

изменения происходили за счет достоверного увеличения не только площади соединительной ткани в 1,5—2,9 раза, но и в результате 5—7-кратного увеличения площади поперечного сечения нервных пучков. Толщина периневрива без достоверных различий между конечностями увеличилась в 1,5 раза. Изложенные закономерности представлены в табл. 2.

Анализ качественно-количественного состава клеточного компонента соединительной ткани эпиневрива и ПСС выявил преобладание клеток фибробластического ряда (количество фибробластов варьировало от 36% до 55% в эпиневриве и от 36% до 46% в параневрии). Тучные клетки, имеющие преимущественно овальную форму и находящиеся в стадии накопления секрета на начальных сроках эксперимента к окончанию переходили в стадию дегрануляции, что приводило к резкому снижению их количества на единице площади среза (количество ТК в эпиневриве на 7-е сутки составило 14% от общего клеточного состава, на 90-е сутки — 8%; в параневрии количество ТК на 7-е сутки составило 9% от общего клеточного состава, на 90-е сутки — 3%).

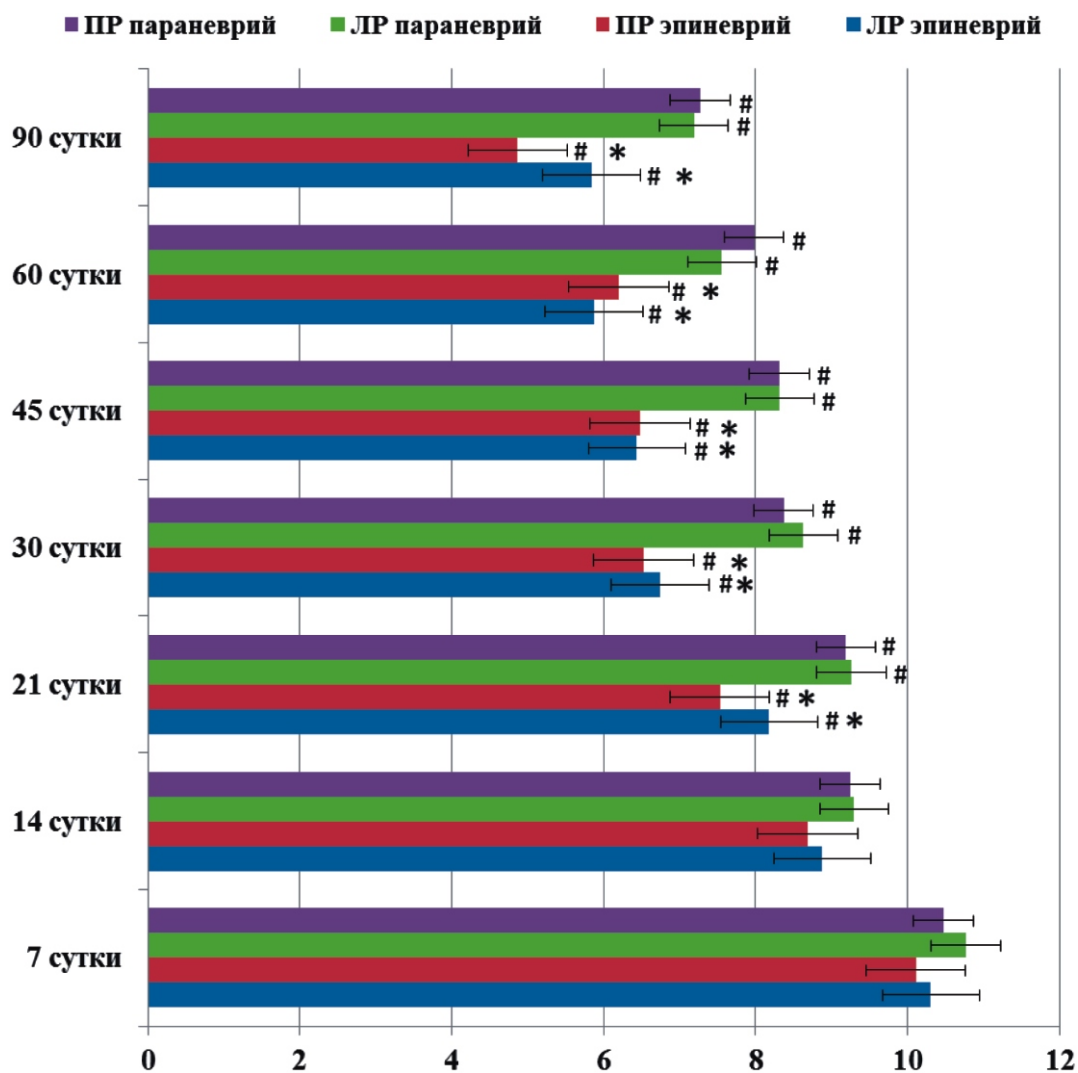


Рис. 2. Динамика изменения индекса пролиферативной активности (по горизонтальной шкале) клеток в эпи- и параневральной соединительной ткани (параневрий) нерва разгибателей (ЛР и ПР — на левой и правой конечности соответственно) в области средней трети плеча в условиях гиперкинезии.
— статистическая значимость отличий от срока обследования 7 суток ($p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни); * — статистическая значимость различий между эпи- и параневральной соединительной ткани на соответствующей стороне ($p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни).

Динамика изменения площади поперечного сечения сосудисто-нервного пучка (Сснп), нервной ткани (Снп), окружающей соединительной ткани (Сст) и толщины периневрия (d_п) нерва разгибателей в условиях гиперкинезии

Сроки наблюдения	Правый нерв разгибателей				Левый нерв разгибателей			
	Сснп	Снп	Сст	d _п	Сснп	Снп	Сст	d _п
Контроль	0,996 ± 0,01	0,030 ± 0,01	0,880 ± 0,01	3,813 ± 0,01	0,969 ± 0,01	0,025 ± 0,01	0,765 ± 0,01	5,325 ± 0,01
7 сут. (n = 10)	1,078 ± 0,01	0,073 ± 0,01*	0,939 ± 0,01*	3,929 ± 0,01	0,986 ± 0,01	0,059 ± 0,01	0,713 ± 0,01	8,056 ± 0,01*
14 сут. (n = 10)	1,102 ± 0,01	0,098 ± 0,01*	0,979 ± 0,01*	3,949 ± 0,01	1,034 ± 0,01*#	0,070 ± 0,01*	1,019 ± 0,01*#	6,043 ± 0,01#
21 сут. (n = 10)	1,117 ± 0,01	0,116 ± 0,01*	1,087 ± 0,01*#	4,698 ± 0,01*#	1,396 ± 0,01*#	0,105 ± 0,01*#	1,393 ± 0,01*#	8,386 ± 0,01*#
30 сут. (n = 10)	1,326 ± 0,01	0,139 ± 0,01*	1,253 ± 0,01*#	4,867 ± 0,01*	1,433 ± 0,01*#	0,132 ± 0,01*#	1,310 ± 0,01*#	7,807 ± 0,01*
45 сут. (n = 10)	1,449 ± 0,01	0,156 ± 0,01*	1,310 ± 0,01*	5,014 ± 0,01*	1,543 ± 0,01*#	0,163 ± 0,01*#	1,411 ± 0,01*#	7,535 ± 0,01*
60 сут. (n = 10)	1,475 ± 0,01	0,163 ± 0,01*	1,319 ± 0,01*	5,388 ± 0,01*#	2,286 ± 0,01*#	0,173 ± 0,01*	2,098 ± 0,01*#	7,865 ± 0,01*
90 сут. (n = 10)	1,502 ± 0,01	0,165 ± 0,01*	1,337 ± 0,01*	5,911 ± 0,01*#	2,304 ± 0,01*	0,188 ± 0,01*#	2,264 ± 0,01*#	8,115 ± 0,01*

Примечание. * — $p < 0,05$ при сравнении с данными в контроле, # — $p < 0,05$ при сравнении с предыдущей точкой тестирования (по критерию Манна–Уитни).

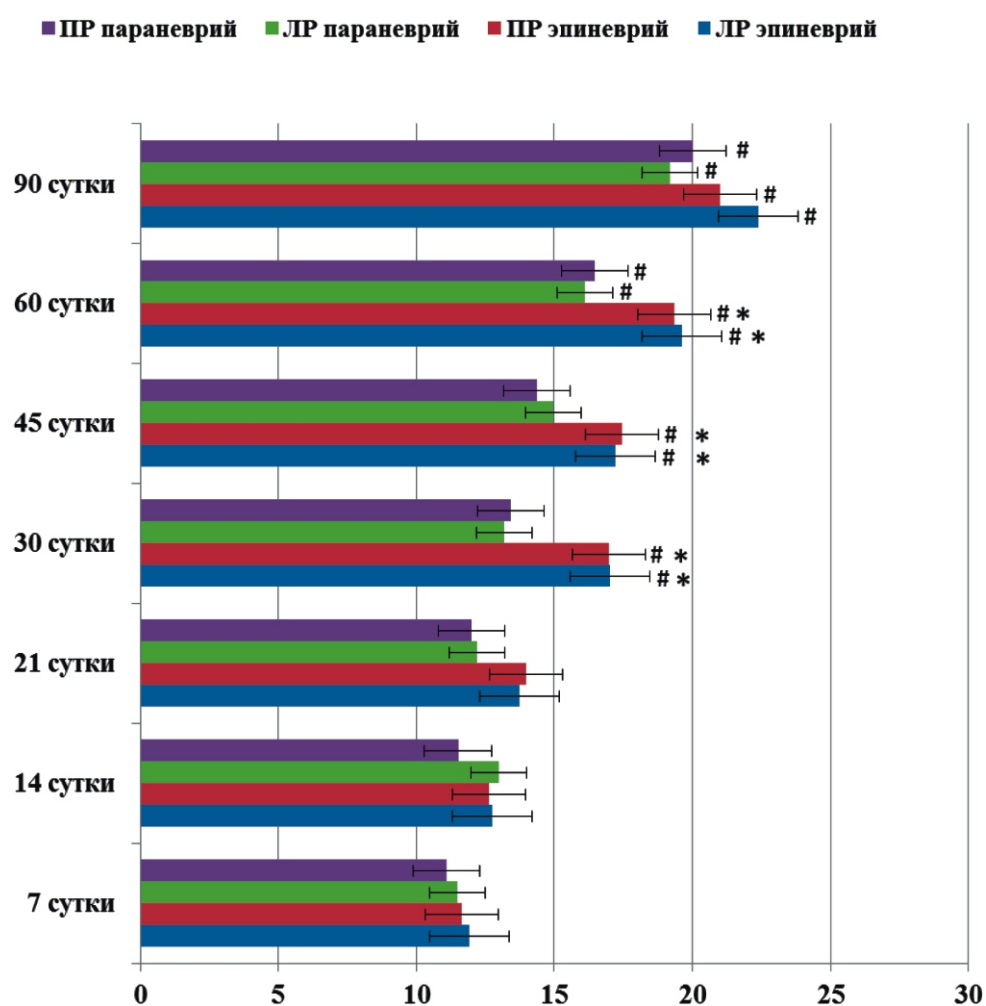


Рис. 3. Динамика изменения индекса пролиферативной активности (по горизонтальной шкале) клеток в эпи- и параневральной соединительной ткани (параневрий) нерва разгибателей (ЛР и ПР — на левой и правой конечности соответственно) в области средней трети плеча в условиях гиперкинезии.

— статистическая значимость отличий от срока обследования 7 суток ($p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни); * — статистическая значимость различий между эпи- и параневральной соединительной тканью на соответствующей стороне ($p < 0,05$ по критерию Манна–Уитни).

Следует отметить, что количество макрофагов в эпиневррии имело тенденцию на уменьшение значений (на 7-е сутки количество макрофагов составило 11% от общего клеточного состава, на 90-е сутки — 1%). В параневррии наблюдался рост количества макрофагов (с 5% от общего количества клеток на 7-е сутки до 15% на 90-е сутки эксперимента) на фоне снижения в 3 раза количества тучных клеток (данные приведены выше).

В условиях гиперкинезии визуализировался утолщенный общий фасциальный футляр, образованный параллельно расположенными в одном направлении, зрелыми коллагеновыми волокнами. Расширенные параневральные фасциально-клетчаточные пространства содержали хорошо структурированные дольки белой жировой ткани. Следует отметить, что выявленное преобладание белой жировой ткани в параневррии в условиях гиперкинезии, при сравнении с условиями гипокинезии, свидетельствует об ее непосредственном участии в процессе адаптации параневральных соединительнотканых структур к повышенной двигательной активности грудной конечности. Жировой ткани отводится роль амортизационной «подушки», которая смягчает всевозможные давления и предупреждает возникновение нарушений при травмах и повреждениях грудной конечности. В результате проведенного морфометрического анализа компонентов сосудисто-нервного пучка нерва разгибателей была выявлена похожая динамика в изменении показателей, с асимметричным преобладанием значений на одной из конечностей (табл. 1, 2). В параневральном фасциально-клетчаточном пространстве, представленном дольками белой жировой ткани, визуализировалось значительное количество кровеносных сосудов, в клеточном компоненте преобладали клетки резиденты.

Иммуногистохимическое исследование выявило, что в начале эксперимента пролиферативная активность клеток была практически одинаковой, как в эпиневррии, так и в ПСС. Затем, к 21-м суткам эксперимента, в эпиневррии индекс пролиферации был в 1,2 раза больше, чем в параневррии. Через месяц эксперимента, в эпиневррии его значения были наибольшими и преобладали в 1,3 раза в сравнении со значениями индекса пролиферативной активности в ПСС (рис. 3). К окончанию эксперимента, на фоне увеличения значений индекса пролиферативной активности, большее количество митотически делящихся клеток, экспрессирующих Ki-67, визуализировалось в эпиневррии, чем в ПСС, что свидетельствует о более высоких адаптационных возможностях параневральных структур.

Следует отметить, что выявленные морфологические отличия в организации эпиневральной соединительной ткани и ПСС в условиях повышения или ограничения двигательной активности грудной конечности, свидетельствуют не только о разной функциональной роли этих оболочек для периферического нерва как органа, но и о значимых отличиях в адаптационных возможностях.

Заключение

Проведенное исследование микроструктурных особенностей ПСС и эпиневррии в сравнительном аспекте при гипо- и гиперкинезии позволяет регулировать адаптационные процессы, происходящие как во внутриневральных структурах, так и в параневральных, тем самым со-

вершенствовать микрохирургические методики по восстановлению целостности посттравматических дефектов сосудисто-нервного пучка.

Список литературы

1. Сидорович Р.Р., Смеянович А.Ф., Гузов С.А., Юдина О.А. Особенности анатомии плечевого сплетения в аспекте выполнения хирургических вмешательств на его структурах. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2011; 10(2): 127-133.
2. Турсунова Ю.П., Баландина О.А., Судюков Л.В. Морфометрические показатели миелиновых и безмиелиновых нервных волокон срединного нерва. *Медицинская наука и образование Урала*. 2010; 11-3: 71-74.
3. Литвиненко Л.М. О сосудисто-нервных комплексах и формировании сосудисто-нервных пучков. *Вестник новых медицинских технологий*. 2006; 13-3: 18-19.
4. Иванов А.В. *Параневральные соединительнотканые структуры плечевого сплетения человека*. В сб.: Человек и его здоровье. Курск: 1998; 1: 52-53.
5. Польской В.С. Параневррий седалищного нерва человека. *Тезисы конференции КГМИ*. Курск, 1991: 90-92.
6. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. *Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel*. Казань: Морцион, 2001. 408 с.
7. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. Под ред. Н.Е. Бузикашвили, Д.В. Самойлова. М.: Практика, 1999. 462 с.
8. Затолокина М.А. Реактивность параневральной соединительной ткани периферических нервов плечевого сплетения при физической нагрузке. *Морфология*. 2016; 149(3): 87.
9. Zatolokina M.A., Gerasimova A.V., Tsaroeva L.K., Maleeva D.S. The morphofunctional state of connective tissue component of peripheral nerves from experimental animals' forelimbs after changing their motor activity. *International Journal Of Applied And Fundamental Research*. 2015; 1: Режим доступа: <http://www.science-sd.com/460-24760> Дата обращения: 16.10.2016.
10. Баглай Е.О., Дубикова А.И. Тучные клетки — ключевые участки патогенеза иммуновоспалительных заболеваний. *Научно-практическая ревматология*. 2015; 53 (2): 182-189.
11. Мухлынина Е.А. Состояние системы тучных клеток при действии на организм экстремальных факторов. *Молодые ученые в медицине: материалы XV Всероссийской научно-практической конференции (2-3 апр. 2010 г.)*. Казань. 2010: 288.
12. Алексеева Н.Т., Глухов А.А., Остроушко А.П. Роль клеток фибробластического дифферона в процессе заживления ран. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*. 2012; 5(3): 601-608.
13. Арташян О.С., Юшков Б.Г., Мухлынина Е.А. Изучение функциональной активности тучных клеток при иммобилизационном стрессе. *Цитология*. 2006; 48(8): 665-668.
14. Тюриков В.М., Грачёв Ю.В. Тригеминальная невралгия: патогенетические и клинические особенности, методы патогенетического обоснованного лечения. Лекция. *Патогенез*. 2013; 11(4): 64-68.

References

1. Sidorovich R.R., Smeyanovich A.F., Guзов S.A., Yudina O.A. [Features of anatomy of the brachial plexus in the aspect of performing surgical interventions on its structures]. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta [Bulletin of Vitebsk State Medical University]*. 2011; 10(2): 127-133. (in Russian)
2. Tursunova Yu.P., Balandina O.A., Sudyukov L.V. [Morphometric parameters of myelin and moth-free nerves of the median nerve]. *Medicinskaya nauka i obrazovanie Urala [Medical science and education of the Urals]*. 2010; 11-3: 71-74. (in Russian)
3. Litvinenko L.M. [About vascular-nervous complexes and formation of vascular-neural bundles]. *Vestnik novykh medicinskih tekhnologij [Bulletin of new medical technologies]*. 2006; 13-3: 18-19. (in Russian)
4. Ivanov A.V. [Paraneural connective tissue structures of human brachial plexus]. *Chelovek i ego zdorov'e: sbornik nauchnykh trudov. Kursk*. 1998; 1: 52-53. (in Russian)

5. Pol'skoi V.S. [Paraneurium of the human sciatic nerve] *Tezisy konferentsii KGMI. [Theses of the conference of KSMI]*. Kursk, 1991: 90-92. (in Russian)
6. Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N. [*Statistical methods in biomedical research using Excel*]. Kazan.: Morion, 2001. 408 p. (in Russian)
7. Glanc S. [*Medico-biological statistics. Per. s angl. pod red. N. E. Buzikashvili, D. V. Samojlova*]. M.: Praktika, 1999. 462 p. (in Russian)
8. Zatulokina M.A. [Reactivity of the paraneural connective tissue of the peripheral nerves of the brachial plexus under physical exertion]. *Morfologiya [Morphology]*. 2016; 3: 87. (in Russian)
9. Zatulokina M.A., Gerasimova A.V., Tsaroeva L.K., Maleeva D.S. [The morphofunctional state of connective tissue component of peripheral nerves from experimental animals' forelimbs after changing their motor activity]. *International Journal Of Applied And Fundamental Research*. 2015; 1. URL: <http://www.science-sd.com/460-24760> Retrieved: 16.10.2016
10. Baglay E.O., Dubikova A.I. [Mast cells are key participants in the pathogenesis of immunoinflammatory diseases]. *Nauchno-praktichesкая revmatologiya [Rheumatology Science and Practice]*. 2015; 53(2): 182-189. (in Russian)
11. Muhlynina E.A. [The state of the mast cell system under the action of extreme factors on the body]. *Molodye uchenye v medicine: materialy XV Vseros. nauch.-prakt. konf (2-3 apr. 2010 g)*. Kazan'. 2010; 288. (in Russian).
12. Alekseeva N.T., Gluhov A.A., Ostroushko A.P. [The Role of Fibroblastic Different Cells in the Process of Wound Healing]. *Vestnik jeksperimental'noj i klinicheskoj hirurgii [Bulletin of Experimental and Clinical Surgery]*. 2012; 5-3: 601-608. (in Russian)
13. Artashyan O.S., Yushkov B.G., Mukhlynina E.A. [Study of the functional activity of mast cells under immobilization stress]. *Citologija [Cytology]*. 2006; 48-8: 665-668. (in Russian)
14. Tyurnikov V.M., Grachev Yu.V. [Trigeminal neuralgia: pathogenetic and clinical features, methods of pathogenetically substantiated treatment. Lecture]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2013; 11(4): 64-68. (in Russian)

Сведения об авторах

Затолокина Мария Алексеевна — доктор медицинских наук, доцент кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кузнецов Сергей Львович — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии, цитологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

УДК 57.084.1 + 616-092.9

Активность дипептидилпептидазы IV при экссудативном воспалении у грызунов

Иванова Е.А.¹, Золотов Н.Н.¹, Позднев В.Ф.², Воронина Т.А.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В.Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича». 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8

Известно, что участие дипептидилпептидазы IV (EC 3.4.14.5, CD26, ДПП-4) в воспалительном процессе обусловлено ее влиянием на хемотаксис, пролиферацию и накопление иммунных клеток в тканях и ферментативным воздействием на ряд медиаторов воспаления. Целью данной работы являлось изучение изменения активности растворимой формы ДПП-4 при экссудативном воспалении у грызунов и оценка влияния ингибиторов ДПП-4 на его выраженность. Методы. Активность ДПП-4 в перитонеальном выпоте у крыс с моделью уксусного перитонита и мышей с моделью гликоген-индуцированного перитонита, а также в сыворотке крови крыс с моделью уксусного перитонита и с моделью вызванного каррагенаном отека лапы оценивали спектрофлуориметрически. Результаты. Установлено, что при экспериментальных перитонитах в экссудате мышей и крыс значимо увеличивается активность ДПП-4. Кроме того, при уксусном перитоните активность ДПП-4 достоверно возрастает и в сыворотке крови. У крыс с отеком лапы достоверного увеличения активности ДПП-4 в сыворотке крови не выявлено, что может быть обусловлено меньшей тяжестью воспалительного процесса. Введение мышам ингибиторов ДПП-4, отличающихся параметрами ингибирования фермента — ситаглиптина ($IC_{50} = 25,0 \pm 9,0$ нмоль/л) и AlaPrdN (2-S-аланина цианопирролидин, $IC_{50} = 2,0 \pm 0,3$ нмоль/л), не привело к достоверному изменению выраженности экссудации при уксусном перитоните у мышей. Заключение. Полученные данные позволяют полагать, что повышение активности ДПП-4 при остром экссудативном воспалении является следствием начавшегося воспалительного процесса.

Ключевые слова: активность дипептидилпептидазы IV, уксусный перитонит, гликоген-индуцированный перитонит, каррагенановый отек, крысы, мыши.

Для цитирования: Иванова Е.А., Золотов Н.Н., Позднев В.Ф., Воронина Т.А. Активность дипептидилпептидазы IV при экссудативном воспалении у грызунов. Патогенез. 2018; 16(1): 51–57

DOI:

Для корреспонденции: Иванова Елена Анатольевна, e-mail: iwanowaea@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 12.12.2017

Alteration of dipeptidyl peptidase IV activity in rodents with exudative inflammation

Ivanova E.A.¹, Zolotov N.N.¹, Pozdnev V.F.², Voronina T.A.¹

¹ V.V.Zakusov Institute of Pharmacology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

² V.N.Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya Str. 10, Bld. 8, Moscow 119121, Russian Federation

The role of dipeptidyl peptidase IV (EC 3.4.14.5., CD26, DPPIV) in inflammation is based on its effects on chemotaxis, proliferation, and accumulation of immune cells in tissues, and proteolysis of some inflammation mediators. The goal of this study was to evaluate the activity of soluble DPPIV in rodents with exudative inflammation and effects of DPPIV inhibitors on exudation. Methods. DPPIV activity was measured using the fluorometric assay in peritoneal exudate from rats with acetic acid-induced peritonitis and mice with glycogen-induced peritonitis as well as in serum of rats with acetic-induced peritonitis and carrageenan-induced paw edema. Results. The DPPIV activity was significantly increased in the exudate from mice and rats with experimental peritonitis. Furthermore, the DPPIV activity was significantly higher in blood serum of rats with acetic acid-induced peritonitis. Absence of a significant increase in the serum DPPIV activity in rats with paw edema could be due to less severe inflammation. DPPIV inhibitors with different IC_{50} , sitagliptin ($IC_{50} = 25.0 \pm 9.0$ nmol/l) and AlaPrdN (2-S-alanine cyanopyrrolidine, $IC_{50} = 2.0 \pm 0.3$ nmol/l), did not significantly change the exudation intensity in mice with acetic acid-induced peritonitis. Conclusion. The increased DPPIV activity in acute exudative inflammation results from inflammatory process onset.

Key words: dipeptidyl peptidase IV activity, acetic acid-induced peritonitis, glycogen-induced peritonitis, carrageenan-induced edema, rats, mice.

For citation: Ivanova E.A., Zolotov N.N., Pozdnev V.F., Voronina T.A. [Alteration of dipeptidyl peptidase IV activity in rodents with exudative inflammation]. Patogenez [Pathogenesis]. 2018; 16(1): 51–57 (in Russian)

DOI:

For correspondence: Ivanova Elena Anatolievna, e-mail: iwanowaea@yandex.ru

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received: 12.12.2017

Введение

В организме человека дипептидилпептидаза IV (ЕС 3.4.14.5, CD26, ДПП-4) экспрессируется на мембранах иммунокомпетентных, эпителиальных и эндотелиальных клеток. Наряду с мембраносвязанной формой ДПП-4 в биологических жидкостях присутствует растворимая форма фермента, которая образуется путем протеолитического слушивания мембраносвязанной формы ДПП-4. Реализация многочисленных биологических функций ДПП-4 обеспечивается как рецепторным взаимодействием, так и ферментативной активностью данного белка [1]. Участие ДПП-4 в воспалительном процессе обусловлено влиянием ДПП-4 на хемотаксис, пролиферацию и накопление иммунных клеток в тканях, а также ферментативным воздействием на такие биологические субстраты, как провоспалительные цитокины, хемокины, вазоактивный интестинальный пептид, вещество P и нейропептид Y [2]. На клеточной линии макрофага мышей RAW264, стимулированной добавлением к культуре липополисахарида, установлено, что растворимая форма ДПП-4 усиливает экспрессию индуцибельной NO-синтазы, увеличивает выработку NO и продукцию провоспалительных цитокинов, а при ее внутривенном введении мышам линии C57BL/6J увеличивается экспрессия толл-подобных рецепторов 2 и 4 типов в почках и белой жировой ткани [3].

Однако у пациентов с такими иммунными воспалительными заболеваниями, как ревматоидный артрит, системная красная волчанка [4], болезнь Крона [5] и неспецифический язвенный колит [6] активность ДПП-4 снижается. В частности, при ревматоидном артрите наблюдается обратная корреляция между активностью ДПП-4 в сыворотке крови и тяжестью заболевания, определяемой по концентрации С-реактивного белка, количеству опухших суставов и в соответствии с суммарным индексом оценки тяжести состояния пациентов с ревматоидным артритом Disease Activity Score (DAS). При этом снижение уровня ДПП-4 в плазме крови пациентов с ревматоидным артритом тем сильнее, чем выраженнее воспалительный процесс [2].

Целью нашей экспериментальной работы явились изучение изменения активности растворимой формы ДПП-4 в воспалительном выпоте и сыворотке крови у грызунов с экссудативным воспалением и оценка влияния ингибиторов ДПП-4 на его выраженность.

Материалы и методы

Объект исследования. В работе использованы половозрелые аутбредные белые мыши-самцы массой 26–30 г и аутбредные белые крысы-самцы массой 240–260 г. Животных получали из Центрального питомника лабораторных животных РАМН («Столбовая», Московская область). Организация и проведение экспериментов осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России №199 от 1 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Животные содержались в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпи-

демиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Моделирование перитонита внутрибрюшинным введением гликогена у мышей. Мышам внутрибрюшинно вводили 500 мкл 5% раствора гликогена (Glycogen from oyster, type II, Sigma-Aldrich), растворенного в физиологическом растворе [7]. Животным контрольной группы внутрибрюшинно вводили 500 мкл физиологического раствора. Через 4 часа после введения раствора гликогена или физиологического раствора мыши были подвергнуты эвтаназии путем цервикальной дислокации. После эвтаназии в брюшную полость мышам вводили 3 мл холодного натрий-фосфатного буфера (рН = 7,4), делали легкий массаж брюшной стенки и собирали перитонеальную жидкость. Супернатант перитонеальной жидкости получали центрифугированием при 5000 оборотах/мин в течение 15 минут и до проведения биохимического исследования хранили при температуре -20°C.

Моделирование перитонита внутрибрюшинным введением раствора уксусной кислоты у крыс. Перитонит у крыс вызывали внутрибрюшинным введением 1% раствора уксусной кислоты (в физиологическом растворе) из расчета 1 мл раствора на 100 г массы тела [8]. Животным контрольной группы внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Через 3 часа после введения раствора уксусной кислоты или физиологического раствора крыс подвергали эвтаназии методом декапитации и собирали кровь. В брюшную полость животных вводили по 5 мл холодного натрий-фосфатного буфера (рН = 7,4), делали легкий массаж брюшной стенки и собирали перитонеальную жидкость. Супернатант перитонеальной жидкости и сыворотку крови получали центрифугированием при 5000 оборотах/мин в течение 15 минут и до проведения биохимического исследования хранили при температуре -20°C.

Моделирование отека задней лапы крыс субплантарным введением каррагенана. Субплантарное введение 0,1 мл 1% раствора каррагенана (сульфатированного полисахарида из ирландского морского мха, Sigma-Aldrich) воспроизводит острую воспалительную реакцию — отек лапы [8]. Выраженность отека лапы регистрировали в динамике по разнице диаметра лапы (миллиметры), измеренного штангенциркулем через 1, 2, 3 и 4 часа после индукции воспаления, относительно диаметра лапы до индукции воспаления. Интактные крысы служили контрольной группой: диаметр их задних лап измеряли дважды с интервалом 1 час. Через 5 часов после введения раствора каррагенана крыс опытной и интактной групп подвергали эвтаназии методом декапитации и собирали кровь. Сыворотку крови получали центрифугированием и до проведения биохимического исследования хранили при температуре -20°C.

Определение активности ДПП-4 в сыворотке крови и перитонеальной жидкости животных. В сыворотке крови крыс с экспериментальными моделями воспаления (ук-

сусным перитонитом и индуцированным каррагенаном отеком лапы) и перитонеальной жидкости крыс с укусным перитонитом и мышей с индуцированным гликогенным перитонитом флуориметрически определяли активность ДПП-4. Метод основан на определении освобождающегося в процессе ферментативной реакции 7-амино-4-метилкумарина. Гидролиз субстрата регистрировали после инкубации проб при 37°C на спектрофлуориметре LS-5B (Perkin-Elmer, США). Инкубация пробы при измерении активности ДПП-4 в сыворотке крови составляла 15 мин, в экссудате — 30 мин. Количество освободившегося из субстрата 4-метил-7-аминокумарина определяли, исходя из величины флуоресценции. Удельную активность ферментов определяли по формуле:

$A \text{ (нмоль/мл/мин)} = [(E-C)/(S-B)] \times t^{-1} \times v^{-1}$,
где E — флуоресценция пробы (380/460 нм), содержащей инкубационную смесь из 0,02 мл раствора субстрата (Gly-Pro-MCA, 1 мг/мл в DMSO) и 0,02 мл сыворотки крови или перитонеальной жидкости; и 0,76 мл 0,02 М трис-HCl буфера (рН 8,0), содержащего по 1мМ ЭДТА-Na2 и дитиотреитола. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 20% уксусной кислоты. С — флуоресценция смеси, содержащей 0,2 мл 20% уксусной кислоты, 0,02 мл субстрата и 0,02 мл сыворотки крови или перитонеальной жидкости, 0,76 мл инкубационного буфера; В — флуоресценция смеси, содержащей 0,02 мл сыворотки крови или перитонеальной жидкости, 0,78 мл инкубационного буфера и 0,2 мл уксусной кислоты; S — флуоресценция смеси, содержащей 0,02 мл субстрата, 0,76 мл инкубационного буфера, 0,2 мл 20% уксусной кислоты и 0,02 мл раствора 7-амино-4-метилкумарина (2 нмоль), t — время инкубации в мин, v — объем ферментного препарата в мл.

Определение IC₅₀ фермента ДПП-4 для ситаглиптина и AlaPrdN. В эксперименте использовали ингибиторы ДПП-4 ситаглиптин и AlaPrdN (2-S-аланина цианопроролдин) в концентрации 0,1; 1; 10 и 100 мкМ. Для каждой концентрации измерения проводили в присутствии различных концентраций субстрата Gly-Pro-AMC (0,006; 0,024; 0,10; 0,39; 1,56; 1,25; 6,25; 25 и 100 нМ). Эксперимент проведен в трех параллельных измерениях. Параметры ингибирования определяли в программе Prism-4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Протокол измерения. К 20 мкл раствора фермента добавляли 740 мкл 0,02 М Трис-HCl с рН 8,0, 20 мкл раствора AlaPrdN или ситаглиптина и преинкубировали при 37°C в течение 30 мин. Затем к смеси добавляли 20 мкл раствора субстрата в DMSO и продолжали инкубировать в тех же условиях в течение 20 мин. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 20% раствора уксусной кислоты. Флуоресценцию освободившегося в процессе ферментативной реакции 7-амино-4-метилкумарина («SerVa», Германия) измеряли при длине волны возбуждения 380 нм и флуоресценции 460 нм. Значения IC₅₀ рассчитывали по уравнению Ченга-Пруссофа в программе Prism-4.

