

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

БСМ

ISSN 1682-0363 (print)
ISSN 1819-3684 (on-line)

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ

BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE

BSM



Том 16

№ 4. 2017

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ



Томская школа патофизиологов в экспозиции музея СибГМУ. 2017 г.

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Научно-практический журнал

Выходит 4 раза в год

ТЕМАТИЧЕСКИЙ ВЫПУСК «АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ
И КЛЕТОЧНОЙ ПАТОЛОГИИ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ»

Том 16, № 4, 2017

ISSN 1682-0363 (print)
ISSN 1819-3684 (on-line)

УЧРЕДИТЕЛЬ И ИЗДАТЕЛЬ:

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный
медицинский университет» Минздрава России

Журнал основан в 2001 году
Зарегистрирован в Министерстве РФ
по делам печати, телерадиовещания
и средств массовых коммуникаций
Свидетельство регистрации ПИ № 77-7366
от 26.03.2001 г.

Журнал издается при поддержке
ТРОО «Академия доказательной медицины»

Журнал входит в Перечень ведущих
рецензируемых научных журналов и изданий,
выпускаемых в РФ, в которых должны быть
опубликованы основные научные результаты
диссертаций на соискание ученой степени
доктора и кандидата наук

Индексация:

Web of Science (WoS (ESCI))

РИНЦ (Science Index)

RSCI

Ulrich's International Periodicals Directory

Cyberleninka

DOAS

Редакция:

634050, г. Томск, пр. Ленина, 107.

Тел.: (382-2)-51-41-53.

<http://bulletin.tomsk.ru>

E-mail: bulletin@bulletin.tomsk.ru

Оригинал-макет:

Издательство СибГМУ.

634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

Редактор Е.Е. Степанова

Электронная верстка, дизайн обложки

А.Д. Кривцова

Отпечатано в ООО «Литбюро»,

634055, г. Томск, ул. Королёва, 4.

Подписано в печать 20.12.2017 г.

Формат 60 × 84/8. Печать офсетная.

Бумага мелованная. Гарнитура «Мысль».

Печ. л. 37,5. Усл. печ. л. 34,7.

Тираж 500 экз. Заказ 708.

Цена – свободная.

Дата выхода в свет 26.12.2017.

Подписка по каталогу «Роспечать» в любом
отделении почты России, подписной индекс 46319

При перепечатке ссылка на
«Бюллетень сибирской медицины» обязательна

Ответственность за достоверность информации,
содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели.

© Сибирский государственный
медицинский университет, 2017

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

В.В. Новицкий, *академик РАН* (Томск)

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Л.М. Огородова, *член-корреспондент РАН* (Томск)

НАУЧНЫЙ РЕДАКТОР

В.В. Калюжин, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)

ВЫПУСКАЮЩИЕ РЕДАКТОРЫ ВЫПУСКА

В.В. Новицкий, *академик РАН* (Томск)

О.И. Уразова, *член-корреспондент РАН* (Томск)

РЕДКОЛЛЕГИЯ:

В.М. Алифирова, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)

Л.И. Афтанас, *академик РАН* (Новосибирск)

А.Н. Байков, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)

А.А. Баранов, *академик РАН* (Москва)

А.И. Венгеровский, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)

Е.Г. Григорьев, *член-корреспондент РАН* (Иркутск)

А.М. Дыгай, *академик РАН* (Томск)

М.В. Завьялова, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)

Л.В. Капилевич, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)

С.И. Карась, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)

Р.С. Карпов, *академик РАН* (Томск)

В.И. Киселев, *член-корреспондент РАН* (Барнаул)

Н.А. Корнетов, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)

С.В. Логвинов, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)

А.Д. Макацария, *член-корреспондент РАН* (Москва)

Л.С. Намазова-Баранова, *академик РАН* (Москва)

С.А. Некрылов, *профессор, д-р ист. наук* (Томск)

В.П. Пузырёв, *академик РАН* (Томск)

В.Ю. Серебров, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)

В.И. Стародубов, *академик РАН* (Москва)

Е.А. Степовая, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)

А.Т. Тепляков, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)

В.А. Ткачук, *академик РАН* (Москва)

В.А. Труфакин, *академик РАН* (Новосибирск)

О.И. Уразова, *член-корреспондент РАН* (Томск)

О.С. Федорова, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)

И.А. Хлусов, *профессор, д-р мед. наук* (Томск)

Е.Л. Чойнзонов, *академик РАН* (Томск)

А.Г. Чучалин, *академик РАН* (Москва)

А.В. Шабров, *академик РАН* (Санкт-Петербург)

В.А. Шкурупий, *академик РАН* (Новосибирск)

М.С. Юсубов, *профессор, д-р хим. наук* (Томск)

A. Antsaklis, *профессор* (Греция)

F. Chervenak, *профессор* (США)

C. Dadak, *профессор* (Австрия)

Y. Dekhtyar, *профессор* (Латвия)

M. Epple, *профессор* (Германия)

D. Gailani, *профессор* (США)

S. Orlov, *профессор* (Канада)

M. Poyurovsky, *профессор* (Израиль)

V. Zhdankin, *профессор* (США)

BULLETIN OF SIBERIAN MEDICINE

Peer-reviewed scientific-practical journal
Issued quarterly

SPECIAL ISSUE «ACTUAL PROBLEMS OF MOLECULAR AND CELLULAR PATHOLOGY
AND PATHOLOGICAL PHYSIOLOGY»

Volume 16, No. 4, 2017

ISSN 1682-0363 (print)
ISSN 1819-3684 (on-line)

FOUNDER AND PUBLISHER:

Siberian State Medical University,
the Ministry for Healthcare
of the Russian Federation

Registered by the Ministry of the Russian Federation
for Affairs of the Press,
Television and Radio Broadcasting and Mass
Communication Media
Certificate of registration PI No. 77-7366
dated to 26.03.2001

The journal is published and supported
by Tomsk Regional Organization «Academy
of Evidence-based Medicine»

Bulletin of Siberian Medicine is included:
in the List of peer-reviewed scientific journals
and publications issued in the Russian Federation,
which should publish main scientific results
of doctor's and candidate's theses

Bulletin of Siberian Medicine is indexed:
Web of Science (WoS (ESCI))
Science Index
RSCI
Ulrich's International Periodicals Directory
Cyberleninka
DOAS

Editorial Board Office:
107, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation
Telephone: +7-(382-2)-51-41-53.
<http://bulletin.tomsk.ru>
E-mail: bulletin@bulletin.tomsk.ru

Publisher: the Siberian State Medical University.
2, Moscow Trakt, Tomsk, 634050,
Russian Federation.
Editor E.E. Stepanova
Electronic makeup, cover design
L.D. Krivtsova

Printed in Litburo LLC,
4, Korolev Str., Tomsk, 634055, Russian Federation

Signed to print 20.12.2017
Format 60 X 84/8. Offset print.
Coated paper. Mysl' font.
P.l. 37,5. C.p.l. 34,7.
500 copies. Odder no. 708.

The price – free.
Date of publication 26.12.2017.

Pass-through copyright.
Advertising providers are liable for the truthfulness
of information in advertising materials.

EDITOR-IN-CHIEF

V.V. Novitsky, *Academician of RAS (Tomsk)*

DEPUTY-EDITOR-IN-CHIEF

L.M. Ogorodova, *Corresponding Member of RAS (Tomsk)*

SCIENCE EDITOR

V.V. Kalyuzhin, *Professor (Tomsk)*

EDITORS OF THE SPECIAL ISSUE

V.V. Novitsky, *Academician of RAS (Tomsk)*

O.I. Urazova, *Corresponding Member of RAS (Tomsk)*

EDITORIAL BOARD:

V.M. Alifirova, *Professor (Tomsk)*

L.I. Aftanas, *Academician of RAS (Novosibirsk)*

A.N. Baikov, *Professor (Tomsk)*

A.A. Baranov, *Academician of RAS (Moscow)*

A.I. Vengerovsky, *Professor (Tomsk)*

Ye.G. Grigoriyev, *Corresponding Member of RAS (Irkutsk)*

A.M. Dygai, *Academician of RAS (Tomsk)*

M.V. Zav'yalova, *Professor (Tomsk)*

L.V. Kapilevich, *Professor (Tomsk)*

S.I. Karas, *Professor (Tomsk)*

R.S. Karpov, *Academician of RAS (Tomsk)*

V.I. Kiselyov, *Corresponding Member of RAS (Barnaul)*

A.N. Kornetov, *Professor (Tomsk)*

S.V. Logvinov, *Professor (Tomsk)*

A.D. Makatsaria, *Corresponding Member of RAS (Moscow)*

L.S. Namazova-Baranova, *Academician of RAS (Moscow)*

S.A. Nekrylov, *Professor (Tomsk)*

V.P. Puzyryov, *Academician of RAS (Tomsk)*

V.Yu. Serebrov, *Professor (Tomsk)*

V.I. Starodubov, *Academician of RAS (Moscow)*

Ye.A. Stepovaya, *Professor (Tomsk)*

A.T. Teplyakov, *Professor (Tomsk)*

V.A. Tkachuk, *Academician of RAS (Moscow)*

V.A. Trufakin, *Academician of RAS (Novosibirsk)*

O.I. Urazova, *Corresponding Member of RAS (Tomsk)*

O.S. Fedorova, *Professor (Tomsk)*

I.A. Khlusov, *Professor (Tomsk)*

Ye.L. Choinzonov, *Academician of RAS (Tomsk)*

A.G. Chuchalin, *Academician of RAS (Moscow)*

A.V. Shabrov, *Academician of RAS (St. Petersburg)*

V.A. Shkurupiy, *Academician of RAS (Novosibirsk)*

M.S. Yusubov, *Professor (Tomsk)*

A. Antsaklis, *Professor (Greece)*

F. Chervenak, *Professor (USA)*

C. Dadak, *Professor (Austria)*

Y. Dekhtyar, *Professor (Latvia)*

M. Epple, *Professor (Germany)*

D. Gailani, *Professor (USA)*

S. Orlov, *Professor (Canada)*

M. Poyurovsky, *Professor (Israel)*

V. Zhdankin, *Professor (USA)*



ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ	REVIEWS AND LECTURES
<p>Гаврилов Ю.В., Деревцова К.З., Корнева Е.А. Орексинергическая система мозга и патогенетические основы нарушений цикла «сон – бодрствование» при нарколепсии</p>	<p>Gavrilov Yu.V., Derevtsova K.Z., Korneva H.A. Orexin system and pathogenesis of sleep-wake cycle disturbances in narcolepsy</p>
<p>Колесникова Л.И., Даренская М.А., Колесников С.И. Свободнорадикальное окисление: взгляд патофизиолога</p>	<p>Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Kolesnikov S.I. Free radical oxidation: a pathophysiolologist's view</p>
<p>Насырова Р.Ф., Толмачев М.Ю., Сычев Д.А., Яхин К.К., Незнанов Н.Г. Механизмы развития антипсихотик-индуцированных метаболических нарушений: фармакогенетический аспект</p>	<p>Nasyrova R.F., Tolmachev M.Yu., Sychev D.A., Yakhin K.K., Neznanov N.G. Mechanisms of development of antipsychotic-induced metabolic disorders: pharmacogenetic aspect</p>
<p>Пономарчук О.О., Максимов Г.В., Орлов С.Н. Регуляция объема клеток эпителия в норме и при патологии</p>	<p>Ponomarchuk O.O., Maximov G.V., Orlov S.N. The regulation of epithelial cells volume in norm and pathology</p>
<p>Чердынцева Н.В., Митрофанова И.В., Булдаков М.А., Стахеева М.Н., Патышева М.Р., Завьялова М.В., Кзышкowska Ю.Г. Макрофаги и опухолевая прогрессия: на пути к макрофаг-специфичной терапии</p>	<p>Cherdyntseva N.V., Mitrofanova I.V., Buldakov M.A., Stakheeva M.N., Patysheva M.R., Zavjalova M.V., Kzbyshkowska J.G. Macrophages and tumor progression: on the way to macrophage-specific therapy</p>
<p>Шкурупий В.А., Ким Л.Б., Ковнер А.В., Черданцева Л.А. Соединительная ткань и проблемы ее патологических состояний</p>	<p>Sbkurupy V.A., Kim L.B., Kovner A.V., Cherdantseva L.A. Connective tissue and the problems of its pathological conditions</p>
<p>Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Зеленин Н.В., Аюшинова Н.И. Воздействие на митогенактивируемые протеинкиназы как новое направление регуляции роста соединительной ткани</p>	<p>Sburygina I.A., Shurygin M.G., Zelenin N.V., Ayushinova N.I. Influence on mitogen-activated protein kinases as a new direction of connective tissue growth regulation</p>
<p>Юшков Б.Г. Клетки иммунной системы и регуляция регенерации</p>	<p>Yushkov B.G. Immune system and regulation of regeneration</p>
ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ	ORIGINAL ARTICLES
<p>Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Черных А.И., Салмина А.Б. Влияние инсулинорезистентности на нарушение метаболизма глюкозы в миндалине головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера</p>	<p>Gorina Ya.V., Komleva Yu.K., Lopatina O.L., Chernykh A.I., Salmina A.B. The effect of insulin resistance on amygdale glucose metabolism alterations in experimental Alzheimer's disease</p>
<p>Дворниченко М.В., Сизикова А.Е., Саприна Т.В., Пашкова Е.Н., Щербинко М.С., Хлусов И.А., Новицкий В.В. Клеточно-молекулярный скрининг дисплазии соединительной ткани у подростков-спортсменов (пилотное исследование)</p>	<p>Dvornichenko M.V., Sizikova A.E., Saprina T.V., Pashkova E.N., Shcherbinko M.S., Khlusov I. A., Novitsky V.V. Cellular and molecular screening of connective tissue dysplasia in adolescent athletes (pilot study)</p>
<p>Дмитриев Ю.В., Минасян С.М., Байрашева В.К., Демченко Е.А., Галагудза М.М. Прямое сравнение кардиопротективных свойств ингибиторов некроптоза на модели глобальной ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы</p>	<p>Dmitriev Yu.V., Minasian S.M., Bayrasheva V.K., Demchenko E.A., Galagudza M.M. Direct comparison of cardioprotective effects of necroptosis inhibitors against global ischemia-reperfusion in the isolated rat heart</p>