Оценка противовоспалительной активности ингибиторов ДПП-4 ситаглиптина и AlaPrdN у мышей. Противовоспалительную активность ингибиторов ДПП-4 ситаглиптина и AlaPrdN оценивали на описанной выше модели укусного перитонита [8] у мышей. Ингибиторы ДПП-4 ситаглиптин и AlaPrdN в дозах 5 и 50 мг/кг и препарат сравнения диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг вводили животным внутрибрюшинно за 1 час до внутрибрюшин-

ного введения 1% раствора уксусной кислоты из расчета 1 мл на 100 г массы тела. Мыши контрольной группы за 1 час до введения раствора уксусной кислоты получали эквивалентный объем растворителя — физиологического раствора с добавлением Твина-80. Через 3 часа после индукции воспаления мышцей подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации, вскрывали брюшную полость, собирали перитонеальный экссудат и регистрировали его массу, по уменьшению которой на фоне изучаемых препаратов судили о наличии у них противовоспалительных свойств.

Статистическая обработка проводилась с помощью программы Statistica 10.0. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро—Уилка с последующей оценкой равенства дисперсий по критерию Левена. В случае нормального распределения в экспериментальных группах и соблюдения межгруппового равенства дисперсий дальнейшую обработку проводили с помощью метода параметрической статистики критерия Даннета. При отсутствии нормального распределения в экспериментальных группах, либо при несоблюдении межгруппового равенства дисперсий дальнейшую обработку проводили с помощью метода непараметрической статистики Манна—Уитни. Для определения статистической значимости различий повторных измерений в группе использовали парный критерий Вилкоксона. Результаты в таблицах представлены в зависимости от использования параметрических или непараметрических методов анализа: в случае применения параметрической статистики — как среднее ± ошибка среднего ($M \pm SE (SD)$); в случае анализа непараметрическими методами — как медиана, и квартили 25% и 75% ($Me (Q1; Q3)$). Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты экспериментальной работы показали, что у мышей с индуцированным внутрибрюшинным введением 5% раствора гликогена перитонитом через 4 часа после индукции воспаления в перитонеальном выпоте наблюдалось достоверное увеличение активности ДПП-4 в 2,1 раза по сравнению с животными контрольной группы. У крыс с укусным перитонитом спустя 3 часа после инъекции раствора уксусной кислоты зарегистрировано еще большее повышение активности изучаемого фермента в перитонеальном экссудате по сравнению с контрольной группой — в 7,8 раза. При этом активность ДПП-4 в сыворотке крови этих крыс возрастала не так драматично, как в экссудате — только на 39,9% ($p < 0,05$) (табл. 1).

Гликоген-индуцированный перитонит является моделью острого нейтрофильного воспаления [7]. Острый перитонит у крыс, вызванный внутрибрюшинным введением 1% раствора уксусной кислоты, сопровождается выходом клеток крови в экссудат с преобладанием нейтрофильного компонента [9]. Известно, что повышение концентрации ДПП-4 в сыворотке крови у людей вызывает отток нейтрофилов от зоны с повышенной концентрацией ДПП-4, и разницы концентраций ДПП-4 между противоположными поверхностями клетки, составляющей 1%, достаточно, чтобы вызвать хеморепульсию нейтрофилов [10]. Поэтому можно предположить, что зафиксированное повышение активности ДПП-4 в перитонеальном выпоте грызунов с экспериментальными нейтро-

фильными перитонитами обеспечивает постепенное уменьшение выраженности нейтрофильного компонента воспалительного процесса. С другой стороны, следствием ферментативной активности растворимой формы ДПП-4 является механизм ограничения влияния пара- и аутокринных биоактивных пептидов зоной их высвобождения. Так, ограничение скопления Т-клеток в очаге повреждения при воспалении обеспечивают хемокины, уровень которых регулируется ДПП-4 [2]. Повышенная активность ДПП-4 в сыворотке крови крыс с укусным перитонитом свидетельствует о выраженной острой воспалительной реакции, протекающей с участием изучаемого фермента в воспалительных сигнальных каскадах. Известно, что при аутоиммунных заболеваниях количество циркулирующих CD26(+) клеток выше в активную фазу заболевания и снижается при иммуносупрессии разного происхождения [11].

Вызванный субплантарным введением раствора каррагенана отек лапы крыс характеризуется двухфазной воспалительной реакцией. Ранняя фаза воспалительной реакции наблюдается в течение 1 часа после введения раствора каррагенана и обусловлена выделением гистамина, серотонина, брадикинина и, в меньшей степени, простагландинов. Отставленная по времени фаза воспаления (спустя 1 час после введения раствора каррагенана) сопровождается нейтрофильной инфильтрацией и продолжающейся генерацией простагландинов [12]. Выделяемые нейтрофилами свободные радикалы, оксид азота NO и провоспалительные цитокины, такие, как фактор некроза опухоли α и интерлейкин-1 β , также вовлечены в процесс развития отставленной по времени фазы остро-го индуцированного раствором каррагенана воспаления лапы крыс [13].

Введение 1% раствора каррагенана в заднюю лапу крыс вызывало развитие воспалительной реакции, проявлявшейся в увеличении диаметра лапы животных, медиана которого через 1 час после введения раствора каррагенана соответствовала 1,74 мм. Через 2 часа после введения флогогена отечность поврежденной лапы крыс стала еще более выраженной, достоверно увеличившись относительно зарегистрированного через 1 час значения и достигнув максимума, соответствовавшего медиане, равной 2,76 мм. Относительно 2-го часа к 3-му часу эксперимента степень воспалительной реакции достоверно снизилась до значения медианы увеличения диаметра лапы, равного 1,83 мм, и после этого к 4 часу опыта практически не изменялась (табл. 2). При этом через 5 часов после индукции воспаления активность ДПП-4 в сыворотке крови крыс с индуцированным каррагенаном отеком лапы увеличивалась незначительно (на 14,7%), не достигая статистически значимого отличия с группой интактных животных. Отсутствие достоверного увеличения активности ДПП-4 в сыворотке крови крыс с индуцированным каррагенаном отеком лапы в отличие от зафиксированного достоверного возрастания активности ДПП-4 в сыворотке крови крыс с укусным перитонитом объясняется, вероятно, меньшей степенью тяжести воспалительного процесса при каррагенановом отеке по сравнению с экспериментальными моделями перитонитов.

На следующем этапе экспериментальной работы оценивали влияние ингибиторов ДПП-4, обладающих разными константами ингибирования фермента, на выраженность экссудативного воспаления. В качестве ингибиторов ДПП-4 были выбраны ситаглиптин и AlaPrdN. На рисунке показана их ингибирующая активность в отношении ДПП-4, оцененная *in vitro*. Ингибирующая актив-

Таблица 1

Активность ДПП-4 при экспериментальном перитоните у мышей и крыс

Группа	Активность ДПП-4 (нмоль \times мл ⁻¹ \times мин ⁻¹)		
	Гликогеновый перитонит у мышей: перитонеальный. Выпот, M \pm SE (SD)	Укусный перитонит у крыс	
		Перитонеальный выпот, Me (Q1; Q3)	Сыворотка крови M \pm SE (SD)
Контроль, физиологический раствор	n = 10 0,63 \pm 0,10 (0,30)	n = 9 2,32 (2,25; 3,52)	n = 9 12,78 \pm 1,39 (4,18)
Животные с перитонитом	n = 10 1,30 \pm 0,10 (0,31)*	n = 10 18,14 (6,35; 20,22) #	n = 10 17,88 \pm 1,72 (5,43)*

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, критерий Даннета; # — $p = 0,002$ по сравнению с контрольной группой, критерий Манна—Уитни

Таблица 2

Активность ДПП-4 в сыворотке крови крыс с индуцированным каррагенаном отеком лапы

Группа	Увеличение диаметра поврежденной лапы, мм (Me (Q1; Q3)), на фоне введения каррагенана через:				Активность ДПП-4 (нмоль \times мл ⁻¹ \times мин ⁻¹) в сыворотке крови
	1 час	2 часа	3 часа	4 часа	
Интактные животные	n = 6 0,00 (-0,02; 0,10)				n = 6 13,25 \pm 1,47 (3,60)
Животные с каррагенановым отеком лапы	n = 9 1,72 (1,36; 2,04) * #	n = 9 2,76 (2,30; 2,92) *	n = 9 1,82 (1,46; 1,94) * #	n = 9 1,96 (1,80; 2,14) *	n = 8 15,20 \pm 1,41 (3,72)

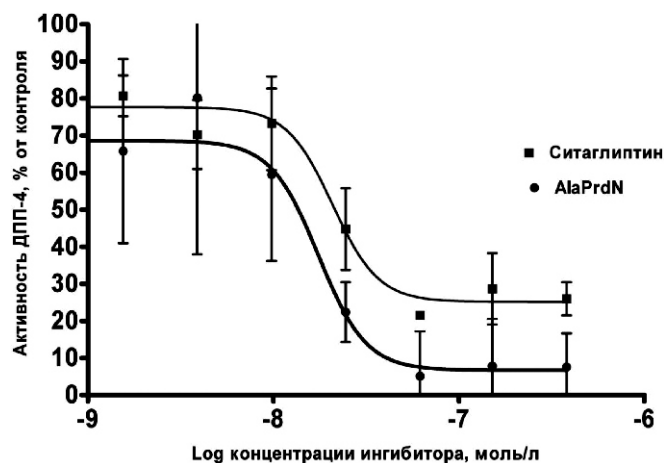
Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с группой интактных животных, критерий Манна—Уитни; # — $p < 0,05$ по сравнению с увеличением диаметра поврежденной лапы через 2 часа после введения раствора каррагенана, парный критерий Вилкоксона

ность AlaPrdN выше, чем у ситаглиптина. Значения IC₅₀, рассчитанные из уравнения Ченга—Пруссофа, находятся для соединения AlaPrdN в диапазоне 2,0 ± 0,3 нмоль/л, а для ситаглиптина — 25,0 ± 9,0 нмоль/л.

С учетом того, что на стрептозотоциновой модели диабета у крыс ситаглиптин в дозе 5 мг/кг проявлял выраженный гипогликемический эффект, повышая уровень инкретинов и инсулина в плазме крови [14], эта доза была выбрана для введения животным в эксперименте по оценке влияния ситаглиптина на экссудативное воспаление. Второй изучаемой дозой ситаглиптина была взята десятикратно ее превышающая (50 мг/кг). AlaPrdN также вводили животным в дозах 5 и 50 мг/кг.

Внутрибрюшинное введение 1% раствора уксусной кислоты вызывало у мышей воспалительную реакцию, которая характеризовалась образованием 560,0 мг экссудата в брюшной полости. Изучаемые ингибиторы ДПП-4 не оказывали достоверного влияния на образование воспалительного выпота в брюшной полости у животных. Ситаглиптин в дозах 5 и 50 мг/кг незначительно уменьшал степень экссудации соответственно на 10,1% и 15,9%; AlaPrdN в дозе 50 мг/кг недостоверно снижал количество образовавшегося воспалительного выпота на 17,2% (табл. 3). При этом препарат сравнения диклофенак натрия при введении мышам внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг достоверно уменьшал массу воспалительного экссудата на 37,0% по сравнению с контрольной группой (табл. 3).

Известны противовоспалительные свойства ингибиторов ДПП-4, проявляющиеся в понижении содержания провоспалительных маркеров цитокинов IL-1β и TNF-α в почках предрасположенных к ожирению и сахарному диабету II типа крыс линии Цукер [15]; предупреждением инфильтрации жировой ткани CD8+ Т-клетками и M1 макрофагами и снижением экспрессии ингибитора активатора плазминогена (РАI-1) у линейных Gsk+/- мышей, диета которых включала комбинацию сахарозы и линолевой кислоты [16]; уменьшением экспрессии мРНК IL-6, TNF-α и IL-12 в жировой ткани и экспрессии мРНК MCP-1, IL-6, IL-12 и ИФН-γ индуцируемого протеина 10 в островках Лангерганса у мышей C57Bl/6J с экспериментальной моделью ожирения [17]; угнетением воспалительных процессов в стенке сосудов и подавлением за счет



Влияние ситаглиптина и AlaPrdN на активность дипептидилпептидазы IV *in vitro*.

этого образования неоинтимы бедренной артерии у линейных мышей с отсутствующим рецептором к липопротеину низкой плотности [18]. Описанные выше противовоспалительные свойства ингибиторов ДПП-4 выявлены у линейных животных с метаболическими нарушениями. В проведенном нами эксперименте использовались аутбредные мыши без метаболических нарушений с острой воспалительной реакцией — уксусным перитонитом. Учитывая, что при уксусном перитоните у крыс наблюдалось выраженное повышение активности ДПП-4 как в перитонеальном выпоте, так и в сыворотке крови, и ингибиторы ДПП-4 с отличающимися константами ингибирования ситаглиптин и AlaPrdN не оказывали достоверного влияния на образование воспалительного выпота в брюшной полости животных, можно предположить, что повышение активности ДПП-4 при экссудативном воспалении является следствием происходящих при воспалении патологических процессов. В частности, ДПП-4 является аденозиндезаминазой (ЕС 3.5.4.4, АДА) связывающим белком, поэтому, вероятно, повышение активности ДПП-4 сопровождается изменением активности АДА, участие которой в развитии воспалительного процесса обсуждается. Так, в синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом активность АДА повышена

Таблица 3

Влияние ингибиторов ДПП-4 на выраженность экссудации при уксусном перитоните у мышей

Группы	Масса экссудата, мг Me (Q1; Q3)
Контроль, уксусный перитонит	n = 7 560,0 (535,0; 620,0)
Диклофенак натрия, 10 мг/кг	n = 7 353,0 (302,0; 364,5) *
Ситаглиптин, 5 мг/кг	n = 7 503,5 (435,8; 525,5)
Ситаглиптин, 50 мг/кг	n = 10 471,0 (397,5; 602,5)
AlaPrdN, 5 мг/кг	n = 10 587,5 (435,0; 764,5)
AlaPrdN, 50 мг/кг	n = 10 463,5 (431,5; 697,5)

Примечание. * — p < 0,05 по сравнению с контрольной группой, критерий Манна—Уитни.

[19], и противовоспалительный эффект антифолатной терапии ревматоидного артрита метотрексатом отчасти объясняется увеличением внеклеточной концентрации аденозина [20].

Заключение

В сыворотке крови крыс и перитонеальном выпоте крыс и мышей с экспериментальными моделями острой экссудативной реакции — укусным и гликоген-индуцированным перитонитами, — характеризующимися выраженным нейтрофильным компонентом, зарегистрирована повышенная активность ДПП-4, которая может рассматриваться маркером воспалительного процесса. В сыворотке крови крыс с отеком лапы, вызванным введением каррагенана, при котором также наблюдается нейтрофильная инфильтрация тканей, достоверного повышения активности ДПП-4 не зарегистрировано, что может быть обусловлено меньшей выраженностью воспалительной реакции. Ввиду того, что ингибиторы ДПП-4 ситаглиптин и AlaPrdN, значительно отличающиеся параметрами ингибирования фермента (IC_{50} для ситаглиптина составляет $25,0 \pm 9,0$ нмоль/л, для AlaPrdN — $2,0 \pm 0,3$ нмоль/л), не оказали значимого влияния на экссудативную реакцию у мышей с укусным перитонитом, мы считаем повышение активности ДПП-4 при остром экссудативном воспалении следствием начавшегося воспалительного процесса. С одной стороны, рост активности ДПП-4 может приводить к постепенному уменьшению выраженности нейтрофильного компонента воспалительного процесса [10]. С другой стороны, следствием ферментативной активности растворимой формы ДПП-4 является ограничение влияния пара- и аутокринных биоактивных пептидов зоной их высвобождения: хемокины, уровень которых регулируется ДПП-4, ограничивают скопление Т-клеток очагом воспаления [2]. Кроме того, ДПП-4 является АДА связывающим белком, поэтому увеличение активности изучаемого фермента может сопровождать также и возрастание ферментативной активности АДА и, вследствие этого, снижение внеклеточной концентрации аденозина, проявляющего противовоспалительные свойства [20]. Полученные нами экспериментальные данные, наряду с результатами описанных в литературе исследований, свидетельствуют о неоднозначной и многокомпонентной роли ДПП-4 при воспалении, требующей дальнейшего изучения каскадов воспалительных реакций, в которых может участвовать этот фермент.

Список литературы

1. Локшина Л.А. Протеиназы плазматической мембраны лимфоидных клеток и их биологическая функция. *Биоорганическая химия*. 1998; 24(5): 323-331.
2. Sedo A., Duke-Cohan J.S., Balaziouva E., Sedova L.R. Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologs: contributing factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Arthritis Res. Ther.* 2005; 7(6): 253-269. DOI: 10.1186/ar1852
3. Lee D.S., Lee E.S., Alam M.M., Jang J.H., Lee H.S., Oh H., Kim Y.C., Manzoor Z., Koh Y.S., Kang D.G., Lee D.H. Soluble DPP-4 up-regulates toll-like receptors and augments inflammatory reactions, which are ameliorated by vildagliptin or mannose-6-phosphate. *Metabolism*. 2016; 65(2): 89-101. DOI: 10.1016/j.metabol.2015.10.002
4. Hagihara M., Ohhashi M., Nagatsu T. Activities of dipeptidyl peptidase II and dipeptidyl peptidase IV in mice with lupus erythema-

tosis-like syndrome and in patients with lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Clin. Chem.* 1987; 33(8): 1463-1465.

5. Rose M., Hildebrandt M., Flieg H., Seibold S., Monnikes H., Klapp B.F. T-cell immune parameters and depression in patients with Crohn's disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 2002; 34(1): 40-48.

6. Hildebrandt M., Rose M., Ruter J., Salama A., Monnikes H., Klapp B.F. Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD 26) in patients with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 2001; 36(10): 1067-1072.

7. Pagano R.L., Mariano M., Giorgi R. Neutrophilic cell-free exudate induces antinociception mediated by the protein S100A9. Mediators of Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2006. 2006(4): 36765. DOI: DOI: 10.1155/MI/2006/36765

8. Шварц Г.Я., Сюбаев Р.Д. *Методические рекомендации по доклиническому изучению нестероидных противовоспалительных лекарственных средств*. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К; 2012. 746-758.

9. Бакаева З.В., Самонина Г.Е., Умарова Б.А., Копылова Г.Н., Гончарова Е.Л., Багликова К.Е. Исследование противовоспалительных свойств глипрוליнов на экспериментальной модели острого перитонита у крыс. *Цитокины и воспаление*. 2008; 2: 28-32.

10. Herlihy S.E., Pilling D., Maharjan A.S., Gomer R.H. Dipeptidyl peptidase IV is a human and murine neutrophil chemorepellent. *J. Immunol.* 2013; 190(12): 6468-6477. DOI: 10.4049/jimmunol.1202583

11. De Meester I., Korom S., Van Damme J., Scharpй S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol. Today.* 1999; 20(8): 367-375.

12. Gilligan J.P., Lovato S.J., Erion M.D., Jeng A.Y. Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. *Inflammation*. 1994; 18(3): 285-292.

13. Halici Z., Dengiz G.O., Odabasoglu F., Suleyman H., Cadirci E., Halici M. Amiodarone has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: An experimental study in rats with carrageenan-induced paw edema. *Eur. J. Pharmacol.* 2007; 566: 215-221. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.03.046

14. Островская Р.У., Золотов Н.Н., Озерова И.В., Иванова Е.А., Капица И.Г., Тарабан К.В., Мичунская А.Б., Воронина Т.А., Гудашева Т.А., Серединин С.Б. Ноопепт восстанавливает показатели инкретиновой системы при моделировании диабета у крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014; 157(3): 321-327. DOI: DOI: 10.1007/s10517-014-2562-5

15. Marques C., Mega C., Gonzalves A., Rodrigues-Santos P., Teixeira-Lemos E., Teixeira F., Fontes-Ribeiro C., Reis F., Fernandes R. Sitagliptin prevents inflammation and apoptotic cell death in the kidney of type 2 diabetic animals. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 538737. DOI: 10.1155/2014/538737.

16. Shirakawa J., Fujii H., Ohnuma K., Sato K., Ito Y., Kaji M., Sakamoto E., Koganei M., Sasaki H., Nagashima Y., Amo K., Aoki K., Morimoto C., Takeda E., Terauchi Y. Diet-induced adipose tissue inflammation and liver steatosis are prevented by DPP-4 inhibition in diabetic mice. *Diabetes*. 2011; 60(4): 1246-1257. DOI: 10.2337/db10-1338

17. Dobrian A.D., Ma Q., Lindsay J.W., Leone K.A., Ma K., Cobben J., Galkina E.V., Nadler J.L. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin reduces local inflammation in adipose tissue and in pancreatic islets of obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2011; 300(2): E410-E421. DOI: 10.1152/ajpendo.00463.2010

18. Akita K., Isoda K., Shimada K., Daida H. Dipeptidyl-peptidase-4 inhibitor, Alogliptin, attenuates arterial inflammation and neointimal formation after injury in low-density lipoprotein (LDL) receptor-deficient mice. *J. Am. Heart Assoc.* 2015, 4(3): e001469. DOI: 10.1161/JAHA.114.001469

19. Nakamachi Y., Koshiba M., Nakazawa T., Hatachi S., Saura R., Kurosaka M., Kusaka H., Kumagai S. Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 668-74. DOI: 10.1002/art.10956

20. Cronstein B.N., Naime D., Ostad E. The antiinflammatory effects of methotrexate are mediated by adenosine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994, 370: 411-6.

References

1. Lokshina L.A. [Plasma membrane proteases of lymphoid cells and their biological functions]. *Биоорганическая химия*. [Bioorganic Chemistry]. 1998; 24(5): 323-331. (in Russian)

2. Sedo A., Duke-Cohan J.S., Balaziova E., Sedova L.R. Dipeptidyl peptidase IV activity and/or structure homologs: contributing factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Arthritis Res. Ther.* 2005; 7(6): 253-269. DOI: 10.1186/ar1852
3. Lee D.S., Lee E.S., Alam M.M., Jang J.H., Lee H.S., Oh H., Kim Y.C., Manzoor Z., Koh Y.S., Kang D.G., Lee D.H. Soluble DPP-4 up-regulates toll-like receptors and augments inflammatory reactions, which are ameliorated by vildagliptin or mannose-6-phosphate. *Metabolism.* 2016; 65(2): 89-101. DOI: 10.1016/j.metabol.2015.10.002
4. Hagihara M., Ohhashi M., Nagatsu T. Activities of dipeptidyl peptidase II and dipeptidyl peptidase IV in mice with lupus erythematosus-like syndrome and in patients with lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Clin. Chem.* 1987; 33(8): 1463-1465.
5. Rose M., Hildebrandt M., Flieg H., Seibold S., Monnikes H., Klapp B.F. T-cell immune parameters and depression in patients with Crohn's disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 2002; 34(1): 40-48.
6. Hildebrandt M., Rose M., Ruter J., Salama A., Monnikes H., Klapp B.F. Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD 26) in patients with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 2001; 36(10): 1067-1072.
7. Pagano R.L., Mariano M., Giorgi R. Neutrophilic cell-free exudate induces antinociception mediate by the protein S100A9. Mediators of Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2006. 2006(4): 36765. DOI: DOI: 10.1155/MI/2006/36765
8. Shvarts G.Ya., Syabaev R.D. [Methodological instructions on the study of new nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: Guidance on preclinical study of new pharmacological substances]. Part 1. Ed. by A.N.Mironov. M. Grif and K; 2012: 746-758. (in Russian)
9. Bakaeva Z.V., Samonina G.E., Umarova B.A., Kopylova G.N., Goncharova E.L., Baglikova K.E. [A study of anti-inflammatory properties of glyprolines using experimental model of the acute peritonitis in rats]. *Citokiny i vospalenie. [Cytokines and inflammation]*. 2008; 2: 28-32. (in Russian)
10. Herlihy S.E., Pilling D., Maharjan A.S., Gomer R.H. Dipeptidyl peptidase IV is a human and murine neutrophil chemorepellent. *J. Immunol.* 2013; 190(12): 6468-6477. DOI: 10.4049/jimmunol.1202583
11. De Meester I., Korom S., Van Damme J., Scharpff S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol. Today.* 1999; 20(8): 367-375.
12. Gilligan J.P., Lovato S.J., Erion M.D., Jeng A.Y. Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. *Inflammation.* 1994; 18(3): 285-292.
13. Halici Z., Dengiz G.O., Odabasoglu F., Suleyman H., Cadirci E., Halici M. Amiodarone has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: An experimental study in rats with carrageenan-induced paw edema. *Eur. J. Pharmacol.* 2007; 566: 215-221. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.03.046
14. Ostrovskaya R.U., Zolotov N.N., Ozerova I.V., Ivanova E.A., Kapitsa I.G., Taraban K.V., Michunskaya A.M., Voronina T.A., Gudashcheva T.A., Seredenin S.B. [Noopept normalizes parameters of the incretin system in rats with experimental diabetes]. *Byulleten eksperimentalnoi biologii i mediciny [J]*. 2014; 157(3): 321-327. DOI: DOI: 10.1007/s10517-014-2562-5 (in Russian)
15. Marques C., Mega C., Gonzalves A., Rodrigues-Santos P., Teixeira-Lemos E., Teixeira F., Fontes-Ribeiro C., Reis F, Fernandes R. Sitagliptin prevents inflammation and apoptotic cell death in the kidney of type 2 diabetic animals. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 538737. DOI: 10.1155/2014/538737.
16. Shirakawa J., Fujii H., Ohnuma K., Sato K., Ito Y., Kaji M., Sakamoto E., Koganei M., Sasaki H., Nagashima Y., Amo K., Aoki K., Morimoto C., Takeda E., Terauchi Y. Diet-induced adipose tissue inflammation and liver steatosis are prevented by DPP-4 inhibition in diabetic mice. *Diabetes.* 2011; 60(4): 1246-1257. DOI: 10.2337/db10-1338
17. Dobrian A.D., Ma Q., Lindsay J.W., Leone K.A., Ma K., Cobben J., Galkina E.V., Nadler J.L. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin reduces local inflammation in adipose tissue and in pancreatic islets of obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2011; 300(2): E410-E421. DOI: 10.1152/ajpendo.00463.2010
18. Akita K., Isoda K., Shimada K., Daida H. Dipeptidyl-peptidase-4 inhibitor, Alogliptin, attenuates arterial inflammation and neointimal formation after injury in low-density lipoprotein (LDL) receptor-deficient mice. *J. Am. Heart Assoc.* 2015, 4(3): e001469. DOI: 10.1161/JAHA.114.001469
19. Nakamachi Y., Koshiba M., Nakazawa T., Hatachi S., Saura R., Kurosaka M., Kusaka H., Kumagai S. Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2003; 48: 668-74. DOI: 10.1002/art.10956
20. Cronstein B.N., Naime D., Ostad E. The antiinflammatory effects of methotrexate are mediated by adenosine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994, 370: 411-6.

Сведения об авторах

Иванова Елена Анатольевна — кандидат фармацевтических наук, старший научный сотрудник лаборатории психофармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В.Закусова»

Золотов Николай Николаевич — доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории психофармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В.Закусова»

Позднев Владимир Федорович — доктор химических наук, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича»

Воронина Татьяна Александровна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией психофармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В.Закусова»

УДК 616.43

Циркулирующие стволовые и прогениторные клетки как маркеры воспаления, регенерации эндотелия и прогноза развития сосудистых осложнений при метаболическом синдроме и сахарном диабете 1 и 2 типа

Першина О.В.¹, Пахомова А.В.¹, Ермакова Н.Н.¹, Рыбалкина О.Ю.¹, Крупин В.А.¹, Пан Э.С.¹, Ваизова О.Е.², Кравченко А.И.³, Самойлова Ю.Г.², Ротканк М.А.², Дыгай А.М.², Скурихин Е.Г.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук. 634028, Томск, пр. Ленина, д. 3

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 634050, Томск, Московский тракт, 2

³ ООО «Открытая лаборатория». 634009, Томск, ул. Карла Маркса, д. 15/1

Цель исследования состояла в выявлении информативных клеточных маркеров сосудистых осложнений, регенерации микрососудистой сети и воспаления в венозной крови здоровых волонтеров, больных с метаболическим синдромом, сахарным диабетом 1 и 2 типа. **Методы.** Обследованы больные с метаболическим синдромом (МС), диабетом 2 типа без осложнений, диабетом 1 типа средней степени тяжести и здоровые волонтеры. Диагноз пациентов подтвержден общеклиническими, биохимическими, коагулометрическими и иммуноферментными методами исследования, для оценки экспрессии антигенов использовался многопараметрический цитометрический анализ. **Результаты.** При анализе экспрессии маркеров показано изменение числа эндотелиальных клеток, мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в крови в зависимости от патологии. Эндотелиальные клетки миелоидного ($CD45^-CD14^+CD34^+CD309^+CD144^+CD31^+$) и немиелоидного ($CD45^-CD14^-CD34^+CD309^+CD144^+CD31^+$) происхождения, $CD309^+$ -эндотелиальные клетки и МСК ($CD44^+CD73^+CD90^+CD105^+$) предлагаются в качестве маркеров повреждения эндотелия при диабетической симптоматике. При этом ГСК ($CD45^+CD34^+$) могут выступать ценным диагностическим и прогностическим маркером воспаления. **Заключение.** Для подтверждения сосудистых повреждений и прогноза развития осложнений при диабете 1 и 2 типа в венозной крови пациентов целесообразно оценивать эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) не костномозговой локализации ($CD31^+CD309^+CD144^+$) и костномозговой локализации ($CD34^+CD309^+$), и ЭПК с высоким регенеративным потенциалом ($CD45^-CD34^+CD31^+CD144^+$). Циркулирующие ЭПК, формирующие колонии *in vitro* ($CD45^-CD34^+CD31^+$), рекомендуется использовать в качестве дифференциального маркера состояния регенерации эндотелия при диабете 2 типа.

Ключевые слова: эндотелиальные прогениторные клетки, мезенхимальные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, сахарный диабет, метаболический синдром, сосудистые осложнения.

Для цитирования: Першина О.В., Пахомова А.В., Ермакова Н.Н., Рыбалкина О.Ю., Крупин В.А., Пан Э.С., Ваизова О.Е., Кравченко А.И., Самойлова Ю.Г., Ротканк М.А., Дыгай А.М., Скурихин Е.Г. Циркулирующие стволовые и прогениторные клетки как маркеры воспаления, регенерации эндотелия и прогноза развития сосудистых осложнений при метаболическом синдроме и сахарном диабете 1 и 2 типа. Патогенез. 2018; 16(1): 58—67

DOI:

Для корреспонденции: Першина Ольга Викторовна, e-mail: ovpershina@gmail.com

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 12.11.2017

Circulating stem and progenitor cells as markers of inflammation, endothelial regeneration, and prediction of vascular complications in metabolic syndrome and type 1 and 2 diabetes mellitus

Pershina O.V.¹, Pakhomova A.V.¹, Ermakova N.N.¹, Rybalkina O.Yu.¹, Krupin V.A.¹, Pan E.S.¹, Vaizova O.E.², Kravchenko A.I.³, Samoilova J.G.², Rotkang M.A.², Dygai A.M.², Skurikhin E.G.¹

¹ E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences, Prospekt Lenina 3, Tomsk 634028, Russian Federation

² Siberian State Medical University, Moskovskiy Tract 2, Tomsk 634050, Russian Federation

³ Open Laboratory Ltd, Karla Marksa Str. 15/1, Tomsk 634009, Russian Federation

The aim of this study was to identify mesenchymal stem cells (MSC), hematopoietic stem cells (HSC), mature endothelial cells, and endothelial progenitor cells (EPC) in the blood of healthy volunteers, patients with metabolic syndrome, and type 1 and 2 diabetes mellitus as new, informative cellular markers of vascular complications, endothelial regeneration, and inflammation. Methods. The diagnosis was confirmed by general clinical, biochemical, coagulometric and ELISA studies; multi-parameter cytometric assay was used for evaluation of antigen expression. **Results.** Changes in the count of MSC, HSC, mature endothelial cells, and endothelial progenitor cells in blood of patients with metabolic syndrome and type 1 and 2 diabetes depended on the type of pathology. We propose using endothelial cells of myeloid ($CD45^+CD14^+CD34^+CD309^+CD144^+CD31^+$) and non-myeloid origin ($CD45^-CD14^-CD34^+CD309^+CD144^+CD31^+$), $CD309^+$ -endothelial cells, and MSCs with the $CD44^+CD73^+CD90^+CD105^+$ phenotype as nonspecific markers of endothelial damage in presence of diabetic symptoms. Furthermore, HSCs ($CD45^+CD34^+$) can be used as a valuable diagnostic and prognostic marker of inflammation. **Conclusions.** It is relevant to evaluate EPCs of non-bone marrow localization ($CD31^+CD309^+CD144^+$) and bone marrow localization ($CD34^+CD309^+$) and EPCs with a high regenerative potential ($CD45^-CD34^+CD31^+CD144^+$) in the blood of patients with type 1 and 2 diabetes to confirm the presence of vascular damage and predict development of complications. Circulating, in vitro colony-forming EPCs ($CD45^-CD34^+CD31^+$) are recommended as a differential marker for inhibition of endothelial regeneration in type 2 diabetes.