Иванов В.В., Шахристов Е.В., Степовая Е.А., Литвяков Н.В., Перекуча Н.А., Носарева О.Л., Фёдорова Т.С., Новицкий В.В. Окислительный стресс в патогенезе сахарного диабета 1 типа: роль ксантиноксидазы адипоцитов	134	Ivanov V.V., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Litvjakov N.V., Perekuch N.A., Nosareva O.L., Fedorova T.S., Novitsky V.V. Oxidative stress in the pathogenesis of type 1 diabetes: the role of adipocyte xanthine oxidase
Кинит Д.Н., Мадонов П.Г., Шерстобоев Е.Ю., Данилец М.Г., Трофимова Е.С., Лигачева А.А., Дыгай А.М. Иммунотоксические эффекты интерферона α -2b, модифицированного иммобилизацией с помощью технологии электронно-лучевого синтеза	144	Kinsbt D.N., Madonov P.G., Sberstoboev E.Yu., Danilets M.G., Trofimova E.S., Ligacheva A.A., Dygai A.M. Immunotoxic effects of interferon alpha-2b, modified by immobilization by means of electron-beam synthesis technology
Колесникова О.П., Гойман Е.В., Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Козлов В.А. Ранние маркеры фенотипической гетерогенности системной красной волчанки в экспериментальной модели	155	Kolesnikova O.P., Goiman E.V., Demchenko E.N., Gavrilova E.D., Kozlov V.A. Early markers of phenotypic heterogeneity in the induced model of systemic lupus erythematosus
Колобовникова Ю.В., Дмитриева А.И., Янкович К.И., Васильева О.А., Пурлик И.Л., Новицкий В.В., Уразова О.И., Хардикова С.А. Галектин-1-опосредованная экспрессия белков-регуляторов клеточного цикла и ростовых факторов при раке желудка	165	Kolobovnikova Yu.V., Dmitrieva A.I., Jankovic K.I., Vasilyeva O.A., Purlik I.L., Novitskiy V.V., Urazova O.I., Khardikova S.A. Galectin-1-mediated expression of proteins-regulators of cell cycle and growth factors in gastric cancer
Коненков В.И., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Климонтов В.В., Тян Н.В., Черных В.В., Черных Д.В., Еремина А.В., Трунов А.Н. Комбинации полиморфизмов в регуляторных участках генов цитокинов ассоциированы с диабетической ретинопатией у больных сахарным диабетом 2 типа	173	Konenkov V.I., Shevchenko A.V., Prokofev V.F., Klimontov V.V., Tyan N.V., Chernykh V.V., Chernykh D.V., Eremina A.V., Trunov A.N. Combinations of polymorphisms in the regulatory regions of cytokine genes are associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients
Кублинский К.С., Уразова О.И., Евтушенко И.Д., Куценко И.Г., Ковалева А.С. Связь аллельного полиморфизма генов ангиогенных факторов с развитием генитального эндометриоза, его клиническими проявлениями и эффективностью лечения	184	Kublinskiy K.S., Urazova O.I., Evtushenko I.D., Kutsenko I.G., Kovaleva A.S. Relationship between allelic polymorphism of angiogenesis factor genes and development of genital endometriosis: clinical evidence and treatment efficacy
Курочкина Ю.Д., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Сизиков А.Э., Сулутьян А.Э., Коненкова Л.П., Чумасова О.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Характеристика дендритных клеток у больных ревматоидным артритом с различным типом медикаментозной терапии	195	Kurochkina Yu.D., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Sizikov A.E., Sulutian A.E., Konenkova L.P., Chumasova O.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Characteristics of dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis and different type of drug therapy
Литвинова Л.С., Тодосенко Н.М., Хазиахматова О.Г., Малинина И.П., Юрова К.А. Клеточные реакции CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺ Т-лимфоцитов на дексаметазон в норме и при ревматоидном артрите в системе <i>in vitro</i>	207	Litvinova L.S., Todosenko N.M., Khaziakhmatova O.G., Malinina I.P., Yurova K.A. Cellular reactions of CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺ T-lymphocytes on dexamethason in normal patients and in patients with with rheumatoid arthritis <i>in vitro</i>
Пахомова А.В., Першина О.В., Крупин В.А., Ермолаева Л.А., Ермакова Н.Н., Кудряшова А.И., Дыгай А.М., Пан Э.С., Рыбалкина О.Ю., Скурихин Е.Г. Роль стволовых и прогениторных клеток в регенерации поджелудочной железы и семенников при метаболических нарушениях	220	Pakhomova A.V., Pershina O.V., Krupin V.A., Ermolaeva L.A., Ermakova N.N., Kudryashova A.I., Dygai A.M., Pan E.S., Rybalkina O.Yu., Skurikhin E.G. The role of stem and progenitor cells in the regeneration of the pancreas and testes in metabolic disorders
Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Семенова Л.Ю. Иммунопатогенез формирования atopических заболеваний	233	Poryadin G.V., Salmasi J.M., Kazimirsky A.N., Semenova L.Yu. Immunopathogenesis of atopic diseases formation
Салмина А.Б., Бойцова Е.Б., Моргунов А.В., Панина Ю.А., Горина Я.В., Писарева Н.В., Нода М., Кутищева И.А., Мартынова Г.П. Экспрессия NLRP3 инфламасом церебрального эндотелия при воспалении вирусного генеза <i>in vitro</i>	242	Salmina A.B., Boytsova E.B., Morgunov A.V., Panina Yu.A., Gorina Ya.V., Pisareva N.V., Kutishcheva I.A., Noda M., Martynova G.P. Expression of cerebral endothelial NLRP3 inflammasome in viral inflammation <i>in vitro</i>

Цыганов М.М., Дерюшева И.В., Гарбуков Е.Ю.,
Ибрагимова М.К., Казанцева П.В., Бычков В.А.,
Слонимская Е.М., Литвяков Н.В.

Явление потери гетерозиготности в опухолевой ткани
молочной железы: связь с экспрессией генов монорези-
стентности

Чумакова С.П., Уразова О.И., Шипулин В.М.,
Новицкий В.В., Хардикова С.А.

Цитокины как индукторы постперфузионной системной
воспалительной реакции у кардиохирургических боль-
ных с различной продолжительностью коронарной патологии

ЭКОНОМИКА И УПРАВЛЕНИЕ В ЗДРАВООХРАНЕНИИ

Бедорева И.Ю., Шалыгина Л.С., Латуха О.А.

Модель устойчивого развития научно-исследователь-
ского учреждения здравоохранения, оказывающего
высокотехнологичную медицинскую помощь

Финченко Е.А., Шалыгина Л.С., Садовой М.А.,
Мамонова Е.В., Шалыгина А.В.

Некоторые аспекты кадрового обеспечения здравооох-
ранения в Сибирском федеральном округе

Финченко Е.А., Шарапов И.В., Иванинский О.И.,
Садовой М.А., Шалыгина Л.С.

Некоторые результаты экспертной оценки проблем
организации амбулаторно-поликлинической помощи

Указатель статей и кратких сообщений, опубликованных
в журнале «Бюллетень сибирской медицины» за 2017 г.

Именной указатель 16-го тома

Tsyganov M.M., Deryusheva I.V., Garbukov E.Yu.,
Ibragimova M.K., Kazantseva P.V., Bychkov V.A.,
Slonimskaya E.M., Litviakov N.V.

Phenomenon of loss of heterozygosity in tumour
tissue of breast cancer: association with expression of
monoresistance genes

Chumakova S.P., Urazova O.I., Shipulin V.M.,
Novitsky V.V., Khardikova S.A.

Cytokines as inducers of postperfusion systemic
inflammatory reaction in cardio-surgical patients with
different duration of coronary pathology

ECONOMICS AND HEALTH MANAGEMENT

Bedoreva I.Yu., Shalygina L.S., Latukha O.A.

A model of sustainable development of scientific
research health institutions, providing high-tech
medical care

Finchenko E.A., Shalygina L.S., Sadovoj M.A.,
Mamonova E.V., Shalygina A.V.

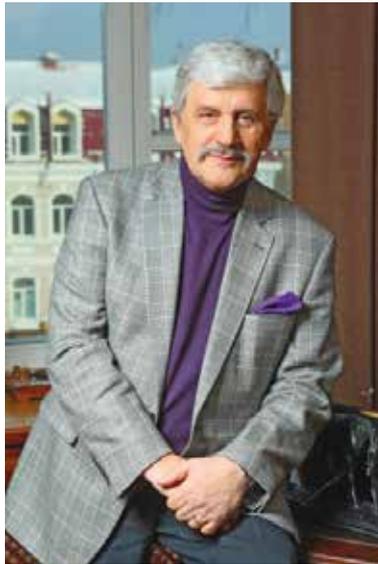
Some aspects of human resources health in Siberian
Federal District

Finchenko E.A., Sharapov I.V., Ivaninskiy O.I.,
Sadovoj M.A., Shalygina L.S.

Results of expert evaluation of problems of
organization of ambulatory-polyclinic assistance

Subject Index of the 16th Volume

Authors Index of the 16th Volume



Дорогие коллеги, друзья!

Вы держите в руках тематический номер нашего журнала, посвященный актуальным проблемам молекулярной и клеточной патологии и патологической физиологии. В создании его приняли участие многие известные ученые-патологи нашей страны – создатели приоритетных научных направлений, руководители ведущих научных школ и всемирно известных лабораторий. Среди авторов размещенных в журнале публикаций академики РАН Е.А. Корнева, (г. Санкт-Петербург), С.И. Колесников и Л.И. Колесникова (г. Москва – Иркутск), В.А. Шкурупий, В.И. Коненков, В.А. Козлов (г. Новосибирск), А.М. Дыгай, В.В. Новицкий (г. Томск), члены-корреспонденты РАН Г.В. Порядин, Д.А. Сычев (г. Москва), М.М. Галагудза (г. Санкт-Петербург), Б.Г. Юшков (г. Екатеринбург), Е.Р. Черных (г. Новосибирск), Н.В. Чердынцева, О.И. Уразова (г. Томск), профессора С.Н. Орлов (г. Москва), Р.Ф. Насырова (г. Санкт-Петербург), Л.С. Литвинова (г. Калининград), В.В. Жданов, Е.А. Степовая, И.А. Хлусов (г. Томск), А.Б. Салмина (г. Красноярск), И.А. Шурыгина (г. Иркутск) и работающие под их руководством талантливые молодые ученые, а также наши коллеги из Германии (Ю.Г. Кжышковска), Канады (О.О. Пономарчук), Японии (М. Нода).

Пользуясь случаем, мы еще раз выражаем глубокую признательность всем нашим коллегам, откликнувшимся на приглашение принять участие в тематическом выпуске нашего журнала и приславшими для опубликования в нем специально подготовленные аналитические обзоры по разработываемым в их научных лабораториях проблемам и оригинальные статьи по результатам исследований последних лет. У нас нет ни малейших сомнений, что все эти публикации вызовут живой читательский интерес не только у ученых-теоретиков, занимающихся разработкой фундаментальных проблем общей патологии и патологической физиологии, но и у широкого круга клиницистов, поскольку многие из них выполнены на клиническом материале и (или) касаются современных подходов к осмыслению многих сложных вопросов патогенеза и патогенетически оправданной терапии таких социально-значимых заболеваний, как сахарный диабет, атеросклероз, онкологические заболевания, болезни старения, аутоиммунные расстройства и др.

Нам было очень интересно и бесконечно приятно работать с материалами, поступившими в адрес редакции журнала и непосредственно в наш (выпускающих редакторов) адрес. Искренне надеемся, что они окажутся полезными и интересными для самого широкого круга читателей.

Выпускающие редакторы номера:
Академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, профессор В.В. Новицкий
Член-корреспондент РАН, профессор О.И. Уразова

УДК 616.8-009.836.12-092

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-7-15

Для цитирования: Гаврилов Ю.В., Деревцова К.З., Корнева Е.А. Орексиnergическая система мозга и патогенетические основы нарушений цикла «сон – бодрствование» при нарколепсии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 7–15.

Орексиnergическая система мозга и патогенетические основы нарушений цикла «сон – бодрствование» при нарколепсии

Гаврилов Ю.В.¹, Деревцова К.З.¹, Корнева Е.А.^{1,2}¹ *Институт экспериментальной медицины (ИЭМ)**Россия, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12*² *Санкт-Петербургский государственный университет**Россия, 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9*

РЕЗЮМЕ

Сон является одной из важнейших витальных функций, и изучение основных механизмов, в результате которых нарушается регуляция цикла «сон – бодрствование», выступает одной из приоритетных задач современной медицинской науки. Известно, что система орексин-содержащих нейронов гипоталамуса, сигналы от которых поступают во все центры бодрствования, играет ведущую роль в инициации и поддержании этого состояния. Недостаточность функции орексиnergической системы гипоталамуса приводит к нарушениям цикла «сон – бодрствование» и развитию тяжелых заболеваний – нарколепсии и катаплексии. Представленный обзор посвящен рассмотрению возможных механизмов развития патологических изменений функций орексин-содержащих нейронов гипоталамуса и заболеваний, обусловленных ими.

Ключевые слова: нарколепсия, катаплексия, орексин, сон, бодрствование.

ВВЕДЕНИЕ

Поддержание состояния бодрствования является сложным активным процессом, вовлекающим множество структур мозга и основные нейромедиаторные системы мозга. Орексиnergические нейроны и орексины являются главным звеном в механизмах обеспечения этой важной функции. Орексиnergические нейроны локализованы симметрично вокруг свода головного мозга в латеральных частях гипоталамуса и имеют проекции ко всем центрам бодрствования, сигналы от орексин-содержащих клеток вызывают деполяризацию нейронов, локализованных в этих областях [1–3]. Показано, что выброс орексина приводит к деполяризации норадренергических нейронов голубого пятна [4], способствует под-

держанию мышечного тонуса при бодрствовании, а деполяризуя гистамиnergические нейроны tuberомаммилярных ядер гипоталамуса [5], препятствует отключению сознания.

Согласно современным представлениям, именно нарушение этих взаимодействий является одной из главных причин возникновения нарколепсии и катаплексии [6, 7]. Нарколепсия как заболевание впервые была охарактеризована более 130 лет назад. Несмотря на это, до недавнего времени механизмы развития этой формы патологии оставались неизвестными. Исследование системы орексин-содержащих нейронов гипоталамуса и установление их роли в развитии нарколепсии явилось самым значимым открытием в этой области после открытия фазы быстрого сна [6]. Попытки исследователей установить причины нарушений функции системы орексин-содержащих нейронов гипоталамуса привели к появлению

✉ Гаврилов Юрий Владимирович, e-mail: yury_doctor@mail.ru.

нескольких возможных теорий о патогенезе этого заболевания. События, происходящие в мозге, инициирующие в дальнейшем деструкцию орексин-содержащих нейронов, будут рассмотрены в этом обзоре.