Key words. Endothelial progenitor cells, mesenchymal stem cells, hematopoietic stem cells, diabetes, metabolic syndrome, vascular complications.

For citation: Pershina O.V., Pakhomova A.V., Ermakova N.N., Rybalkina O.Yu., Krupin V.A., Pan E.S., Vaizova O.E., Kravchenko A.I., Samoilova J.G., Rotkang M.A., Dygai A.M., Skurikhin E.G. [Circulating stem and progenitor cells as markers of inflammation, endothelial regeneration, and prediction of vascular complications in metabolic syndrome and type 1 and 2 diabetes mellitus]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(1): 58–67 (in Russian)

DOI:

For correspondence: Pershina Olga Viktorovna, e-mail: ovpershina@gmail.com

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received: 12.11.2017

Введение

В последнее время большое внимание уделяется изучению стволовых и прогениторных клеток в крови в контексте, как здоровья, так и болезней. Обсуждается диагностическое значение определения циркулирующих в крови мезенхимальных стволовых клеток (МСК), гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), эндотелиальных клеток (ЭК) и эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК) при различных заболеваниях [1–3]. Если для определения МСК и ГСК научное сообщество пришло к некоторому стандарту набора антигенов, то в типировании предшественников эндотелиальных клеток и зрелых эндотелиальных клеток консенсуса не наблюдается. Большинство авторов признается, что ЭК представляют собой гетерогенную группу. На настоящий момент по иммунофенотипу ЭК разделяют на две субпопуляции: эндотелиальные прогениторные клетки гемопоэтического и не гемопоэтического происхождения. [4]. В работе Мауг и соавторов (2011) обозначены циркулирующие клетки-предшественники, так называемые «side population cells», и циркулирующие зрелые эндотелиальные клетки, которые определяются на поверхности стенок сосудов [5]. Для каждой из популяции характерен специфический поверхностный профиль антигенов и функции. В частности, ЭК гемопоэтического происхождения позитивны по CD34, CD309 и CD133 маркерам, ЭК миелоидного происхождения, помимо известных эндотелиальных маркеров, могут экспрессировать маркер CD14. CD31 известен как молекула адгезии, и в комбинации с другими маркерами идентифицирован не только на циркулирующих

ЭК, но и ЭПК. CD144, который также называют сосудистым эндотелиальным кадгерином, преимущественно экспрессируется на ЭК, хотя обнаруживается и на так называемых поздних ЭПК [6]. Таким образом, в настоящий момент нет никаких однозначных выводов относительно маркеров зрелых и не зрелых эндотелиальных клеток.

Сосудистые осложнения у больных с сахарным диабетом (СД) связаны со снижением числа и нарушением функциональных особенностей циркулирующих эндотелиальных клеток [7]. Существует мнение, что некоторые подтипы эндотелиальных прогениторных клеток (такие, как $CD34^+CD31^+CD133^+CD309^+$) могут выступать в качестве маркеров для диагностики нарушения эндотелия и прогнозирования сосудистых осложнений при метаболическом синдроме и диабете [8]. В то же время, методов клинической диагностики, позволяющих оценить выраженность тканевой травмы, дать прогноз развития заболевания и оценку регенеративного потенциала поврежденных специализированных клеток, нет. Потенциальными маркерами патологии могут быть стволовые и прогениторные клетки. Так, известно, что ГСК поддерживают воспаление [9, 10], МСК участвуют в фибропластическом процессе, обладают противовоспалительной активностью [11]. Эндотелиальные прогениторные клетки рассматриваются как потенциальные биомаркеры регенерации эндотелия [11]. Из этических соображений невозможно провести анализ маркеров сосудистых нарушений у пациента с метаболическим синдромом, после чего ожидать формирование диабета и развития осложнений, и вновь оценить экспрессию антигенов. Как правило, пациент обращается к врачу с уже с конкретным заболева-

нием. В связи с этим мы сформировали группы пациентов таким образом, чтобы в одном исследовании такую картину было возможно смоделировать.

В связи с вышеизложенным, целью исследования было выявление информативных клеточных маркеров сосудистых осложнений, регенерации микрососудистой сети и воспаления в венозной крови больных с метаболическим синдромом, сахарным диабетом 1 и 2 типа.

Материалы и методы исследования

В настоящем клиническом исследовании проанализированы стволовые и прогениторные клетки венозной крови больных с метаболическим синдромом (МС), сахарным диабетом 2 типа (СД2) без осложнений, сахарным диабетом 1 типа (СД1) и здоровых волонтеров. Критериями включения явились: мужчины и женщины 55–75 лет с индексом массы тела выше 25 кг/м² для больных с диабетом 2 типа без осложнений, мужчины и женщины 20–25 лет с верифицированным диагнозом диабет 1 типа средней степени тяжести (табл. 1). Критериями исключения являлись: острые инфекционно-воспалительные заболевания, онкологические заболевания в анамнезе в течение последних 5 лет, беременность и лактация. Исследование было поисковым, поэтому включало ограниченное количество лиц.

Всем группам был проведен общепринятый комплекс клинико-лабораторных, биохимических, иммуноферментных методов обследования пациентов для подтверждения диагноза МС, СД 2 и СД 1.

Научно-исследовательская работа проведена в соответствии с Хельсинской декларацией, «Рекомендациями для врачей, занимающихся биомедицинскими исследованиями с участием людей» Всемирной медицинской ассоциации. Протокол исследования одобрен комитетом по биоэтике ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России (протокол №5084/1 от 26.12.2016). До начала исследования обследованные подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование было поисковым, поэтому включало ограниченное количество пациентов.

Фракцию мононуклеаров получали из венозной крови волонтеров и пациентов центрифугированием с использованием набора для выделения клеток Lympholyte-H (Плотность приблизительно 1,077 г/мл, CEDARLANE, Netherlands), далее в градиенте плотности выделяли клеточную фракцию, обогащенную мононуклеарами. Затем полученные клетки отмывали центрифугированием при 1500 об/мин средой 199 («Sigma», США). Надосадочную жидкость заменяли средой RPMI-1640 («Sigma», США), содержащей 5% ЭТС («Sigma», США), производили под-

счет общего количества клеток. Далее проводили исследования экспрессии мембранных рецепторов мононуклеаров с использованием проточного цитофлуориметра FACS Canto II с программным обеспечением FACS Diva («BD Biosciences», США).

Для определения ГСК использовали антитела к антигену дифференцировки 45 и антитела к антигену дифференцировки 34 (CD45-FITC/CD34-PE) (Becton Dickinson, США). Для этого полученную фракцию мононуклеаров разделяли на аликвоты по 1 × 10⁶ клеток в 50 мкл среды и окрашивали антителами к поверхностным маркерам CD45 FITC (изотиоцианат флуоресцеина) и CD34 PE (фикоэритрин) согласно инструкции производителя.

Экспрессия мембранных рецепторов мезенхимальных стволовых клеток венозной крови анализировали с использованием набора для определения МСК производства Becton Dickinson (США). Полученную фракцию мононуклеаров разделяли на аликвоты по 1 × 10⁶ клеток в 100 мкл среды и окрашивали антителами к поверхностным маркерам — коктейль антител, меченых PE: CD34 (клон 581), CD11b (клон ICRF44), CD19 (клон H1B19), CD45 (клон H130), HLA-DR (клон G46-6); CD90, меченый FITC (клон 5E10); CD105, меченый PerCP-Cy5.5 (клон 266); CD73, меченый APC (клон AD2); CD44, меченый PE, согласно инструкции производителя. При проведении анализа формировали следующие контрольные группы изотипов: изотипический контроль коктейля антител mIgG1, к FITC (клон X40), mIgG1, к PerCP-Cy5.5 (клон X40), mIgG1, к APC (клон X40); изотипический контроль IgG2b, меченый PE.

Для идентификации эндотелиальных прогениторных клеток и зрелых эндотелиальных клеток фракцию мононуклеаров разделяли на аликвоты по 1 × 10⁶ клеток в 100 мкл среды и окрашивали антителами к поверхностным маркерам: CD34, меченые фикоэритрином-Сай7 (CD34 PE-Cy7), CD45RA, меченые АФЦ-Аш7 (CD45RA APC-H7), CD309 (VEGFR-2), меченные ФЭ (CD309(PE)), CD144, меченые ПерСП-Сай5.5 (CD144 PerCP-Cy5.5), CD14, меченые АФЦ(CD14 APC), CD31, меченые ФИТЦ (CD31 FITC), согласно инструкции производителя. При этом использовали следующие контрольные группы изотипов: изотипический контроль IgG1 PE Cy7, изотипический контроль IgG2b APC-H7, изотипический контроль IgG2b APC, изотипический контроль IgG1 PERCP-CY5.5, изотипический контроль IgG1 FITC, изотипический контроль IgG2a, PE.

Иммунофенотип зрелых клеток, стволовых и прогениторных клеток, исследованных в венозной крови у здоровых волонтеров и больных СД 1, СД 2, МС представлен в табл. 3.

Таблица 1

Общая характеристика волонтеров и больных, включенных в клиническое исследование

Критерии	Здоровые волонтеры (n = 11)	Больные с СД 1 (n = 10)	Больные с СД 2 (n = 7)	Больные с МС (n = 7)
Возраст, год	24,85 ± 1,39	23,14 ± 2,15	62,43 ± 5,58 *	60,14 ± 3,60*
Рост, м	1,78 ± 0,03	1,70 ± 0,06	1,68 ± 0,02	1,60 ± 0,03
Вес, кг	76,89 ± 4,13	78,90 ± 1,43	97,43 ± 7,20 *	102,86 ± 4,89 *
Индекс массы тела, кг/м ²	24,10 ± 1,02	27,30 ± 2,80	34,19 ± 2,06 *	37,92 ± 2,85 *
Примечание. * достоверность различия с группой волонтеров (p < 0,05)				

Полученные данные проверяли на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро—Уилка. По результатам проверки статистическую обработку проводили с использованием непараметрических методов (Манна—Уитни и Вилкоксона) при помощи компьютерной программы Statistica 7.0 (StatSoft). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Оценка взаимосвязи количественных и порядковых признаков проведена при помощи корреляционного анализа (непараметрический коэффициент корреляции Спирмена).

Результаты исследования и обсуждение

Результаты общепринятого комплекса клинико-лабораторных, биохимических, иммуноферментных методов обследования пациентов для подтверждения диагноза СД1, СД 2 и МС представлены в табл. 2. У больных СД 1,

СД 2 и МС наблюдался повышенный уровень глюкозы, у больных с СД 2 и МС оказался сниженным уровень инсулина в крови.

По природе, экспрессии поверхностных антигенов, свойствам и тканевой принадлежности эндотелиальные клетки представляют собой гетерогенную группу. На первом этапе мы оценили два таких известных маркера эндотелиальных клеток как CD31 (белок межклеточных контактов эндотелиальных клеток) и CD309 (рецептор фактора роста эндотелия сосудов — vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2). Нами не выявлены различия в содержании CD31⁺-клеток между волонтерами и пациентами с МС, СД1 и СД2 (табл. 3). Между тем, у всех обследованных больных количество CD309⁺-клеток снижалось в несколько раз по сравнению с волонтерами, при этом в группах с СД1 и СД2 выраженность эффекта преобладала над таковой в группе с МС (рис. 1, А, Б, табл. 3).

Таблица 2

Биохимические показатели в сыворотке крови волонтеров и пациентов, включенных в клиническое исследование

Критерии	Здоровые волонтеры (n = 11)	Больные с СД 1 (n = 10)	Больные с СД 2 (n = 7)	Больные с МС (n = 7)
Глюкоза (ммоль/л)	5,36 ± 0,23	11,06 ± 2,09 *	9,17 ± 0,89 *	6,57 ± 0,19 *
Инсулин (мкМЕ/мл)	14,03 ± 4,97	15,53 ± 1,79	7,81 ± 0,55 *	9,59 ± 1,27 *
Проинсулин (пмоль/л)	4,22 ± 0,28	4,43 ± 0,52	4,77 ± 0,25	3,23 ± 0,27

Примечание. * достоверность различия с группой волонтеров ($p < 0,05$).

Таблица 3

Содержание стволовых и прогениторных клеток в венозной крови волонтеров и больных с метаболическим синдромом и диабетом (% от меченных мононуклеаров) (M ± m)

Клетки / иммунофенотип	Волонтеры (n = 11)	Пациенты с СД 1 (n = 10)	Пациенты с СД 2 (n = 7)	Пациенты с МС (n = 7)
Популяция циркулирующих эндотелиальных клеток, моноцитов, некоторых популяций лимфоцитов (CD31 ⁺)	72,9 ± 8,36	81,13 ± 4,59	78,78 ± 3,87	78,15 ± 2,68
Преимущественно зрелые эндотелиальные клетки, экспрессирующие сигнал фактора роста эндотелия сосудов VEGFR-2 (CD309 ⁺)	0,59 ± 0,19	0,18 ± 0,03 *	0,15 ± 0,03 *	0,24 ± 0,04 *
Эндотелиальные клетки не костномозговой локализации (CD31 ⁺ CD309 ⁺ CD144 ⁺)	0,39 ± 0,16	0,13 ± 0,04 *	0,17 ± 0,03 *	0,90 ± 0,58
Популяция ГСК и эндотелиальных зрелых и незрелых клеток (CD34 ⁺)	3,33 ± 0,89	16,59 ± 4,31 *	0,95 ± 0,09 *	1,17 ± 0,25 *
Гемопозитические стволовые клетки (CD45 ⁺ CD34 ⁺)	0,10 ± 0,02	0,30 ± 0,04 *	0,24 ± 0,03 *	0,66 ± 0,09 *
Незрелые и зрелые эндотелиальные клетки костномозговой локализации (CD34 ⁺ CD309 ⁺)	12,13 ± 4,39	1,89 ± 0,89*	6,14 ± 0,97 *	12,37 ± 4,23
Циркулирующие эндотелиальные прогениторные клетки, формирующие колонии <i>in vitro</i> (CD45-CD34 ⁺ CD31 ⁺)	1,22 ± 0,23	1,22 ± 0,40	0,35 ± 0,07 *	1,42 ± 0,38
Циркулирующие эндотелиальные прогениторные клетки с высоким регенеративным потенциалом (CD45-CD34 ⁺ CD31 ⁺ CD144 ⁺)	0,55 ± 0,24	0,06 ± 0,03	0,03 ± 0,01 *	0,31 ± 0,09
Эндотелиальные клетки немиелоидного происхождения / (CD45-CD14-CD34 ⁺ CD309 ⁺ CD144 ⁺ CD31 ⁺)	0,16 ± 0,04	0,01 ± 0,00 *	0,01 ± 0,00 *	0,05 ± 0,01 *
Эндотелиальные клетки миелоидного происхождения (CD45-CD14 ⁺ CD34 ⁺ CD309 ⁺ CD144 ⁺ CD31 ⁺)	0,12 ± 0,03	0,01 ± 0,004 *	0,01 ± 0,005 *	0,03 ± 0,004 *
Мезенхимальные стволовые клетки (CD34,CD11b,CD19,CD45, HLA-DR) ⁺ (CD73,CD90,CD105) ⁺	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Популяция мезенхимальных стволовых и эндотелиальных клеток (CD44 ⁺ CD73 ⁺ CD90 ⁺ CD105 ⁺)	0,16 ± 0,03	0,07 ± 0,01 *	0,05 ± 0,008 *	0,01 ± 0,003 *

Примечание. * достоверность различия с группой волонтеров ($p < 0,05$).

Таким образом, циркулирующие эндотелиальные клетки позитивные по CD309, но не по CD31, могут являться потенциальным диагностическим маркером сосудистых нарушений. Прослеживается определенная зависимость эффекта от тяжести заболевания, что указывает на перспективность использования маркера сосудистого развития и регуляции сосудистой проницаемости CD309 в качестве предиктора выраженности сосудистых осложнений. Как известно, выраженность сосудистых нарушений при СД1 значительно больше, чем при метаболическом синдроме и диабете 2 типа [12].

Помимо эндотелиальных клеток, CD31 экспрессируется на поверхности моноцитов и лимфоцитов. В целях исключения клеток воспаления из общей фракции CD31+-клеток в линейку антигенов мы ввели маркер CD144 (альтернативное название VE-Cadherin, Cadherin-5) и CD309. Маркер

CD309 экспрессируется не только на поверхности эндотелиальных клеток, но и выступает мембранным антигеном стволовых клеток и прогениторных клеток [13]. Есть мнение, что предложенная для исследования линейка антигенов характеризует ЭПК не костномозговой локализации [13]. По нашим данным, фракция CD31+CD309+CD144+-клеток в крови пациентов с СД1 и СД2 достоверно уменьшалась на 66% и 56% соответственно, у пациентов с МС, напротив, наблюдалось значительное увеличение их числа (в 2,3 раза; $p < 0,05$) (табл. 3). Ранее нами было продемонстрировано накопление CD31+-клеток в травмированных тканях животных при моделировании метаболических нарушений [14]. Не исключено, что у пациентов с МС одновременно с мобилизацией в кровь ЭПК с фенотипом CD31+CD309+CD144+ мигрируют в травмированную ткань и регенерируют эндотелий.

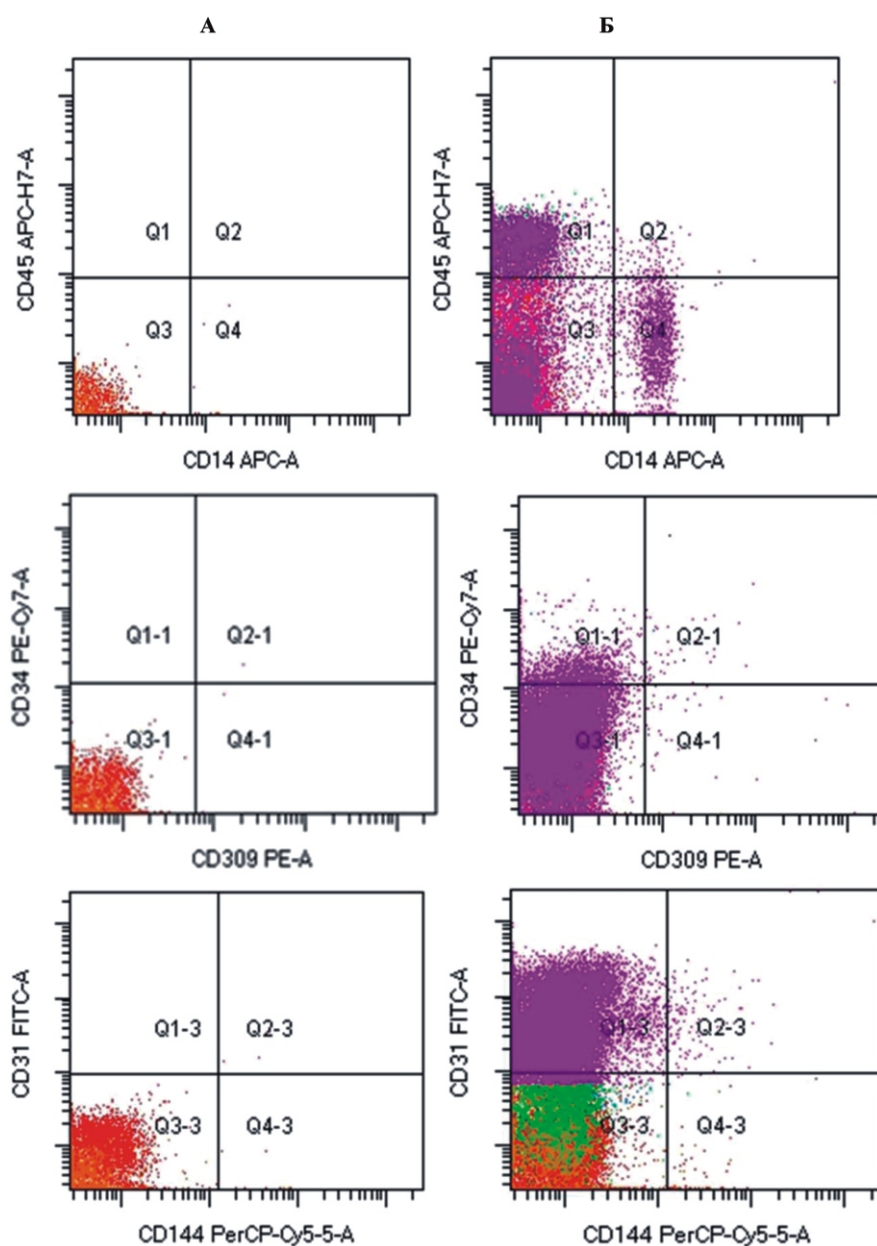


Рис. 1. Данные анализа количественной и качественной экспрессии эндотелиальных прогениторных клеток, полученные с помощью проточной цитометрии, на мононуклеарах, выделенных из венозной крови здорового волонтера.

А — изотипический контроль для эндотелиальных прогениторных клеток;

Б — подтверждение фенотипа и качественный анализ экспрессии CD45/CD14, CD34/CD309 и CD31/CD144 на двухмерных диаграммах.

Молекула межклеточной адгезии CD34 представляет собой примитивный маркер гемопоэтических клеток, опосредует связывание стволовых клеток с внеклеточным матриксом костного мозга или напрямую со стромальными клетками. В нашей работе мы выявили накопление

CD34⁺-клеток в крови пациентов с СД1 и сокращение их у больных с СД2 и метаболическим синдромом (табл. 3). Выявленное увеличение количества циркулирующих CD34⁺-клеток может быть связано с ГСК. Однако фенотип ГСК не ограничивается одним маркером. Как прави-

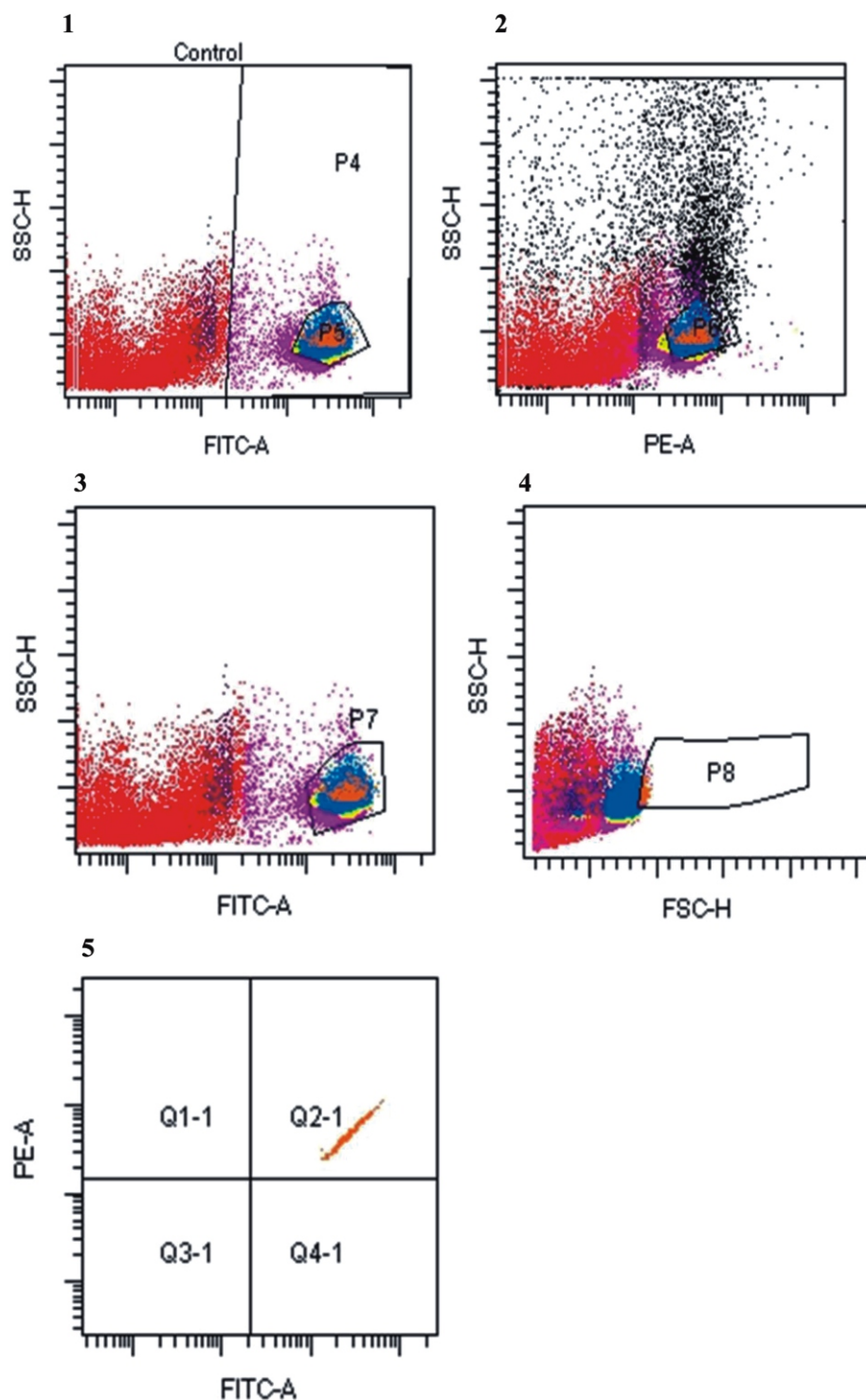


Рис. 2. Данные анализа количественной и качественной экспрессии гемопоэтических стволовых клеток, полученные с помощью проточной цитометрии, на мононуклеарах, выделенных из венозной крови здорового волонтера: дот-плоты количественной и качественной экспрессии и стратегия гейтирования для определения гемопоэтических стволовых клеток с помощью проточной цитометрии.

1 – на двухмерной гистограмме SSC-H/FITC гейт R4 ограничивает лейкоциты CD45⁺, гейт R5 убирает двойные позитивные события;

2 – на двухмерной гистограмме SSC-H/PE гейт R6 ограничивает CD34⁺ события из R5;

3 – на двухмерной гистограмме SSC-H/FITC гейт R7 ограничивает события с высоким уровнем экспрессии CD45⁺ из R6;

4 – обратное гейтирование CD45⁺CD34⁺ на гистограмму FSC/SSC подтверждает их принадлежность к области лимфоцитов, гейт R8, 5). Анализ CD45⁺ против CD34⁺ от всех событий.

ло, для оценки ГСК в общей фракции CD34⁺-клеток дополнительно оценивается экспрессия пан гемопоэтического маркера CD45 [15]. По нашим данным, число циркулирующих CD45⁺CD34⁺-ГСК у больных всех нозологий возросло: в группе пациентов с МС в 6,6 раза, с СД1 в 3 раза, с СД2 — в 2,4 раза (рис. 2, табл. 3). Есть мнение, что ГСК участвуют в воспалительных процессах, дифференцируясь в клетки миелоидного или лимфоидного ряда в зависимости от характера воспаления и фактора его провоцирующего, с другой стороны, мобилизуясь в кровь мигрируют в травмированный участок ткани, где поддерживают воспаление паракринно [9, 10]. Исходя из этого, циркулирующие ГСК при диабете и МС, по всей видимости, указывают на воспаление.

Фракция CD34⁺-клеток содержит приблизительно 80% ГСК, около 15% ЭПК и зрелых эндотелиальных клеток, и небольшое количество предшественников других линий [16]. Сочетание маркера стволовости CD34 и эндотелиального CD309 позволило оценить популяцию циркулирующих ЭПК костного мозга и клеток стенок кровеносных сосудов у больных и волонтеров [16]. Так, у пациентов с инсулинозависимым диабетом количество ЭПК с иммунофенотипом CD34+CD309+ уменьшалось (табл. 3). Подобная реакция, но менее выраженная, наблюдалась при СД2 типа. Между тем, различий в содержании CD34+CD309+-клеток в венозной крови у больных с МС и волонтеров не обнаружено.

Таким образом, ЭПК с фенотипом CD34+CD309+, подобно CD31+CD309+CD144+-эндотелиальным прогениторным клеткам, могут выступить маркером наруше-

ний регенерации эндотелия при диабете. Ингибция ЭПК вызвана противовоспалительной активностью ГСК, что подтверждается высокими значениями коэффициентов корреляции между этими двумя популяциями клеток у пациентов с СД1.

В некоторых работах указывают на целесообразность изучения эндотелиальных прогениторных клеток во фракции циркулирующих клеток, не экспрессирующих CD45. Так, CD45-CD34+CD31+-клетки способны формировать колонии *in vitro*, CD45-CD34+CD31+CD144+-клетки демонстрируют высокий регенеративный потенциал [17]. Результаты проведенных цитометрических исследований свидетельствовали о снижении уровня CD34+CD31+ -ЭПК и CD45-CD34+CD31+CD144+-ЭПК в крови пациентов с СД2, в группе СД1 было обнаружено избирательное уменьшение числа ЭПК с высоким регенеративным потенциалом (табл. 3). В ряде случаев в дополнение к CD45 и эндотелиальным маркерам анализируют экспрессию антигена гранулоцитов и макрофагов / моноцитов CD14 (LPS-Reseptor). Введение в линейку маркеров CD14 позволило нам разделить эндотелиальные клетки по природе:

миелоидные (CD45-CD14+CD34+CD309+CD144+CD31+) и немиелоидные (CD45-CD14-CD34+CD309+ CD144+ CD31+ и CD45-CD14-CD34+CD309+) [4]. Так, у пациентов с СД1, СД2 и МС отмечалось уменьшение числа циркулирующих эндотелиальных клеток миелоидного и немиелоидного происхождения по сравнению с волонтерами (табл. 3). Эти данные во многом повторяют уже известные

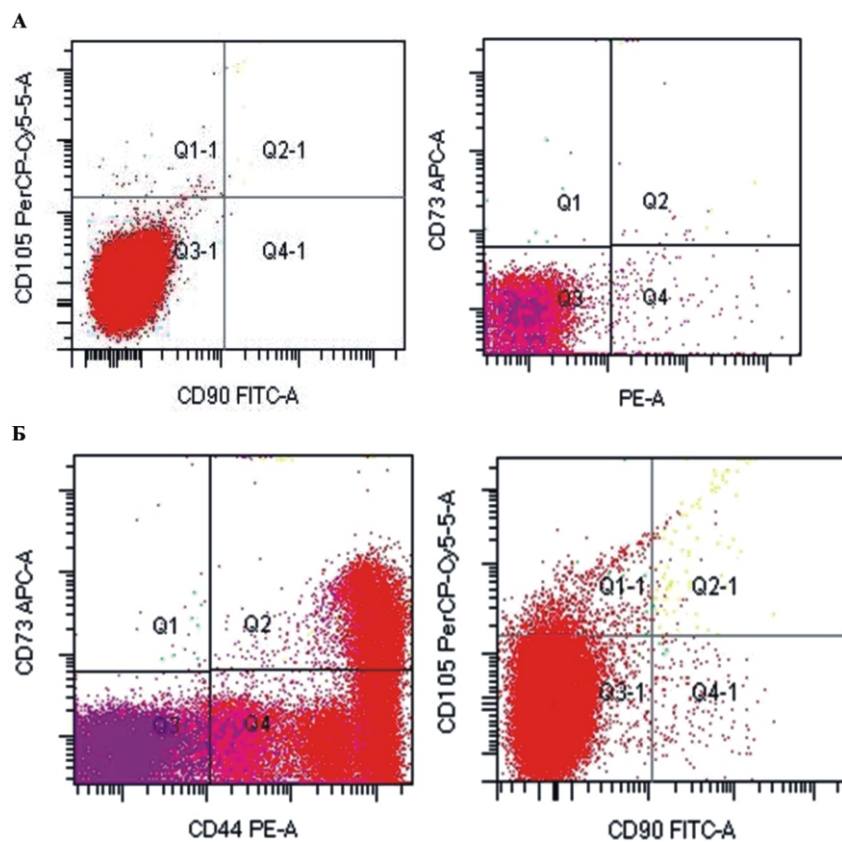


Рис. 3. Данные анализа количественной и качественной экспрессии мезенхимальных стволовых клеток полученные с помощью проточной цитометрии, на мононуклеарах, выделенных из венозной крови здорового волонтера.

А — изотипический контроль для мезенхимальных стволовых клеток; Б — подтверждение фенотипа и качественный анализ экспрессии CD44/CD73 и CD90/CD105 на двухмерных диаграммах.

результаты клинических исследований [18] и позволяют судить о сосудистых осложнениях при диабете по результатам оценки ЭПК с фенотипом CD45-CD34+CD31+CD144+.

По современным представлениям, МСК улучшают эндотелиальные функции [19] и стимулируют эндогенные прогениторные клетки. Эффекты связаны с паракринной активностью МСК. Ряд исследователей акцентирует внимание на способности МСК дифференцироваться в эндотелиальные клетки [19]. При этом считается, что потенциал дифференцироваться в эндотелиальные клетки обладают костномозговые МСК [20]. Необходимость оценки МСК в клинической практике дополнительно основывается на обозначенных ранее антифиброзных, противовоспалительных и проангиогенных свойствах МСК [19, 20]. Изучение антигенов мезенхимальных клеток в настоящем исследовании не выявило достоверных различий в содержании МСК с фенотипом (CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR)⁻ (CD73, CD90, CD105)⁺ у больных всех групп и здоровых волонтеров (табл. 3). В то же время количество МСК с фенотипом CD44+CD73+CD90+CD105⁺ у больных всех групп достоверно снижалось, наиболее выражено в группе с метаболическим синдромом (более чем на 93% относительно группы здоровых волонтеров) (рис. 3, табл. 3).