Нарколепсия поражает в среднем 1 из 2 000 людей и может приводить к полной неспособности индивида к активной социальной жизни. В 2000 г. две исследовательские группы установили, что нарколепсия может быть вызвана селективной недостаточностью орексинергической системы [8, 9]. Эта система представлена небольшой популяцией нейронов (у человека не более 70 000 клеток), локализованных, главным образом, в латеральной части гипоталамуса [10]. Именно разрушение большинства орексин-продуцирующих нейронов в гипоталамусе приводит к развитию нарколепсии, которая сопровождается приступами катаплексии. Помимо катаплексии нарколепсия характеризуется избыточной дневной сонливостью, фрагментированным сном и другими симптомами. У больных нарколепсией наблюдается потеря около 95% нейронов, содержащих орексин. Очевидно, что система орексин-содержащих нейронов по каким-то причинам может селективно подвергаться деструктивным изменениям, что и вызывает развитие нарколепсии, однако причины появления таких изменений не полностью ясны до сих пор.

С момента открытия этой нейромедиаторной системы накоплен большой объем данных об этиологии нарколепсии. Установлено, что в ряде случаев нарколепсия может иметь аутоиммунную природу, поскольку диагностированное у ряда таких пациентов повышенное содержание специфических антител приводило к аутоиммунным реакциям, разрушающим орексин-содержащие нейроны [11]. Однако у части пациентов с нарколепсией уровень этих антител был в пределах нормы. Выяснение механизмов аутоиммунной деструкции орексин-синтезирующих нейронов гипоталамуса и определение группы генов лейкоцитарного антигена человека (HLA), связанных с развитием этого процесса и являющихся важным диагностическим критерием, представляется перспективным.

Не меньше вопросов возникает относительно проявления главных симптомов, сопровождающих нарколепсию, – катаплексии, гипнагогических галлюцинаций и сонного паралича. Эти симптомы имеют много общего с физиологическим состоянием, характерным для rapid eye movement (REM) фазы сна [12]. Показано, что при нарколепсии, вызванной недостаточностью эндогенно-

го орексина, приступы могут провоцироваться различными стрессорными воздействиями, часто требующими повышенной физической активности [13, 14]. Во время катаплексических приступов в мозге происходит быстрый переход из состояния бодрствования в состояние парадоксальной фазы сна, при этом наблюдается мышечная атония, потеря сознания [15]. Механизмы развития таких переходов недостаточно изучены. Согласно современным представлениям, центры бодрствования регулируются ГАМКергическими нейронами ventrolateral preoptic nucleus (VLPO) по механизму положительной обратной связи [16]. Эти нервные клетки могут посылать тормозные сигналы к нейронам, локализованным в центрах бодрствования. Эти же нейроны в свою очередь могут посылать тормозные сигналы к клеткам, содержащим ГАМК в VLPO. Процесс перехода из состояния бодрствования в состояние сна происходит в момент снижения активности активирующих нейронов, расположенных в центрах бодрствования, что сразу приводит к активации тормозных нейронов VLPO, посылающих сигналы в эти центры. Выраженность этого процесса возрастает, пока не срабатывает спусковой flip-flop механизм, обеспечивающий переход в фазу сна. Установлено, что орексины, возбуждая все центры бодрствования, препятствуют этому переключению, не подавляя при этом центры сна, являясь, таким образом, главным звеном в регуляции цикла «сон – бодрствование» [17, 18].

Эмоциональный стресс, требующий активных кратковременных энергетических затрат и реализующийся с участием лимбической системы (смех, возбуждение, смущение, страх, гнев, физические упражнения, испуг), провоцирует приступы нарколепсии и катаплексии. Часто нарколепсия сопровождается эндокринно-вегетативными нарушениями, артериальной гипотонией, ожирением, лимфоцитозом, эозинофилией, амимией [19]. Помимо характерных для нарколепсии проявлений у пациентов, страдающих нарколепсией, часто развивается депрессия вследствие неспособности к длительной целенаправленной деятельности. Течение нарколепсии хроническое, однако показано, что с возрастом степень выраженности заболевания снижается. Следует отметить, что мужчины страдают нарколепсией чаще [20].

Как было отмечено выше, многие исследователи считают, что нарколепсия у человека является аутоиммунным заболеванием [13, 14] и вызывается наличием группы генов лейкоцитарного антигена человека (HLA). Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению это-

го вопроса, механизмы развития аутоиммунного процесса неизвестны.

Экспериментальная модель нарколепсии основана на селективном разрушении орексин-содержащих нейронов у животных, при этом отмечали сопутствующие нарушения: ожирение, анорексию, снижение локомоторной активности, отсутствие привыкания к наркотическим препаратам, снижение реакции на стресс. Гипертермическая реакция на стресс у таких животных отсутствовала [19].

Описана и генетическая форма нарколепсии, развитие которой происходит при нарушении экспрессии гена препроорексина или мутации гена *OxR2* (у собак) [13, 14]. Получены экспериментальные модели этого заболевания, изучение которых позволило установить принципиальные различия в клинической картине генетически обусловленной и аутоиммунной форм нарколепсии [13, 14].

При воспроизведении генетической формы нарколепсии в эксперименте (животные, нокаутные по гену препроорексина) наблюдали анорексию, снижение уровня локомоторной активности, частоты сердечных сокращений, артериального давления и (так же, как у людей) регистрировали невосприимчивость к аддиктивным расстройствам и стрессорным воздействиям [21, 22]. У животных, нокаутных по гену рецептора к орексину *OxR2*, были отмечены сходные симптомы [23]. Следует отметить, что при генетической форме заболевания, связанной с нарушением лиганд-рецепторного взаимодействия на мембранах орексин-содержащих нейронов, многие нарушения функций менее выражены (например, ожирение), что может свидетельствовать о наличии компенсаторных регуляторных механизмов, развивающихся еще в начале жизни [23].

При недостаточности орексинергической системы, вызванной аутоиммунными процессами, приводящими к постепенному разрушению орексин-содержащих нейронов в гипоталамусе, ухудшение клинических проявлений и появление дополнительных симптомов может быть связано с участием в формировании этих процессов других биологически активных веществ, синтезирующихся в нейронах, содержащих орексин (динорфин, neuronal activity-regulated pentraxin (NARP), галанин и др.) [24].

Разнообразие клинической картины течения нарколепсии связывают с функциональной неоднородностью популяции гипоталамических орексин-содержащих нейронов [25]. В ряде работ продемонстрирована функциональная дискрет-

ность популяции орексин-содержащих нейронов гипоталамуса. Об этом свидетельствует избирательность реакции орексин-содержащих нейронов, локализованных в структурах гипоталамуса крыс (lateral hypothalamus area (ЛНА), posterior hypothalamus (PH), dorsomedial hypothalamus (ДМН)), в ответ на применение стрессорных стимулов антигенной и неантигенной природы [26–30]. Дискретность популяции орексин-содержащих нейронов гипоталамуса ярко продемонстрирована в работах Т. Thannikal (2009). Потеря орексин-содержащих нейронов в гипоталамусе при нарколепсии без катаплексических приступов ограничивалась ядрами PH и lateral hypothalamus (ЛН). При нарколепсии с катаплексией потеря клеток наблюдалась в ядрах anterior hypothalamus (АН), dorsal hypothalamus (ДН), ДМН, PH и ЛН [25]. Установлено, что катаплексия как важный симптом встречается, по разным данным, у 20–50% больных нарколепсией [31]. Наличие таких симптомов, как выключение или сохранение сознания при катаплексических приступах, гипнагогические галлюцинации и синдром сонного апноэ также проявляются не в каждом случае [32].

Кроме того, помимо патологических изменений, наблюдающихся в орексин-содержащих нейронах гипоталамуса, при нарколепсии обнаружены изменения функции других активирующих систем, синтезирующих нейромедиаторы гистамин [33] и галанин [34]. Пониженный уровень гистамина в спинномозговой жидкости у пациентов с нарколепсией коррелирует с иммуногистохимически визуализируемым увеличением количества гистамин-содержащих нейронов, локализованных в тубермамиллярных ядрах гипоталамуса (TMN), что может свидетельствовать о нарушении баланса синтеза и утилизации этого нейромедиатора. Количество иммунопозитивных клеток, содержащих гистамин, увеличивалось на 94% у пациентов, страдавших нарколепсией (рис.).

Аналогичные результаты были получены на двух экспериментальных моделях нарколепсии у мышей. Количество определяемых гистохимически гистаминергических нейронов TMN было увеличено на 53% у мышей, нокаутных по гену препроорексина, в сравнении с показателями у мышей дикого типа, тогда как у трансгенных мышей (orexin / ataxin-3) констатировано увеличение их количества на 28% [35].

Y.V. Gavrilov et al. (2013) высказывали предположение о компенсаторной роли установленных изменений в ответ на потерю активирующих сигналов, посылаемых орексин-содержащими

нейронами. Эти же изменения, в свою очередь, могут вносить свой вклад в клиническую картину нарколепсии. Так, например, показано, что у ряда пациентов наблюдается фрагментированный ночной сон, а во время приступов катаплексии сохраняется сознание [36]. Кроме того, в орек-

син-содержащих нейронах синтезируется ряд биологически активных веществ, нейромедиаторов и нейрогормонов, участвующих в поддержании жизненно важных функций, нарушение синтеза которых меняет клиническую картину заболевания, что затрудняет диагностику [37].

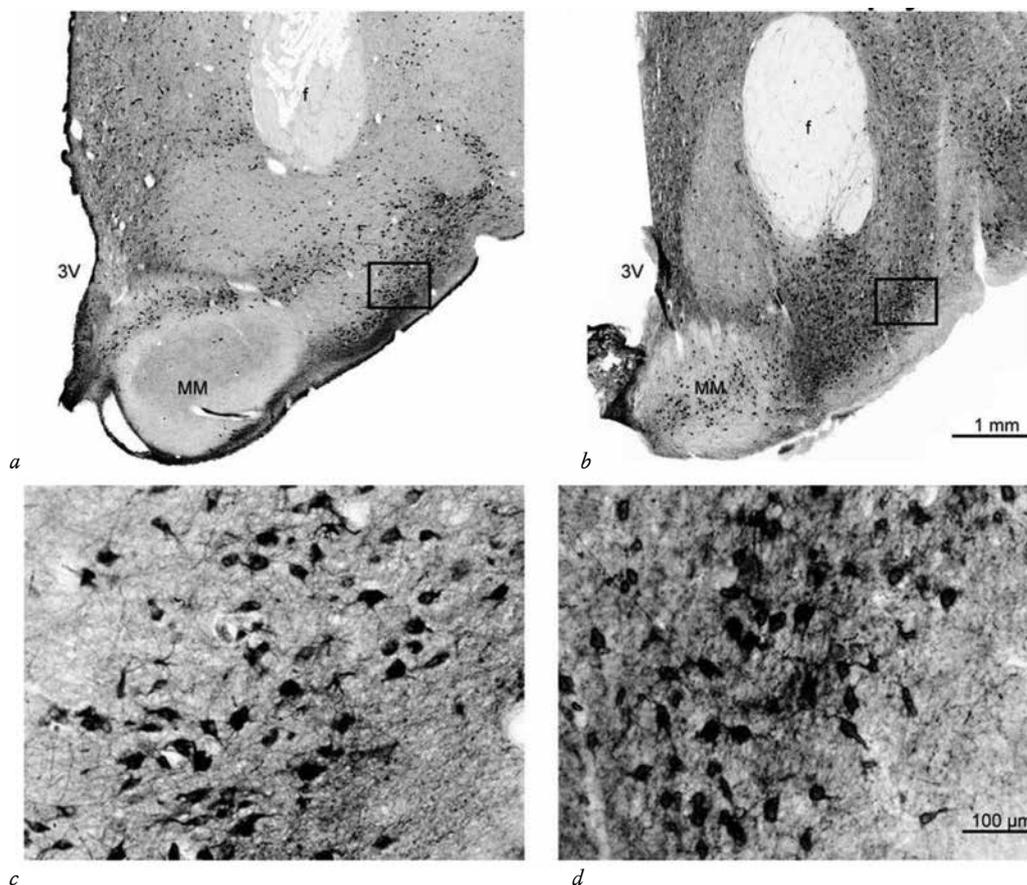


Рисунок. Микрофотографии срезов гипоталамуса людей контрольной группы (а) и больных нарколепсией (б), окрашенных антителами к histidine decarboxylase (HDC) [34]. Область гипоталамуса, примыкающая к мамиллярным телам, содержит приблизительно на 60% больше нейронов, синтезирующих гистамин. Ниже показаны микрофотографии срезов мозга больных нарколепсией (с) и (d), где роstralнее мамиллярных тел количество иммунопозитивных клеток увеличено, тогда как каудальнее плотность расположения нейронов снижена

Figure. Microphotographs of hypothalamus sections in the control group (a) and narcolepsy patients (b), stained with antibodies to Histidine decarboxylase (HDC) [34]. The area of the hypothalamus, adjacent to the mammillary bodies, contains approximately 60% more neurons synthesizing histamine. Below there are the microphotographs of the brain sections of patients with narcolepsy (c) and (d), where the number of immunopositive cells rostral to the mammillary bodies is enlarged, while the density of caudal neuronal arrangement is reduced

Патологические изменения в орексин-содержащих нейронах гипоталамуса у человека в основном развиваются в подростковом и юношеском возрасте и не являются врожденными. Развитие нарколепсии как основного заболевания среди близких родственников регистрируется лишь в 1–2% случаях [38]. Исследования, проведенные на монозиготных близнецах, не выявили 100%-й генетической предрасположенности – из 20 обследованных пар только у семи развивалась нарколепсия (35%). В то же время

всего у трех пар из этих пяти тест на антитела HLA-DQB1*0602 был положительным, что не позволяет сделать заключение об исключительно аутоиммунной природе данного заболевания [39]. Однако вопрос о возможном существовании генов, при наличии которых действие определенных триггерных факторов приводит к развитию заболевания, остается открытым. Из упоминаемых в литературе триггерных факторов основными являются черепно-мозговая травма [38–40], резкая смена привычного режима сна и бодрствования

[41, 42], а также различные инфекционные заболевания [43, 44]. Так, у пациентов с острым течением нарколепсии обнаруживается повышенный уровень антител к стрептолизину-О стрептококков группы А, что является индикатором недавно перенесенной стрептококковой инфекции, вызванной *Streptococcus pyogenes* [45]. Инфицирование *Streptococcus pyogenes* у пациентов младше 21 года повышает риск развития нарколепсии-катаплексии в 5,4 раза [46]. В 2014 г. в Норвегии у двух детей диагностировали нарколепсию после того, как им была сделана вакцинация препаратом Pandemrix против свиного гриппа [47, 48].

В большинстве клинических случаев нарколепсии мутаций гена препроорексина, а также генов рецепторов к орексинам А и В не идентифицировали [49–51]. Также не было обнаружено подобных мутаций у близких родственников пациентов, страдающих нарколепсией. Следует отметить, что у части таких пациентов тест на антитела HLA-DQB1*0602 был негативным. Упоминается и один установленный случай генетической формы ранней нарколепсии и катаплексии у шестимесячного младенца. В этом случае не удалось идентифицировать орексин А в спинномозговой жидкости [49].

Нарколепсия, диагностированная у других млекопитающих, определяется мутацией гена *OxR2*, в результате которой нарушается способность рецептора воспринимать сигнал от орексин-содержащих нейронов [52]. У мышей, нокаутных по гену препроорексина, также проявляются симптомы нарколепсии, а применение антинарколептических препаратов приводит к увеличению экспрессии гена *c-fos* в орексин-содержащих нейронах гипоталамуса по сравнению с периодами сна [28, 53, 54].

Положение о том, что развитие нарколепсии может быть обусловлено наличием антител HLA-DR2, впервые было высказано в Японии в 1983 г. [55, 56]. Учеными Европы и США установлено, что 90–100% пациентов, страдающих нарколепсией с катаплексией, являются носителями субтипа HLA-DR2. Это открытие и привело к появлению гипотезы об аутоиммунной природе заболевания. Многочисленные попытки описать гаплотип пациентов с различными формами нарколепсии не привели к устойчивому результату, и наличие определенных лейкоцитарных антигенов субтипа HLA-DR2 стало рассматриваться в качестве важного маркера при диагностике нарколепсии. При этом полезность HLA-типирования ограничена тем фактом, что HLA-ассоциированный тип нарколепсии встречается в 90% случаев у паци-

ентов с катаплексией [57]. У людей, страдающих другими формами нарколепсии, наличие тех или иных аллелей генов HLA не столь однозначно.

Таким образом, приведенные результаты позволяют прийти к выводам о том, что HLA-типирование, как и идентификация орексина А в спинномозговой жидкости, являются полезным инструментом для установления диагноза нарколепсии. Однако же эти данные не позволяют сделать окончательные выводы о том, имеет ли нарколепсия аутоиммунную природу, хотя наличие антигенов HLA-DQ и HLA-DR в крови больных предопределяет развитие болезни.

Несмотря на то что нет четких данных о существовании нейродегенеративных процессов, приводящих к развитию нарколепсии, показано, что некоторые формы патологии могут приводить к потере орексин-синтезирующих нейронов в гипоталамусе. При таких заболеваниях, как болезнь Паркинсона [58, 59], хорей Гантингтона [60], детектировалось значительное снижение количества гипоталамических орексин-содержащих нейронов (у более 50% популяции), но уровень орексина А в спинномозговой жидкости часто оставался в пределах нормы [61].

Исследование срезов мозга умерших пациентов с нарколепсией на возможное накопление белковых включений типа β -амилоида, убиквитина и других веществ не дало положительных результатов [62]. Нарколепсия как заболевание, появившись одномоментно, не прогрессирует с возрастом, как другие нейродегенеративные расстройства; более того, некоторые симптомы становятся менее выраженными [63]. Эти данные позволяют исключить нейродегенеративную природу нарколепсии.

Следует отметить случаи развития вторичной нарколепсии, вызванной действием опухолей, локализованных вблизи третьего желудочка. Высказывается предположение о том, что опухоль специфически воздействует на гематоэнцефалический барьер, повышая его проницаемость, или же приводит к появлению очагов воспаления в гипоталамусе, что, в свою очередь, может инициировать начало аутоиммунной деструкции орексин-содержащих нейронов гипоталамуса [64].

Результаты работ, свидетельствующие о том, что обнаружение HLA-DR2 и HLA-DQB1*0602 в крови ассоциировано с развитием нарколепсии, позволили большинству исследователей склоняться к положению об аутоиммунной природе нарколепсии [65, 66]. Однако классические аутоиммунные заболевания, такие как системная красная волчанка, ревматоидный артрит или

миастения, не встречаются у пациентов, страдающих нарколепсией. Общие аутоантитела против ядерных белков так же редко обнаруживаются в плазме нарколептических больных. Интрацеребральный синтез иммуноглобулинов и олигоклональные группы не идентифицируются в спинномозговой жидкости. До сих пор не выявлено специфических антител к орексину А и В и рецепторам OXR1 и OXR2. Не выявлялись и другие признаки воспаления в ЦНС, такие как инфильтрация Т- и В-лимфоцитами в ЦНС, выход моноцитов из кровяного русла или активации клеток микроглии. Учитывая эти доводы, возможность аутоиммунной природы нарколепсии остается под вопросом и требует дальнейшего изучения.

Таким образом, несмотря на прогресс в исследовании системы орексин-содержащих нейронов гипоталамуса и их роли в развитии нарколепсии, остается много неясного в патогенезе этого заболевания. Очевидно, что деструктивные изменения, происходящие в орексин-содержащих нейронах гипоталамуса, играют ведущую роль в патогенезе нарколепсии и катаплексии, но вопрос о причинах развития этих изменений во многих случаях остается открытым. Установлено и участие других активирующих нейромедиаторных систем, компенсирующих недостаточность функции орексинергической системы мозга, но в то же время усугубляющих течение нарколепсии, поскольку эти процессы обуславливают появление других симптомов и дисфункций добавлением других симптомов. Обнаружение инфекционных триггеров (стрептококковой инфекции), а также HLA-ассоциированного типа нарколепсии создает предпосылки для разработки диагностических и терапевтических инструментов, которые позволят эффективно предотвращать развитие нарколепсии у пациентов группы риска.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии источников финансирования при проведении исследования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Eriksson K.S., Sergeeva O., Brown R.E., and Haas H.L. Orexin/hypocretin excites the histaminergic neurons of

- the tuberomammillary nucleus // *J. Neurosci.* 2001; 21: 9273–9279. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03243.x.
2. Marcus J.N., Aschkenasi C.J., Lee C.E., Chemelli R.M., Saper C.B., Yanagisawa M. and Elmquist J.K. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain // *J. Comp. Neurol.* 2001; 435: 6–25. DOI: 10.1002/cne.1190.
3. Trivedi P., Yu H., MacNeil D.J., Van der Ploeg L.H. and Guan X.M. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain // *FEBS Lett.* 1998; 438: 71–75. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)01266-6.
4. Pace-Schott E.F., Hobson J.A. The neurobiology of sleep: genetics, cellular physiology and subcortical networks // *Nat. Rev. Neurosci.* 2002; 3: 591–605. DOI: 10.1038/nrn895.
5. Huang Z.L., Qu W.M., Li W.D., Mochizuki T., Eguchi N., Watanabe T., Urade Y. and Hayaishi O. Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98: 9965–9970. DOI: 10.1073/pnas.181330998.
6. Mignot E. A commentary on the neurobiology of the hypocretin/orexin system // *Neuropsychopharmacology.* 2001 Nov; 25 (5 Suppl.): S5–13. DOI: 10.1016/S0893-133X(01)00316-5.
7. Abad V.C., Guilleminault C. New developments in the management of narcolepsy // *Nat. Sci. Sleep.* 2017, Mar. 3; 9: 39–57. DOI: 10.2147/NSS.S103467.
8. Kousaku Ohno and Takeshi Sakurai. Orexin neuronal circuitry: Role in the regulation of sleep and wakefulness // *Frontiers in Neuroendocrinology.* 2008; 29 (1): 70–87. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23078-8_4.
9. Thomas Chacko Thannickal, A decade of hypocretin/orexin: Accomplishments in sleep medicine // *Sleep Medicine Reviews.* 2009; 13 (1): 5–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smrv.2008.09.004>.
10. Davis J.F., Choi D.L., Benoit S.C. (2011). 24. Orexigenic Hypothalamic Peptides Behavior and Feeding – 24.5 Orexin. In Preedy V.R., Watson R.R., Martin C.R. Handbook of Behavior, Food and Nutrition. Springer: 361–2. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92271-3_24.
11. Lin L., Hungs M., Mignot E. Narcolepsy and the HLA region // *J. Neuroimmunol.* 2001; Jul. 2; 117 (1–2): 9–20. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(01\)00333-2](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(01)00333-2).
12. Dement W.C., Carskadon M.A., Guilleminault C., Zarcone V.P. Narcolepsy // *Diagnosis and treatment. Prim Care.* 1976; Dec.; 3 (4): 609–23.
13. Mignot E., Taheri S., Nishino S. Sleeping with the hypothalamus: emerging therapeutic targets for sleep disorders // *Nature Neuroscience.* 2002; 5: 1071–1075. DOI: 10.1038/nn944.
14. Mignot E., Lammers G.J., Ripley B., Okun M., Nevsimalova S., Overeem S., Vankova J., Black J., Harsh J., Bassetti C., Schrader H., Nishino S. The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias // *Arch. Neurol.* 2002; Oct.; 59 (10): 1553–1562. DOI: 10.1001/archneur.59.10.1553.

15. Wurtman R.J. Narcolepsy and the hypocretins // *Metabolism*. 2006; Oct.; 55(10 Suppl. 2): S36–9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2006.07.011>.
16. Gvilia I. Underlying brain mechanisms that regulate sleep-wakefulness cycles // *Int. Rev. Neurobiol.* 2010; 93: 1–21. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(10\)93001-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(10)93001-8).
17. Taheri S., Zeitzer J.M., Mignot E. The role of hypocretins (orexins) in sleep regulation and narcolepsy // *Annu Rev. Neurosci.* 2002; 25: 283–313. Epub. 2002; Mar; 20. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142826>.
18. Mieda M. The Roles of Orexins in Sleep/Wake Regulation // *Neurosci Res.* 2017; May; 16: S0168–0102 (16) 30320-0. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.03.015>.
19. Hara J., Beuckmann C.T., Nambu T., Willie J.T., Chemelli R.M., Sinton C.M., Sugiyama F., Yagami K., Goto K., Yanagisawa M., Sakurai T. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity // *Neuron*. 2001; May; 30 (2): 345–354. [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00293-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00293-8).
20. Won C., Mahmoudi M., Qin L., Purvis T., Mathur A., Mohsenin V. The impact of gender on timeliness of narcolepsy diagnosis // *J. Clin. Sleep. Med.* 2014; Jan. 15; 10 (1): 89–95. <http://dx.doi.org/10.5664/jcs.m.3370>.
21. Chemelli R.M., Willie J.T., Sinton C.M., Elmquist J.K., Scammell T., Lee C., Richardson J.A., Williams S.C., Xiong Y., Kisanuki Y., Fitch T.E., Nakazato M., Hammer R.E., Saper C.B., and Yanagisawa M. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation // *Cell*. 1999; 98: 437–451. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81973-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81973-X).
22. Mochizuki T., Arrigoni E., Marcus J.N., Clark E.L., Yamamoto M., Honer M., Borroni E., Lowell B.B., Elmquist J.K., Scammell T.E. Orexin receptor 2 expression in the posterior hypothalamus rescues sleepiness in narcoleptic mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; Mar. 15; 108 (11): 4471–6. DOI: 10.1073/pnas.1012456108.
23. Hara J., Yanagisawa M., Sakurai T. Difference in obesity phenotype between orexin-knockout mice and orexin neuron-deficient mice with same genetic background and environmental conditions // *Neurosci Lett*. 2005; Jun. 3; 380 (3): 239–422. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.01.046>.
24. Chou T.C., Lee C.E., Lu J., Elmquist J.K., Hara J., Willie J.T., Beuckmann C.T., Chemelli R.M., Sakurai T., Yanagisawa M., Saper C.B., Scammell T.E. Orexin (hypocretin) neurons contain dynorphin // *J. Neurosci.* 2001; Oct. 1; 21 (19): RC168.
25. Thannickal T.C., Nienhuis R., Siegel J.M. Localized Loss of Hypocretin (Orexin) Cells in Narcolepsy Without Cataplexy // *Sleep*. 2009; 32 (8): 993–998. <https://doi.org/10.1093/sleep/32.8.993>.
26. Shainidze K.Z., Novikova N.S. Immunoreactivity of Hypothalamic Orexin-Containing Neurons in Rats in Movement Restriction and Cooling // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2011; 41 (2): 213–221. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s11055-011-9402-0>.
27. Perekrest S.V., Shainidze K.Z., Loskutov Y.V., Abramova T.V., Novikova N.S., Korneva E.A. Immunoreactivity of Orexin-Containing Neurons in the Hypothalamus and the Level of Expression of the Preproorexin Gene in These Cells after Administration of Lipopolysaccharide // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2013; 43 (2): 256–260. DOI:10.1007/s11055-013-9725-0.
28. Estabrooke I.V., McCarthy M.T., Ko E. et al. Fos expression in orexin neurons varies with behavioral state // *J. Neurosci.* 2001; 21: 1656–1662.
29. Kurose T., Ueta Y., Yamamoto Y. et al. Effects of restricted feeding on the activity of hypothalamic orexin (OX)-A containing neurons and OX2 receptor mRNA level in the paraventricular nucleus of rats // *Regul. Pept.* 2002. 104: 145–151. doi:10.1016/s0167-0115(01)00340-8.
30. Moriguchi T., Sakurai T., Nambu T. et al. Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia // *Neurosci Lett*. 1999; 264: 101–104. doi:10.1016/s0304-3940(99)00177-9.
31. Mignot E., Hayduk R., Black J., Grumet F.C., Guilleminault C. HLA DQB1*0602 is associated with cataplexy in 509 narcoleptic patients // *Sleep*. 1997; Nov.; 20 (11): 1012–1020. DOI:10.1093/sleep/20.11.1012.
32. Pintwala S., Peever J. Circuit mechanisms of sleepiness and cataplexy in narcolepsy // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2017 Mar. 23; 44: 50–58. DOI:10.1016/j.conb.2017.02.010.
33. Valko P.O., Gavrillov Y.V., Yamamoto M., Reddy H., Haybaeck J., Mignot E., Baumann C.R., Scammell T.E. Increase of histaminergic tuberomammillary neurons in narcolepsy // *Ann. Neurol.* 2013; Dec.; 74 (6): 794–804. doi:10.1002/ana.24019
34. Gavrillov Y.V., Ellison B.A., Yamamoto M., Reddy H., Haybaeck J., Mignot E., Baumann C.R., Scammell T.E., Valko P.O. Disrupted Sleep in Narcolepsy: Exploring the Integrity of Galanin Neurons in the Ventrolateral Preoptic Area // *Sleep*. 2016; May 1; 39 (5): 1059–1062. doi:10.5665/sleep.5754
35. Billiard M. Narcolepsy. Clinical features and aetiology // *Ann. Clin. Res.* 1985; 17 (5): 220–226.
36. Mignot E. Genetic and familial aspects of narcolepsy // *Neurology*. 1998; 50 (2 Suppl. 1): S16–22. DOI: 10.1212/wnl.50.2_suppl_1.s16.
37. Lin L., Mignot E. Human leukocyte antigen and narcolepsy: present status and relationship with familial history and hypocretin deficiency. In: Bassetti C., Billiard M., Mignot E., editors. Narcolepsy and hypersomnia. New York: Informa Health Care. 2007; 220: 411–426.
38. Gill A.W. Idiopathic and traumatic narcolepsy // *Lancet*. 1941; 1: 474. DOI: 10.1016/s0140-6736(00)61098-x.
39. Guilleminault C., Faull K.F., Miles L., van den Hoed J. Posttraumatic excessive daytime sleepiness: a review of 20 patients // *Neurology*. 1983; 33 (12): 1584–1589. DOI: 10.1212/wnl.33.12.1584.
40. Lankford D.A., Wellman J.J., O'Hara C. Posttraumatic narcolepsy in mild to moderate closed head injury //