Итак, изучение поверхностных антигенов мезенхимальных, эндотелиальных и гемопоэтических предшественников позволило нам предложить новые прогностические маркеры, отражающие воспаление, эндотелиальные дисфункции/нарушения эндотелия для больных МС, СД2 и СД1. Так, эндотелиальные клетки немиелоидного (CD45-CD14-CD34+CD309+CD144+CD31⁺) и миелоидного происхождения (CD45-CD14+CD34+CD309+CD144+CD31⁺), а также CD309⁻-эндотелиальные клетки возможно использовать в качестве неспецифических маркеров эндотелиального повреждения. При этом для более точного прогноза сосудистых осложнений целесообразно исследовать МСК с фенотипом CD44+CD73+CD90+CD105⁺, так как эти клетки необходимы для регенерации эндотелия [20]. Оценка ГСК (CD45+CD34⁺) может выступать ценным диагностическим и прогностическим маркером воспаления. Циркулирующие эндотелиальные прогениторные клетки с такими фенотипами, как CD31+CD309+CD144⁺ (не костномозговой локализации), CD34+CD309⁺ (костномозговой локализации), CD45-CD34+CD31+CD144⁺ (с высоким регенеративным потенциалом) предлагаются нами в качестве дополнительного критерия «закрепления» сосудистых повреждений и прогноза развития осложнений при СД1 и СД2. При этом эндотелиальные прогениторные клетки, формирующие колонии *in vitro*, можно использовать в качестве дифференциального маркера состояния регенерации эндотелия при диабете 2 типа.

Выводы

1. Для оценки риска развития сосудистых осложнений и прогноза течения заболевания у пациентов с метаболическим синдромом, сахарным диабетом 1 и 2 типа с поврежденным эндотелием целесообразно одновременно оценивать ГСК (CD45+CD34⁺), МСК (CD44+CD73+CD90+CD105⁺), CD309⁻-эндотелиальные клетки и эндотелиальные клетки немиелоидного происхождения (CD45-CD14-CD34+CD309+CD144+CD31⁺) и миелоидного

происхождения (CD45-CD14+CD34+CD309+CD144+CD31⁺) в венозной крови.

2. Циркулирующие эндотелиальные прогениторные клетки не костномозговой локализации (CD31+CD309+CD144⁺) и костномозговой локализации (CD34+CD309⁺), с высоким регенеративным потенциалом (CD45-CD34+CD31+CD144⁺) и клональной активностью (CD45-CD34+CD31⁺) можно рассматривать как возможные маркеры регенерации эндотелия для прогностического анализа течения заболеваний, при снижении их уровня принимать своевременные лечебные меры для стимуляции регенерации эндотелия.

Список литературы

1. Hamou C., Callaghan M.J., Thangarajah H., Chang E., Chang E.I., Grogan R.H., Paterno J., Vial I.N., Jazayeri L., Gurtner G.C. Mesenchymal stem cells can participate in ischemic neovascularization. *Plast. Reconstr. Surg.* 2009; 123(Suppl. 2): 45-55. DOI: 10.1097/PRS.0b013e318191be4a
2. Tepper O.M., Capla J.M., Galiano R.D., Ceradini D.J., Callaghan M.J., Kleinman M.E., Gurtner G.C. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood.* 2005; 105(3): 1068-1077. DOI: 10.1182/blood-2004-03-1051
3. Kucia, M.J., Wysoczynski M., Wu W., Zuba-Surma E.K., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. *Stem Cells.* 2008; 26(8): 2083-2092. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0922
4. Asahara T., Kawamoto A., Masuda H. Concise review: circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells.* 2011; 29(11): 1650-1655. DOI: 10.1002/stem.745
5. Mayr M., Niederseer D., Niebauer J. From bench to bedside: what physicians need to know about endothelial progenitor cells. *Am. J. Med.* 2011; 124: 489-497. DOI: 10.1016/j.amjmed.2011.01.015
6. Piatkowski A., Grieb G., Simons D., Jurgen B., van der Hulst R.R. Endothelial Progenitor Cells Potential — New Avenues to Improve Neovascularization and Reendothelialization. *International Review of Cell and Molecular Biology.* 2013; 306: 43-81. DOI.org/10.1016/B978-0-12-407694-5.00002-X.
7. Ambasta R.K., Kohli H., Kumar P. Multiple therapeutic effect of endothelial progenitor cell regulated by drugs in diabetes and diabetes related disorder. *J. Transl Med.* 2017; 15(1): 185. DOI: 10.1186/s12967-017-1280-y
8. Blann A.D., Woywodt A., Bertolini F., Bull T.M., Buyon J.P., Clancy R.M., Haubitz M., Heibel R.P., Lip G.Y., Mancuso P., Sampol J., Solovey A., Dignat-George F. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost.* 2005; 93: 228-235. DOI: 10.1160/TH04-09-0578
9. Jaiswal S., Jamieson C.H., Pang W.W. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell.* 2009; 138(2): 271-285. DOI: 10.1016/j.cell.2009.05.046
10. Scumpia P.O., Kelly-Scumpia K.M., Delano M.J., Weinstein J.S., Cuenca A.G., Al-Quran S. Cutting edge: bacterial infection induces hematopoietic stem and progenitor cell expansion in the absence of TLR signaling. *J. Immunol.* 2010; 184(5): 2247-2251. DOI: 10.4049/jimmunol.0903652
11. Abebe W., Mozaffari M. Endothelial dysfunction in diabetes: potential application of circulating markers as advanced diagnostic and prognostic tools. *EPMA J.* 2010; 1: 32-45. DOI: 10.1007/s13167-010-0012-7
12. Shibuyaa M., Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental Cell Research.* 2006; 312: 549-560. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.11.012
13. Sandhu K., Mamas M., Butler R. Endothelial progenitor cells: Exploring the pleiotropic effects of statins. *World J. Cardiol.* 2017; 9(1): 1-13. DOI: 10.4330/wjc.v9.i1.1
14. Скурихин Е.Г., Пахомова А.В., Першина О.В., Ермолаева Л.А., Крупин В.А., Ермакова Н.Н., Пан Э.С., Кудряшова А.И., Рыбалкина О.Ю., Павловская Т.Б., Литвяков Н.В., Гольдберг В.Е., Дыгай А.М. Регенераторный потенциал сперматогональных стволовых клеток, эндотелиальных и эпителиальных

прекурсоров мышей линии C57Bl/6 с метаболическими нарушениями. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 163(2): 204-210. DOI: 10.1007/s10517-017-3775-1

15. Whitby A, Whitby L, Fletcher M, Reilly JT, Sutherland DR, Keeney M, Barnett D. ISHAGE protocol: Are we doing it correctly? *Cytometry Part B*. 2012; 82: 9-17. DOI: 10.1002/cyto.b.20612

16. Fadini G.P., Losordo D., Dimmeler S. Critical re-evaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ. Res.* 2012; 110(4): 624-637. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243386

17. Van Craenenbroeck E.M., Van Craenenbroeck A.H., van Ierssel S., Bruyndonckx L., Hoymans V.Y., Vrints C.J., Conraads V.M. Quantification of circulating CD34+/KDR+/CD45dim endothelial progenitor cells: analytical considerations. *Int. J. Cardiol.* 2013; 167: 1688-1695. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.10.047

18. Ye L., Poh K.K. Enhancing endothelial progenitor cell for clinical use. *World J Stem Cells*. 2015; 7(6): 894-898. DOI: 10.4252/wjsc.v7.i6.894

19. Premer C., Blum A., Bellio M.A., Schulman I.H., Hurwitz B.E., Parker M., Dermarkarian CR, DiFede DL, Balkan W, Khan A, Hare JM. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Restore Endothelial Function in Heart Failure by Stimulating Endothelial Progenitor Cells. *EBioMedicine*. 2015; 2: 467-475 DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.03.020

20. Chen M-Y., Lie P-C., Li Z-H., Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*. 2009; 37: 629-640. DOI: 10.1016/j.exphem.2009.02.003

References

1. Hamou C., Callaghan M.J., Thangarajah H., Chang E., Chang E.I., Grogan R.H., Paterno J., Vial I.N., Jazayeri L., Gurtner G.C. Mesenchymal stem cells can participate in ischemic neovascularization. *Plast. Reconstr. Surg.* 2009; 123(Suppl. 2): 45-55. DOI: 10.1097/PRS.0b013e318191be4a

2. Tepper O.M., Capla J.M., Galiano R.D., Ceradini D.J., Callaghan M.J., Kleinman M.E., Gurtner G.C. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood*. 2005; 105(3): 1068-1077. DOI: 10.1182/blood-2004-03-1051

3. Kucia M.J., Wyszczynski M., Wu W., Zuba-Surma E.K., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. *Stem Cells*. 2008; 26(8): 2083-2092. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0922

4. Asahara T., Kawamoto A., Masuda H. Concise review: circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells*. 2011; 29(11): 1650-1655. DOI: 10.1002/stem.745

5. Mayr M., Niederseer D., Niebauer J. From bench to bedside: what physicians need to know about endothelial progenitor cells. *Am. J. Med.* 2011; 124: 489-497. DOI: 10.1016/j.amjmed.2011.01.015

6. Piatkowski A., Grieb G., Simons D., Jurgen B., van der Hulst R.R. Endothelial Progenitor Cells Potential — New Avenues to Improve Neoangiogenesis and Reendothelialization. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2013; 306: 43-81. DOI.org/10.1016/B978-0-12-407694-5.00002-X.

7. Ambasta R.K., Kohli H., Kumar P. Multiple therapeutic effect of endothelial progenitor cell regulated by drugs in diabetes and diabe-

tes related disorder. *J. Transl. Med.* 2017; 15(1): 185. DOI: 10.1186/s12967-017-1280-y

8. Blann A.D., Woywodt A., Bertolini F., Bull T.M., Buyon J.P., Clancy R.M., Haubitz M., Heibel R.P., Lip G.Y., Mancuso P., Sampol J., Solovey A., Dignat-George F. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost.* 2005; 93: 228-235. DOI: 10.1160/TH04-09-0578

9. Jaiswal S., Jamieson C.H., Pang W.W. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*. 2009; 138(2): 271-285. DOI: 10.1016/j.cell.2009.05.046

10. Scumpia P.O., Kelly-Scumpia K.M., Delano M.J., Weinstein J.S., Cuenca A.G., Al-Quran S. Cutting edge: bacterial infection induces hematopoietic stem and progenitor cell expansion in the absence of TLR signaling. *J. Immunol.* 2010; 184(5): 2247-2251. DOI: 10.4049/jimmunol.0903652

11. Abebe W., Mozaffari M. Endothelial dysfunction in diabetes: potential application of circulating markers as advanced diagnostic and prognostic tools. *EPMA J.* 2010; 1: 32-45. DOI: 10.1007/s13167-010-0012-7

12. Shibuyaa M., Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental Cell Research*. 2006; 312: 549-560. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.11.012

13. Sandhu K., Mamas M., Butler R. Endothelial progenitor cells: Exploring the pleiotropic effects of statins. *World J. Cardiol.* 2017; 9(1): 1-13. DOI: 10.4330/wjc.v9.i1.1

14. Skurikhin EG, Pakhomova AV, Pershina OV, Ermolaeva LA, Krupin VA, Ermakova NN, Pan ES, Kudryashova AI, Rybalkina OY, Pavlovskaya TB, Litvyakov NV, Goldberg VE, Dygai AM. [Regenerative Potential of Spermatogonial Stem Cells, Endothelial Progenitor Cells, and Epithelial Progenitor Cells of C57Bl/6 Male Mice with Metabolic Disorders]. *Byulleten' ehksperimental'noi biologii i mediciny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]*. 2017, 163(2): 239-244. DOI: 10.1007/s10517-017-3775-1 (in Russian)

15. Whitby A, Whitby L, Fletcher M, Reilly JT, Sutherland DR, Keeney M, Barnett D. ISHAGE protocol: Are we doing it correctly? *Cytometry Part B*. 2012; 82: 9-17. DOI: 10.1002/cyto.b.20612

16. Fadini G.P., Losordo D., Dimmeler S. Critical re-evaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ. Res.* 2012; 110(4): 624-637. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243386

17. Van Craenenbroeck E.M., Van Craenenbroeck A.H., van Ierssel S., Bruyndonckx L., Hoymans V.Y., Vrints C.J., Conraads V.M. Quantification of circulating CD34+/KDR+/CD45dim endothelial progenitor cells: analytical considerations. *Int. J. Cardiol.* 2013; 167: 1688-1695. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.10.047

18. Ye L., Poh K.K. Enhancing endothelial progenitor cell for clinical use. *World J Stem Cells*. 2015; 7(6): 894-898. DOI: 10.4252/wjsc.v7.i6.894

19. Premer C., Blum A., Bellio M.A., Schulman I.H., Hurwitz B.E., Parker M., Dermarkarian CR, DiFede DL, Balkan W, Khan A, Hare JM. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Restore Endothelial Function in Heart Failure by Stimulating Endothelial Progenitor Cells. *EBioMedicine*. 2015; 2: 467-475 DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.03.020

20. Chen M-Y., Lie P-C., Li Z-H., Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*. 2009; 37: 629-640. DOI: 10.1016/j.exphem.2009.02.003

Сведения об авторах

Першина Ольга Викторовна — доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории регенеративной фармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.Гольдберга» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук

Пахомова Ангелина Владимировна — кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории регенеративной фармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.Гольдберга» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук

Ермакова Наталия Николаевна — кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории регенеративной фармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.Гольдберга» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук

Рыбалкина Ольга Юрьевна — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории онкофармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.Гольдберга» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук

Крупин Вячеслав Андреевич — кандидат медицинских наук, лаборант-исследователь лаборатории регенеративной фармакологии.

Пан Эдгар Сергеевич — лаборант-исследователь лаборатории регенеративной фармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.Гольдберга» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук

Ваизова Ольга Евгеньевна — доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кравченко Александр Иванович — кандидат медицинских наук, врач клинической лабораторной диагностики, директор ООО «Открытая лаборатория»

Самойлова Юлия Геннадьевна — руководитель Центра клинических исследований, доктор медицинских наук, профессор кафедры эндокринологии и диабетологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ротканк Мария Алексеевна — эксперт центра клинических исследований Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Дыгай Александр Михайлович — доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.Гольдберга» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук

Скурихин Евгений Германович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией регенеративной фармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.Гольдберга» Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук

УДК 616.28-008-07

Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия у больных хроническим гнойным средним отитом

Байке Е.В.^{1,2}, Уразова О.И.²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 672090, Чита, ул. Горького, 39а

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 634050, Томск, Московский тракт, 2

Цель исследования — анализ изменений активности лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА) у больных хроническим гнойным средним отитом (ХГСО) до начала и на 2-е и 10-е сутки лечения. **Материалы и методы.** Обследованы 299 пациентов с ХГСО, из них 146 с туботимпанальной формой (мезотимпанит) и 153 с эптитимпано-антральной формой (эпитимпанит) болезни. Лимфоциты и тромбоциты выделяли из цельной крови методом градиентного центрифугирования для определения показателей ЛТА по методу Ю.А. Витковского. Рассчитывали количество лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов (ЛТАг) и число тромбоцитов, адгезированных на поверхности одного лимфоцита, или степень адгезии (лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс — ЛТИ). Субпопуляционный состав лимфоцитов ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$, $CD22^+$) в крови и агрегатах с тромбоцитами определяли с помощью моноклональных антител. Для измерения концентрации интерлейкинов (IL) 1β и IL-10 в сыворотке крови применяли иммуноферментный анализ. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Критический уровень значимости принимался равным 0,05. **Результаты.** У больных с разными формами ХГСО до лечения отмечается снижение общего количества лимфоцитов, содержания их субпопуляций ($CD4^+$, $CD16^+$, $CD22^+$) и ЛТАг в крови. Одновременно с этим выявляются разнонаправленные изменения ЛТИ: снижение при мезотимпаните и увеличение при эптитимпаните. На 2-е сутки лечения у больных с мезотимпанитом количество ЛТАг (%) и ЛТИ повышаются практически в 2 раза по сравнению с исходными значениями, при этом содержание $CD4^+$ Т-лимфоцитов и $CD16^+$ NK-клеток в крови снижается еще больше. У лиц с эптитимпанитом относительное количество ЛТАг (%) увеличивается на 59,7%, а ЛТИ снижается на 9,2% соответственно. Через 10 дней лечения у больных ХГСО показатели ЛТА проявляют тенденцию к нормализации. **Заключение.** При ХГСО способность лимфоцитов адгезировать на своей поверхности тромбоциты снижается. Динамика лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии на фоне лечения является показателем регрессии воспалительного процесса и эффективности терапии.

Ключевые слова: хронический гнойный средний отит; лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия; иммунитет; гемостаз.

Для цитирования: Байке Е.В., Уразова О.И. Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия у больных хроническим гнойным средним отитом. Патогенез. 2018; 16(1): 68–75

DOI:

Для корреспонденции: Байке Елена Викторовна, e-mail: elenabayke@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Поступила: 08.12.2017

Lymphocyte-platelet adhesion in patients with chronic suppurative otitis media

Bayke E.V.^{1,2}, Urazova O.I.²

¹ Chita State Medical Academy, Gorkogo Str. 39a, Chita 672090, Russian Federation

² Siberian State Medical University, Moskovskiy Tract 2, Tomsk 634050, Russian Federation

The study objective was to analyze changes of lymphocyte-platelet adhesion (LPA) activity in patients with chronic suppurative otitis media before and on days 2 and 10 of treatment. **Materials and methods.** The study included 299 patients with chronic suppurative otitis media; 146 patients had the tubotympanic form (mesotympanitis) and 153 patients had the epitympano-antral form (epitympanitis) of disease. Lymphocytes and platelets were isolated from whole blood using gradient centrifugation to determine LPA parameters using the method of Yu.A. Vitkovskiy. Counts of lymphocyte-platelet aggregates (LPAg) and platelets adhered to the surface were expressed per lymphocyte (lymphocyte-platelet index, LPI). Lymphocyte subpopulations ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD16^+$, $CD22^+$) were identified in blood and platelet aggregates using monoclonal antibodies. Blood serum concentrations of cytokines IL- 1β and IL-10 were measured by ELISA. Statistical analysis was performed with Student's *t*-test at the significance level of 0.05. **Results.** In patients with different forms of chronic suppurative otitis

media, the pretreatment lymphocyte count, content of their subpopulations ($CD4^+$, $CD16^+$, $CD22^+$), and blood level of LPAg were decreased. At the same time, LPIs changed in different directions; LPI values were decreased in mesotympanitis and increased in epitympanitis. In patients with mesotympanitis on day 2 of treatment, the amount of LPAg (%) and LPI increased almost twofold compared to baseline values while counts of $CD4^+$ T-lymphocyte and $CD16^+$ NK cells were decreased even more. In patients with epitympanitis, the relative amount of LPAg (%) was increased by 59.7% and LPI was decreased by 9.2%, respectively. In patients with chronic suppurative otitis media after 10 days of treatment, LPA indexes tended to normalize. **Conclusion.** In chronic suppurative otitis media, the capability of lymphocyte surface for platelet adhesion was reduced. Changes in LPA during the treatment indicated regression of the inflammatory process and evidenced the effectiveness of therapy.

Key words: chronic suppurative otitis media; lymphocyte-platelet adhesion; immunity; hemostasis.

For citation: Bayke E.V., Urazova O.I. [Lymphocyte-platelet adhesion in patients with chronic suppurative otitis media]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(1): 68–75 (in Russian)

DOI:

For correspondence: Bayke Elena, e-mail: elenabayke@yandex.ru

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received: 08.12.2017

В мире хроническим гнойным средним отитом (ХГСО) страдают от 1 до 46% населения, проживающих в развитых и развивающихся странах, это около 65–330 млн человек. Из них 60% имеют значительное снижение слуха [1]. При этом хронический средний отит с холестеатомой выявляется у 24–63% больных ХГСО, у которых костная резорбция обнаруживается в 78,8% и более случаев, что является причиной развития отогенных осложнений [2].

Особенности реализации воспалительной реакции во многом зависят от состояния факторов локального и системного иммунитета организма и их ответной реакции на флогоген (антиген). Однако для благополучного завершения воспалительного процесса необходимо адекватное функционирование всех интегральных систем защиты, в частности иммунитета и гомеостаза — их форменных элементов и медиаторов [3, 4]. Тромбоциты — клетки, выполняющие не только гемостатические, но и другие, не относящиеся к гемокоагуляции функции. Одной из них является обеспечение эмиграции лейкоцитов (лимфоцитов и др.) в очаг воспаления путем стимуляции их адгезии к сосудистой стенке с целью последующего участия в реализации иммунных реакций (направленных на локализацию, деструкцию и удаление флогогена) и репаративных процессах [5]. Показателем межклеточных взаимодействий при кооперации систем иммунитета и гомеостаза в условиях патологии может служить лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия (ЛТА) [6]. Однако при ХГСО, в патогенезе которого взаимосвязь между иммунитетом и гомеостазом является очень тесной, способность лимфоцитов вступать в контакт с тромбоцитами до конца не установлена, в то время как изучение этого феномена является актуальным для расширения знаний о патогенезе заболевания.

Цель исследования — анализ изменений активности лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (ЛТА) у больных хроническим гнойным средним отитом (ХГСО) до начала и на 2-е и 10-е сутки лечения.

Материалы и методы

В исследование были включены 299 пациентов (129 (43,1%) мужчин и 170 (56,9%) женщин в возрасте $38,0 \pm 4,3$ года), находившихся на стационарном лечении в оториноларингологическом отделении Краевой клини-

ческой больницы г. Читы. Все обследуемые были разделены на 2 группы. Первую составили 146 пациентов, страдающих туботимпанальной формой ХГСО (или мезотимпанитом) с мукозным течением воспалительного процесса в среднем ухе. Во вторую группу вошли 153 больных с хроническим эпитимпано-антральным средним отитом (эпитимпанитом) и кариозно-деструктивными изменениями в среднем ухе. В контрольную группу были включены 183 здоровых доноров — жителей Забайкальского края (79 (43,2%) мужчин и 104 (56,8%) женщин в возрасте $33,2 \pm 2,6$ года).

Всем обследуемым выполнялись стандартные общеклинические (общий и биохимический анализы крови, общий анализ мочи), бактериологическое (мазок из уха на микрофлору и чувствительность к антибиотикам) и рентгенологическое исследования. Состояние слуховой функции определялось с помощью акуметрии и тональной пороговой аудиометрии.

Лабораторные исследования у всех пациентов были проведены на момент поступления, на 2-е и 10-е сутки комбинированного (хирургического и консервативного) лечения в стационаре. Консервативная терапия включала туалет уха, местную антибактериальную терапию, прием антигистаминных средств и физиолечение. Хирургические вмешательства на среднем ухе (слухулучшающие операции у пациентов с мезотимпанитом, санирующие операции с элементами реконструкции слуховой цепи у больных с эпитимпанитом) выполнялись под контролем микроскопии в условиях общей анестезии с применением как заушного, так и эндаурального подходов.

Подсчет общего числа лейкоцитов в крови проводили стандартным методом в камере Горяева. Определение показателей ЛТА, относящихся к тестам для оценки функционального состояния иммунокомпетентных клеток и активности воспаления, проводили по методу, предложенному Ю.А. Витковским и соавт. (1999) [7]. Для совместного выделения лимфоцитов и тромбоцитов свежую гепаринизированную кровь наслаивали на градиент плотности фиколл-урографина (плотность 1,077 г/мл) и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 40 мин. После центрифугирования кольца, содержащие лимфоциты (нижнее) и тромбоциты (верхнее), собирали пипеткой в одну пробирку с 5 мл физиологического раствора и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 4 мин. Надосадочную жидкость сливали, осадок микроскопировали

в камере Горяева. ЛТА оценивали по числу лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов (ЛТАг) на 100 клеток. Результаты выражали в процентах и (в пересчете на абсолютное количество лимфоцитов в крови) $\times 10^9/\text{л}$. По суммарному количеству кровяных пластинок на поверхности одного лимфоцита, деленных на общее число ЛТАг рассчитывали среднее число тромбоцитов, присоединившихся к лимфоцитам, т.е. лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс (ЛТИ, или степень адгезии).

Для определения субпопуляций лимфоцитов в лунки полистирольного планшета вносили моноклональные антитела к антигенам CD3 (Т-лимфоциты), CD4 (Т-лимфоциты-хелперы), CD8 (цитотоксические Т-лимфоциты, или ЦТЛ), CD22 (В-лимфоциты), CD16 (натуральные киллеры — НК-клетки) («ДиагноТех», г.Москва), инкубировали 2 ч при комнатной температуре, далее дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS, pH = 7,4). Затем в «сенсibilизированные» лунки вносили взвесь выделенных из крови лимфоцитов и инкубировали их в течение 1 ч при 37°C. Не прикрепившиеся к поверхности планшета клетки удаляли двукратным промыванием PBS. Оставшиеся клетки (лимфоциты, несущие конкретный CD-антиген) подсчитывали в камере Горяева. Результаты выражали в $\times 10^9/\text{л}$. Для подсчета количества ЛТАг (%) с включением в них лимфоцитов определенных субпопуляций (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD22⁺, CD16⁺) дополнительно в лунки планшета добавляли аутологичную плазму, обогащенную тромбоцитами, в объемном соотношении 2:1 и инкубировали в течение 30 мин, после чего подсчитывали ЛТАг (в % на 100 клеток) в камере Горяева.

Для определения концентрации интерлейкинов (IL) в сыворотке крови (IL-1 β , IL-10) применяли метод твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с инструкциями производителя наборов реагентов («Вектор-Бест», г. Новосибирск).

Полученные данные обрабатывали с помощью пакетов программ BIOSTAT, STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., США). Характер распределения выборочных данных определяли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Для оценки значимости различий средних значений независимых выборок с нормальным распределением ис-

пользовали t-критерий Стьюдента. В случае сравнения средних значений нормально распределенных связанных совокупностей «до и после» применяли парный t-критерий Стьюдента. Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Поскольку выборочные данные групп исследования соответствовали нормальному распределению, мы использовали параметрические методы представления и анализа данных.

В ходе проведенного исследования у больных ХГСО на момент поступления обнаруживался лейкоцитоз ($p < 0,001$). Одновременно у пациентов с разными формами ХГСО отмечалось снижение общего количества лимфоцитов и числа их основных субпопуляций CD4⁺, CD16⁺, CD22⁺ в крови, что указывает на наличие Т-, НК- и В-клеточного иммунодефицита. Степень его выраженности соответствовала тяжести патологического процесса в среднем ухе (табл. 1).

Снижение активности ЛТА регистрировали при обеих формах ХГСО, более выраженное при кариозно-деструктивном течении болезни (табл. 2).

Так, у больных ХГСО отмечалось снижение относительного (%) и абсолютного ($\times 10^9/\text{л}$) количества ЛТАг (табл. 2). Наряду с дефицитом Т-клеток, несущих антиген CD4⁺ (на 16,5 и 23,5% ниже нормы при мезотимпаните и эптитимпаните соответственно), обнаруживалось снижение количества ЛТАг (%), образованных CD4⁺ лимфоцитами (на 38,2% при мезотимпаните и 8,6% при эптитимпаните). Одновременно с этим выявлялись агрегаты с включением CD16⁺ НК-клеток (табл. 1, 2). Отмечалось увеличение количества ЛТАг с CD3⁺ лимфоцитами (%), — у больных с мезотимпанитом на 11,4% и с эптитимпанитом на 64,8% относительно контрольных значений, в то время как общее количество Т-лимфоцитов (CD3⁺ клеток, $\times 10^9/\text{л}$) у больных ХГСО обеих клинических групп было сопоставимым с нормой (табл. 1, 2).

При межгрупповом сравнении показателей ЛТА выявлено, что в крови у лиц, страдающих эптитимпанитом, от-

Таблица 1

Общее количество лейкоцитов, лимфоцитов и их субпопуляционный состав в крови у больных ХГСО до лечения (M \pm m)

Показатели		Здоровые доноры (n = 183)	Больные с мезотимпанитом (n = 146)	Больные с эптитимпанитом (n = 153)
Общее количество лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$		6,41 \pm 0,91	10,62 \pm 0,72 $p < 0,001$	10,35 \pm 0,53 $p < 0,001$
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$		2,11 \pm 0,01	1,92 \pm 0,08 $p = 0,019$	1,82 \pm 0,06 $p < 0,001$
Субпопуляциии лимфоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	CD3 ⁺	1,28 \pm 0,15	1,14 \pm 0,09	1,01 \pm 0,07
	CD4 ⁺	0,85 \pm 0,03	0,71 \pm 0,06 $p = 0,037$	0,65 \pm 0,04 $p < 0,001$
	CD8 ⁺	0,56 \pm 0,10	0,51 \pm 0,09	0,48 \pm 0,08
	CD16 ⁺	0,28 \pm 0,03	0,21 \pm 0,05	0,18 \pm 0,04 $p = 0,046$
	CD22 ⁺	0,39 \pm 0,07	0,25 \pm 0,03 $p = 0,049$	0,21 \pm 0,03 $p = 0,018$

Примечание. p — уровень статистической значимости различий по сравнению с группой здоровых доноров.

носительное (%) и абсолютное ($\times 10^9/\text{л}$) количество ЛТАг превышало их содержание у больных с мезотимпанитом более чем в 1,3 раза, а количество кровяных пластинок, адгезированных на поверхности одного лимфоцита (ЛТИ), было в 2,2 раза больше, чем в группе сравнения (табл. 2). Более высокая активность ЛТА при эптитимпаните сочеталась с более выраженной адгезией с тромбоцитами лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺ и CD16⁺ — на 47,9, 47,9 и 75,0% соответственно по сравнению с показателями у больных с мезотимпанитом (табл. 2). При этом изменение ЛТИ у пациентов сравниваемых клинических групп носило разнонаправленный характер. Так, степень адгезии у больных с мезотимпанитом была на 43,9% ниже, а у пациентов с эптитимпанитом, напротив, на 22,6% выше относительно ЛТИ у здоровых доноров (табл. 2).

На 2-е сутки комбинированного лечения у пациентов обеих клинических групп отмечалось увеличение показателей ЛТА по сравнению с нормой — относительного количества ЛТАг (при нормализации их абсолютного числа) и ЛТИ (степени адгезии). Так, количество ЛТАг (%) увеличивались у пациентов с мезотимпанитом на 94,6%, а у лиц, страдающих эптитимпанитом — на 59,8% сравнительно с их исходными значениями на момент поступления (табл. 3). Наряду с этим численность ЛТАг (%) на 2-е сутки лечения у больных ХГСО первой (с мезотимпанитом) и второй (с эптитимпанитом) групп оказалась выше, чем у здоровых доноров — на 10,6 и на 18,7% соответственно. При этом их относительное количество у пациентов второй группы превышало концентрацию ЛТАг (%) в крови у больных первой группы на 7,3% (табл. 3).

На фоне развивающегося у больных с мезотимпанитом и эптитимпанитом на 2-е сутки лечения дефицита Т-клеток (CD3⁺, $\times 10^9/\text{л}$) (на 33,6 и 43,7% сравнительно с нормой соответственно) относительное содержание ЛТАг с CD3⁺ лимфоцитами в их крови становилось выше по сравнению с исходными значениями на момент поступления (в 1,8 и 1,6 раза соответственно) и у здоровых доноров (в 2,0 и 2,7 раза соответственно) (табл. 3). Разница между количеством ЛТАг с включением CD3⁺ лимфо-

цитов (%) у больных ХГСО первой и второй клинических групп составила 36,2% с преобладанием их численности при эптитимпаните (табл. 3).

На 2-е сутки лечения у больных с мезотимпанитом и эптитимпанитом прирост количества содержащих CD4⁺ лимфоциты ЛТАг в крови (%) относительно исходных значений (в 2,5 и 1,8 раза соответственно) и нормы (на 56,0 и 72,6% соответственно) сочетался с сохраняющимся (и даже в некоторой степени более выраженным, чем до лечения) дефицитом CD4⁺ Т-клеток ($\times 10^9/\text{л}$) (табл. 3). При этом относительное содержание агрегатов с включением CD4⁺ лимфоцитов у пациентов с кариозно-деструктивным течением ХГСО было на 10,7% выше, чем у больных с мезотимпанитом (табл. 3).

Такая же тенденция прослеживалась и в отношении абсолютного количества CD16⁺ НК-клеток и относительного содержания ЛТАг с CD16⁺ НК-клетками (%) у больных с ХГСО. Снижение абсолютного количества CD16⁺ НК-клеток ($\times 10^9/\text{л}$) в крови при мезотимпаните и эптитимпаните сопровождалось увеличением относительного количества ЛТАг с CD16⁺ НК-клетками (на 57,6 и 31,3% соответственно) по сравнению с их исходными значениями на момент поступления в стационар (табл. 3). При этом у больных с эптитимпанитом на 2-е сутки лечения содержание ЛТАг с НК-клетками (%) было 1,5 раза выше, чем во второй группе больных ХГСО (табл. 3).

Одновременно с этим у больных с мезотимпанитом на 2-е сутки лечения выявлялось увеличение числа кровяных пластинок, адгезированных на поверхности одного лимфоцита, по сравнению со значениями ЛТИ на момент поступления (в 2,0 раза) и в контроле (на 10,7%) (табл. 3). В крови у пациентов с эптитимпанитом, наоборот, степень адгезии оказалась ниже, чем до лечения на 9,2%, но выше ЛТИ у здоровых доноров на 11,3% (табл. 3).