- Sleep*. 1994; 17 (8 Suppl.): S25–8. DOI: 10.1093/sleep/17.suppl_8.s25
41. Honda Y. A monozygotic pair completely discordant for narcolepsy, with sleep deprivation as a possible precipitating factor // *Sleep. Biol. Rhythms*. 2003; 1: 147–149. DOI: 10.1046/j.1446-9235.2003.00027.x.
 42. Orellana C., Villemin E., Tafti M., Carlander B., Besset A., Billiard M. Life events in the year preceding the onset of narcolepsy // *Sleep*. 1994; 17 (8 Suppl.): S50–3. DOI: 10.1093/sleep/17.suppl_8.s50.
 43. Roth B. Narcolepsy and hypersomnia. Basel: Karger; 1980. DOI: 10.1159/000386922.
 44. Mueller-Eckhardt G., Meier-Ewart K., Schiefer H.G. Is there an infectious origin of narcolepsy? // *Lancet*. 1990; 335 (8686): 424. DOI: 10.1016/0140-6736(90)90270-f.
 45. Aran A., Lin L., Nevsimalova S. et al. Elevated anti-streptococcal antibodies in patients with recent narcolepsy onset // *Sleep*. 2009; 32 (8): 979–983. DOI: 10.1093/sleep/32.8.979.
 46. Koepsell T.D., Longstreth W.T., Ton T.G. Medical exposures in youth and the frequency of narcolepsy with cataplexy: a population-based case-control study in genetically predisposed people // *J. Sleep. Res.* 2010; 19 (1 Pt 1): 80–86. DOI: 10.1111/j.1365-2869.2009.00756.x.
 47. Flu vaccine may cause narcolepsy [Электронный ресурс]. ScienceNordic. 2012, September 17. <http://scienordic.com/flu-vaccine-may-cause-narcolepsy>.
 48. Bomfim I.L., Lamb F., Fink K., Szakács A., Silveira A., Franzén L., Azhary V., Maeurer M., Feltelius N., Darin N., Hallböök T., Arnheim-Dahlström L., Kockum I., Olsson T. The immunogenetics of narcolepsy associated with A(H1N1)pdm09 vaccination (Pandemrix) supports a potent gene-environment interaction // *Genes Immun.* 2017 Mar; 18 (2): 75–81. DOI: 10.1038/gene.2017.1.
 49. Peyron C., Faraco J., Rogers W. et al. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains // *Nat. Med.* 2000; 6 (9): 991–997.
 50. Hungs M., Lin L., Okun M., Mignot E. Polymorphisms in the vicinity of the hypocretin/orexin are not associated with human narcolepsy // *Neurology*. 2001; 57 (10): 1893–1895. DOI: 10.1212/wnl.57.10.1893.
 51. Olafsdottir B.R., Rye D.B., Scammell T.E., Matheson J.K., Stefansson K., Gulcher J.R. Polymorphisms in hypocretin/orexin pathway genes and narcolepsy // *Neurology*. 2001; 57 (10): 1896–1899. DOI: 10.1212/wnl.57.10.1896.
 52. Okun M.L., Lin L., Pelin Z., Hong S., Mignot E. Clinical aspects of narcolepsy-cataplexy across ethnic groups // *Sleep*. 2002; Feb. 1; 25 (1): 27–35. DOI: 10.1093/sleep/25.1.27.
 53. Chemelli R.M., Willie J.T., Sinton C.M., Elmquist J.K., Scammell T., Lee C., Richardson J.A., Williams S.C., Xiong Y., Kisanuki Y., Fitch T.E., Nakazato M., Hammer R.E., Saper C.B., and Yanagisawa M. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation // *Cell*. 1999; 98: 437–451. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81973-x.
 54. Scammell T.E., Estabrooke I.V., McCarthy M.T., Chemelli R.M., Yanagisawa M., Miller M.S. and Saper C.B. Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness // *J. Neurosci.* 2000; 20: 8620–8628.
 55. Honda Y., Asake A., Tanaka Y., Juji T. Discrimination of narcolepsy by using genetic markers and HLA // *Sleep Res.* 1983; 12: 254.
 56. Juji T., Satake M., Honda Y., Doi Y. HLA antigens in Japanese patients with narcolepsy. All the patients were DR2 positive // *Tissue Antigens*. 1984; 24: 316–319. doi:10.1111/j.1399-0039.1984.tb02144.x.
 57. Mignot E., Hayduk R., Black J., Grumet F.C., Guilleminault C. HLA DQB1*0602 is associated with cataplexy in 509 narcoleptic patients // *Sleep*. 1997; 20 (11): 1012–1020. DOI: 10.1093/sleep/20.11.1012.
 58. Thannickal T.C., Lai Y.Y., Siegel J.M. Hypocretin (orexin) cell loss in Parkinson's disease // *Brain*. 2007; 130 (Pt. 6): 1586–1595. DOI: 10.1093/brain/awm097.
 59. Fronczek R., Overeem S., Lee S.Y. et al. Hypocretin (orexin) loss in Parkinson's disease // *Brain*. 2007; 130 (Pt. 6): 1577–1585. DOI: 10.1093/brain/awm090.
 60. Aziz A., Fronczek R., Maat-Schieman M. et al. Hypocretin and melanin-concentrating hormone in patients with Huntington disease // *Brain Pathol.* 2008; 18 (4): 474–483. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2008.00135.x.
 61. Bourgin P., Zeitzer J.M., Mignot E. CSF hypocretin-1 assessment in sleep and neurological disorders // *Lancet. Neurol.* 2008; 7 (7): 649–662. DOI: 10.1016/s1474-4422(08)70140-6.
 62. Honda M., Arai T., Fukuzawa M. et al. Absence of ubiquitinated inclusions in hypocretin neurons of patients with narcolepsy // *Neurology*. 2009; 73 (7): 511–517. DOI: 10.1212/wnl.0b013e3181b2a6af.
 63. Dauvilliers Y., Gosselin A., Paquet J., Touchon J., Billiard M., Montplaisir J. Effect of age on MSLT results in patients with narcolepsy-cataplexy // *Neurology*. 2004; 62 (1): 46–50. DOI: 10.1212/01.wnl.0000101725.34089.1e.
 64. Mignot E. A hundred years of narcolepsy research // *Arch. Ital. Biol.* 2001; 139 (3): 207–220. DOI: <https://doi.org/10.4449/aib.v139i3.500>.
 65. Moreira F., Pedrazzoli M., Dos Santos Coelho F.M. et al. Clock gene polymorphisms and narcolepsy in positive and negative HLA-DQB1*0602 patients // *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 2005; 140 (1–2): 150–154. DOI: 10.1016/j.molbrainres.2005.07.015.
 66. Adriano Fontana, Heidemarie Gast, Thomas Birchler Narcolepsy: Autoimmunity or Secondary to Infection? // *Narcolepsy*. 2011; 1: 19–26. DOI: 10.1007/978-1-4419-8390-9_2.

Поступила в редакцию 29.06.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Гаврилов Юрий Владимирович, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, отдел общей патологии и патологической физиологии, ИЭМ, г. Санкт-Петербург.

Деревцова (Шаинидзе) Кристина Зурабовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, отдел общей патологии и патологической физиологии, ИЭМ, г. Санкт-Петербург.

Корнева Елена Андреевна, академик РАН, д-р мед. наук, гл. науч. сотрудник, отдел общей патологии и патологической физиологии, ИЭМ, г. Санкт-Петербург; профессор кафедры патофизиологии, Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург.

(✉) Гаврилов Юрий Владимирович, e-mail: yury_doctor@mail.ru.

УДК 616.8-009.836.12-092

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-7-15

For citation: Gavrilo Yu.V., Derevtsova K.Z., Korneva H.A. Orexin system and pathogenesis of sleep-wake cycle disturbances in narcolepsy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 7–15.

Orexin system and pathogenesis of sleep-wake cycle disturbances in narcolepsy

Gavrilov Yu.V.¹, Derevtsova K.Z.¹, Korneva H.A.^{1,2}

¹ *Institute of Experimental Medicine (IEM)*
12, Academician Pavlova Str., St.-Petersburg, 197376, Russian Federation

² *St.-Petersburg State University*
7–9, Universitetskay Nab., St.-Petersburg, 199034, Russian Federation

ABSTRACT

Sleep is the one of the most important vital functions of the body. The study of the primary mechanisms that result in disturbance of the sleep-wake cycle is a priority of modern medical science. It is known that the orexin neurons of the hypothalamus, which send projections to all waking centers, play a leading role in initiating and maintaining this state. Insufficiency of the function of the orexinergic system of the hypothalamus leads to disturbances in the sleep-wake cycle and the development of the severe diseases of narcolepsy and cataplexy. The presented review is devoted to the investigation of possible mechanisms of development of pathological changes in the orexin-containing neurons functions and the diseases caused by them.

Key words: narcolepsy, cataplexy, orexin, sleep, wakefulness.

Received June 29.2017
Accepted November 08.2017

Gavrilov Yuri V., PhD, Senior Researcher, Department of General Pathology and Pathological Physiology, IEM, St.-Petersburg, Russian Federation.

Derevtsova (Shainidze) Kristina Z., PhD, Senior Researcher, Department of General Pathology and Pathological Physiology, IEM, St.-Petersburg, Russian Federation.

Korneva Elena A., Academician of the Russian Academy Sciences, DM, Chief Senior Researcher, Department of General Pathology and Pathological Physiology; Professor of Pathophysiology Department, St.-Petersburg State University, St.-Petersburg, Russian Federation.

(✉) Gavrilov Yuri V., e-mail: yury_doctor@mail.ru.

УДК 616-098:577.125.33:577.121.7

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-16-29

Для цитирования: Колесникова Л.И., Даренская М.А., Колесников С.И. Свободнорадикальное окисление: взгляд патофизиолога. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 16–29.

Свободнорадикальное окисление: взгляд патофизиолога

Колесникова Л.И., Даренская М.А., Колесников С.И.

Научный центр (НЦ) проблем здоровья семьи и репродукции человека
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16

РЕЗЮМЕ

С середины XX в. произошел значительный прогресс исследований в области свободнорадикальной биологии и медицины, и, соответственно, существенно расширился спектр заболеваний и патологических состояний, которые стали связывать со свободными радикалами. В настоящее время проблема изучения молекулярно-клеточных механизмов развития окислительного стресса является чрезвычайно актуальной для медицинской науки, так как затрагивает значительное количество патологий, в том числе имеющих социальную значимость.

Важная роль перекисного окисления липидов (ПОЛ) и недостаточности факторов антиоксидантной защиты (АОЗ) в общепатологических процессах, в частности при холодовом и токсическом стрессах, опухолевом росте, воспалении, а также при физиологической и патологической беременности (в том числе на экспериментальных животных), исследовалась в лабораториях Института клинической и экспериментальной медицины Сибирского отделения РАМН (г. Новосибирск), начиная с 1972 г. Данные изыскания проведены впервые не только в СССР, но и в мире, что доказано многочисленными патентными свидетельствами. Исследования продолжены в Научном центре проблем здоровья семьи и репродукции человека (г. Иркутск), где создана технология оценки окислительного стресса и применения антиоксидантов в комплексной терапии осложненной и неосложненной беременности, нарушений репродуктивного здоровья у мужчин и женщин, расстройств сна, при социально-значимых заболеваниях, в педиатрической практике. Произведен анализ изменений процесса липопероксидации при физиологическом становлении репродуктивной функции, отмечена зависимость процесса пероксидации липидов от гендерной и этнической принадлежности.

При различных патологических состояниях (сахарный диабет 1-го типа, эссенциальная артериальная гипертензия, осложненная беременность, эндокринное бесплодие, эндометриоз, мужское бесплодие) установлена этноспецифичность изменений системы «ПОЛ – АОЗ» у представителей бурятского этноса. Вследствие этого этническая группа бурят была определена как группа «относительной этнической нормы». Сделано заключение о «специфичности» проявлений неспецифичного процесса свободнорадикального окисления, что особенно важно для персонализированной диагностики, профилактики и лечения.

Ключевые слова: свободнорадикальное окисление, окислительный стресс, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, патологические состояния, этнос.

История свободнорадикальной биологии. Считается, что свободнорадикальная биология не имеет точных исторических корней, но на протяжении нескольких столетий химии эффективно работали

с различными соединениями, структуру которых не могли объяснить и зарегистрировать [1, 2]. В отличие от простых химических реакций, в условиях сложного организма данные вещества проявляли множественные эффекты, что часто не имело логи-

✉ Даренская Марина Александровна, e-mail: marina_darenskaya@inbox.ru.

ческого объяснения [3]. При этом соединения, стимулирующие (нитроглицерин) или ингибирующие (витамины С и Е) продукцию радикалов, использовались врачами задолго до понимания механизмов их действия. Так, жирорастворимый витамин Е (токоферол) был открыт в 1922 г. Г. Эвансом и К. Бишоп как вещество, необходимое для размножения крыс, в чистом же виде первые α - и β -токоферолы были получены только в 1936 г. [4–7]. А. Сент-Дьерди в 1928 г. из коры надпочечников был выделен восстанавливающий фактор, который в последующем был идентифицирован как витамин С, предотвращающий развитие цинги [8].