На 10-е сутки комплексного лечения у больных ХГСО отмечалась тенденция к нормализации субпопуляционного состава лимфоцитов и значений ЛТА. При этом общее количество лимфоцитов ($\times 10^9/\text{л}$) у пациентов с мезотимпанитом и абсолютное количество CD3⁺ и CD16⁺ лимфоци-

Таблица 2

Показатели лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии у больных ХГСО до лечения ($M \pm m$)

Показатели	Здоровые доноры (n = 183)	Больные с мезотимпанитом (n = 146)	Больные с эптитимпанитом (n = 153)
ЛТАг, %	14,69 ± 0,05	8,35 ± 0,18 p1<0,001	10,91 ± 0,17 p1,2<0,001
ЛТАг, $\times 10^9/\text{л}$	0,30 ± 0,03	0,17 ± 0,02 p1<0,001	0,23 ± 0,02 p2<0,001
ЛТИ	3,19 ± 0,08	1,79 ± 0,07 p1<0,001	3,91 ± 0,12 p1,2<0,001
% ЛТАг с CD3 ⁺ Т-лимфоцитами	7,81 ± 0,04	8,70 ± 0,06 p1<0,001	12,87 ± 0,05 p1,2<0,001
% ЛТАг с CD4 ⁺ Т-лимфоцитами	36,47 ± 1,13	22,53 ± 0,07 p1<0,001	33,33 ± 0,06 p1 = 0,005 p2<0,001
% ЛТАг с CD8 ⁺ Т-лимфоцитами	0	0	0
% ЛТАг с CD22 ⁺ В-лимфоцитами	0	0	0
% ЛТАг с CD16 ⁺ НК-лимфоцитами	0	19,04 ± 0,04	33,33 ± 0,06 p2<0,001

Примечание. p1 — уровень статистической значимости различий по сравнению с группой здоровых доноров; p2 — уровень статистической значимости различий между больными с мезотимпанитом и эптитимпанитом.

тов ($\times 10^9/\text{л}$) у больных ХГСО обеих групп исследования восстанавливалось до нормы. Количество CD4^+ Т-клеток ($\times 10^9/\text{л}$), учитывая незначительное его повышение, в среднем сохранялось ниже, чем у здоровых доноров (табл. 4).

Абсолютное количество ЛТАг ($\times 10^9/\text{л}$) у больных ХГСО на 10-е сутки (как и на 2-й день) лечения сохранялось в пределах нормы. При этом относительное количество ЛТАг (%) снижалось по сравнению с их количеством

Таблица 3

Показатели лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии у больных ХГСО на 2-е сутки лечения ($M \pm m$)

Показатели	Здоровые доноры (n = 183)	Больные с мезотимпанитом (n = 146)	Больные с эпитимпанитом (n = 153)
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	2,11 \pm 0,01	2,03 \pm 0,06	1,95 \pm 0,03 p1<0,001 p3 = 0,263
ЛТАг, %	14,69 \pm 0,05	16,25 \pm 0,07 p1,3<0,001	17,43 \pm 0,04 p1,2,3<0,001
ЛТАг, $\times 10^9/\text{л}$	0,31 \pm 0,03	0,33 \pm 0,04 p3<0,001	0,34 \pm 0,05
ЛТИ	3,19 \pm 0,08	3,53 \pm 0,06 p1 = 0,005 p3<0,001	3,55 \pm 0,03 p1<0,001 p3 = 0,003
CD3^+ Т-лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	1,28 \pm 0,15	0,85 \pm 0,06 p1 = 0,008 p3 = 0,007	0,72 \pm 0,03 p1,3<0,001
% ЛТАг с CD3^+ Т-лимфоцитами	7,81 \pm 0,04	15,29 \pm 0,05 p1,3<0,001	20,83 \pm 0,04 p1,2,3<0,001
CD4^+ Т-лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,85 \pm 0,03	0,58 \pm 0,11 p1<0,001	0,54 \pm 0,08 p1<0,001
% ЛТАг с CD4^+ Т-лимфоцитами	36,47 \pm 1,13	56,89 \pm 0,12 p1,3<0,001	62,96 \pm 0,05 p1,2,3<0,001
CD16^+ NK-клетки, $\times 10^9/\text{л}$	0,28 \pm 0,03	0,10 \pm 0,07 p1 = 0,018	0,08 \pm 0,04 p1<0,001
% ЛТАг с CD16^+ NK-клетками	0	30,00 \pm 0,06 p3<0,001	43,75 \pm 0,03 p2,3<0,001

Примечание. p1 — уровень статистической значимости различий по сравнению с группой здоровых доноров; p2 — между больными с мезотимпанитом и эпитимпанитом; p3 — до и на 2-е сутки лечения.

Таблица 4

Показатели лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии у больных ХГСО на 10-е сутки лечения ($M \pm m$)

Показатели	Здоровые доноры (n = 183)	Больные с мезотимпанитом (n = 146)	Больные с эпитимпанитом (n = 153)
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	2,11 \pm 0,01	2,02 \pm 0,06	1,93 \pm 0,09 p1<0,001
ЛТАг, %	14,69 \pm 0,05	13,36 \pm 0,07 p1,3,4<0,001	13,47 \pm 0,06 p1,3,4<0,001
ЛТАг, $\times 10^9/\text{л}$	0,31 \pm 0,03	0,27 \pm 0,05 p3 = 0,041	0,26 \pm 0,06
ЛТИ	3,19 \pm 0,08	3,08 \pm 0,07 p3,4<0,001	3,17 \pm 0,05 p3,4<0,001
CD3^+ Т-лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	1,28 \pm 0,15	1,25 \pm 0,06 p4<0,001	1,19 \pm 0,07 p4<0,001
% ЛТАг с CD3^+ Т-лимфоцитами	7,81 \pm 0,04	8,60 \pm 0,07 p1,4<0,001	9,21 \pm 0,05 p1,2,3,4<0,001
CD4^+ Т-лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,85 \pm 0,03	0,62 \pm 0,03 p1<0,001	0,58 \pm 0,06 p1<0,001
% ЛТАг с CD4^+ Т-лимфоцитами	36,47 \pm 1,13	43,54 \pm 0,06 p1,3,4<0,001	44,82 \pm 0,05 p1,3,4<0,001
CD16^+ NK-клетки, $\times 10^9/\text{л}$	0,28 \pm 0,03	0,23 \pm 0,04	0,21 \pm 0,03
% ЛТАг с CD16^+ NK-клетками	0	0	0

Примечание. p1 — уровень статистической значимости различий по сравнению с группой здоровых доноров; p2 — между больными с мезотимпанитом и эпитимпанитом; p3 — до и на 10-е сутки лечения; p4 — на 2-е и 10-е сутки лечения.

на 2-е сутки лечения и в контроле — в первой группе на 17,8 и 9,0%, во второй группе — на 22,7 и 8,3% соответственно. Однако по сравнению с периодом до лечения оно, напротив, возросло — на 60,0 и 23,5% при мезотимпаните и эпитимпаните соответственно (табл. 4).

Относительное количество ЛТАг с CD3⁺ лимфоцитами (%) в крови у пациентов с мезотимпанитом и эпитимпанитом на 10-е сутки наблюдения было выше контрольных значений (на 10,1 и 17,9% соответственно), но с тенденцией к нормализации их уровня относительно 2-го дня лечения (со снижением на 43,8 и 55,8% соответственно). При этом у пациентов с кариозно-деструктивным течением ХГСО количество ЛТАг с CD3⁺ Т-клетками (%) было на 7,0% выше, чем у больных с мукозным течением болезни (табл. 4).

Количество ЛТАг с CD4⁺ Т-клетками (%) у пациентов первой и второй групп сохранялось выше нормы (на 19,4 и 22,9% соответственно), но снижалось относительно их содержания в крови на 2-е сутки лечения (на 23,5 и 28,8% соответственно) (табл. 4). Прирост относительного количества ЛТАг с включением в их состав CD4⁺ Т-клеток на 10-е сутки лечения по сравнению с исходными данными (до лечения) у больных с мезотимпанитом и эпитимпанитом составил 93,3 и 34,5% соответственно (табл. 4).

В конце лечения также отмечалась нормализация ЛТИ. Он снижался у больных с мезотимпанитом и эпитимпанитом по сравнению с его значениями на 2-е сутки лечения на 12,7% и 10,7% соответственно, а у пациентов с кариозно-деструктивным течением ХГСО относительно периода до лечения на 18,9%. В то же время увеличение ЛТИ при мезотимпаните с момента госпитализации составило 72,1% (табл. 4).

Таким образом, развитие патологического процесса в среднем ухе по кариозно-деструктивному и мукозному вариантам ассоциируется с изменениями активности ЛТА разной степени выраженности и (в случае ЛТИ) направленности. Так в чем же биологическая сущность этого феномена при ХГСО?

ЛТА, являясь объективным тестом, характеризует состояние иммунитета и гемостаза [8, 9]. Воспалительный процесс в среднем ухе, как и любой другой локализации, сопровождается явлениями первичной и вторичной альтерации с нарушением целостности эндотелия сосудов, изменением его адгезивных свойств, что побуждает эмиграцию лейкоцитов в очаг воспаления с целью его санации и осуществления репаративных функций, направленных на восстановление ткани после повреждения флогогеном и медиаторами воспаления [10]. Тромбоциты, синтезируя и секретируя значительное число биологически активных соединений, способны контактировать напрямую с клетками эндотелия сосудов, гранулоцитами, моноцитами и лимфоцитами, обеспечивая их взаимодействие с коллагеновыми волокнами. Более того, тромбоциты, содержащие сократительные белки и способные к самостоятельному передвижению, содействуют эмиграции лейкоцитов в очаг повреждения, осуществляют трофическую и репаративную функции путем секреции соответствующих факторов [11, 12]. Особенность лимфоцитов адгезировать на своей поверхности тромбоциты связана с экспрессией поверхностных молекул контактного взаимодействия — прежде всего, интегринов (β -суперсемейства, включая LFA, или Lymphocyte Function Associated Antigen) и селектинов (Е на лейкоцитах и Р на тромбоцитах), которые

опосредуют взаимодействие клеток между собой, с эндотелием и субэндотелием, способствуют развитию иммунных реакций, тромбоза и реализации феномена ЛТА [13, 14].

Осуществление контроля за механизмом ЛТА происходит также за счет сбалансированного действия провоспалительных и противовоспалительных цитокинов на тромбоциты и лейкоциты [13].

Результаты наших исследований позволяют утверждать, что при ХГСО происходят существенные сдвиги со стороны клеточных и гуморальных факторов защиты, связанных с системой крови. Мы установили, что тенденция к снижению общего и относительного количества лимфоцитов в крови у пациентов с ХГСО находится в прямой зависимости от тяжести течения воспалительного процесса в среднем ухе. Это объясняется тем, что при хроническом воспалении ведущими клетками, эмигрирующими в очаги альтерации, являются макрофаги, дифференцирующиеся из моноцитов крови, и лимфоциты [3, 14, 15]. Вместе с лимфоцитопенией у больных ХГСО регистрировалось снижение значений ЛТА относительно нормы, однако факторы, определяющие количество агрегатов лимфоцитов и тромбоцитов в крови, были различными и обуславливались характером течения патологического процесса.

Так, у больных с хроническим туботимпанальным гнойным средним отитом малое количество агрегатов, вероятнее всего, явилось результатом как Т-клеточного иммунодефицита (ввиду снижения количества Т-лимфоцитов-хелперов), так и феномена лейкоцитарной депрессии, характерного для вялотекущих воспалительных заболеваний [16]. Это подтверждается уменьшением ЛТИ у больных с мезотимпанитом относительно ЛТИ у здоровых лиц (табл. 1).

При холестеатомно-деструктивном процессе в среднем ухе ЛТИ, напротив, превышал норму. Известно, что активированные лимфоциты адгезируют тромбоциты и, благодаря ретракции последних, продвигаются через поврежденную стенку сосуда вглубь травмированного участка ткани, где развивается иммунный ответ [17]. Можно думать, что снижение относительного количества ЛТАг у пациентов с эпитимпано-антральной формой ХГСО явилось результатом усиленной эмиграции лимфоцитов из сосудистого русла в очаг повреждения, что на фоне хронического воспаления может совмещаться с истощением гемопоэтической функции костного мозга.

С другой стороны, известно, что при различных патологических процессах сдвиги ЛТА протекают в две фазы. Вначале число лимфоцитов и связанных с ними кровяных пластинок увеличивается в 2–3 раза, а по мере развития заболевания резко снижается. Этим, по-видимому, и объясняется установленное нами снижение относительного (%) и (при мезотимпаните) абсолютного ($\times 10^9/\text{л}$) количества ЛТАг в крови у больных ХГСО на момент поступления в стационар ввиду длительно протекающего воспалительного процесса. Однако на 2-е сутки после оперативного вмешательства на фоне снижения абсолютного количества Т-лимфоцитов и НК-клеток в крови относительное содержание ЛТАг увеличивалось (в 1,6 и 2 раза в первой и второй группах соответственно) с дальнейшей тенденцией к нормализации их численности на 10-е сутки консервативной терапии. Абсолютное количество ЛТАг восстанавливалось уже на 2-е сутки лечения.

Содержание интерлейкинов IL-1 β и IL-10 в сыворотке крови (пг/мл) у больных ХГСО до лечения (M \pm m)

Группы исследования	IL-1 β	IL-10
Здоровые доноры (n = 183)	0	0,32 \pm 0,13
Больные с мезотимпанитом (n = 146)	12,43 \pm 0,08	1,44 \pm 0,07 p1<0,001
Больные с эптитимпанитом (n = 153)	18,59 \pm 0,05 p2<0,001	1,72 \pm 0,09 p1<0,001, p2 = 0,014

Примечание. p1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой здоровых доноров; p2 – между больными с мезотимпанитом и эптитимпанитом.

Увеличение активности ЛТАг при воспалении (равно как и на 2-й день оперативного вмешательства у больных ХГСО) может быть связано с повреждением тканей, поступлением в кровь индукторов агрегации тромбоцитов (АДФ, катехоламинов, тромбина, фактора активации тромбоцитов и др.) и секрецией провоспалительных цитокинов. Известно, что IL-1 β и IL-2, стимулируя функции макрофагов, Т-хелперов 1 и 2 типов, НК- и НКТ-клеток, самым активным образом участвуют в механизмах ЛТА в очаге воспаления [18]. При действии провоспалительного IL-1 β активируются макрофаги, которые продуцируют факторы активации Th1-лимфоцитов. Th1, в свою очередь, вырабатывают IL-2, обладающий свойствами митогена в отношении Т-лимфоцитов всех субпопуляций, НК- и НКТ-клеток. Кроме того, IL-2 является специфическим индуктором экспрессии иммуноглобулиноподобных молекул адгезии ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) на Т- и В-лимфоцитах [19].

Нами выявлено, что у лиц, страдающих ХГСО, повышалось содержание провоспалительного IL-1 β в сыворотке крови (табл. 5). При этом у больных с эптитимпано-антральной формой ХГСО концентрация IL-1 β в крови была на 49,5% выше, чем у пациентов с хроническим туботимпанальным средним отитом.

Различия в содержании IL-1 β в сыворотке крови у пациентов с мезотимпанитом и эптитимпанитом, по нашему мнению, определяются участием продуктов тканевого распада и других медиаторов воспаления (в том числе лимфоцитарных) в активации вырабатывающих его макрофагов при условии продолжающегося воспаления, влияющего на особенности морфологических изменений в среднем ухе при ХГСО.

Общеизвестно, что регресс воспаления связан с повышением секреции клетками очага, в частности толерогенными макрофагами с иммунорегуляторной активностью и супрессорными регуляторными Т-лимфоцитами (Treg), противовоспалительных цитокинов — IL-10, трансформирующего фактора роста β (TGF β) и др. (результатом чего является повышение их содержания в крови). Увеличение содержания IL-10 в микроокружении, по данным литературы, сопровождается торможением ЛТА и, как следствие, миграции иммунокомпетентных клеток в очаг повреждения [7, 19]. Оказываемый IL-10 эффект позволяет регулировать, а на завершающей стадии блокировать миграционный поток лимфоцитов в очаг воспаления. Одновременно с этим IL-10, замедляя свертываемость крови и стимулируя фибринолиз, устраняет гиперкоагуляцию и стаз (первичный и венозный), являющиеся следствием изменений реологических свойств крови и микроцирку-

ляции, связанных с воспалением [20]. Однако у лиц с тяжелым кариозно-деструктивным течением отита содержание IL-10 было выше, чем у пациентов с мукозным течением ХГСО, только на 19,4% (табл. 5), что характеризует явную недостаточность IL-10-зависимого противовоспалительного ответа у пациентов с хроническим эптитимпано-антральным средним отитом.

Заключение

При ХГСО способность лимфоцитов адгезировать на своей поверхности тромбоциты снижается. Кариозно-деструктивные изменения в среднем ухе сопровождаются более выраженными изменениями ЛТА. Динамика значений ЛТА на 2-е и 10-е сутки комбинированного лечения позволяет оценить степень его эффективности. Содержание IL-1 β в крови у больных ХГСО коррелирует с тяжестью воспалительного процесса в среднем ухе — при эптитимпаните оно в 1,5 раза выше, чем при мезотимпаните. Концентрация противовоспалительного IL-10 у пациентов с деструктивным течением воспаления в среднем ухе, напротив, превышает его содержание в крови при мукозном течении ХГСО, но, по-видимому, является недостаточной для благоприятного завершения воспалительного процесса в ухе.

Список литературы

1. Гаров Е.В., Гарова Е.Е. Современные принципы диагностики и лечения пациентов с хроническим гнойным средним отитом. *Русский медицинский журнал*. 2012; 27: 1355-9. DOI: 10.1017/s0022215116005375
2. Пальчун В.Т. *Оториноларингология: руководство для врачей*. М.: Гэотар-Медиа; 2013. 616 с.
3. Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В. Итоги 10-летнего исследования механизмов лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии. *Забайкальский медицинский вестник*. 2008; 2: 36-41.
4. Фрейдлин И.С. Взаимосвязи врожденного и приобретенного иммунитета при инфекциях (ревизия догм). *Инфекция и иммунитет*. 2011; 1(3): 199-206.
5. Витковский Ю.А., Солпов А.В., Кузник Б.И. Тромбоциты усиливают адгезию лимфоцитов к экстрацеллюлярному матриксу. В кн.: *XX съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова. Тезисы докладов*. М., 2007; 178.
6. Сахарова Д.А., Витковский Ю.А., Емельянова А.Н. Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия у больных хроническим вирусным гепатитом С. В кн.: *Гепатология сегодня: сборник XVIII Российского конгресса*. М.: 2013; 41.
7. Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В. Феномен лимфоцитарно-тромбоцитарного розеткообразования. *Иммунология*. 1999; 4: 35-7.
8. Шангина А.М. Показатели сосудисто-тромбоцитарного гемостаза у пациентов с первичной подагрой. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2011;101(2): 54-6.

9. Сивкова А.А. Патогенетическое значение феномена лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии и провоспалительных цитокинов в развитии неалкогольной жировой болезни печени. *Врач-аспирант*. 2011; 46 (3-4): 578-82.

10. Семинский И.Ж., Майборода А.А. Особенности клеточных реакций в очагах воспаления разной этиологии. Сообщение 4. Факторы, механизмы и критерии хронизации воспаления. *Журнал инфекционной патологии*. 2000; 7 (3-4): 33-8.

11. Миromanov А.М. Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия у больных с переломами длинных трубчатых костей и хроническим остеомиелитом. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2010; 30 (1): 104-8.

12. Vitkovsky Y. Status of platelet-lymphocyte aggregation in circulating blood of patients with type 1 diabetes with and without diabetic nephropathy. *Israel Medical Association Journal*. 2008; 10 (10): 691-4.

13. Витковский Ю.А., Кузник Б.И., Солпов А.В. Патогенетическое значение лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии. *Медицинская иммунология*. 2009; 3: 141-3.

14. Кузник Б.И., Витковский Ю.А., Солпов А.В. Адгезивные молекулы и лейкоцитарно-тромбоцитарное взаимодействие. *Вестник гематологии*. 2006; 2 (2): 42-55.

15. Яшан А.И., Герасимюк М.И. Характер изменений соотношений субпопуляций лимфоцитов у больных хроническим декомпенсированным тонзиллитом. *Вестник оториноларингологии*. 2015; 2: 27-30.

16. Сахарова Д.А., Терешков П.П., Витковский Ю.А. Состояние клеточного иммунитета при хроническом вирусном гепатите С в зависимости от некоторых клинических характеристик. *Врач-аспирант*. 2013; 61 (6): 481-8.

17. Sigal A., Bleijs D.A., Grabovsky V. The LFA-1 integrin supports rolling adhesion on ICAM-1 under physiological shear flow in a permissive cellular environment. *Immunology*. 2000; 165: 442-542. DOI: 10.4049/jimmunol.165.1.442

18. Витковский Ю.А. Влияние интерлейкинов 1 β , 2, 10, и 16 на взаимодействие лимфоцитарно-тромбоцитарных агрегатов с экстрацеллюлярным матриксом. *Иммунология*. 2006; 27 (3): 141-3.

19. Solpov A., Shenkman B., Vitkovsky Y., Brill G., Koltakov A., Farzam N., Varon D., Bank I., Savion N. Platelets enhance CD4+ lymphocyte adhesion to extracellular matrix under flow conditions: Role of platelet aggregation, integrins, and non-integrin receptors. *Thrombosis and Haemostasis*. 2006; 95: 815-21. DOI: 10.1160/th05-07-0524

20. Weyrich A.S., Zimmerman G.A. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol*. 2004; 25 (9): 489-95. DOI: 10.1016/j.it.2004.07.003

References

1. Garov E.V., Garova E.E. [Modern principles of diagnosis and treatment of patients with chronic purulent otitis media]. *Russkii medicinskii zhurnal [Russian Medical Journal]*. 2012; 27: 1355-9. DOI: 10.1017/s0022215116005375 (In Russian)

2. Pal'chun V.T. [Otorhinolaryngology]. M.: Gehotar-Media; 2013. 616 c. (In Russian)

3. Vitkovskii Yu.A., Kuznik B.I., Solpov A.V. [The results of 10 years research mechanisms of lymphocyte-platelet adhesion]. *Zabajkalskii medicinskii vestnik [Transbaikalian Medical Bulletin]*. 2008; 2: 36-41. (In Russian)

4. Frejdlin I.S. [The relationship of innate and acquired immunity in infections (the revision of the classical dogma)]. *Infekciya i immuni-*

tet [Russian Journal of Infection and Immunity]. 2011; 1 (3): 199-206. (In Russian)

5. Vitkovskii Yu.A., Solpov A.V., Kuznik B.I. [Platelets enhance adhesion of lymphocytes to extracellular matrix]. In: *XX s'ezd Fiziologicheskogo obshchestva im. I.P. Pavlova. Tezisy dokladov [XX Congress of the Physiological Society. I.P. Pavlova. Theses of reports.]*. M., 2007; 178. (In Russian)

6. Saharova D.A., Vitkovskii Yu.A., Emel'yanova A.N. [Lymphocyte-platelet adhesion in patients with chronic viral hepatitis C]. *Gepatologiya segodnya: sbornik XVIII Rossijskogo kongressa [Hepatology today: a collection of the XVIIIth Russian Congress.]*. M.: 2013; 41. (In Russian)

7. Vitkovskii Yu.A., Kuznik B.I., Solpov A.V. [The phenomenon of lymphocyte-platelet rosette]. *Immunologiya [Immunology]*. 1999; 4: 35-7. (In Russian)

8. Shangina A.M. [The indicators of vascular-platelet hemostasis in patients with primary gout]. *Sibirskii medicinskii zhurnal (Irkutsk) [The Siberian Medical Journal]*. 2011; 101(2): 54-6. (in Russian)

9. Sivkova A.A. [Pathogenetic significance of the phenomenon of lymphocyte-platelet adhesion and Pro-inflammatory cytokines in the development of nonalcoholic fatty liver disease]. *Vrach-aspirant [Postgraduate Doctor]*. 2011; 46(3-4): 578-82. (in Russian)

10. Seminskii I.Zh., Majboroda A.A. [Features cellular reactions in inflammation of different etiology. Message 4. Factors, mechanisms and criteria for the chronicity of inflammation]. *Zhurnal infekcionnoj patologii [Journal of Infectious Diseases]*. 2000; 7(3-4): 33-8. (In Russian)

11. Miromanov A.M. [Lymphocyte-platelet adhesion in patients with fractures of long tubular bones, and chronic osteomyelitis]. *Sibirskii nauchnyj medicinskii zhurnal [The Siberian Scientific Medical Journal]*. 2010; 30(1): 104-8. (In Russian)

12. Vitkovskiy Yu. Status of platelet-lymphocyte aggregation in circulating blood of patients with type 1 diabetes with and without diabetic nephropathy. *Israel Medical Association Journal*. 2008; 10(10): 691-4.

13. Vitkovskii Yu.A., Kuznik B.I., Solpov A.V. [Pathogenetic significance of lymphocyte-platelet adhesion]. *Medicinskaya immunologiya [Medical Immunology]*. 2009; 3: 141-3. (In Russian)

14. Kuznik B.I., Vitkovskii Yu.A., Solpov A.V. [Adhesion molecules and leukocyte-platelet interaction]. *Vestnik gematologii [The bulletin of hematology]*. 2006; 2(2): 42-55. (In Russian)

15. Yashan A.I., Gerasimyuk M.I. [The nature of the changes in the ratios of lymphocyte subpopulations in patients with chronic decompensated tonsillitis]. *Vestnik otorinolaringologii [The bulletin of otorinolaryngology]*. 2015; 2: 27-30. (In Russian)

16. Saharova D.A., Tereshkov P.P., Vitkovskii Yu.A. [The state of cellular immunity in chronic hepatitis C depending on some clinical characteristics]. *Vrach-aspirant [Postgraduate Doctor]*. 2013; 61(6): 481-8. (in Russian)

17. Sigal A., Bleijs D.A., Grabovsky V. The LFA-1 integrin supports rolling adhesion on ICAM-1 under physiological shear flow in a permissive cellular environment. *Immunology*. 2000; 165: 442-542. DOI: 10.4049/jimmunol.165.1.442

18. Vitkovskii Yu.A. [Influence of interleukins 1 β , 2, 10, and 16 on the interaction of lymphocyte-platelet aggregates with the extracellular matrix]. *Immunologiya [Immunology]*. 2006; 27(3): 141-3. (in Russian)

19. Solpov A., Shenkman B., Vitkovsky Y., Brill G., Koltakov A., Farzam N., Varon D., Bank I., Savion N. Platelets enhance CD4+ lymphocyte adhesion to extracellular matrix under flow conditions: Role of platelet aggregation, integrins, and non-integrin receptors. *Thrombosis and Haemostasis*. 2006; 95: 815-21. DOI: 10.1160/th05-07-0524

20. Weyrich A.S., Zimmerman G.A. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol*. 2004; 25(9): 489-95. DOI: 10.1016/j.it.2004.07.003

Сведения об авторах

Байке Елена Викторовна — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры оториноларингологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, докторант кафедры патофизиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Уразова Ольга Ивановна — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, профессор кафедры патофизиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

УДК 616-006

Применение биополимерных материалов для направленного подведения лекарств в терапии сопровождения лучевого лечения больных с опухолями головы и шеи

Бойко А.В.¹, Геворков А.Р.¹, Олтаржевская Н.Д.², Швец В.И.³, Шашков С.В.¹

¹ Городское бюджетное учреждение здравоохранения «Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А.Герцена» — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

125284, Москва, 2-й Боткинский проезд, д. 3

² ООО «Колетекс». 115093, Москва, ул. Павловская, д. 1, нежилые помещения № 4-6

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский технологический университет» (Институт тонких химических технологий имени М.В.Ломоносова) Министерства образования и науки Российской Федерации. 119454, Москва, пр. Вернадского, д. 78

В работе освещены основные вопросы эффективности и переносимости лучевого и химиолучевого лечения больных опухолями головы и шеи. Представлен спектр побочных эффектов и затронуты ключевые аспекты терапии сопровождения. Особое внимание уделено роли местной ранозаживляющей терапии в борьбе с мукозитом и дерматитом в рамках обеспечения оптимальных сроков лучевой терапии, а также сохранения качества жизни пациентов на всех этапах их лечения и реабилитации. Отдельно описаны возможности эффективной местной доставки лекарственных средств путем применения отечественных биополимерных наноматериалов. Так, использование биополимера альгината натрия в качестве матрицы в сочетании с деринатом позволило получить необходимый ранозаживляющий эффект, а добавление других лекарственных наделило препарат противомикробным, обезболивающим, антиоксидантным, либо радиомодифицирующим действием. Применение адекватной терапии сопровождения с ранозаживляющим компонентом позволяет соблюдать оптимальные сроки лечения, что было достоверно показано на собственном опыте.

Ключевые слова: опухоли головы и шеи, лучевая терапия, биополимерные наноматериалы, сопроводительная терапия.

Для цитирования: Бойко А.В., Геворков А.Р., Олтаржевская Н.Д., Швец В.И., Шашков С.В. Применение биополимерных материалов для направленного подведения лекарств в терапии сопровождения лучевого лечения больных с опухолями головы и шеи. Патогенез. 2018; 16(1):76–82

DOI:

Для корреспонденции: Геворков Артем Рубенович, e-mail: torsurg@mail.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 15.11.2017

Biopolymeric materials for targeted drug delivery in the therapy accompanying radiation treatment of patients with head and neck tumors

Boyko A.V.¹, Gevorkov A.R.¹, Oltarzhevskaya N.D.², Shvets V.I.³, Shashkov S.V.¹

¹ P.A. Gertsen Moscow Research Institute of Oncology, 2nd Botkinskiy Proezd 3, Moscow 125284, Russian Federation

² Koletex Ltd, Pavlovskaya Str. 21, Non-Residential Premises 4-6, Moscow 115093, Russian Federation

³ M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies at the Moscow Technological University, Prospekt Vernadskogo 78, Moscow 119454, Russian Federation

The study highlighted major aspects of efficacy and tolerability of radiation and chemoradiation treatment in patients with head and neck tumors. A range of side effects is presented and key aspects of supportive care are discussed. Particular attention was paid to local wound healing as the main cure for mucositis and dermatitis and key factor for optimal timing of radiotherapy as well as to preserving patients' quality of life. Possibilities for effective local drug delivery using biopolymeric nanomaterials are described. Thus, the use of biopolymeric sodium alginate as a matrix in combination with derinate allowed to achieve the required wound-healing effect. Addition of other drugs provided anti-infection, analgesic, antioxidant or radiomodifying effects. Appropriate supportive therapy in combination with a wound healing component allows to adhere to the optimal treatment duration, as our experience has convincingly demonstrated.

Key words: head and neck tumors, radiotherapy, biopolymeric nanomaterials, supportive care.

For citation: Boyko A.V., Gevorkov A.R., Oltarzhevskaya N.D., Shvets V.I., Shashkov S.V. [Biopolymeric materials for targeted administration of drugs in the therapy accompanying radiation treatment of patients with head and neck tumor]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2018; 16(1): 76–82 (in Russian)

DOI:

For correspondence: Gevorkov Artem Rubenovich, e-mail: torsurg@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received: 15.11.2017

Опухоли головы и шеи представляют собой значительную группу злокачественных новообразований, которые нередко диагностируются на поздних стадиях и требуют комбинированных и комплексных подходов к лечению. В России за последние 5 лет наблюдаются тенденции к росту заболеваемости новообразованиями полости рта и глотки — с 23,1 до 26 и с 10,1 до 11,5 случаев на 100 000 населения соответственно [1, 2]. Причем в 2015 году у 60,7% из 8184 больных с опухолями полости рта и у 80,6% из 4940 пациентов с поражением глотки были исходно выявлены III–IV стадии процесса. Для злокачественных новообразований головы и шеи характерно местное распространение опухолевого процесса за счет выхода за пределы органа и вовлечения соседних структур, что во многом определяет тактику лечения и прогноз течения заболевания. Отличительной особенностью является склонность к лимфогенному регионарному метастазированию с этапным поражением групп узлов. Таким образом, особое значение имеет адекватное применение таких локальных методов, как лучевая терапия. При этом перед онкологами стоит не только задача излечения от онкологического процесса, но и реабилитации, социальной адаптации и сохранения высокого качества жизни больных.

Эффективность лучевой терапии обусловлена радиочувствительностью опухолей орофарингеальной зоны, внедрением технологий точного подведения ионизирующего излучения (3D конформная лучевая терапия, IMRT и др.), а также применением новых способов радиомодификации. Комбинация лучевого и лекарственного лечения на сегодняшний день является стандартом при ведении больных с местно распространенными опухолями головы и шеи, поскольку позволяет обеспечить хорошие показатели локорегионарного контроля, общей и безрецидивной выживаемости пациентов [3–5]. Преимущество сочетания ионизирующего излучения с лекарственной модификацией было достоверно показано за последние 15 лет в ряде крупных рандомизированных исследований [4, 6–8]. Обратной стороной являются побочные эффекты проводимого сочетанного лучевого и лекарственного лечения, в том числе гепато-, нефро- и гематологическая токсичность системной химиотерапии, а также потенцирование лучевых реакций. Традиционно используемые методы системного подведения лекарств к опухоли не позволяют ограничить их локализацию зоной опухолевого поражения, что приводит к снижению концентрации препарата в новообразовании и, соответственно, к снижению эффективности терапии, а также побочному их действию в здоровых тканях. Таким образом, особый интерес представляет локальная направленная доставка противоопухолевых препаратов.

Эволюция лучевой и лекарственной терапии с внедрением все более агрессивных методов привела к повышению эффективности противоопухолевого воздействия, но

в то же время и высокому риску проявления побочных эффектов, приводящих к снижению качества жизни пациентов, а иногда к глубокой инвалидизации и даже смерти [9–14]. В свете сказанного особую роль играет индивидуальный подбор терапии сопровождения, позволяющей не только успешно провести лечение в полном объеме, но и обеспечить реабилитацию и сохранение качества жизни пациента.

Поскольку лучевая терапия является локальным методом, побочные эффекты при лечении опухолей головы и шеи, за исключением общей слабости, также носят местный характер и ограничиваются облучаемой областью. Наиболее распространенной лучевой реакцией, возникающей в ходе лучевой терапии у больных опухолями головы и шеи, является лучевая мукозит (эпителиит), возникающий более чем у 60% пациентов при проведении стандартного режима фракционирования и практически у 100% больных при нетрадиционных режимах или химиолучевой терапии [15–18]. Зарубежные радиотерапевты отмечают, что более чем в 40% при проведении облучения с лекарственной модификацией развиваются побочные эффекты тяжелой степени [12, 19–23]. Согласно отечественным данным, частота тяжелых лучевых реакций, как правило, не превышает 10–20% [24, 25.]. Другим частым побочным эффектом облучения является дерматит в области воздействия ионизирующего излучения, возникающий в той или иной степени более чем у 90% больных [26–28]. Эту проблему отечественные специалисты считают не менее актуальной [29, 30]. Мукозит и дерматит играют ключевую роль в переносимости лучевой терапии по поводу рака головы и шеи, а также значительно влияют на качество жизни больных в процессе лечения и после его завершения. Необходимо отметить, что спектр ранних побочных эффектов значительно шире и также включает ксеростомию, накопление вязкого секрета, дисгезию, дисфагию, одинофагию, алопецию в области облучения, осиплость, присоединение вторичной инфекции в области облучения или в результате аспирации. Позже в зависимости от области облучения и лучевой нагрузки на здоровые ткани может наблюдаться ксеростомия, дисгезия, дисфагия, повышенный риск аспирации, дисфункция щитовидной железы, тризм, остеонекроз, кариес, трофические язвы слизистой оболочки и кожи, лимфостаз, катаракта, снижение слуха, стриктура пищевода [31, 32]. Побочные эффекты во многом взаимосвязаны патогенетически и провоцируют друг друга, причем неадекватное ведение пациента с ранними лучевыми реакциями может приводить к поздним лучевым повреждениям [33–36].

Результаты лучевого и химиолучевого лечения больных опухолями головы и шеи, неотъемлемо связаны с проведением адекватной сопроводительной терапии, в том числе нутритивной поддержки, ранозаживляющей терапии, своевременной профилактики и лечения вто-

ричной инфекции, постоянного контакта и психологической поддержки пациентов, а также адекватного обезбоживания. При этом анальгезирующая терапия требуется в связи с болевым синдромом, развивающимся как в результате опухолевого поражения, так и вследствие возникающих в процессе терапии лучевых реакций.

Мукозит (эпителиит) верхних отделов дыхательной и пищеварительной системы представляет собой основной побочный эффект при лучевой терапии опухолей головы и шеи. Его проявления затрудняют прием пищи, а также речь и даже открытие рта. В настоящее время эффективной профилактики мукозитов не существует, так что основную роль играет адекватная сопроводительная терапия. В то же время, важной мерой первичной профилактики лучевых реакций является рациональное дозиметрическое планирование и точная реализация плана облучения в пределах толерантности нормальных тканей.

Развитие и течение местных лучевых реакций характеризуется определенной фазностью. В интервале доз от 10 до 20 Гр возникают гиперемия и отек слизистой, соответствующие I стадии мукозита СТСАЕ. По мере увеличения доз до 30 Гр при химиолучевом лечении нередко развивается сливная форма, соответствующая III стадии [37–39]. Сливной мукозит, как наиболее выраженное проявление местной лучевой реакции, обычно сопровождается сильными болями, затрудняющими речь и прием пищи, позывами к рвоте, а в отдельных случаях приводит к ухудшению общего состояния и гипертермии. Кроме того, дефекты слизистой оболочки могут стать входными воротами для оппортунистических инфекций, например кандидоза [31, 40]. Спустя 1,5–2 недели по окончании лучевой терапии проявления реакции слизистых обычно купируются. Вкусовые ощущения восстанавливаются через 1–2 месяца, а слюноотделение — через 2–5 месяцев, но иногда и в более поздние сроки.

С момента проявлений лучевого эпителиита и до полного стихания реакций показано применение ранозаживляющих местных средств (гели, раствор мочевины и др.). При наличии болевого синдрома применяют местные и системные обезболивающие средства [18]. Чаще всего требуется назначение опиатов, причем следует обратить внимание на трансдермальные формы их применения [31]. Адекватное питание и поддержание водного баланса является жизненно важным. Особую роль играет сбалансированность приема пищи, что отражает поддержание стабильного веса. Присоединение оппортунистической инфекции в полости рта и глотке, будь то грибковая инвазия или бактериальная инфекция, требует своевременно назначения антибиотической терапии.

В постлучевом периоде нормальные ткани, подвергшиеся облучению, очень ранимы, поэтому в ранние сроки не рекомендуется выполнение инвазивных диагностических процедур и биопсии без крайней необходимости. Показан подбор диеты, при необходимости в сочетании с противорефлюксными препаратами [15, 41].

Лучевой дерматит кожи головы и шеи представляет собой частый побочный эффект при лучевой терапии опухолей головы и шеи. Его проявления во многом недооценены, однако на самом деле значительно влияют на переносимость лечения и качество жизни пациентов [42–44]. Местные лучевые реакции кожи челюстно-лицевой области проявляются в основном в виде эритемы и сухого эпидермита, возникающих на дозах более 20 Гр.

При их возникновении перерыва в лечении не требуется, поскольку купируются они самостоятельно, либо при местной ранозаживляющей терапии. При облучении метастатических узлов на шее и подведении СОД 50 Гр дерматит бывает более выраженным и достигает степени влажного эпидермита.

С момента проявлений лучевого дерматита и до полного стихания реакций показано применение ранозаживляющих местных средств (гели, метилурациловая мазь, рибофлавин), а также солнцезащитных средств. Кожу необходимо оберегать от трения и раздражения. Характерной чертой развития тяжелых лучевых дерматитов является длительное, прогрессирующее и, нередко, рецидивирующее течение, нарушения микроциркуляции, трофических и обменных процессов в облученных тканях. Дефекты кожи могут стать входными воротами для оппортунистических инфекций, например, *Staphylococcus aureus* [28].

Таким образом, очевидно, что ранозаживляющая терапия является ключевым компонентом терапии сопровождения в рамках борьбы с лучевым мукозитом и дерматитом.

На сегодняшний день возможности ранозаживляющей терапии, в том числе локальных ее вариантов, ограничены, а вопрос выбора и эффективной локальной доставки лекарственных средств актуален как никогда. Комбинация носителя с различными лекарственными агентами позволила не только внедрить принципиально новые методики ранозаживляющей терапии, но и дополнить их противомикробным, обезболивающим, антиоксидантным и радиомодифицирующим действием, в зависимости от цели применения средства [45].

Технологические решения предполагают использование наночастиц с размерами от 50 до 200 нм (ряд исследований указывает от 10 до 300 нм, что связывается с возможностью проникновения через биологические барьеры) и специфичностью к большинству опухолевых тканей. Подбирая размеры и поверхностные свойства транспортных частиц, усложняя их модификацию, меняя заряд, учитывая характер связи с лекарством и т.д., возможно направленно влиять на высвобождение лекарственного вещества [46] в поврежденные ткани.

Учитывая большие технологические сложности, возникающие при создании лекарственных форм для направленной доставки к очагу поражения с помощью описанных выше приемов, остановимся на способе, предложенном [47] и заключающемся в использовании биополимера альгината натрия в качестве матрицы — переносчика лекарств. Исследования гидрогеля на основе альгината натрия методом фотонно-корреляционной микроскопии (Vectan Counter, 648 нм) показало, что в нем присутствуют частицы нанодиапазона в количестве 80–90%. Введение в такой гель субстанции лекарств позволяет говорить о нём как о лечебном наногеле, который можно максимально направленно подводить к очагу поражения, используя ректальное, орофарингеальное, вагинальное апплицирование на слизистых поверхностях. Иными словами, альгинатный наногель является «депо», контейнером для введенного в него лекарства. Отметим отсутствие химического связывания в системе полимер-лекарство и роль альгината как защитного коллоида (по отношению к лекарству), предотвращающего агрегацию молекул лекарства. Будучи максимально возможно близко подведенным к очагу поражения (или месту планируемого облуче-

ния) гель, располагаясь поверхностно (этому способствуют реологические свойства геля), защищает ткани. При этом за счет физиологической жидкости, выделяемой в указанном месте, проходит его набухание (полимер относится к неограниченно набухаемым) и распределенный в нем лекарственный препарат высвобождается и поступает непосредственно в очаг поражения. Скорость поступления лекарства из «депо» зависит от скорости набухания геля, количества биологической жидкости и может соответствовать заданным врачам требованиям. Выбор именно этого биополимера — альгината натрия — обоснован следующими факторами: его гемостатическими свойствами, положительным влиянием на регенерацию тканей, возможностью пролонгаций действия введенных лекарств, радиопротекторной активностью. Это особенно важно при защите здоровых тканей от лучевых поражений.

В качестве примера приведем результаты использования лечебной гидрогелевой формы Колегель, содержащей фармакологический препарат с иммуномодуляторными свойствами, а именно деринат (дезоксирибонуклеат натрия). Она была создана для профилактики лучевых реакций со стороны слизистых полостных органов (прямая кишка, мочевого пузыря, полость рта и др.).

Деринат представляет собой универсальный метаболический модулятор, обладающий неспецифическим общебиологическим стимулирующим действием на все органы и ткани [48]. Такие свойства дерината, как способность восстанавливать ткани, усиливать клеточную регенерацию наряду с антиоксидантной, антимикробной и антибактериальной активностью, подтолкнули к созданию новой гидрогелевой лечебной формы дерината для местного использования. Это позволяет, во-первых, избежать побочных эффектов, в первую очередь значительной болезненности при внутримышечном введении; во-вторых, доставить препарат непосредственно к месту поражения.

Таким образом, применение биополимерных наноматериалов с локальной доставкой лекарственных средств обеспечивает хорошую переносимость и непрерывность лучевого и химиолучевого лечения больных опухолями головы и шеи. Это позволяет рассчитывать на повышение эффективности противоопухолевой терапии, а также на сохранение качества жизни пациентов во время лечения и в период их реабилитации. Вариабельность лекарственных средств, которые может переносить разработанная матрица, обеспечивает широкий спектр свойств, включая ранозаживляющий, противовоспалительный, обезболивающий и другие. С другой стороны, использование разработанных биополимерных наноматериалов открывает новые возможности радиомодификации за счет локальной доставки сенсibilizаторов в опухолевую ткань.

Список литературы

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2015 году. Под ред. А.Д.Каприна, В.В.Старинского, Г.В.Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ НМИРЦ Минздрава России, 2016. 236 с.
2. Лучевая терапия в онкологии: руководство. Под ред. Э.К.Хансена, М.Роач III. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 1008с.
3. Lu J.J., Brady L.W. *Radiation oncology an evidence-based approach*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008. 651p. DOI 10.1007/978-3-540-77385-6

4. Pignon J.P., Maitre A.L., Maillard E., Bourhis J. On behalf of the MACH-NC Collaborative Group. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother. Oncol.* 2009; 92(1): 4-14. DOI: 10.1016/j.radonc.2009.04.014

5. Beyzadeoglu M., Ebruli C., Ozyigit G. *Basic Radiation Oncology*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. 576p. DOI 10.1007/978-3-642-11666-7

6. Adelstein D.J. An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21(1): 92-98. DOI: 10.1200/JCO.2003.01.008

7. Rades D., Seidl D., Janssen S., Bajrovic A., Karner K, Strojjan P., Schild S.E. Comparison of weekly administration of cisplatin versus three courses of cisplatin 100 mg/m² for definitive radiochemotherapy of locally advanced head-and-neck cancers. *BMC Cancer*. 2016; 16: 437. DOI: 10.1186/s12885-016-2478-8

8. Hall S.F, Griffiths R. Did the addition of concomitant chemotherapy to radiotherapy improve outcomes in hypopharyngeal cancer? A population-based study. *Curr. Oncol.* 2016; 23(4): 266-272. DOI: 10.3747/co.23.3085

9. McCoul E.D., Har-El G. Meta-Analysis of impaired vocal cord mobility as prognostic factor in t2 glottic carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2009; 135(5): 479-486. DOI: 10.1001/archoto.2009.47

10. Scully C., Bagan J.V. Recent advances in oral oncology 2007: imaging, treatment and treatment outcomes. *Oral Oncol.* 2008; 44: 211-215. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2008.01.006

11. Ryu C.H., Roh J.L., Kim S.B., Lee S.W., Choi S.H., Nam S.Y., Kim S.Y. Risk factors for non-cancer health events in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Ann. Oncol.* 2013; 24: 1049-1064. DOI: 10.1093/annonc/mds540

12. Argiris A., Brockstein B.E., Haraf D.J., Stenson K.M., Mittal B.B., Kies M.S., Rosen F.R., Jovanovic B., Vokes E.E. Competing causes of death and second primary tumors in patients with locoregionally advanced head and neck cancer treated with chemoradiotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 1956-1962. DOI :10.1158/1078-0432.CCR-03-1077

13. Kang H.S., Roh J.L., Lee S. Kim S.B., Choi S.H., Nam S.Y., Kim S.Y. Noncancer-related health events and mortality in head and neck cancer patients after definitive radiotherapy. A Prospective Study. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95(19): e3403. DOI:10.1097/MD.0000000000003403

14. Bensing W., Schubert M., Ang K.K., Brizel D., Brown E., Eilers J.G., Elting L., Mittal B.B., Schattner M.A., Spielberger R., Treister N.S., Trotti A.M. 3rd. NCCN Task Force Report. prevention and management of mucositis in cancer care. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 2008; 6(1): 1-21.

15. Rosenthal D.I, Trotti A. Strategies for managing radiation-induced mucositis in head and neck cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* 2009; 19:29-34. DOI: 10.1016/j.semradonc.2008.09.006

16. Campos M.I., Campos C.N., Aarestrup F.M., Aarestrup B.J. Oral mucositis in cancer treatment: natural history, prevention and treatment. *Mol. Clin. Oncol.* 2014; 2, 337-340. DOI: 10.3892/mco.2014.253

17. Zhu G. Asian expert recommendation on management of skin and mucosal effects of radiation, with or without the addition of cetuximab or chemotherapy, in treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2016; 16: 42. DOI: 10.1186/s12885-016-2073-z

18. Roopashri G. Radiotherapy and chemotherapy induced oral mucositis — prevention and current therapeutic modalities. *IJDA*. 2010; 2: 174-179.

19. *Radiation Oncology: An Evidence-Based Approach*. Ed. by J.J.Lu, L.W.Brady. NY: Springer, 2008. 657 p.

20. Hansen E.K. *Handbook of Evidence-Based Radiation Oncology*. NY: Springer, 2010. 786 p.

21. Scully C., Epstein J., Sonis S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy and radiochemotherapy. Part 2: Diagnosis and management of mucositis. *Head Neck*. 2004; 26(1): 77-84. DOI: 10.1002/hed.10326

22. Epstein J.B., Thariat J., Bensadoun R.J., Barasch A., Murphy B.A., Kolnick L., Popplewell L., Maghami E. Oral complications of cancer and cancer therapy: from cancer treatment to survivorship. *CA Cancer J. Clin.* 2012; 62(6): 400-422. DOI: 10.3322/caac.21157

23. Vera-Llonch M, Oster G., Hagiwara M., Sonis S. Oral mucositis in patients undergoing radiation treatment for head and neck carcinoma. *Cancer*. 2006; 106: 329-336. DOI: 10.1002/cncr.21622
24. Гладилина И.А., Шабанов М.А. *Лучевое и химиолучевое лечение распространенного рака ротоглотки*. Тверь, 2001. 110 с.
25. Алиева С.Б., Ткачев С.И., Любаев В.Л. Субраманиан С. Химиолучевая терапия местнораспространенного рака головы и шеи III-IV стадии. *Вестник Российского онкологического научного центра им. Н.Н.Блохина Российской академии медицинских наук*. 2007; 18(2): 39-42.
26. Harris R, Probst H., Beardmore C., James S., Dumbleton C., Bolderston A., Faithfull S, Wells M., Southgate E. Radiotherapy skin care: A survey of practice in the UK. *Radiography*. 2011; DOI: 10.1016/j.radi.2011.10.040
27. Bernier J., Russi E.G., Homey B., Merlano M.C., Mesia R., Peyrade F., Budach W. Management of radiation dermatitis in patients receiving cetuximab and radiotherapy for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: proposals for a revised grading system and consensus management guidelines. *Ann. Oncol.* 2011; 22: 2191-2200. DOI: 10.1093/annonc/mdr139
28. Hymes S.R., Strom E.A., Fife C. Radiation dermatitis: clinical presentation, pathophysiology, and treatment. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2006; 54: 28-46. DOI: 10.1016/j.jaad.2005.08.054
29. Бардычев М.С., Шукашвили Н.Н. Клинико-морфологическая характеристика поздних лучевых язв кожи. *Медицинская радиология*. 1974; 6: 32-37.
30. Хосева Е.Н., Малишевская Н.П., Берзин С.А. Дерматологические последствия лучевой терапии онкологических больных. *Альманах клинической медицины*. 2006; 9: 154-159.
31. Сопроводительная терапия в онкологии. Практическое руководство. Под ред. С.Ю.Мооркрафта, Д.Л.Ю.Ли, Д. Каннин-гэма. М.: Гэотар, 2016. 432 с.
32. Brady O., Donnelly M., Horgan A., Maher M. Post-radiotherapy side effects for head and neck cancer — the patient's perspective. *Proc. Nutr. Soc. Harrogate*. 2011; 70(OCE5): E283. DOI: 10.1017/S0029665111003685
33. Galloway T., Amdur R. Management and prevention of complications during initial treatment of head and neck cancer. 2014. URL: https://www.uptodate.com/contents/?topicRef=3408&source=see_link Дата обращения: 24.03.2018
34. Langius J.A., Zandbergen M.C., Van Tulder M.W., Eerenstein S.E.J., Leemans C.R., Weijs P.J.M. Effect of nutritional interventions on nutritional status of patients with head and neck cancer receiving (chemo)radiotherapy: A systematic review. *Clin. Nutr.* 2013; 32: 671-678. DOI: 10.1016/j.clnu.2013.06.012.
35. Payakachat N., Ounpraseuth S., Suen J.Y. Late complications and long-term quality of life for survivors (> 5 years) with history of head and neck cancer. *Head Neck*. 2013; 35: 819-825. DOI: 10.1002/hed.23035
36. Paleri V., Roe J.W.G., Strojjan P., Corry J., Gregoire V., Hamoir M., Eisbruch A., Mendenhall W.M., Silver C.E., Rinaldo A., Takes R.P., Ferlito A. Strategies to reduce long-term postchemoradiation dysphagia in patients with head and neck cancer: An evidence-based review: Strategies to reduce dysphagia after chemoradiation. *Head Neck*. 2014; 36: 431-443. DOI: 10.1002/hed.23251
37. Zhu G., Lin J-C, Kim S-B, Bernier J., Agarwal J.P., Vermorcken J.B., Thinh D.H.Q., Cheng H-C, Yun H.J., Chitapanarux I. Asian expert recommendation on management of skin and mucosal effects of radiation, with or without the addition of cetuximab or chemotherapy, in treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2016; 16:42. DOI:
38. Lalla R.V., Sonis S.T., Peterson D.E. Management of Oral Mucositis in Patients with Cancer. *Den. Clin. North. Am.* 2008; 52(1): 61-67. DOI: 10.1016/j.cden.2007.10.002
39. Georgiou M, Papatziou G, Domoxoudis S, Pistevou-Gompaki K, Papanikolaou A. Oral Mucositis: understanding the pathology and management. *Hippokratia*. 2012; 16: 215-216.
40. Elad S., Zadik Y., Hewson I. A systematic review of viral infections associated with oral involvement in cancer patients: a spotlight on Herpes viridae. *Supp. Care in Cancer*. 2010; 18(8): 993-1006. DOI: 10.1007/s00520-010-0900-3
41. Pauloski B.R. Rehabilitation of dysphagia following head and neck cancer. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 2008; 9: 889-928. DOI: 10.1016/j.pmr.2008.05.010
42. McQuestion M. Evidence-based skin care management in radiation therapy. *Semin. Oncol. Nurs.* 2006; 22: 163-173. DOI: 10.1016/j.soncn.2006.04.004
43. Feight D., Baney T., Bruce S., McQuestion M. Putting evidence into practice. *Clin. J. Oncol. Nurs.* 2011; 15(5): 481-492. DOI: 10.1188/11.CJON.481-492
44. Schnur J.B., Quелlette S.C., DiLorenzo T.A., Green S., Montgomery G.H. A Qualitative Analysis of Acute Skin Toxicity Among Breast Cancer Radiotherapy Patients. *Psychooncology*. 2011; 20(3): 260-268. DOI: 10.1002/pon.1734
45. Олтаржевская Н.Д., Швец В.И., Коровина М.А., Липатова И.М., Хлыстова Т.С. Выбор состава биополимерной лечебной депо-композиции для использования в различных областях медицины. *Биотехнология*. 2016; 32(1): 43-52.
46. Кричевский Г.Е. *Нано-, био-, химические технологии и производство нового поколения волокон, текстиля и одежды*. М.: 2011. 528 с.
47. Бойко, А.В., Корятова Л.И., Олтаржевская Н.Д. *Направленная доставка лекарственных препаратов при лечении онкологических больных*. М.: ИМК, 2013. 194 с.
48. Каплина Э.Н., Вайберг Ю.П. *Деринат — природный иммуномодулятор для детей и взрослых*. М.: Научная книга, 2004. 186 с.

References

- [The state of oncological care to the population of Russia in 2015]. Ed. A.D.Kaprin, V.V.Starinski, G.V. Petrova. М.: P.A. Herzen MNIOI — FGBU NMIRC Minzdrava Rossii, 2016. 236 с. (in Russian)
- [Radiotherapy in oncology: manual]. Ed. E.K.Hanse, M.Roach. М.: GEOTAR-Media, 2014. 1008 p. (in Russian)
- Lu J.J., Brady L.W. *Radiation oncology an evidence-based approach*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008. 651p. DOI 10.1007/978-3-540-77385-6
- Pignon J.P., Maitre A.L., Maillard E., Bourhis J. On behalf of the MACH-NC Collaborative Group. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother. Oncol.* 2009; 92(1): 4-14. DOI: 10.1016/j.radonc.2009.04.014
- Beyzadeoglu M., Ebruli C., Ozyigit. G. Basic Radiation Oncology. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. 576p. DOI 10.1007/978-3-642-11666-7
- Adelstein D.J. An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21(1): 92-98. DOI: 10.1200/JCO.2003.01.008
- Rades D., Seidl D., Janssen S., Bajrovic A., Karner K, Strojjan P., Schild S.E. Comparison of weekly administration of cisplatin versus three courses of cisplatin 100 mg/m² for definitive radiochemotherapy of locally advanced head-and-neck cancers. *BMC Cancer*. 2016; 16: 437. DOI: 10.1186/s12885-016-2478-8
- Hall S.F, Griffiths R. Did the addition of concomitant chemotherapy to radiotherapy improve outcomes in hypopharyngeal cancer? A population-based study. *Curr. Oncol.* 2016; 23(4): 266-272. DOI: 10.3747/co.23.3085
- McCoul E.D., Har-El G. Meta-Analysis of impaired vocal cord mobility as prognostic factor in t2 glottic carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2009; 135(5): 479-486. DOI: 10.1001/archoto.2009.47
- Scully C., Bagan J.V. Recent advances in oral oncology 2007: imaging, treatment and treatment outcomes. *Oral Oncol.* 2008; 44: 211-215. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2008.01.006
- Ryu C.H., Roh J.L., Kim S.B., Lee S.W., Choi S.H., Nam S.Y., Kim S.Y. Risk factors for non-cancer health events in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Ann. Oncol.* 2013; 24: 1049-1064. DOI: 10.1093/annonc/mds540
- Argiris A., Brockstein B.E., Haraf D.J., Stenson K.M., Mittal B.B., Kies M.S., Rosen F.R., Jovanovic B., Vokes E.E. Competing causes of death and second primary tumors in patients with locoregionally advanced head and neck cancer treated with chemoradiotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 1956-1962. DOI :10.1158/1078-0432.CCR-03-1077
- Kang H.S., Roh J.L., Lee S. Kim S.B., Choi S.H., Nam S.Y., Kim S.Y. Noncancer-related health events and mortality in head and neck cancer patients after definitive radiotherapy. A Prospective Study.

- Medicine* (Baltimore). 2016; 95(19): e3403. DOI:10.1097/MD.0000000000003403
14. Bensinger W., Schubert M., Ang K.K., Brizel D., Brown E., Eilers J.G., Elting L., Mittal B.B., Schattner M.A., Spielberger R., Treister N.S., Trotti A.M. 3rd. NCCN Task Force Report. prevention and management of mucositis in cancer care. *J. Natl. Compr. Canc. Nerw.* 2008; 6(1): 1-21.
 15. Rosenthal D.I., Trotti A. Strategies for managing radiation-induced mucositis in head and neck cancer. *Semin. Radiat. Oncol.* 2009; 19:29-34. DOI: 10.1016/j.semradonc.2008.09.006
 16. Campos M.I., Campos C.N., Aarestrup F.M., Aarestrup B.J. Oral mucositis in cancer treatment: natural history, prevention and treatment. *Mol. Clin. Oncol.* 2014; 2, 337-340. DOI: 10.3892/mco.2014.253
 17. Zhu G. Asian expert recommendation on management of skin and mucosal effects of radiation, with or without the addition of cetuximab or chemotherapy, in treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2016; 16: 42. DOI: 10.1186/s12885-016-2073-z
 18. Roopashri G. Radiotherapy and chemotherapy induced oral mucositis — prevention and current therapeutic modalities. *IJDA.* 2010; 2: 174-179.
 19. Radiation Oncology: An Evidence-Based Approach. Ed. by J.J.Lu, L.W.Brady. NY: Springer, 2008. 657 p.
 20. Hansen E.K. *Handbook of Evidence-Based Radiation Oncology.* NY: Springer, 2010. 786 p.
 21. Scully C., Epstein J., Sonis S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy and radiochemotherapy. Part 2: Diagnosis and management of mucositis. *Head Neck.* 2004; 26(1): 77-84. DOI: 10.1002/hed.10326
 22. Epstein J.B., Thariat J., Bensadoun R.J., Barasch A., Murphy B.A., Kolnick L., Popplewell L., Maghami E. Oral complications of cancer and cancer therapy: from cancer treatment to survivorship. *CA Cancer J. Clin.* 2012; 62(6): 400-422. DOI: 10.3322/caac.21157
 23. Vera-Llonch M., Oster G., Hagiwara M., Sonis S. Oral mucositis in patients undergoing radiation treatment for head and neck carcinoma. *Cancer.* 2006; 106: 329-336. DOI: 10.1002/cncr.21622
 24. Gladilina I.A., Shabanov M.A. [Radiation and chemoradiation in local advanced oropharyngeal cancer treatment]. Tver, 2001. 110 p. (in Russian)
 25. Alieva S.B., Tkachev S.I., Lubaev V.L., Subramanian S. [Chemoradiotherapy in local advanced head and neck cancer treatment]. *Vestnik Rossijskogo onkologicheskogo nauchnogo centra imeni N.N.Blokhina Rossijskoy akademii medicinskih nauk [Bulletin of the Russian Blokhin Cancer Research Center of the Russian Academy of Medical Sciences].* 2007; 18(2): 39-42. (in Russian)
 26. Harris R., Probst H., Beardmore C., James S., Dumbleton C., Bolderston A., Faithfull S, Wells M., Southgate E. Radiotherapy skin care: A survey of practice in the UK. *Radiography.* 2011; DOI: 10.1016/j.radi.2011.10.040
 27. Bernier J., Russi E.G., Homey B., Merlano M.C., Mesia R., Peyrade F., Budach W. Management of radiation dermatitis in patients receiving cetuximab and radiotherapy for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: proposals for a revised grading system and consensus management guidelines. *Ann. Oncol.* 2011; 22: 2191-2200. DOI: 10.1093/annonc/mdr139
 28. Hymes S.R., Strom E.A., Fife C. Radiation dermatitis: clinical presentation, pathophysiology, and treatment. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2006; 54: 28-46. DOI: 10.1016/j.jaad.2005.08.054
 29. Bardychev M.S., Shukashvili N.N. [Clinical and morphological characteristics of late radial skin ulcers]. *Medicinskaya radiologiya [Medical radiology].* 1974; 6: 32-37. (in Russian)
 30. Khoseva E.N., Malishevskaya N.P., Berzin S.A. [Dermatological side effects of radiation therapy of cancer patients]. *Almanakh klinicheskoy mediciny [Almanac of Clinical Medicine].* 2006; 9: 154-159. (in Russian)
 31. [Supportive care in oncology. Practical manual]. Ed. by S.U.Muocraft, D.L.U.Lee, D.Kanninham. M.: Geotar, 2016. 432 p. (in Russian)
 32. Brady O., Donnelly M., Horgan A., Maher M. Post-radiotherapy side effects for head and neck cancer — the patient's perspective. *Proc. Nutr. Soc. Harrogate.* 2011; 70(OCE5): E283. DOI: 10.1017/S0029665111003685
 33. Galloway T., Amdur R. Management and prevention of complications during initial treatment of head and neck cancer. 2014. URL: https://www.uptodate.com/contents/?topicRef=3408&source=see_link Retrieved: 24.03.2018
 34. Langius J.A., Zandbergen M.C., Van Tulder M.W., Eerenstein S.E.J., Leemans C.R., Weijs P.J.M. Effect of nutritional interventions on nutritional status of patients with head and neck cancer receiving (chemo)radiotherapy: A systematic review. *Clin. Nutr.* 2013; 32: 671-678. DOI: 10.1016/j.clnu.2013.06.012
 35. Payakachat N., Ounpraseuth S., Suen J.Y. Late complications and long-term quality of life for survivors (> 5 years) with history of head and neck cancer. *Head Neck.* 2013; 35: 819-825. DOI: 10.1002/hed.23035
 36. Paleri V., Roe J.W.G., Strojjan P., Corry J., Gregoire V., Hamoir M., Eisbruch A., Mendenhall W.M., Silver C.E., Rinaldo A., Takes R.P., Ferlito A. Strategies to reduce long-term postchemoradiation dysphagia in patients with head and neck cancer: An evidence-based review: Strategies to reduce dysphagia after chemoradiation. *Head Neck.* 2014; 36: 431-443. DOI: 10.1002/hed.23251
 37. Zhu G., Lin J-C, Kim S-B, Bernier J., Agarwal J.P., Vermorcken J.B., Thinh D.H.Q., Cheng H-C, Yun H.J., Chitapanarux I. Asian expert recommendation on management of skin and mucosal effects of radiation, with or without the addition of cetuximab or chemotherapy, in treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2016; 16:42. DOI: 10.1186/s12885-016-2073-z
 38. Lalla R.V., Sonis S.T., Peterson D.E. Management of Oral Mucositis in Patients with Cancer. *Den. Clin. North. Am.* 2008; 52(1): 61-67. DOI: 10.1016/j.cden.2007.10.002
 39. Georgiou M, Patapatiou G, Domoxoudis S, Pistevou-Gompaki K, Papanikolaou A. Oral Mucositis: understanding the pathology and management. *Hippokratia.* 2012; 16: 215-216.
 40. Elad S., Zadik Y., Hewson I. A systematic review of viral infections associated with oral involvement in cancer patients: a spotlight on Herpes viridea. *Supp. Care in Cancer.* 2010; 18(8): 993-1006. DOI: 10.1007/s00520-010-0900-3
 41. Pauloski B.R. Rehabilitation of dysphagia following head and neck cancer. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 2008; 9: 889-928. DOI: 10.1016/j.pmr.2008.05.010
 42. McQuestion M. Evidence-based skin care management in radiation therapy. *Semin. Oncol. Nurs.* 2006; 22: 163-173. DOI: 10.1016/j.soncn.2006.04.004
 43. Feight D., Baney T., Bruce S., McQuestion M. Putting evidence into practice. *Clin. J. Oncol. Nurs.* 2011; 15(5): 481-492. DOI: 10.1188/11.CJON.481-492
 44. Schnur J.B., Quелlette S.C., DiLorenzo T.A., Green S., Montgomery G.H. A Qualitative Analysis of Acute Skin Toxicity Among Breast Cancer Radiotherapy Patients. *Psychooncology.* 2011; 20(3): 260-268. DOI: 10.1002/pon.1734
 45. Oltarzhvskaya N.D., Shvets V.I., Korovina M.A., Lipatova I.M., Khlistova T.S. [The choice of the composition of the biopolymer therapeutic depot composition for use in various fields of medicine]. *Biotehnologiya [Biotechnology].* 2016; 32(1): 43-52. (in Russian)
 46. Krichevski G.E. [Nano-, bio-, chemical technologies and production of a new generation of fibers, textiles and clothing]. M.: 2011. 528 p. (in Russian)
 47. Boyko A.V., Koritova L.N., Oltarzhvskaya N.D. [Directional delivery of medicines in the treatment of cancer patients]. M.: IMK, 2013. 194 p. (in Russian)
 48. Kaplina E.N., Vaiberg Yu.P. *Derinat — a natural immunomodulator for children and adults.* M.: Scientific book, 2004. 186 p.