Серьезным толчком в изучении роли радикалов в биологических процессах послужили взрывы атомных бомб в Японии в 1945 г. Проведенные Б.Н. Тарусовым и Н.М. Эммануэлем исследования показали, что действие ионизирующих излучений на живые организмы реализуется через образование радикалов, возникающих при расщеплении воды, что убедительно доказывало патогенетическую значимость радикалов в генезе лучевой болезни [9, 10]. Параллельно группой химиков под руководством лауреата Нобелевской премии Н.Н. Семенова была разработана теория цепного радикального окисления органических молекул, которая оказалась применима к липидам клеточных мембран живого организма. Его ученик академик АН СССР Н.М. Эммануэль впервые высказал предположение, что вызванные свободными радикалами повреждения играют решающую роль в возникновении и развитии злокачественных новообразований [11]. В это же время американским исследователем Д. Харманн была сформулирована актуальная и по сей день свободнорадикальная теория старения, заключающаяся в разрушении клеточных макромолекул (ДНК, белки, липиды) гидроксильными радикалами и синглетным кислородом [12]. Данные исследования вызвали значительный интерес к проблеме свободнорадикального окисления (СРО) в живых системах во всем мире и заложили основу новой научной дисциплины – свободнорадикальной биологии и медицины в СССР и России [13–15].

В 1960-е гг. на кафедре общей и медицинской биофизики II Московского медицинского института им. Н.И. Пирогова (ныне РНИМУ им. Н.И. Пирогова) активно разрабатываются методы регистрации свободных радикалов [16]. Методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) впервые были зарегистрированы радикалы липидов, которые являются главными участниками цепных реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биологических мембранах и липопroteинах. Еще

более чувствительным методом обнаружения радикалов оказался метод регистрации сверхслабого свечения при биохимических реакциях или хемилюминесценции, впервые разработанный академиком РАН Ю.А. Владимировым и положивший начало исследованиям в этой области не только в СССР, но и в мире. Далее было показано, что заметный уровень ПОЛ регистрируется лишь в присутствии ионов двухвалентного железа (Fe^{2+}) и этот процесс имеет четко выраженный цепной характер [17]. Обобщением данных о механизмах ПОЛ в биологических мембранах и его роли в развитии болезней человека стала монография Ю.А. Владимирова и А.И. Арчакова (1972 г.) Впоследствии этими учеными было доказано, что одним из четырех основных фундаментальных механизмов нарушения барьерной функции мембран при патологии является ПОЛ, которое приводит к понижению электрической прочности мембран и их пробоем под действием трансмембранного электрического потенциала [18]. Дальнейшие исследования показали, что процесс ПОЛ затрагивает важнейшие характеристики липидной фазы мембран (заряд, вязкость, мембранную проницаемость), приводит к нарушению белок-липидных взаимодействий, изменению активности мембраносвязанных ферментов и т.д. [19]. Это позволило сделать вывод, что ПОЛ – универсальный механизм повреждения мембранных структур клетки при различных патологических состояниях и воздействии неблагоприятных факторов внешней среды [20, 21].

Если патогенетическая роль свободных радикалов была экспериментально доказана, то их положительные свойства были открыты несколько позднее. Показано, что микробицидная функция фагоцитов, осуществляющих защиту организма от бактериальных инфекций, во многом зависит от способности клеток синтезировать супероксидный радикал и перекись водорода [22]. Была установлена вовлеченность кислородных радикалов в процессы неспецифической резистентности организма и иммунорегуляции [23]. При этом существовавшие изначально представления о неферментативной природе свободнорадикальных процессов в организме, регуляторами которых являются низкомолекулярные фенольные антиоксиданты – «ловушки радикалов» (α -токоферол, восстановленная форма коэнзима Q, полифенолы растительного происхождения) позднее были дополнены открытием ферментативных реакций, субстратами которых являются свободные радикалы, или лабильные продукты свободнорадикального окисления [24]. Так, I. Fridovich

было установлено, что известный голубой белок эритроцитов – эритрокупреин является ферментом супероксиддисмутазой (СОД), способной катализировать дисмутацию супероксидных анион-радикалов. Показано, что глутатионпероксидаза обладает широкой субстратной специфичностью и способна восстанавливать не только пероксид водорода, но и разнообразные органические гидропероксиды, в том числе гидроперокси-производные полиненасыщенных жирных кислот [25]. В результате доказано, что регуляция СРО в организме осуществляется системой антиоксидантной защиты (регуляции), состоящей из неферментативных компонентов и ферментов, утилизирующих активные формы кислорода или предотвращающих их образование. В.З. Ланкиным и соавт. впервые предложено обозначать СОД, каталазу, глутатионпероксидазу и глутатион-S-трансферазу как антиоксидантные ферменты [26, 27]. Безусловно важным в истории СРО стало выявление регуляторной роли кислородных радикалов в 1987 г., когда было доказано, что эндотелиальный фактор релаксации сосудов есть не что иное, как NO-радикал [28, 29].

Многогранность и разнонаправленность влияния одних и тех же молекул в реализации повреждений, защитных реакций, а также межклеточных взаимодействий вынудило исследователей по-новому взглянуть на участие радикалов и, соответственно, системы антиоксидантной защиты в патологических процессах.

Исследования свободнорадикального окисления в генезе сердечно-сосудистых заболеваний. Если на начальных этапах концепция свободнорадикальной патологии, выдвинутая в середине XX в. Б.Н. Тарусовым, касалась только лучевой болезни и гиповитаминоза Е, то в дальнейшем перечень свободнорадикальных патологий значительно расширился – воспалительные заболевания, сахарный диабет, атеросклероз и др. [30–32]. О наличии первичных продуктов СРО липидов – липопероксидов в атеросклеротических бляшках аорты человека впервые было сообщено J. Glavind et al. в 1952 г. Далее проведенные под руководством В.З. Ланкина экспериментальные и клинические исследования показали, что атеросклероз во многом является «свободнорадикальной патологией» [33, 34]. Так, в крови больных атеросклерозом жителей г. Москвы отмечалось увеличение уровня первичных и вторичных продуктов СРО липидов при одновременном достоверном снижении активности эритроцитарной глутатионпероксидазы [33]. При этом наиболее атерогенные липопротеины низкой плотности одновременно

являются и наиболее чувствительными к СРО. Впоследствии было доказано, что существует единый молекулярный механизм первичных предатерогенных повреждений стенки сосудов при атеросклерозе и диабете, который состоит в усиленном образовании карбонил-модифицированных липопротеинов низкой плотности, накапливающихся в пенистых клетках [31]. Была выдвинута гипотеза об определяющей роли окислительного стресса как универсального механизма в развитии сахарного диабета, согласно которой дисфункция митохондрий и гиперпродукция ими супероксидных радикалов представляет основной механизм повреждения тканей [35, 36].

К настоящему времени известно уже более 200 заболеваний и патологических состояний, в патогенезе которых принимают участие свободные радикалы. При этом для разных заболеваний характерна однонаправленность изменений внутренней среды и функциональных нарушений кровеносных сосудов, что позволяет говорить о едином механизме их развития – дисбалансе в системе «ПОЛ – антиоксиданты». Для описания данного дисбаланса в различных средах организма был введен термин «окислительный стресс» [37, 38], который получил повсеместное применение.

Таким образом, в ходе многолетних научных изысканий были сформулированы критерии свободнорадикальной патологии: повышенное содержание в тканях, клетках продуктов СРО (гидроперекисей липидов, диеновых и триеновых конъюгатов, альдегидов, кетонов и др.), снижение содержания антиоксидантов (токоферол, аскорбат, восстановленный глутатион, SH-соединения), наличие клинических симптомов (вялость, хрупкость сосудов, снижение фертильности, преждевременное старение и др.), выраженный профилактический и лечебный эффект препаратов-антиоксидантов [37]. Однако, несмотря на большой прогресс, который был достигнут в последние годы в области исследований свободнорадикальных патологий, до сих пор существуют многочисленные проблемы в данной области, связанные с отсутствием четких критериев диагностики, разнородностью симптомов, невозможностью в чистом виде выделить основное звено патогенеза «свободнорадикального» заболевания, несовершенством методических приемов. В то же время проблема изучения молекулярно-клеточных механизмов развития окислительного стресса является чрезвычайно актуальной для медицинской науки, так как затрагивает значительное количество патологий, в том числе имеющих социальную значимость.

Вклад сибирских ученых. В СССР исследование процессов СРО в онтогенезе и при различных патологических состояниях, в том числе в клинике, инициированы в начале 1970-х гг. авторами данного обзора. Эти работы были поддержаны нашими учителями – выдающимся отечественным патофизиологом академиком Российской академии медицинских наук (РАМН) Е.Д. Гольдбергом, основателями Сибирского отделения РАМН: клиницистом, видным идеологом теории адаптации человека академиком РАМН В.П. Казначеевым и эмбриологом профессором М.Я. Субботиным.

До 1987 г. нашей научной группой был проведен большой цикл работ по анализу особенностей ПОЛ в условиях Сибири и Крайнего Севера, а также относительно роли ПОЛ в процессе адаптации и ее нарушениях у человека. Так, было показано, что при напряженном кислородном режиме, испытываемом организмом на Севере, и возрастании роли липидов в его энергообеспечении создаются условия для активации реакций перекисного окисления, особенно в системах транспорта и утилизации кислорода [39, 40]. Реакции ПОЛ в этих условиях могут превращаться в основное звено патогенеза, или ведущий патогенетический фактор заболеваний внутренних органов, в частности легких, на Севере. Рекомендации, составленные в результате данных исследований, легли в основу ранней диагностики, профилактики и новых подходов к лечению развивающихся в этих условиях пневмоний. Далее было тщательно проанализировано течение реакций ПОЛ при различных пограничных (индукция микросомных монооксигеназ печени фенобарбиталом, в том числе при беременности, стимуляция системы мононуклеарных фагоцитов зимозаном в ходе длительного холодого воздействия, в динамике осложненной и неосложненной беременности, в том числе при моделировании патологий в эксперименте) [41–45] и патологических состояниях (воспаление, язва желудка, онкопатология) [46, 47].

Учитывая исследования Ф.З. Меерсона и соавт. [34], В.Е. Кагана и соавт. [48–50], было сформировано представление об определенных этапах фазового развития перекисных процессов в органах и тканях [43]. В норме ПОЛ поддерживается на низком уровне, обеспечивающем регуляцию структуры и функции мембран. При воздействии системообразующего фактора непосредственно (в эксперименте) или через эндокринно-метаболические механизмы (при стрессе) происходит повышение склонности липидов мембран к окислению, зависящее от накопления естественных субстратов ПОЛ – полиненасыщенных жирных

кислот. При кратковременном эффекте воздействия фактор выступает в роли сигнала для запуска систем антиоксидантной защиты, в случае длительного воздействия дисбаланс в системе «ПОЛ – АОЗ» прогрессирует и требует применения препаратов антиоксидантного ряда. В ходе данных исследований постулировано, что для полного представления о характере перекисных повреждений в организме и выборе тактики рациональной коррекции необходим комплексный анализ ПОЛ, включающий оценку как начальных, так и конечных его продуктов, показателей АОЗ, параметров структурно-функциональной организации биологических мембран клетки, в том числе различных органов [41].

С конца 1980-х г. данные исследования были перенесены в Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека (далее – Центр) в г. Иркутске, где развивается научная школа по патофизиологии, трижды становившаяся обладателем гранта Президента РФ по поддержке ведущих научных школ России.

Для оценки состояния системы «ПОЛ – АОЗ» в Центре была внедрена аналитическая технология, успешно апробированная при различных патологических состояниях. Для оценки степени выраженности прооксидантных процессов при патологии разработан интегративный показатель – коэффициент окислительного стресса (КОС), представляющий собой отношение концентрации продуктов ПОЛ к факторам антиокислительной защиты [51]. Использование КОС в клинике позволяет уточнить механизмы развития патологического состояния, используется в качестве критерия оценки состояния больных, при формировании групп повышенного риска, а также при выборе средств антиоксидантной терапии.

Исследования свободнорадикального окисления в акушерстве и гинекологии. В ходе проведенных в Центре исследований была раскрыта роль процессов липопероксидации в структурно-функциональных изменениях системы «мать – внезародышевые органы – плод» в динамике осложненной и неосложненной беременности [52, 53]. Показано, что наиболее значимыми критериями неосложненной беременности является повышение уровня гидроперекисей липидов на ранних сроках беременности, снижение концентрации продуктов ПОЛ в I триместре с последующим их повышением к родам. При преждевременных родах содержание α -токоферола снижено, а концентрации гидроперекисей липидов и малонового диальдегида (МДА) резко возрастают, особенно в III триместре. При неосложненной беременности

уровень восстановленного глутатиона возрастает по мере протекания беременности, а при угрозе прерывания и преждевременных родах содержание глутатиона снижается. Выявлено, что в плаценте и амниотической жидкости изменение содержания продуктов ПОЛ имеет ту же тенденцию, что и в крови. Содержание глутатиона в плаценте в период 12–40-й нед беременности повышается более чем наполовину, а в амниотической жидкости концентрация антиоксиданта возрастает в два раза [52]. Отмечено, что активация ПОЛ и снижение антиокислительной активности липидов является важным патогенетическим звеном возникновения фетоплацентарной недостаточности, вследствие чего предложен новый способ профилактики и лечения осложнений беременности.

Показано, что в различные периоды физиологически обусловленных этапов становления репродуктивной функции женщины изменения системы «ПОЛ – АОЗ» носят скоординированный характер на каждом этапе [54]. Доказан фазовый сбалансированный характер изменений активности ПОЛ – АОЗ, коррелирующий с гормональными сдвигами при нормальном менструальном цикле. Выявлено, что в перименопаузе отмечается увеличение вторичных продуктов липопероксидации при недостаточной функции АОЗ, что позволяет трактовать данное явление как начальные проявления окислительного стресса. В постменопаузе с накоплением высокотоксичных продуктов ПОЛ регистрируется дискоординация проокислительного и окислительного звеньев системы «ПОЛ – АОЗ» с развитием выраженного окислительного стресса [55].

При проведении гендерного сравнительного анализа течения процессов ПОЛ – АОЗ при возрастных гормондефицитных состояниях отмечалось, что повышенная активность ПОЛ – АОЗ является менее значимой при возрастном андрогенном дефиците, чем при эстрогендефицитных состояниях у женщин, обуславливая большие функциональные резервы и адаптивные возможности при относительно плавном снижении функции секреции андрогенов тестикулами, что позволило разработать принципы таргетной коррекции и профилактики возрастных гормондефицитных состояний [56]. В дальнейшем в Центре были разработаны новые направления патофизиологии, посвященные механизмам репродуктивных расстройств и особенностям онтогенеза населения региона Восточной Сибири с учетом изменений в системе «ПОЛ – АОЗ» [57].