Сведения об авторах

Бойко Анна Владимировна — доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения лучевой терапии с модификацией Городского бюджетного учреждения здравоохранения «Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А.Герцена» — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Геворков Артем Рубенович — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения лучевой терапии с модификацией Городского бюджетного учреждения здравоохранения «Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А.Герцена» — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Олтаржевская Наталия Дмитриевна — доктор технических наук, профессор, генеральный директор ООО «Колетекс»

Швец Виталий Иванович — доктор химических наук, профессор, академик РАН, профессор кафедры биотехнологии и промышленной фармации Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский технологический университет» (Институт тонких химических технологий имени М.В.Ломоносова) Министерства образования и науки Российской Федерации

Шашков Сергей Владимирович — аспирант отделения лучевой терапии с модификацией Городского бюджетного учреждения здравоохранения «Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А.Герцена» — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

УДК 616.8-092

О регенерации мозга (Лекция II)

Пальцын А.А.^{1,2}, Свиридкина Н.Б.¹¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

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

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская Академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 123995, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

Медицинское противодействие возрастной деградации мозга может быть не только профилактическим, т.е. замедлением его, но и регенеративным — восстановлением утраченного. Для успеха регенеративной медицины необходимо знание природных механизмов регенерации и действие в соответствии с ними. В нейрогенных зонах представляется разумным стимулировать нейрогенез и восстанавливать утраченные связи путем включения в сети новых нейронов. Относительно некоторых областей мозга (кора, мозжечок, спинной мозг), где постнатальный нейрогенез в эволюции не сложился, есть свидетельства разветвления в сохранившихся нейронах процессов внутриклеточной регенерации, в частности увеличения числа ядер и, соответственно, генов, обеспечивающих связи нейронов. Такую регенерацию наблюдали при экспериментальном инсульте и адаптации к гипоксии.

Ключевые слова: слияния клеток; двухъядерные нейроны; геномный фонд мозга.

Для цитирования: Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б. О регенерации мозга (Лекция II). Патогенез. 2018; 16(1): 83—91

DOI:

Для корреспонденции: Пальцын Александр Александрович, e-mail: lrrp@mail.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 17.08.2017

About regeneration of the brain (Lecture II)

Paltsyn A.A.^{1,2}, Sviridkina N.B.¹¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation² Russian Medical Academy of Continuing Vocational Education, Barrikadnaya Str. 2/1, Moscow 123995, Russian Federation

Medical counteraction to age-related brain degradation can be not only preventive, i.e., slowing, but also regenerative, aimed at recovery of the loss. Successful regenerative treatment implies insight into natural mechanisms of regeneration with ensuing actions. In neurogenic zones, it seems reasonable to stimulate neurogenesis and restore lost connections by including new neurons in the network. For some brain areas (cortex, cerebellum, spinal cord), where postnatal neurogenesis has not evolved during the evolution, there is evidence for development of intracellular regeneration processes in survived neurons, in particular, an increase in the number of nuclei and, respectively, the genes providing neuronal connections. Such regeneration was observed in experimental stroke and adaptation to hypoxia.

Key words: cell fusion; binuclear neurons; genomic fund of a brain.

For citation: Paltsyn A.A., Sviridkina N.B. [About regeneration of the brain (Lecture II)]. Patogenez [Pathogenesis]. 2018; 16(1): 83—91 (in Russian)

DOI:

For correspondence: Paltsyn Alexandr Alexandrovich, e-mail: lrrp@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received: 17.08.2017

Что может противопоставить медицина возрастным изменениям мозга, как компенсировать эти повреждения, отодвинуть срок их развития? Жесткие рамки статьи не позволяют говорить о тех важных, действенных и, даже без преувеличения мощных факторах, которые мы объединяем под понятием «образ жизни». Не говорим о них потому, что образ жизни в большей степени социальная проблема, мы же будем держаться поближе к медицине и, в частности, к клеточным технологиям. Клеточные технологии неврологической направленности сегодня едва ли

не самая горячая и даже скажем не очень уместное в научной лексике слово — модная тема. Мы позволили себе использовать слово «модная», чтобы подчеркнуть, что, как в моде популярно порой не самое прекрасное и разумное, так и в неврологических клеточных технологиях проявляется тенденция концентрировать большие усилия на тупиковых направлениях, в ущерб другим, как минимум, не столь очевидно бессмысленным.

Главная цель врачей всех времен, всех народов и всех специальностей: не мешать, а ещё лучше, способствовать

регенерации. Для этого нужно знать естественные, сложившиеся в эволюции механизмы регенерации и направлять свою активность в соответствии с этими механизмами.

В предыдущей части статьи мы пытались убедить читателя, что главным итогом возрастных и большинства, если не всех патогенных повреждений мозга является недостаточность связей. Восстановить, регенерировать утрату можно путем образования новых, дополнительных связей. Несколько схематизируя, но без большого греха против истины можно сказать: нужны новые синапсы. Дефицит связей может быть обусловлен первичным повреждением белого вещества — глии, волокон и миелина, как бывает при множественном склерозе, лейкодиетрофии. Глиальные клетки обновляются в течение всей жизни млекопитающего. Следовательно, клеточная терапия таких заболеваний с задачей пополнить число глиоцитов соответствует естественному механизму регенерации и поэтому представляется разумным направлением медицины. Однако, чаще синапсы утрачиваются вследствие повреждения и гибели нейронов. Например, в старости и при таких распространенных заболеваниях как атеросклероз, гипертоническая болезнь, диабет, инсульт. Новые синапсы могут быть получены двумя способами: *первый* — появлением новых нейронов, *второй* — появлением дополнительных отростков и синапсов на имеющихся нейронах. Напоминаем, что любая терапия, а в данном случае, направленная на увеличение числа синапсов, будет успешной только тогда, когда врач станет действовать согласно природе, а не поперек неё. Как же решает проблему восполнения утраченных синапсов природа? Первый способ, т.е. новообразование нейронов у взрослого млекопитающего, природа использует успешно с надежно доказанным восстановлением недостаточной до этого функции и способ этот называется, как мы уже говорили, нейрогенезом у взрослых. Однако, в природе нейрогенез совершается только в двух сравнительно небольших зонах мозга и распространяется только на гранулярные нейроны. Так вот, вопреки устройству природы многие нейробиологи, специалисты по клеточной терапии направляют усилия на технологии внедрения нейрогенеза в другие области мозга и на новообразование других видов нейронов. Внедрения не получается потому, что оно идет вопреки природе. На наш взгляд, сверхпопулярное сегодня направление — нейрогенез у взрослых млекопитающих, количество статей в котором измеряется многими тысячами, будучи полезным, получая новые знания об устройстве мозга, в практическом использовании этих знаний, находится в состоянии кризиса, но напор исследователей не ослабевает. Чтобы наше мнение не сочли предвзятым, объективности ради, приводим несколько названий статей и цитат из статей, авторами которых являются сами специалисты по нейрогенезу. 1) Известный нейробиолог Rakic в 2002 году на заре этого направления назвал одну из своих статей [1] так: «Нейрогенез у взрослых млекопитающих: сущность кризиса». Цитата из этой статьи: «Однако, неудержимое стремление лечить неврологические расстройства, обусловило неоправданную готовность признать неубедительные доказательства нейрогенеза в жизни и в эксперименте». 2) Cattaneo and Bonfanti (2014). Название статьи: «Терапевтический потенциал нейральных стволовых клеток: больше в мечтах людей, чем в их мозгах» [2]. 3) Lois, and Kelsch (2014). Цитата из

статьи: «К сожалению, после 20 лет интенсивных исследований нет ясных свидетельств того, что нейрогенез у взрослых можно использовать для восстановления нейронных сетей» [3]. 4) Peretto and Bonfanti (2015) «Тем не менее, несмотря на поразительные усилия выяснить механизмы/факторы, регулирующие нейрогенез у взрослых и его физиологическую функцию, вопрос, может ли он использоваться для лечения неврологических болезней, остается нерешенным» [4].

В недавней статье одного из авторитетных специалистов по обсуждаемой проблеме [Bonfanti, 2016] нейрогенез за пределами канонических зон (т.е. гиппокампа и боковых желудочков), как спонтанный, так и реактивный, развивающийся в ответ на повреждение, назван неполным — «incomplete» [5]. Имеется в виду, что полный нейрогенез — это процесс от активации NSC до интеграции образовавшихся нейронов в местную сеть. Автор подчеркивает, что судьба нейронов, образовавшихся в неполном нейрогенезе остается неясной.

Обратимся ко второму способу увеличения числа синапсов в мозге — появлению дополнительных отростков и синапсов на имеющихся нейронах. Иными словами, превращению некоторого числа нейронов в структурно и, соответственно, функционально более мощные клетки. Этим способом пока не лечат людей, но мы хотим рассказать о некоторых фактах, которые, как нам кажется, свидетельствуют о полезности серьезного изучения этого способа. Наибольшее число опубликованных сегодня результатов относятся к нейронам Пуркинью.

О присутствии в мозжечке одиночных клеток Пуркинью с двумя ядрами известно давно. Наиболее раннее сообщение, найденное нами в оригинале относится к 1928 году, автор — Inukai [6]. У крыс в возрасте 730 и более дней (по человеческим меркам это лет 90) Inukai нередко находил двух- и даже, как он пишет, трехядерные клетки. У крыс среднего возраста (200 дней) такие клетки не встречались. В 1937 году Andrew описал находки у старых мышей (более 740 дней) двухядерных нейронов Пуркинью [7]. У животных меньшего возраста таких клеток автор не обнаруживал.

Ранние сообщения о двухядерных клетках Пуркинью у человека связывались авторами этих сообщений с различными патологическими состояниями. Сообщалось, в частности, о находках таких клеток при шизофрении. Это по вторичным сведениям. Оригинальных работ нам не удалось получить. Самая ранняя из оригинальных это опять Andrew, но на 2 года позже [8]. В результате исследования 40 мозжечков, полученных от людей различного возраста, он обнаружил двухядерные нейроны Пуркинью только у одного: 22 летнего негра, умершего от цереброспинального сифилиса, причем содержание таких клеток составило, как он пишет, «от 3 до 4%».

Уже по этим находкам двухядерных нейронов у старых и больных млекопитающих можно было предположить, что появление второго ядра может быть выражением регенераторного процесса. Однако тогда ещё не пришло время массового, серьезного и систематического обращения ученых к проблеме регенерации мозга и эти наблюдения были, по существу, забыты, точнее, не стали развиваться дальнейшими исследованиями.

Возврат к теме двухядерных нейронов Пуркинью произошёл на рубеже XX—XXI веков в связи с неожиданными находками, сделанными в широко развернувшихся

тогда исследования дифференцировки стволовых клеток. В очень популярной статье 2000 года Mezey с сотрудниками [9] изложили результаты трансплантации костного мозга мышей от доноров-самцов реципиентам-самкам. Авторы описали появление в коре, гипоталамусе, гиппокампе, амигдале клеток, содержащих Y хромосому и меченых нейрональными маркерами. Делается вывод о дифференцировке костномозговых клеток донора в нейроны реципиента. Через 3 года Mezey с другими сотрудниками [10] опубликовала статью, уже описывающую наблюдения (терапевтическая пересадка костного мозга от мужчин женщинам) и по трактовке результатов (дифференцировка костномозговых клеток в нейроны). Они наблюдали совмещение нейронального маркера (NeuN) и Y хромосомы в клетках коры реципиентов. Такую далеко зашедшую дифференцировку стали называть «трансдифференцировкой», имея в виду, что в своем развитии мезодермальная клетка костного мозга превратилась в эктодермальную нейрон. Клетка в развитии «пересекла границу» зародышевых листков.

Принцип описанных трансгендерных пересадок, основанный на опознании в организме самок, клеток или потомков клеток самца по Y хромосоме, был использован для создания метода трансгенных пересадок. Одновременно со статьей Mezey с соавт. 2000 года (в том же номере журнала Science) была опубликована работа Brazelton с соавт. [11], в которой уже трансгенным методом доказывается то же самое: трансдифференцировка костномозговой клетки в нейрон.

Трансгенные эксперименты производятся чаще на мышах и называются трансгенными потому что все клетки мышей-доноров содержат трансген: т.е. введенный в клетку ген, продукт которого — метаболически инертное, но легко обнаруживаемое вещество, присутствие которого выдает донорское происхождение любой исследуемой клетки в теле реципиента. Чаще всего в качестве трансгена используется белок с зеленой флуоресценцией (green fluorescent protein — GFP).

Эксперимент осуществляется следующим образом. Взрослых мышей реципиентов облучают в смертельной дозе. Затем вводят им костный мозг (bone marrow-derived cells, BMDC) от взрослых GFP-положительных доноров. Для подавления реакции «трансплантат — против хозяина» реципиенты получают большие дозы иммунодепрессантов. Естественно, после таких манипуляций у реципиентов находят много зеленых клеток крови. Не так естественно и очевидно, но, тем не менее, это было — встречались зеленые дифференцированные клетки других тканей. Не отвлекаясь от темы, скажем только о мозге. О первых сообщениях 2000 года относительно трансдифференцировки мы уже сказали. В 2001 году опубликована статья Priller с соавт. [12], обнаруживших в мозжечке реципиентов через год после трансгенной пересадки костного мозга зеленые нейроны Пуркинью (рис. 1).

Объяснение авторами этого факта полностью соответствовало представлениям 2001 года. Они сочли, что мезодермальная BMDC стала эктодермальным нейроном. Объяснение казалось обоснованным: ведь нейрон зеленый, следовательно, он — ставшая нейроном BMDC. Авторы не смутило то, что чудесное превращение произошло не с эмбриональной клеткой, отличающейся повышенной пластичностью, а с клеткой взрослого животного

и в организме взрослого животного с давно (ещё в эмбриональном периоде) сформированным мозжечком. Но, повторяем, эта трактовка не была плодом пылкого воображения маленькой группы людей — авторов статьи. В то время так думала большая часть научного сообщества. Конечно, по до сих пор не изжитому, а в то время безудержному, стремлению всеместно пересаживать стволовые клетки, Priller с соавторами рекомендуют *трансплантацию BMDC для лечения в клинике двигательных расстройств*. Рекомендация смелая, если не сказать легкомысленная. Во-первых, потому, что при исследовании целого мозжечка находили всего несколько зеленых нейронов Пуркинью, а во-вторых — условия трансгенного эксперимента бесконечно далеки от реальных условий развития болезней человека.

Серьезный удар по идее постнатального нейрогенеза, а заодно и по популярным и слишком оптимистично оцениваемым представлениям о трансдифференцировке нанесла группа публикаций, появившаяся в 2002—2003 годах [13—19]. В этих статьях было заявлено, что стволовая клетка может *сливаться* с дифференцированной клеткой различных тканей. По этой причине «классическое» доказательство пластичности вообще и, в частности, пластическое появление во взрослом мозге нейрона, «трансдифференцировавшегося» из BMDC, оказались артефактом. Открытая возможность слияния BMDC дает другое, не столь фантастичное объяснение результатов, якобы демонстрирующих трансдифференцировки. BMDC не превратилась в дефинитивную клетку. У Priller с сотрудниками — это нейрон Пуркинью, отличавшийся не только характерной топографией и морфологией, но и экспрессировавший маркеры дифференцированного нейрона Пуркинью. Все эти специфические особенности «взрослого»

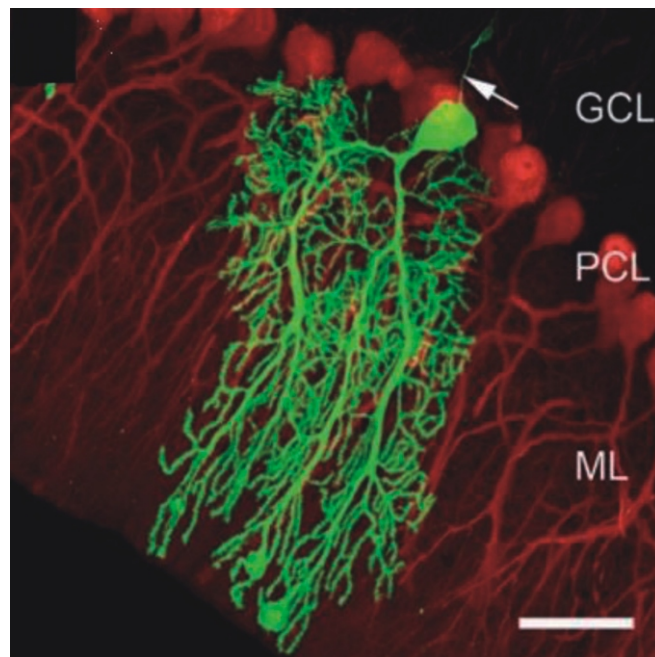


Рис. 1. Трансгенный эксперимент с GFP-мечеными донорскими клетками. Конфокально-микроскопическое изображение ряда нейронов Пуркинью в срезе мозжечка. Иммуноцитохимическая окраска на специфический маркер нейронов Пуркинью — калбиндин (красный) и маркер донорских костномозговых клеток GFP (зеленый). Один из нейронов и его дендритное дерево выделяются GFP-положительной окраской. Рис. из [21].

нейрона Пуркинье не были созданы самостоятельно BMDC. Она просто слилась с готовым, дифференцированным нейроном и передала ему свой маркер — зеленый цвет.

Указанные работы 2002—2003 годов имеют принципиальное значение не только в учении о стволовых клетках. Эти статьи привлекли внимание научного сообщества к двум важным для нашей темы о нейронах Пуркинье моментам: способности этих нейронов сливаться с другими клетками и влиянии второго ядра на функцию клетки. Оказалось, что BMDC могут участвовать в регенерации и развитии не только путем дифференцировки и трансдифференцировки в зрелые клетки, но и путем слияния с дифференцированными клетками поврежденного или развивающегося органа.

Уже первая группа исследователей, обнаружившая слияние BMDC с нейронами Пуркинье [13] предположила, что добавление генетического материала — второго ядра — может иметь поддерживающее или восстанавливающее значение для этих нейронов. Принципиальная возможность регенерации путем слияния с иными (гетеротипическими) клетками была убедительно доказана работой Vassilopoulos с сотрудниками [16]. Хотя в этой работе объектом изучения была печень, мы скажем несколько слов о ней потому, что ею была доказана возможность слиянием клеток избавить животных от смертельной болезни, т.е. доказана лечебная эффективность слияния клеток.

Мыши с мутацией гена фумарилацетоацетат гидролазы (ФАГ), т.е. ФАГ отрицательные (ФАГ^{-/-}) мыши страдают тирозинемией и погибают, если им не вводить лекарство (NTBC — нитизинон). Таким мышам после облучения вводили BMDC от диких (ФАГ^{+/+}) мышей. Через 4—5 месяцев после трансплантации реципиенты выглядели здоровыми, хотя введения нитизинона прекращали, билирубин сыворотки снижался практически до нормы. Гистохимическое исследование показало, что большинство гепатоцитов имели нормальное строение и экспрессировали ФАГ^{+/+}. Отсутствующий ген ФАГ гепатоциты могли получить только в результате слияния с несущей этот ген клеткой донора. Все собственные клетки реципиента, в том числе и стволовые, были ФАГ^{-/-}. Механизм репарации был следующий. Болезнь обуславливалась недостатком структур (генов ФАГ), необходимых для обеспечения функции органа. Слившиеся стволовые или прогениторные клетки внесли недостающие структуры (гены) в специфические клетки органа — гепатоциты. Под влиянием специализированной цитоплазмы произошло репрограммирование внесенных ядер, соответствующее функции принявших эти ядра клеток. Репрессированные до слияния гены ФАГ стволовых клеток после слияния, попав в цитоплазму гепатоцита, дерепрессировались и тем довели в органе число ранее отсутствующих структур до уровня, обеспечивающего сохранение жизни и выздоровление животного.

Регенераторная роль слияний клеток с нейронами Пуркинье пока не так эффектно установлена, как в цитированной нами работе Vassilopoulos с соавт. [16], но, тем не менее, имеет в настоящее время немало поводов для доверия. В исследовании Weimann с соавт. [20] показано, что в образовавшемся после слияния BMDC с нейроном Пуркинье гетерокарионе (т.е. в клетке с двумя различными ядрами) происходит репрограммирование ядра BMDC. Оно увеличивается в размере, в нем становится

больше дисперсного хроматина и активируется специфичный для нейронов Пуркинье ген. Иными словами, появляется дополнительная структура — второе ядро, идентичная или, по крайней мере, неотличимая по каким-то генам от ядра нейрона Пуркинье. Увеличение числа структур — классический признак регенерации. Число гетерокарионов увеличивалось по мере старения животных, а также *при развитии у них аутоиммунного энцефаломиелимита* [21]. Увеличение у старых и больных животных числа двухъядерных, способных к большей функциональной нагрузке нейронов — серьезное указание на регенераторную роль слияния клеток.

Все ранее упомянутые исследования слияний клеток с нейронами Пуркинье были выполнены методом трансгенных пересадок. При многих достоинствах этого метода, следует помнить, что трансгенный эксперимент далек от реальных патологических состояний у людей и животных и совсем непригоден для суждения о закономерностях нормального онтогенеза. Поэтому особую ценность имеют результаты исследования мозжечков у интактных животных, не подвергавшихся каким-либо воздействиям. В 2007 году появились 2 статьи на эту тему. Wiersema с соавт. [22] не нашли двухъядерных нейронов Пуркинье у молодых мышей, а у мышей в возрасте 12 месяцев содержание двухъядерных нейронов составило 1,44%. Группа итальянских авторов с соавт. [23] также не нашли двухъядерных клеток у мышей в возрасте 2 месяца. А у 18-месячных содержание двухъядерных нейронов Пуркинье составило 4,97%. При избирательном повреждении нейронов Пуркинье двухъядерные нейроны появлялись и у молодых животных. В этих экспериментах клетки-доноры второго ядра остались неизвестны.

Большинство находок двухъядерных нейронов Пуркинье сделано в трансгенных экспериментах, которые наряду с внесением генетически меченых клеток предусматривают облучение реципиента, т.е. повреждение и поэтому резонным представляется предположение о репаративном значении слияния клеток, появления в нейроне второго ядра.

Когда повреждение, необходимое по схеме трансгенного эксперимента, усиливали развитием у животных аутоиммунного энцефаломиелимита, наблюдали десятикратное увеличение числа слившихся нейронов Пуркинье [21].

Одним из исследований, вновь указавшим на регенераторное значение появления двухъядерных нейронов Пуркинье, но уже на клиническом материале стала работа Kemp с соавт. [24]. Авторы провели сравнительное исследование шести мозжечков, полученных от больных множественным склерозом (диагноз установлен клинически и подтвержден аутопсией) и пяти мозжечков людей, умерших не от неврологических болезней. При множественном склерозе содержание двухъядерных нейронов Пуркинье составило 0,376%, в контроле 0,024%. Увеличение числа двухъядерных нейронов Пуркинье при множественном склерозе авторы рассматривают как признак регенерации и даже как перспективу улучшения функции мозжечка *in vivo*. Перспектива авторам видится в том, что пересадками костного мозга можно превращать какую-то долю нейронов Пуркинье в двухъядерные и тем увеличивать функциональные возможности популяции этих клеток, пострадавшей в результате возрастных или патогенных повреждений.

Следует отметить, что клеточной терапии при патологии нейронов Пуркинье, конечно, свойственны «детские болезни», характерные для всего современного направления клеточной терапии. Основная идея направления — получить клетки из одного места и сразу или, нарастив число клеток в культуре, а иногда и добившись определенного уровня дифференцировки, «воспитав» в культуре, ввести их в другое место того же или другого организма. Мы вовсе не пытаемся такую стратегию критиковать. Она обусловлена благородным стремлением уже сегодня, с современным багажом знаний, облегчать болезни людей. Однако не следует забывать, что такое положение медицинской науки и практики вынужденное, и есть приспособление к деятельности в условиях недостаточного знания. Понятно, что успех медицинских усилий возможен только при условии совпадения их с естественными механизмами регенерации. Стволовые клетки есть в любом органе и если в органе развился патологический процесс, значит, деятельность эндогенных стволовых клеток по какой-то причине не обеспечивает нормальную функцию. Истинно этиопатогенетической терапия будет только в том случае, когда врач будет знать, что произошло с эндогенными клетками и как исправить это положение.

Возвращаясь от этих общих рассуждений к нашей конкретной теме, напоминаем о неоднократно описанном и у животных, и у людей появлении двухъядерных нейронов Пуркинье в нормальном онтогенезе. Если уж научное сообщество склонно единодушно воспринимать этот факт как проявление регенерации, то он не может быть ничем другим как *физиологической регенерацией*. Это очень важно. Механизмы этого явления заслуживают самого тщательного изучения, поскольку репаративная регенерация не имеет собственных механизмов и отличается от физиологической регенерации, только количественно. Однако сегодня при популярности исследований слияния нейронов Пуркинье с VMDC в трансгенных экспериментах остается неизвестным и, насколько мы знаем, не изучаемым вопрос о том, какая клетка отдает своё ядро нейрону Пуркинье в естественных условиях, когда двухъядерные нейроны появляются без специальных воздействий у старых и больных грызунов и людей. А как раз этот аспект исследований представляется наиболее значимым и перспективным, если иметь в виду, что деятельность врача должна соответствовать природным механизмам регенерации.

Огромные нейроны Пуркинье, одни из самых больших в организме, каждый из них имеет порядка 200 000 связей с другими нейронами. Формируются эти клетки в эмбриогенезе и не пополняются у взрослых млекопитающих даже из эндогенных нейральных стволовых клеток. Выращивание клеток Пуркинье, как и других крупных нейронов, в уже сформированном мозге с установлением всех необходимых связей (числом 200 000) даже из местных предшественников кажется большой фантастикой. Тем более, по-видимому, не стоит пытаться их вырастить «рассудку вопреки, наперекор стихиям» из любых введенных в организм клеток. В этих условиях выяснение механизмов их естественной внутриклеточной регенерации слиянием с соседней клеткой и захватом второго ядра представляется более реалистичным и более близким к интересам клиники направлением работы.

Тема слияния клеток для неврологии не только очередное торжество диалектики, но и «классика жанра».

Она возвращает нас к истокам нейронной теории — дискуссии Кахаля с Гольджи. Большая ошибка Гольджи в этой дискуссии содержала в себе и маленькую истину: нейроны не составляют, как он думал, синцитий, однако у них повышена способность к слиянию. Описаны многочисленные случаи слияний аксонов, дендритов между собой и с сомой клеток, а также самих нейронов с другими клетками [25, 26].

Сравнительно недавно, в июле 2015 года опубликовано исследование шведских ученых, которые использовали мышиную модель множественного склероза — аутоиммунный энцефаломиелит. Наряду с уже известным увеличением числа двухъядерных нейронов Пуркинье при этой болезни они обнаружили двухъядерные мотонейроны спинного мозга [27]. Этот эксперимент показал, что регенерация захватом второго ядра свойственна не только нейронам Пуркинье, но может происходить и в других крупных нейронах. Ещё один вид крупных нейронов, регенерирующих захватом второго ядра, а именно пирамидные нейроны коры, возможно, это клетки Беца, изучали сотрудники Института общей патологии и патофизиологии РАН.

В норме и при модельных патологических процессах в коре мозга обнаруживаются нейроны с двумя одинаковыми ядрами (дикарионы), а также с двумя ядрами, различающимися по морфологическим и цитохимическим признакам (гетерокарионы). В гетерокарионах одно ядро всегда бывает по всем характеристикам нейрональным. Отличие второго ядра от ядра нейрона может быть выражено в различной степени. Это различие объяснили тем, что нейрон сливается с глиальной клеткой, ядро которой, воздействием принявшей его цитоплазмы, претерпевает постепенное превращение (репрограммирование) во второе нейрональное ядро. Объяснение обуславливается находками, представленными в рис. 2—6.

В результате слияния и репрограммирования в нейроне появляется второе нейрональное ядро — второй генном. Есть факты, позволяющие предполагать, что добавлением новых геномов осуществляется физиологическая и репаративная регенерация мозга. Функции не бывает без структуры. Первичная структура для всех функций —



Рис 2. Начальный момент слияния олигодендроцита с нейроном. В нижней части препарата (между стрелками) клеточная мембрана отсутствует, цитоплазмы двух клеток слились. В верхней части препарата мембрана пока сохранилась. М — мембрана. ЯН — ядро нейрона. ЯО — ядро олигодендроцита.

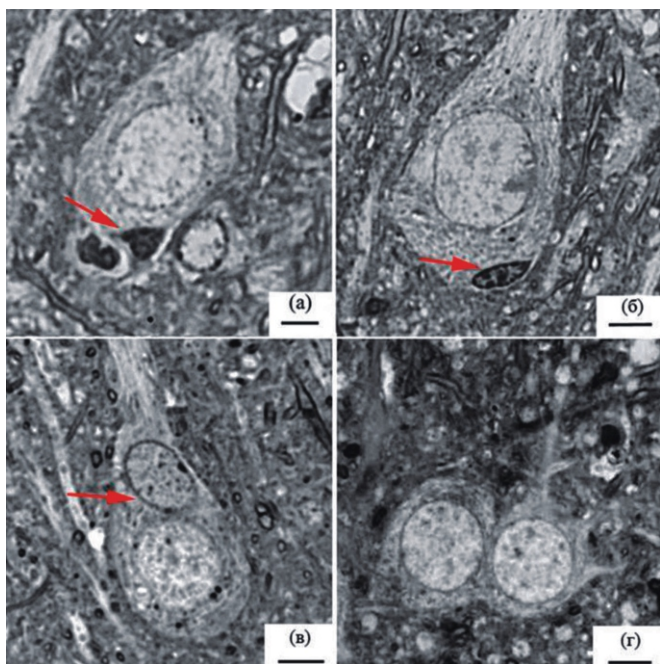


Рис. 3. Стадии пронеурального репрограммирования ядра олигодендроцита. а) Ядро олигодендроцита (стрелка) расположено в цитоплазме нейрона, но признаков репрограммирования ещё нет. Ядра резко различны. Ядро нейрона большое, круглое, светлое с дисперсным (светлым) хроматином (эухроматин). Ядро олигодендроцита маленькое, неправильной формы. Весь хроматин темный — гетерохроматин. б) Первый признак репрограммирования — разделение хроматина на гетеро- и эухроматин. В маленьком неправильной формы ядре олигодендроцита (стрелка) появились светлые эухроматиновые участки. в) Значительное увеличение сходства, расположенного в нейроне, ядра олигодендроцита (стрелка) с ядром нейрона. Ядро олигодендроцита резко увеличилось в объеме, «округлилось» содержит преимущественно эухроматин. г) Нейрон содержит два морфологически не различающихся типично нейрональных ядра. Гетерокарион превратился в дикарион. Появился двухъядерный нейрон. Масштаб 10 мкм.

ген. Следовательно, функциональная нагрузка, которую

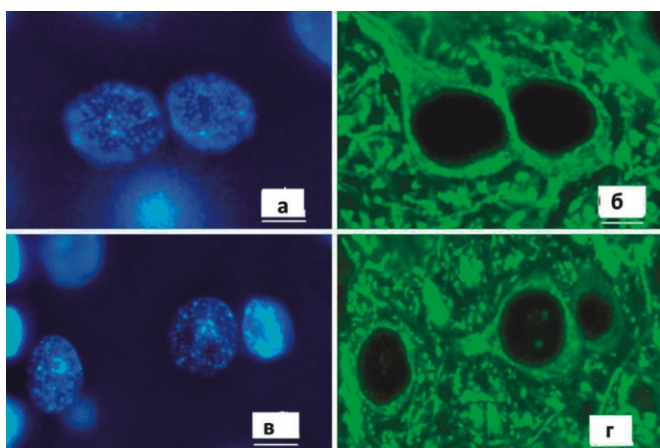


Рис. 5. Экспрессия MAP2 в двухъядерных нейронах. а) Два не различимых по морфологии нейрональных ядра расположены рядом (дикарион). б) Кадр «а», снятый через фильтр, выявляющий белок MAP2 (зеленый). MAP2 — белок микротрубочек, которые располагаются в околоядерном пространстве и в дендритах. Именно так локализуется в снимке ярко зеленый материал. Иными словами, методика эксперимента выявляет микротрубочки. в) Два рядом расположенных ядра различаются по величине и интенсивности флуоресцентного сигнала (гетерокарион). г) Кадр «в», снятый через фильтр для MAP2. Зеленый материал окружает не только нейрональное по строению хроматина ядро, но и репрограммируемое (с более грубым хроматином) ядро. Сигнал MAP2 вокруг второго ядра слабее. «а», «в» — окраска ДНК флуоресцентным красителем DAPI. «б», «г» — иммуноцитохимическое выявление MAP2. Масштаб — 10 мкм.

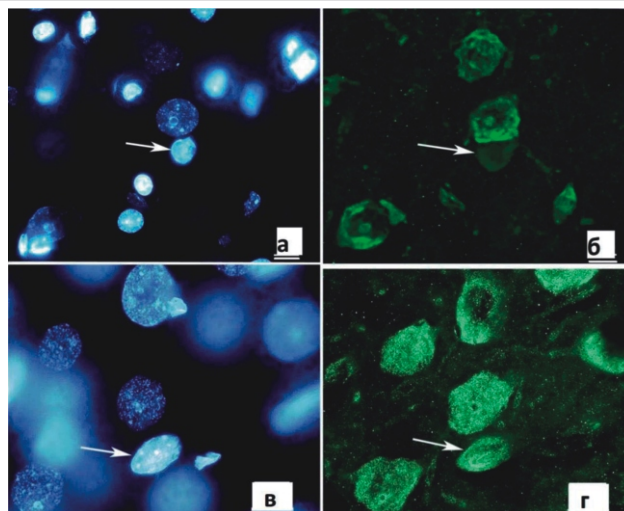


Рис. 4. Экспрессия нейронального белка NeuN в репрограммируемых ядрах олигодендроцитов. а) В центре кадра яркое с конденсированным гетерохроматином ядро олигодендроцита (стрелка). Над ним темное (эухроматин) ядро нейрона. В кадре присутствуют еще несколько мелких, ярких ядер олигодендроцитов (контроль). б) Кадр «а» с фильтром, выявляющим NeuN. В указанном стрелкой ядре олигодендроцита присутствует NeuN, хотя и в меньшей концентрации, чем в ядре нейрона над ним. Контрольные ядра не видны (NeuN в ядрах, не сливающихся с нейронами олигодендроцитов, не выявляется). в) Указанное стрелкой ядро олигодендроцита значительно крупнее, чем в кадре «а» — более поздняя стадия репрограммирования. г) Кадр «в» с фильтром для NeuN. Более поздняя по морфологическому критерию стадия пронеурального репрограммирования ядра олигодендроцита, демонстрирует и большее содержание NeuN. «а», «в» — Окраска ДНК флуоресцентным красителем DAPI. «б», «г» — Иммуноцитохимическое выявление NeuN. Масштаб — 10 мкм.

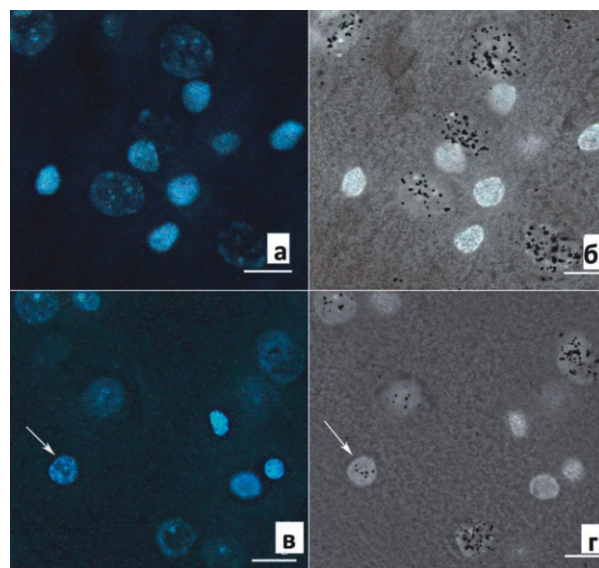


Рис. 6. Увеличение скорости транскрипции в репрограммируемом ядре. а) В участке среза коры 5 ядер нейронов (большие, темные) и 6 ядер олигодендроцитов (маленькие, яркие). б) Авторадиографическая метка участка «а», отражающая скорость синтеза РНК в ядрах. Пять ядер нейронов интенсивно мечены — высокая скорость транскрипции. Все 6 ядер олигодендроцитов метки не содержат — транскрипция не выявляется (ниже порога чувствительности метода). в) В участке среза 4 ядра олигодендроцитов. Одно из них (стрелка) отличается от остальных максимальным размером и неравномерной окраской: разделением хроматина на гетеро- и эухроматин. г) Авторадиографическая метка участка «в». Ядра нейронов мечены. Ядра обычных олигодендроцитов (3 справа) немечены. Ядро олигодендроцита с пронеуральным изменением структуры (увеличение размера и разделение хроматина) демонстрирует и пронеуральное изменение функции — оно мечено, т.е. увеличена скорость транскрипции. «а», «в» — окраска ДНК флуоресцентным красителем DAPI. «б», «г» — освещение, выявляющее авторадиографическую метку. Масштаб — 10 мкм.

может выполнять какая-то популяция нейронов, ограничена общим геномным фондом этой популяции, т.е. суммой всех генов во всех нейронах. С возрастом количество нейронов уменьшается. Нейрогенез, как оказалось, происходит только в двух небольших зонах мозга. В обширных областях мозга, где нет нейрогенеза, нет и пополнения геномного фонда, получаемого нами при рождении и неуклонно уменьшающегося в течение жизни с каждым погибшим нейроном. Причем, это не вся правда, это идеализированная ситуация. Она не очень страшная, поскольку нейроны в нормальной жизни гибнут не много. Реальная ситуация страшнее. С возрастом уменьшаются число синапсов, прочность синаптических связей и уровень экспрессии генов. Эти изменения значительны и именно они, по современным понятиям, главная причина физического и умственного увядания стариков. Изменения синапсов и уровня экспрессии не уменьшают число генов в фонде. Но накапливаясь при старении и болезнях, они всё же делают фонд недостаточным для выполнения необходимого для жизни объема функций. Иными словами, по действию на функцию мозга деградация синаптических связей и снижение уровня экспрессии генов равносильны гибели нейронов. И такая псевдогибель разрушает мозг быстрее, чем действительная гибель нейронов.

Слияние с олигодендроцитами и пронеурональное репрограммирование ядер олигодендроцитов, не увеличивая число нейронов в коре, увеличивает число нейрональных геномов, пополняет геномный фонд популяции. Это компенсирует возрастное и патогенное истощение фонда и позволяет сохранять достаточный для жизни уровень функции.

Значение двухъядерных нейронов в репаративной регенерации исследовали при экспериментальном геморрагическом инсульте в двигательной зоне коры. Благоприятное течение инсульта выразилось максимальной скоростью восстановления нарушенных инсультом движений, и максимальным содержанием двухъядерных нейронов в коре, окружающей зону повреждения, т.е. функциональным и структурным признаками регенерации [28, 29].

Другое доказательство регенераторного значения слияний. Давно установлено, что адаптация животных к гипоксии, многократным пребыванием в барокамере с пониженным атмосферным давлением создает нейропротективный эффект. Выяснили, что морфологически этот нейропротективный эффект выражается увеличением содержания двухъядерных нейронов в коре [30] (рис. 7, 8).

Структурно-функциональное своеобразие нейрона (пожизненная работа в нервных сетях, неповторимая комбинация миллионов контактов, в которой воплощены уникальность индивидуума и опыт его жизни) обуславливает своеобразие регенерации нейрона — не замену клетки (такую клетку заменить нельзя), а захват второго ядра. Двухъядерный нейрон двукратно увеличивает своё представительство в нервных сетях созданием новых отростков и синапсов. Это компенсирует возрастную или вызванную болезнью утрату части синапсов в нем самом и в других нейронах. Восстанавливается самое главное для нервной деятельности, её суть — восстанавливаются связи. Какаль говорил: «интеллигентность, талант, гений — это не количество нейронов, а объём белого вещества».

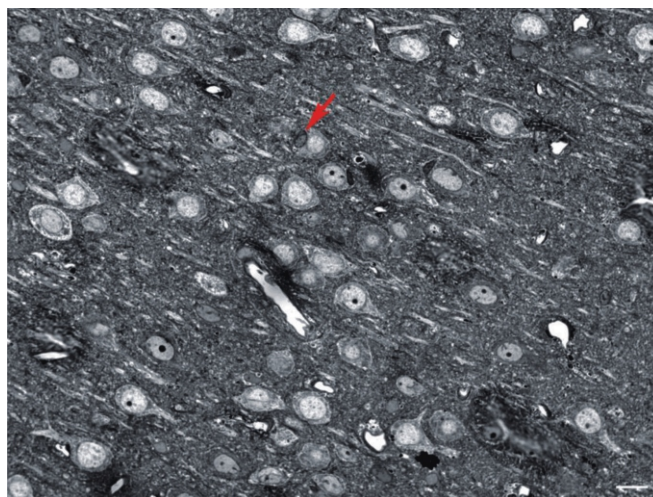


Рис. 7. Сенсомоторная зона коры крысы (контроль). В кадре один двухъядерный нейрон (стрелка). Масштаб — 20 мкм.

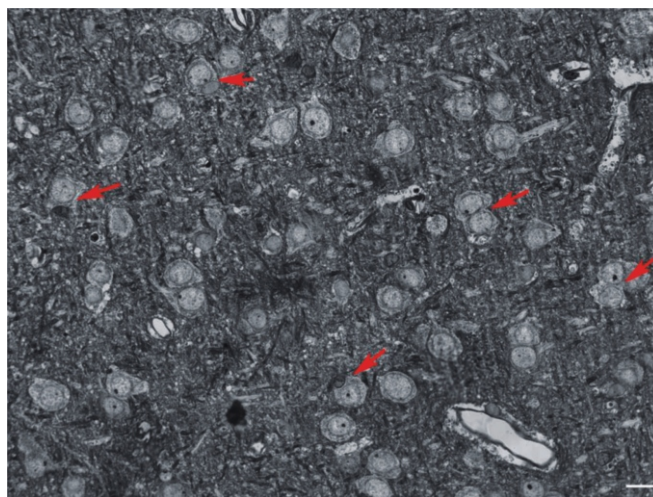


Рис. 8. Сенсомоторная зона коры крысы (адаптация к гипоксии). В кадре (равном по площади рис. 7) 5 двухъядерных нейронов (стрелки). Масштаб — 20 мкм.

Список литературы

1. Rakic P. Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J. Neurosci.* 2002; 22: 614-8.
2. Cattaneo E., Bonfanti L. Therapeutic potential of neural stem cells: greater in people's perception than in their brains? *Front. Neurosci.*, 2014; 8: 79. DOI: 10.3389/fnins.2014.00079
3. Lois C., Kelsch W. Adult neurogenesis and its promise as a hope for brain repair. *Front. Neurosci.*, 2014; 8: 165. DOI: 10.3389/fnins.2014.00165
4. Peretto P., Bonfanti L. Adult neurogenesis 20 years later: physiological function vs. brain repair. *Front. Neurosci.*, 2015; 6: 71. DOI: 10.3389/fnins.2015.00071
5. Bonfanti L. Adult Neurogenesis 50 Years Later: Limits and Opportunities in Mammals. *Front. Neurosci.* 2016; 10: 44. DOI: 10.3389/fnins.2016.00044
6. Inukai T. On the loss of Purkinje cells, with advancing age, from the cerebellar cortex of the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 1928; 45: 1-31.
7. Andrew W. The effects of fatigue due to muscular exercise on the Purkinje cells of the mouse, with special reference to the factor of age. *Ztschr. F. Zellforschung u. mikr. Anat.* 1937; 27: 534-55.
8. Andrew W. Origin and significance of binucleate Purkinje cells in man. *Arch. Pathol.* 1939; 28: 821-6.
9. Mezey E., Chandross K.J., Harta G., Maki R.A., McKercher S.R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science.* 2000; 290 (5497): 1779-82.

10. Mezey E., Key S., Vogelsang G., Szalayova I., Lange G.D., Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100 (3): 1364-9. DOI: 10.1073/pnas.0336479100

11. Brazelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.I., Blau H.M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000; 290: 1775-9.

12. Priller J., Persons D.A., Klett F.F., Kempermann G., Kreutzberg G.W., Dirnagl U. Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J. Cell Biol.* 2001; 155: 733-8. DOI: 10.1083/jcb.200105103

13. Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M., Fike J.R., Lee H.O., Pfeffer K., Lois C., Morrison S.J., Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 2003; 425: 968-73. DOI: 10.1038/nature02069

14. Gussoni E., Bennett R.R., Muskiewicz K.R., Meyerrose T., Nolte J.A., Gilgoff I., Stein J., Chan Y.M., Lidov H.G., Bunemann C.G., Von Moers A., Morris G.E., Den Dunnen J.T., Chamberlain J.S., Kunkel L.M., Weinberg K. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.* 2002; 110: 807-14. DOI: 10.1172/JCI16098

15. Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D.M., Nakano Y., Meyer E.M., Morel L., Petersen B.E., Scott E.W. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 2002; 416: 542-5. DOI: 10.1038/nature730

16. Vassilopoulos G., Wang P.R., Russell D.W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*. 2003; 422: 901-4. DOI: 10.1038/nature01539

17. Wang X., Willenbring H., Akkari Y., Torimaru Y., Foster M., Al-Dhalimy M., Lagasse E., Finegold M., Olson S., Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*. 2003; 422: 897-901. DOI: 10.1038/nature01531

18. Weimann J.M., Charlton C.A., Brazelton T.R., Hackman R.C., Blau H.M. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003a; 100: 2088-93. DOI: 10.1073/pnas.0337659100

19. Ying Qi-L., Nichols J., Evans E.P., Smith A.G. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*. 2002; 416: 545-8. DOI: 10.1038/nature729

20. Weimann J.M., Johansson C.B., Trejo A., Blau H.M. Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat. Cell Biol.* 2003b; 5(11): 959-66. DOI: 10.1038/ncb1053

21. Johansson C.B., Youssef S., Koleckar K., Holbrook C., Doyonnas R., Corbel S.Y., Steinman L., Rossi F.M., Blau H.M. Extensive fusion of haematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation. *Nat. Cell Biol.* 2008; 10(5): 575-83. DOI: 10.1038/ncb1720

22. Wiersema A., Dijk F., Dontje B., van der Want J.J., de Han G. Cerebellar heterokaryon formation increases with age and after irradiation. *Stem Cell Res.* 2007; 1(2): 150-4. DOI: 10.1016/j.scr.2008.02.001

23. Magrassi L., Grimaldi P., Ibatci A., Corselli M., Ciardelli L., Castello S., Podesta M., Frassoni F., Rossi F. Induction and survival of binucleated Purkinje neurons by selective damage and aging. *J. Neurosci.* 2007; 27(37): 9885-92. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2539-07.2007

24. Kemp K., Gray E., Wilkins A., Scolding N. Purkinje cell fusion and binucleate heterokaryon formation in multiple sclerosis cerebellum. *Brain*. 2012; 135(Pt 10): 2962-72. DOI: 10.1093/brain/aww226

25. Giordano-Santini R., Linton C., Hilliard M.A. Cell-cell fusion in the nervous system: Alternative mechanisms of development, injury, and repair. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2016; 60: 146-54. DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.06.019

26. Kravtsov V., Oren-Suissa M., Podbilewicz B. The fusogen AFF-1 can rejuvenate the regenerative potential of adult dendritic trees by self-fusion. *Development*. 2017; 144(13): 2364-74. DOI: 10.1242/dev.150037

27. Sankavaram S.R., Svensson M.A., Olsson T., Brundin L., Johansson C.B. Cell Fusion along the Anterior-Posterior Neuroaxis in Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0133903. DOI: 10.1371/journal.pone.0133903

28. Пальцын А.А., Константинова Н.Б., Романова Г.А., Шакова Ф.М., Квашенникова Ю.Н., Кубатиев А.А. Роль слияния клеток в физиологической и репаративной регенерации коры го-

ловного мозга. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009; 148(11): 580-3.

29. Paltsyn A., Komissarova S., Dubrovin I., Kubatiev A. Increased Cell Fusion in Cerebral Cortex May Contribute to Poststroke Regeneration. *Stroke Res. Treat.* 2013; 2013: 869327. DOI: 10.1155/2013/869327.

30. Paltsyn A.A., Manukhina E.B., Goryacheva A.V., Downey H.F., Dubrovin I.P., Komissarova S.V., Kubatiev A.A. Intermittent hypoxia stimulates formation of binuclear neurons in brain cortex — A role of cell fusion in neuroprotection? *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2014; 239(5): 595-600. DOI: 10.1177/1535370214523898.

References

- Rakic P. Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J. Neurosci.* 2002; 22: 614-8.
- Cattaneo E., Bonfanti L. Therapeutic potential of neural stem cells: greater in people's perception than in their brains? *Front. Neurosci.*, 2014; 8: 79. DOI: 10.3389/fnins.2014.00079
- Lois C., Kelsch W. Adult neurogenesis and its promise as a hope for brain repair. *Front. Neurosci.*, 2014; 8: 165. DOI: 10.3389/fnins.2014.00165
- Peretto P., Bonfanti L. Adult neurogenesis 20 years later: physiological function vs. brain repair. *Front. Neurosci.*, 2015; 6: 71. DOI: 10.3389/fnins.2015.00071
- Bonfanti L. Adult Neurogenesis 50 Years Later: Limits and Opportunities in Mammals. *Front Neurosci.* 2016; 10: 44. DOI: 10.3389/fnins.2016.00044
- Inukai T. On the loss of Purkinje cells, with advancing age, from the cerebellar cortex of the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 1928; 45: 1-31.
- Andrew W. The effects of fatigue due to muscular exercise on the Purkinje cells of the mouse, with special reference to the factor of age. *Ztschr. F. Zellforschung u. mikr. Anat.* 1937; 27: 534-55.
- Andrew W. Origin and significance of binucleate Purkinje cells in man. *Arch. Pathol.* 1939; 28: 821-6.
- Mezey E., Chandross K.J., Harta G., Maki R.A., McKercher S.R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*. 2000; 290 (5497): 1779-82.
- Mezey E., Key S., Vogelsang G., Szalayova I., Lange G.D., Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100 (3): 1364-9. DOI: 10.1073/pnas.0336479100
- Brazelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.I., Blau H.M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000; 290: 1775-9.
- Priller J., Persons D.A., Klett F.F., Kempermann G., Kreutzberg G.W., Dirnagl U. Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J. Cell Biol.* 2001; 155: 733-8. DOI: 10.1083/jcb.200105103
- Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M., Fike J.R., Lee H.O., Pfeffer K., Lois C., Morrison S.J., Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 2003; 425: 968-73. DOI: 10.1038/nature02069
- Gussoni E., Bennett R.R., Muskiewicz K.R., Meyerrose T., Nolte J.A., Gilgoff I., Stein J., Chan Y.M., Lidov H.G., Bunemann C.G., Von Moers A., Morris G.E., Den Dunnen J.T., Chamberlain J.S., Kunkel L.M., Weinberg K. Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.* 2002; 110: 807-14. DOI: 10.1172/JCI16098
- Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D.M., Nakano Y., Meyer E.M., Morel L., Petersen B.E., Scott E.W. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*. 2002; 416: 542-5. DOI: 10.1038/nature730
- Vassilopoulos G., Wang P.R., Russell D.W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*. 2003; 422: 901-4. DOI: 10.1038/nature01539
- Wang X., Willenbring H., Akkari Y., Torimaru Y., Foster M., Al-Dhalimy M., Lagasse E., Finegold M., Olson S., Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*. 2003; 422: 897-901. DOI: 10.1038/nature01531
- Weimann J.M., Charlton C.A., Brazelton T.R., Hackman R.C., Blau H.M. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003a; 100: 2088-93. DOI: 10.1073/pnas.0337659100

19. Ying Qi-L., Nichols J., Evans E.P., Smith A.G. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*. 2002; 416: 545-8. DOI: 10.1038/nature729
20. Weimann J.M., Johansson C.B., Trejo A., Blau H.M. Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat. Cell Biol.* 2003b; 5(11): 959-66. DOI: 10.1038/ncb1053
21. Johansson C.B., Youssef S., Kolekar K., Holbrook C., Doyonnas R., Corbel S.Y., Steinman L., Rossi F.M., Blau H.M. Extensive fusion of haematopoietic cells with Purkinje neurons in response to chronic inflammation. *Nat. Cell Biol.* 2008; 10(5): 575-83. DOI: 10.1038/ncb1720
22. Wiersema A., Dijk F., Dontje B., van der Want J.J., de Haan G. Cerebellar heterokaryon formation increases with age and after irradiation. *Stem Cell Res.* 2007; 1(2): 150-4. DOI: 10.1016/j.scr.2008.02.001
23. Magrassi L., Grimaldi P., Ibatci A., Corselli M., Ciardelli L., Castello S., Podesta M., Frassoni F., Rossi F. Induction and survival of binucleated Purkinje neurons by selective damage and aging. *J. Neurosci.* 2007; 27(37): 9885-92. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2539-07.2007
24. Kemp K., Gray E., Wilkins A., Scolding N. Purkinje cell fusion and binucleate heterokaryon formation in multiple sclerosis cerebellum. *Brain*. 2012; 135(Pt 10): 2962-72. DOI: 10.1093/brain/aww226
25. Giordano-Santini R., Linton C., Hilliard M.A. Cell-cell fusion in the nervous system: Alternative mechanisms of development, injury, and repair. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2016; 60: 146-54. DOI: 10.1016/j.semdb.2016.06.019
26. Kravtsov V., Oren-Suissa M., Podbilewicz B. The fusogen AFF-1 can rejuvenate the regenerative potential of adult dendritic trees by self-fusion. *Development*. 2017; 144(13): 2364-74. DOI: 10.1242/dev.150037
27. Sankavaram S.R., Svensson M.A., Olsson T., Brundin L., Johansson C.B. Cell Fusion along the Anterior-Posterior Neuroaxis in Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0133903. DOI: 10.1371/journal.pone.0133903
28. Pal'tsin A.A., Konstantinova N.B., Romanova G.A., Shakova F.M., Kvashennikova Yu.N., Kubatiev A.A. [The role of cell fusion in the physiological and reparative regeneration of the cerebral cortex]. *Byulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]*. 2009; 148(11): 580-3.
29. Paltsyn A., Komissarova S., Dubrovin I., Kubatiev A. Increased Cell Fusion in Cerebral Cortex May Contribute to Poststroke Regeneration. *Stroke Res. Treat.* 2013; 2013: 869327. DOI: 10.1155/2013/869327.
30. Paltsyn A.A., Manukhina E.B., Goryacheva A.V., Dorney H.F., Dubrovin I.P., Komissarova S.V., Kubatiev A.A. Intermittent hypoxia stimulates formation of binuclear neurons in brain cortex — A role of cell fusion in neuroprotection? *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2014; 239(5): 595-600. DOI: 10.1177/1535370214523898.

Сведения об авторах

Пальцын Александр Александрович — доктор биологических наук, профессор, лауреат Государственной премии СССР, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», профессор кафедры общей патологии и патофизиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская Академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Свиридкина Надежда Борисовна — кандидат биологических наук, руководитель клиники подопытных животных Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Правила для авторов

К публикации в журнале «Патогенез» принимаются ранее не опубликованные работы по профилю журнала: теоретические и обзорные статьи, результаты завершённых оригинальных исследований, краткие сообщения, описания клинических случаев, рецензии на книги, комментарии читателей к ранее опубликованным статьям и письма к редактору, информация о научных мероприятиях. В соответствии с международными этическими правилами публикации научных работ (<https://publicationethics.org/>), подача к рассмотрению ранее опубликованного материала и плагиат приведут к безусловному отказу в опубликовании. Не принимаются к печати статьи, представляющие собой отдельные этапы незавершённых исследований, а также статьи, посвящённые исследованиям, выполненным с нарушением этических норм и правил и норм гуманного обращения с биообъектами.

Решение о публикации принимается редколлегией журнала после рецензирования рукописи с учетом научной значимости и актуальности представленных материалов. При рассмотрении полученных авторских материалов редакционная коллегия руководствуется «Едиными требованиями к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» (www.ICMJE.org) и «Рекомендациями для авторов по подготовке и оформлению научных статей в журналах, индексируемых в международных наукометрических базах данных», подготовленными Минобрнауки России (<http://минобрнауки.рф>). Статьи, отклоненные редакционной коллегией, повторно не принимаются и не рассматриваются.

Статья должна быть написана на русском или английском языке, представлена в одном печатном экземпляре в формате любой версии текстового редактора Microsoft Word for Windows и прислана в электронном виде на e-mail редакции. Статья должна сопровождаться направлением (сопроводительным письмом) от учреждения, где была выполнена научная работа. Направление также присылается в бумажной и электронной формах.

I. Рукопись. Направляется в редакцию в электронном варианте на адрес patoniopp2017@yandex.ru. Файл со статьей должен быть представлен в формате Microsoft Word (иметь расширение *.doc, *.docx, *.rtf).

1. Рекомендуемый объем полного текста рукописи (оригинальные исследования, лекции, обзоры), включая резюме, таблицы и список литературы, не должен превышать 6000 слов. Объем статей, посвященных описанию клинических случаев, не более 4000 слов; краткие сообщения и письма в редакцию — в пределах 1500 слов. Количество слов в тексте можно узнать через меню Word («Файл» — «Просмотреть свойства документа» — «Статистика»). Если превышение рекомендованного объема статьи, по мнению автора, оправдано, и текст не может быть уменьшен, решение о публикации принимается на заседании редколлегии по рекомендации рецензента.

2. Формат текста рукописи. Текст должен быть напечатан шрифтом Times New Roman, иметь размер 12 pt и межстрочный интервал 1,5 pt. Отступы с каждой стороны страницы 2 см. Выделения в тексте можно проводить ТОЛЬКО курсивом или полужирным начертанием букв,

но НЕ подчеркиванием. Из текста необходимо удалить все повторяющиеся пробелы и лишние разрывы строк (в автоматическом режиме через сервис Microsoft Word «найти и заменить»).

3. Файл с текстом статьи должен содержать всю информацию для публикации (в том числе рисунки с подписями и таблицы с заглавием). Структура рукописи должна соответствовать шаблону:

Русскоязычная аннотация

Название статьи.

Авторы статьи. При написании авторов статьи фамилию следует указывать до инициалов имени и отчества (Иванов П.С., Петров С.И., Сидоров И.П.)

Название учреждения. Необходимо привести официальное ПОЛНОЕ название учреждения (без сокращений) и адрес электронной почты для контактов с авторами. Если в написании рукописи принимали участие авторы из разных учреждений, необходимо соотнести названия учреждений и ФИО авторов путем добавления цифровых индексов в верхнем регистре перед названиями учреждений и фамилиями соответствующих авторов.

Резюме статьи должно быть (если работа оригинальная) структурированным: актуальность, цель, материалы и методы, результаты, выводы. Резюме должно полностью соответствовать содержанию работы. Объем текста резюме должен быть в пределах 100—300 слов.

Ключевые слова. Необходимо указать ключевые слова — от 3 до 10, способствующих индексированию статьи в поисковых системах. Ключевые слова должны попарно соответствовать на русском и английском языках.

Англоязычная аннотация

Article title. Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию;

Author names. ФИО необходимо писать в соответствии с заграничным паспортом, или так же, как в ранее опубликованных в зарубежных журналах статьях. Авторам, публикующимся впервые и не имеющим заграничного паспорта, следует воспользоваться стандартом транслитерации BGN/PCGN (см. ниже);

Affiliation. Необходимо указывать ОФИЦИАЛЬНОЕ АНГЛОЯЗЫЧНОЕ НАЗВАНИЕ УЧРЕЖДЕНИЯ и адрес электронной почты для контактов с авторами. Наиболее полный список названий учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ eLibrary.ru;

Abstract. Англоязычная версия резюме статьи должна по смыслу и структуре полностью соответствовать русскоязычной и быть грамотной с точки зрения английского языка;

Keywords. Для выбора ключевых слов на английском следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США — Medical Subject Headings (MeSH).

Полный текст (на русском, английском или обоих языках) должен быть структурированным по разделам. Структура полного текста рукописи, посвященной описа-

нию результатов оригинальных исследований, должна соответствовать общепринятому шаблону и содержать разделы: введение (актуальность), цель и задачи, материалы и методы (пациенты и методы), результаты, выводы, обсуждение (дискуссия).

Дополнительная информация (на русском, английском или обоих языках)

Информация о конфликте интересов. Авторы должны раскрыть потенциальные и явные конфликты интересов, связанные с рукописью. Конфликтом интересов может считаться любая ситуация (финансовые отношения, служба или работа в учреждениях, имеющих финансовый или политический интерес к публикуемым материалам, должностные обязанности и др.), способная повлиять на автора рукописи и привести к сокрытию, искажению данных, или изменить их трактовку. Наличие конфликта интересов у одного или нескольких авторов не является поводом для отказа в публикации статьи. Выявленное редакцией сокрытие потенциальных и явных конфликтов интересов со стороны авторов может стать причиной отказа в рассмотрении и публикации рукописи.

Информация о спонсорстве. Необходимо указывать источник финансирования как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется.

Благодарности. Авторы могут выразить благодарности людям и организациям, способствовавшим публикации статьи в журнале, но не являющимся её авторами.

Сведения об авторах: ученая степень, учёное звание, должность, e-mail.

Список литературы. В библиографии (пристатейном списке литературы) каждый источник следует помещать с **новой** строки под порядковым номером.

В списке все работы перечисляются в порядке цитирования, а НЕ в алфавитном порядке.

Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях и лекциях допускается до 20, в обзорах — до 60 источников;

В тексте статьи ссылки на источники приводятся в квадратных скобках арабскими цифрами.

В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены **ВСЕ АВТОРЫ**. Недопустимо сокращать название статьи. Название англоязычных журналов следует приводить в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя.

Формат пристатейных списков литературы должен соответствовать требованиям и стандартам MedLine (U.S. National Information Standards Organization NISO Z39.29-2005 [R2010]), что обеспечит в дальнейшем индексирование статьи в международных базах данных (см. раздел «Оформление библиографии»).

При ссылке на журнальные статьи (наиболее частый источник информации для цитирования) следует придерживаться шаблона:

Автор А.А., Соавтор Б.Б. Название статьи. *Название журнала* Год; Том(Номер): стр.—стр. При возможности указать DOI.

Название статьи и журнала не следует разделять знаком «//». Для описания даты выхода, тома, номера журнала и страниц, на которых опубликована статья, следует использовать сокращенный формат записи. Пример:

Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *NEJM* 2002; 347(4): 284—287. DOI: 10.1056/NEJMs020632

Дедов И.И., Шестакова М.В. Эпидемиология сахарного диабета и микрососудистых осложнений. *Сахарный диабет* 2010; (3): 17—22.

При ссылке на книгу: Автор А.А. *Название книги*. Город (где издана): название издательства; год издания. Если ссылка дается на главу книги: (авторы); название главы. После точки ставится “В кн.:" или “In:” и фамилия(и) автора(ов) или редактора(ов), затем название книги и выходные данные. Пример:

Paxinos G., Watson Ch. *The rat brain in the stereotaxic coordinates*. N.Y.: Academic Press, 1982.

Максимова Т.М. Физическое развитие детей и подростков в возрасте 7—15 лет в Российской Федерации и в мире. В кн.: *Физическое развитие детей и подростков Российской Федерации*. Сб. мат-лов (выпуск VI). Под ред. акад. РАН и РАМН А.А. Баранова, член-корр. РАМН В.Р. Кучмы. М.: Издательство «ПедиатрЪ», 2013: 180—181.

Для электронных изданий указывается дата обращения в формате дд.мм.гггг (на русском языке: Дата обращения 07.07.2017; на английском языке: Retrieved: 07.07.2017).

II. Английский язык и транслитерация. При публикации статьи часть или вся информация должна быть дублирована на английский язык или транслитерирована (написана латинскими буквами). При транслитерации рекомендуется использовать стандарт BGN/PCGN (United States Board on Geographic Names / Permanent Committee on Geographical Names for British Official Use), рекомендованный международным издательством Oxford University Press, как «British Standard». Для транслитерации текста в соответствии со стандартом BGN можно воспользоваться ссылкой <http://ru.translit.ru/?account=bgn>.

Список литературы, имеющий русскоязычные источники, в обязательном порядке переводится на английский язык (References). При этом названия статей на русском языке переводятся на английский и даются в квадратных скобках, названия журналов даются в транслитерации, и переводятся на английский язык. В конце пишется (in Russian). Пример:

Grier K., Ressler L. [The investigation of the sensorimotor feedback performance in obese and normal-weight teenagers during physical activity]. *Lechebnaya fizkul'tura i sportivnaya meditsina [Exercise therapy and Sports Medicine]*. 2013; 1(109): 30—36. (In Russian)

III. В статьях, публикуемых журналом «Патогенез», обязательна статистическая обработка количественных данных. В разделе Материалы и методы должно присутствовать описание статистических методов, указан статистический пакет, применявшийся при обработке результатов, и номер его версии. Выбор статистических критериев и алгоритмов должен быть обоснован в тексте статьи.

IV. Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нём информацию. Ссылки на таблицы в тексте обязательны.

V. Рисунки (графики, диаграммы, схемы, чертежи и другие иллюстрации, рисованные средствами MS Office) должны быть контрастными и четкими. Объем графического материала минимальный (за исключением работ, где это оправдано характером исследования). Допускается применение цветной графики. Каждый рисунок должен быть помещен в текст и сопровождаться нумерованной подрисунковой подписью. Ссылки на рисунки в тексте обязательны.

VI. Фотографии, отпечатки экранов мониторов (скриншоты) и другие нерисованные иллюстрации необходимо дублировать в виде отдельных файлов формата *.jpeg, *.bmp, *.gif (*.doc и *.docx — в случае, если на изображения нанесены дополнительные пометки). Разрешение изображения должно быть >300 dpi. Файлам изображений необходимо присвоить название, соответствующее номеру рисунка в тексте.

VII. Соответствие нормам этики. Для публикации результатов оригинальной работы с участием людей необхо-

димо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие. В случае проведения исследований с участием животных — соответствовал ли протокол исследования этическим принципам и нормам проведения биомедицинских исследований с участием животных. В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, её расположения, номера протокола и даты заседания комитета).

VIII. Сопроводительные документы. При подаче рукописи в редакцию журнала необходимо дополнительно прислать файлы, содержащие сканированные изображения заполненных и заверенных сопроводительных документов (в формате *.pdf). К сопроводительным документам относится сопроводительное письмо с места работы автора с печатью и подписью руководителя организации, а также подписями всех соавторов.