Исследования свободнорадикального окисления при нейроэндокринных заболеваниях. Весьма

актуальными явились исследования СРО у пациенток с нейроэндокринными заболеваниями, приводящими к нарушению репродуктивной функции. Одним из таких заболеваний является гипоталамический синдром (ГС), характеризующийся нарушением гормональной функции надпочечников и яичников. Гипоталамический синдром пубертатного периода с наличием репродуктивных нарушений характеризовался активацией процессов ПОЛ с накоплением одного из конечных продуктов ПОЛ – малонового диальдегида на фоне компенсаторного накопления ретинола и снижения концентрации α -токоферола. У женщин репродуктивного возраста с ГС отмечалась активация процессов липопероксидации на фоне снижения резервов неферментативного и ферментативного звеньев антиоксидантной защиты.

Также установлено, что изменения процессов ПОЛ у пациенток с синдромом поликистозных яичников носят преимущественно компенсаторный характер, что выражается в увеличении уровня α -токоферола, ретинола и умеренном снижении активности СОД [58]. В ходе исследований показано, что в патогенезе возникновения гормонозависимых заболеваний органов репродуктивной системы, к которым относятся дисгормональные заболевания молочных желез, сопровождающиеся увеличением уровня эстрогенов, пролактина и дефицитом прогестерона, особая роль принадлежит неспецифическим биохимическим процессам липопероксидации в виде накопления первичных и промежуточных продуктов ПОЛ на фоне снижения уровня ретинола, активности СОД и дисбаланса в системе глутатиона [57].

Выявлено, что одним из важных звеньев патогенеза эндокринного бесплодия у женщин, наряду с нарушением функционирования гипофизарно-гонадально-надпочечниковой системы, является дислиппротеинемия и дисбаланс в процессах ПОЛ – АОЗ и их взаимоотношений. При этом в зависимости от формы бесплодия менялся и характер функционирования компонентов системы липопероксидации [58].

Представляются важными и перспективными исследования ПОЛ – АОЗ при бесплодии у мужчин. Известно, что оценка уровня генерации свободных радикалов в эякуляте выступает одним из важных методов, позволяющих дать характеристику фертильности спермы [59]. Исследования при различных видах патоспермии (олиго-, астено-, тератозооспермии) [60] подтвердили, что при репродуктивных нарушениях и патоспермии наблюдаются изменения в метаболической системе «ПОЛ – АОЗ» в сторону активности проок-

сидантного звена, которые свидетельствуют о ее выраженном дисбалансе. Отмечено также, что у мужчин с бесплодием и избыточной массой тела нарушение баланса в системе глутатиона более выражено по сравнению с бесплодными мужчинами с нормальной массой тела [61].

Значительное место в нарушениях репродуктивной функции отводится эндометриозу. Исследованиями Центра установлено, что в патогенезе данного заболевания существенную роль играет развитие окислительного стресса, которое сопровождается истощением антиоксидантных факторов, что требует использования в схеме лечения жирорастворимых витаминов (α -токоферол, ретинол) и глутоксима [57].

Серия работ была посвящена тяжелому нейроэндокринному заболеванию, приводящему к нарушению репродуктивной функции – сахарному диабету 1-го типа (СД1). Одной из гипотез, объясняющих развитие аменореи при СД1, считается истощение энергетической сети организма в результате массивной потери глюкозы с мочой, дальнейшего развития хронического стресса, дисгормональных нарушений, ановуляторных расстройств. Сотрудниками Центра выявлено, что у женщин репродуктивного возраста с СД1 нарушения менструальной функции имеют место при недостатке α -токоферола, восстановленного глутатиона, низкой активности СОД, повышении концентрации окисленного глутатиона, нормальном уровне ретинола и увеличении диапазона изменений содержания первичных и конечных продуктов липопероксидации [54].

Процессы свободнорадикального окисления при нарушениях сна. В плане исследования ПОЛ – АОЗ при разных аспектах метаболического синдрома внимания заслуживает также изучение закономерностей изменения в системе у пациентов с различной степенью гипоксии при синдроме обструктивного апноэ (СОА) и (или) гипопноэ сна (ГС). У пациентов с синдромом повышенной резистивности верхних дыхательных путей отмечается увеличение общей антиоксидантной активности (АОА) и концентрации первичных продуктов ПОЛ; с легкой степенью тяжести СОА/ГС – снижение общей АОА и повышение уровня первичных продуктов ПОЛ; с увеличением степени гипоксического (воздействия на организм в группах со средней и тяжелой степенью тяжести СОА/ГС) отмечается дальнейшее снижение показателей антиоксидантной защиты, что свидетельствует о развитии дизадаптивных реакций [62, 63].

Процессы свободнорадикального окисления при социально-значимых инфекционных забо-

леваниях. Установлено, что у женщин, проживающих на территории Иркутской области, при сочетанной с гепатитами В и (или) С ВИЧ-инфекции имеется более выраженный дисбаланс между про- и антиоксидантными факторами [64]. В группе женщин с ВИЧ-инфекцией и недостаточностью α -токоферола отмечается высокая частота встречаемости нарушений менструального цикла, случаев бесплодия и недостаточности лютеиновой фазы [65]. Показано, что для острой и хронической форм гепатита характерно накопление атерогенных фракций крови и продуктов липопероксидации с одновременным снижением активности системы антиоксидантной защиты [66].

Свободнорадикальное окисление в педиатрии. Сотрудниками Центра выявлено, что у подростков с психоэмоциональными нарушениями в генезе формирования эссенциальной артериальной гипертензии значимыми факторами являются метаболические изменения в системе «ПОЛ – АОЗ» и дисбаланс биоэлементного статуса [67]. У подростков с лабильной артериальной гипертензией окислительный стресс формируется за счет интенсификации процессов ПОЛ на стадии образования кетодиенов (КД) и сопряженных триенов (СТ), а в группе со стабильной артериальной гипертензией – на стадии образования первичных продуктов – диеновых конъюгатов (ДК) и конечных продуктов ПОЛ [68]. Значимыми явились также данные об этногенетической детерминированности окислительного стресса при формировании эссенциальной артериальной гипертензии у детей (в группе подростков-бурят коэффициент окислительного стресса оказался равным 2,60, что было ниже, чем у русских – 5,31) [69].

Этнические особенности течения процессов ПОЛ – АОЗ. Система «ПОЛ – АОЗ» является важнейшим компонентом адаптивных реакций организма, что позволяет оценить устойчивость биологических систем к воздействиям различного характера. Негативные тенденции, характерные в последние десятилетия для малых и коренных этносов России, отражаются на биохимических процессах, обеспечивающих реактивность организма, его адаптивные возможности. В настоящее время коллективом центра активно проводятся исследования по изучению закономерностей метаболических реакций в формировании адаптационно-компенсаторных процессов в норме и при развитии различных патологических состояний у представителей основных этнических групп Восточной Сибири: тофаларов, эвенков и бурят [70].

Результаты исследования процессов липопероксидации в онтогенезе у коренных малых

народов Сибири указывают на их адаптивную направленность в детско-подростковом возрасте с переходом в дизадаптивную в более старшем возрастном периоде, что определяет повышенный риск депопуляции коренных народов Сибири в условиях изменения социально-культурных и этно-исторических ритмов жизни [71–73]. В этих условиях метаболические реакции липидного обмена у подростков-тофаларов и бурят не меняются и для них характерна антиатерогенная направленность, в отличие от эвенков и европеоидов пришлое населения, в группах которых отмечается нарастание уровня холестерол-содержащих компонентов крови [74].

Работами Центра доказано, что распределение частот аллелей и генотипов полиморфизмов генов антиоксидантных ферментов характеризуется межэтнической дифференциацией [75]. Так, при исследовании распространенности аллелей и генотипов полиморфизма $-262C>T$ гена *CAT* (rs1001179) у подростков русской и бурятской национальности было получено, что частота встречаемости аллеля $-262T$ у русских составляет 28,31%, у бурят – 16,84% ($p < 0,01$). В обеих этнических группах выявлена корреляционная зависимость изучаемого полиморфизма с концентрацией диеновых конъюгатов. У носителей ТТ-генотипа концентрация диеновых конъюгатов ниже, чем у носителей СТ- и СС-генотипов полиморфизма $-262C>T$ гена *CAT* [76].

Выявлены определенные метаболические особенности течения ряда заболеваний у представителей бурятского этноса, что позволило отнести их к группе «относительной этнической нормы». Так, было доказано, что степень интенсивности липопероксидных процессов у пациентов бурятского этноса с сахарным диабетом 1-го типа снижена по сравнению с русскими (более низкий уровень первичных и промежуточных продуктов, повышенные значения общей антиокислительной активности), что подтверждается и низкими значениями коэффициента окислительного стресса [77]. Течение СД1 у бурят также характеризуется сниженными значениями общих липидов, триацилглицеридов, общего холестерина и липопротеинов низкой плотности, что, вероятно, может способствовать более благоприятному течению заболевания у бурят [78]. По полученным ранее клиническим данным выявлено, что поздние сосудистые осложнения (диабетическая ретинопатия и диабетическая нефропатия) у больных СД1 бурятского этноса встречаются реже относительно среднестатистических показателей [79, 80]. В соответствии с выявленными изменениями пред-

ложен способ прогнозирования течения сахарного диабета у лиц русской и бурятской популяции.

Получены новые данные относительно течения метаболических реакций у женщин различных этнических групп с осложненной беременностью. У пациенток бурятского этноса в динамике беременности высокой степени риска (I–III триместры беременности) активация процессов ПОЛ сопровождается возрастанием общей АОА сыворотки крови в отличие от пациенток русской национальности, у которых на фоне повышенного уровня продуктов ПОЛ происходит снижение содержания различных компонентов АОЗ. При обследовании женщин с эндокринным бесплодием бурятской и русской этногрупп установлено, что в целом у обследованных пациенток происходит увеличение содержания конечных (ТБК-активных) продуктов ПОЛ. При этом у пациенток бурятской этногруппы отмечается снижение общей АОА, активности СОД и уровня α -токоферола, у женщин русской этногруппы – дисбаланс в системе глутатиона [81]. Распределение генотипов и аллелей гена детоксикации *GSTP1* у обследованных русских женщин с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ) и бесплодием характеризовалось повышением частоты «мутантного» аллеля В гена детоксикации *GSTP1*, что не характерно для буряток с НГЭ и бесплодием. Определен характер нарушений состояния системы «ПОЛ – АОЗ» при патозооспермии у русских и бурят, установлены наиболее значимые звенья патогенеза в зависимости от этнического фактора [82]. Дифференцированная оценка ферментов глутатиондисульфидной системы и межиндивидуальных различий активности данных ферментов определяется полиморфизмами генов семейства глутатион-S-трансфераз (*GSTT1*, *GSTM1* и *GSTP1*) и может быть рекомендована для установления значимых биохимических и молекулярно-генетических маркеров риска формирования бесплодия у мужчин разных этнических групп [83].

Представленные выше данные литературы свидетельствуют о том, что проблема изучения молекулярно-клеточных механизмов СРО крайне актуальна и в настоящее время, так как затрагивает значительное количество патологий, в том числе имеющих социальную значимость. В ходе научных изысканий Центра высказано предположение о том, что типовой патологический процесс свободнорадикального окисления имеет определенную специфичность проявлений в зависимости от характера патологии, возраста, гендерной и этнической принадлежности пациента. Полученные результаты легли в основу

разработки новых методических, клинических и этноспецифических подходов к диагностике, профилактики и лечению ряда заболеваний, патологических процессов и состояний.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Knight J.A. Free radicals: their history and current status in aging and disease // *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 1998; 28 (6): 331–346.
2. Gutteridge J., Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000; 899 (1): 136–147. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06182.x.
3. Devasagayam T.P.A., Tilak J.C., Bloor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S., Lele R.D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects // *Japi*. 2004; 52 (10): 794–804.
4. Brigelius-Flohe R., Traber M.G. Vitamin E: function and metabolism // *The FASEB Journal*. 1999; 13: 1145–1155.
5. Zenkov N.K., Chechushkov A.V., Kozhin P.M., Kandalintseva N.V., Martinovich G.G., Menshchikova E.B. Plant phenols and autophagy // *Biochemistry (Moscow)*. 2016; 81 (4): 297–314.
6. Zenkov N.K., Menshchikova E.B., Kandalintseva N.V., Oleynik A.S., Prosenko A.E., Gusachenko O.N., Shklyaeva O.A., Vavilin V.A., Lyakhovich V.V. Antioxidant and anti-inflammatory activity of new water-soluble sulfur-containing phenolic compounds // *Biochemistry (Moscow)*. 2007; 72 (6): 644–651.
7. Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health // *Pharmacognosy Reviews*. 2010; 4 (8): 118–126. DOI: 10.4103/0973-7847.70902.
8. Padayatty S.J., Katz A., Wang Ya., Eck P., Bethesda, Kwon O., Lee Je-H., Chen S., Corpe C., Dutta A., Dutta S.K., Levine M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention // *Journal of the American college of Nutrition*. 2003; 22 (1): 18–35. <http://dx.doi.org/10.1080/07315724.2003.10719272>.
9. Weiss J.F., Landauer M.R. History and development of radiation-protective agents // *International journal of radiation-biology*. 2009; 85 (7): 539–573. <http://dx.doi.org/10.1080/09553000902985144>.
10. Prasad K.N., Cole W.C., Hasse G.M. Health risks of low dose ionizing radiation in humans: a review // *Experimental Biology and Medicine*. 2004; 229 (5): 378–382.
11. Emanuel N.M. Free radicals and the action of inhibitors of radical processes under pathological states and ageing in living organisms and in man // *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1976; 9 (02): 283–308. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0033583500002420>.
12. Harman D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009 // *Biogerontology*. 2009; 10 (6): 773. DOI:10.1007/s10522-009-9234-2.
13. Selman C., Blount J.D., Nussey D.H., Speakman J.R. Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? // *Trends in Ecology & Evolution*. 2012; 27 (10): 570–577. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2012.06.006>.
14. Costantini D., Rowe M., Butler M.W., McGraw K.J. From molecules to living systems: historical and contemporary issues in oxidative stress and antioxidant ecology // *Functional Ecology*. 2010; 24 (5): 950–959. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2010.01746.x.
15. Lushchak V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification // *Chemico-Biological Interactions*. 2014; 224: 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>.
16. Vladimirov Y.A., Proskurnina E.V. Free radicals and cell chemiluminescence // *Biochemistry (Moscow)*. 2009; 74 (13): 1545–1566. DOI: 10.1134/S0006297909130082.
17. Осипов А.Н., Якутова Э.Ш., Владимиров Ю.А. Образование гидроксильных радикалов при взаимодействии гипохлорита с ионами железа // *Биофизика*. 1993; 38 (3): 390–396.
- Osipov A.N., Yakutova E.S., Vladimirov Yu.A. Obrazovanie gidroksil'nyh radikalov pri vzaimodejstvii gipohlorita s ionami zheleza [Formation of hydroxyl radicals by the interaction of hypochlorite with iron ions] // *Biofizika – Biophysics*. 1993; 38 (3): 390–396 (in Russian).
18. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // *Вестник Российской академии медицинских наук*. 1998; 7: 43–51.
- Vladimirov Yu.A. Svobodnye radikaly i antioksidanty [Free radicals and antioxidants] // *Vestnik RAMN – Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 1998; 7: 43–51 (in Russian).
19. Vladimirov Yu.A. The loss of barrier properties by inner and outer mitochondrial membranes, necrosis and apoptosis // *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*. 2002; 19 (5): 356–377.
- Vladimirov Yu.A. The loss of barrier properties by inner and outer mitochondrial membranes, necrosis and apoptosis // *Biologicheskie membrany: Zhurnal membranoj i kletочноj biologii – Biological membranes: Journal of the membrane and cell biology*. 2002; 19 (5): 356–377 (in Russian).
20. Menshchikova E., Zenkov N., Tkachev V., Potapova O., Cherdantseva L., Shkurupiy V. Oxidative stress and free-radical oxidation in bcg granulomatosis development // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013; 2013: 452546. DOI: 10.1155/2013/452546.

21. Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., Izmailov D.Yu. Chemiluminescence as a method for detection and study of free radicals in biological systems // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2007; 144 (3): 390–396. DOI: 10.1007/s10517-007-0340-3.
22. Lee W.L., Harrison R.E., Grinstead S. Phagocytosis by neutrophils // *Microbes and Infection*. 2003; 5 (14): 1299–1306. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.014>.
23. Panasenko O.M., Vol'nova T.V., Azizova O.A., Vladimirov Y.A. Free radical modification of lipoproteins and cholesterol accumulation in cells upon atherosclerosis // *Free Radical Biology & Medicine*. 1991; 10 (2): 137–148. DOI: 10.1016/0891-5849(91)90007-P.
24. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases // *Annual Review of biochemistry*. 1995; 64 (1): 97–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>.
25. Christophersen B.O. Formation of monohydroxy-polyenic fatty acids from lipid peroxides by glutathione peroxidase // *Biochim. Biophys. Acta*. 1968; 164 (1): 35–46. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(68\)90068-4](https://doi.org/10.1016/0005-2760(68)90068-4).
26. Bondar' T.N., Lankin V.Z., Veselova S.P., Vikhert A.M. Enzymatic utilization of lipid peroxides in the atherosclerotic human aorta // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1988; 106 (4): 1435–1437. DOI: 10.1007/BF00837757.
27. Сайфутдинов Р.И., Коц Я.И., Тихазе А.К., Ланкин В.З. Изменение активности антиокислительных ферментов у больных с хронической сердечной недостаточностью // *Кардиология*. 1990; 30 (3): 65–68.
- Sayfutdinov R.I., Kots Y.I., Tikhaze A.K., Lankin V.Z. Изменение активности антиокислительных ферментов у больных с хронической сердечной недостаточностью [Change in the activity of antioxidant enzymes in patients with chronic heart failure] // *Kardiologija – Cardiology*. 1990; 30 (3): 65–68 (in Russian).
28. Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor // *Nature*. 1987; 327: 524–526. DOI: 10.1038/327524a0.
29. Menshikova E.B., Zenkov N.K., Reutov V.P. Nitric oxide and no-synthases in mammals in different functional states // *Biochemistry (Moscow)*. 2000; 65 (4): 409–426.
30. Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Konovalova G.G., Kaminniy A.I., Kaminnaya I. The antioxidative therapy of atherosclerosis with using of natural and synthetic antioxidants // *Atherosclerosis*. 2000; 151 (1): 308–309.
31. Ланкин В.З., Тихазе А.К. Важная роль свободнорадикальных процессов в этиологии и патогенезе атеросклероза и сахарного диабета // *Кардиология*. 2016; 56 (12): 97–105. DOI: 10.18565/cardio.2016.12.97-105.
- Lankin V.Z., Tikhaze A.K. Vazhnaya rol' svobodnoradikal'nyh processov v jetologii i patogeneze ateroskleroza i saharnogo diabeta [The important role of free radical processes in the ethology and pathogenesis of atherosclerosis and diabetes mellitus] // *Kardiologija – Cardiology*. 2016; 56 (12): 97–105. DOI: 10.18565/cardio.2016.12.97-105 (in Russian).
32. McCord J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress // *The American Journal of Medicine*. 2000; 108 (8): 652–659. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00412-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00412-5).
33. Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Belenkov Yu.N. Free radical processes in diseases of the cardiovascular system // *Kardiologija – Cardiology*. 2000; 40 (7): 48–61 (in Russian).
34. Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Kapel'ko V.I., Shepel'kova G.S., Shumaev K.B., Panasenko O.M., Panasenko G.G., Belenkov Y.N. Mechanisms of oxidative modification of low density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress // *Biochemistry (Moscow)*. 2007; 72 (10): 1081–1090. DOI:10.1134/S0006297907100069.
35. Giacco F., Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications // *Circulation research*. 2010; 107 (9): 1058–1070. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>.
36. Rains J.L., Jain S.K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes // *Free Radical Biology and Medicine*. 2011; 50 (5): 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006>.
37. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Активная защита при окислительном стрессе. антиоксидант-респонсивный элемент (обзор) // *Биохимия*. 2006; 71 (9): 1183–1198.
- Lyakhovich V.V., Vavilin V.A., Zenkov N.K., Men'shchikova E.B. Aktivnaja zashhita pri okislitel'nom stresse. Antioksidant-responsivnyj jelement (obzor) [Active protection in case of oxidative stress. Antioxidant-responsive element (review)] // *Biobimija – Biochemistry*. 2006; 71 (9): 1183–1198.
38. Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004; 55: 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>.
39. Куликов В.Ю., Луценко М.Т., Колесникова Л.И., Семенюк Д.Н., Целуйко С.С. Гидроперекиси жирных кислот флюоресцирующие продукты и концентрация токоферола в ткани кроликов при действии на них холода // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1980; 90 (12): 681–682.
- Kulikov V.Yu., Lutsenko M.T., Kolesnikova L.I., Semenyuk D.N., Celuyko S.S. Gidroperekisi zhirnyh kislot fljuorescirujushhie produkty i koncentracija tokoferola v tkani krolikov pri dejstvii na nih holoda [Fatty acid hydroperoxides fluorescent products and tocopherol concentrations in rabbit tissue under the action of cold on them] // *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1980; 90 (12): 681–682 (in Russian).
40. Семенюк А.В., Колесникова Л.И., Ситникова Д.В., Колосова Н.Г., Куликов В.Ю., Салганик Р.И., Непомнящих Г.И. Роль ПОЛ в регуляции активности митохондриальных монооксигеназ печени гомеотермных животных при холодовом воздействии // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1983; 95 (1): 37–39.

- Semenyuk A.V., Kolesnikova L.I., Sitnikova D.V., Kolosova N.G., Kulikov V.Yu., Salganik R.I., Nepomnyashchikh G.I. Rol' POL v reguljacii aktivnosti mikrosomal'nyh monoooksigenaz pecheni gomojotermnyh zhivotnyh pri holodovom vozdeystvii [The role of LPO in the regulation of the activity of microsomal monoxygenases of the liver of homoothermic animals under cold] // *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1983; 95 (1): 37–39 (in Russian).
41. Куликов В.Ю., Казначеев В.П., Колесникова Л.И., Молчанова Л.В. Перекисное окисление липидов эритроцитов человека при различных патологических состояниях // *Вопросы медицинской химии*. 1976; 22 (5): 617–621.
- Kulikov V.Yu., Kaznacheev V.P., Kolesnikova L.I., Molchanova L.V. Perekisnoe okislenie lipidov jeritrocitov cheloveka pri razlichnyh patologicheskikh sostojanijah [Lipid peroxidation of human erythrocytes in various pathological states] // *Voprosy medicinskoj himii – Questions of Medical Chemistry*. 1976; 22 (5): 617–621 (in Russian).
42. Куликов В.Ю., Казначеев В.П., Колесникова Л.И. Некоторые особенности действия УФ-облучения на сыворотку крови человека в норме и при патологии // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1977; 83 (4): 427–429.
- Kulikov V.Yu., Kaznacheev V.P., Kolesnikova L.I. Nekotorye osobennosti dejstvija UF-oblucheniya na syvorotku krovi cheloveka v norme i pri patologii [Some features of the effect of UV-irradiation on human serum in normal and pathological conditions] // *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1977; 83 (4): 427–429 (in Russian).
43. Казначеев В.П., Колесников С.И., Куликов В.Ю., Колесникова Л.И., Колесникова О.П. Реакции свободно-радикального окисления липидов при физиологической и осложненной беременности в клинике и эксперименте // *Акушерство и гинекология*. 1979; 4: 40–44.
- Kaznacheev V.P., Kolesnikov S.I., Kulikov V.Yu., Kolesnikova L.I., Kolesnikova O.P. Reakcii svobodnoradikal'nogo okisleniya lipidov pri fiziologicheskoj i oslozhnennoj beremennosti v klinike i jeksperimente [Reactions of free radical of lipids during physiological and complicated pregnancy in the clinic and experiment] // *Akusberstvo i ginekologija – Obstetrics and Gynecology*. 1979; 4: 40–44 (in Russian).
44. Glazyrin A.L., Kolesnikov S.I., Safronov A.Y. Histochemical localization of oxidized glutathione-catalysing enzymes in human term placenta // *The Histochemical Journal*. 1993; 25 (1): 45–50.
45. Гладышев Ю.В., Колесников С.И., Семенюк А.В., Иванов В.В. Влияние активации перекисного окисления липидов на структуру внезародышевых органов и печени крыс в различные периоды онтогенеза // *Цитология*. 1994; 36 (1): 98–103.
- Gladyshev Yu.V., Kolesnikov S.I., Semenyuk A.V., Ivanov V.V. Vlijanie aktivacii perekisnogo okisleniya lipidov na strukturu vnezarodyshevyyh organov i pecheni krysv v razlichnyh periody ontogeneza [Effect of activation of lipid peroxidation on the structure of extra-embryonic organs and liver of rats at different periods of ontogenesis] // *Citologija – Cytology*. 1994; 36 (1): 98–103 (in Russian).
46. Куликов В.Ю., Ермолаева В.В., Колесникова Л.И., Молчанова Л.В., Косованова Л.В. Реакция перекисного окисления липидов в сыворотке крови больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки // *Вопросы медицинской химии*. 1979; 25 (3): 289–292.
- Kulikov V.Yu., Ermolaeva V.V., Kolesnikova L.I., Molchanova L.V., Kosovanova L.V. Reakcija perekisnogo okisleniya lipidov v syvorotke krovi bol'nyh jazvennoj bolezni'ju zheludka i dvenadcatiperstnoj kishki [The reactions of lipid peroxidation in the serum of patients with peptic ulcer of the stomach and duodenum] // *Voprosy medicinskoj himii – Questions of Medical Chemistry*. 1979; 25 (3): 289–292 (in Russian).
47. Семенюк А.В., Колесникова Л.И., Куликов В.Ю., Неделькина С.В., Салганик Р.И. Метод оценки активности ферментов метаболизма лекарственных соединений // *Клиническая лабораторная диагностика*. 1982; 10: 607–609.
- Semenyuk A.V., Kolesnikova L.I., Kulikov V.Yu., Nedelkina S.V., Salganik R.I. Metod ocenki aktivnosti fermentov metabolizma lekarstvennyh soedinenij [Method for the evaluation of the activity of metabolism enzymes of drug compounds] // *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika – Clinical Laboratory Diagnostics*. 1982; 10: 607–609 (in Russian).
48. Meerson F.Z., Kagan V.E., Kozlov Y.P., Belkina L.M., Arkhipenko Y.V. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart // *Basic Research in Cardiology*. 1982; 77 (5): 465–485. DOI: 10.1007/BF01907940.
49. Каган В.Е., Прилипко А.Л., Савов В.М. Об участии свободных активных форм кислорода в ферментативном перекисном окислении липидов в биомембранах // *Биохимия*. 1979; 44 (3): 482–489.
- Kagan V.Ye., Prilipko L.L., Savov V.M. Ob uchastii svobodnyh aktivnyh form kisloroda v fermentativnom perekisnom okislenii lipidov v biomembranah [About participation of free active oxygen species in fermentative lipid peroxidation in biomembranes] // *Biobimija – Biochemistry*. 1979; 44 (3): 482–489 (in Russian).
50. Каган В.Е., Шведова А.А., Новиков К.Н. Об участии фосфолипаз в «регенерации» фоторецепторных мембран, подвергшихся перекисному окислению // *Биофизика*. 1978; 23 (2): 279–283.
- Kagan V.E., Shvedova A.A., Novikov K.N. Ob uchastii fosfolipaz v «regeneracii» fotoreceptornyh membran, podvergshijsja perekisnomu okisleniju [On the involvement of phospholipases in the “regeneration” of photoreceptor membranes subjected to peroxide oxidation] // *Biofizika – Biophysics*. 1978; 23 (2): 279–283 (in Russian).
51. Колесникова Л.И., Семьонова Н.В., Гребенкина Л.А., Даренская М.А., Сутурина Л.В., Гнусина С.В. Integral

- indicator of oxidative stress in human blood // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014; 157 (6): 715–717 DOI: 10.1007/s10517-014-2649-z.
52. Колесникова Л.И., Иванова И.В., Скосырева Г.А., Петерсон В.Д. Перекисное окисление липидов как диагностический критерий угрозы невынашивания беременности // *Акушерство и гинекология*. 1990; 1: 24–29.
- Kolesnikova L.I., Ivanova I.V., Skosyeva G.A., Peterson V.D. Perekisnoe okislenie lipidov kak diagnosticheskij kriterij ugrozy nevyynashivaniya beremennosti [Lipid peroxidation as a diagnostic criterion of the threat of pregnancy] // *Akusherstvo i ginekologija – Obstetrics and Gynecology*. 1990; 1: 24–29 (in Russian).
53. Колесникова Л.И., Протопопова Н.В., Мадаева И.М., Сахьянова Н.Л. Влияние нарушения сна на состояние плода у беременных женщин с артериальной гипертензией // *Акушерство и гинекология*. 2012; 5: 17–22.
- Kolesnikova L.I., Protopopova N.V., Madaeva I.M., Sakhyanova N.L. Vlijanie narushenija sna na sostojanie ploda u beremennyh zhenshhin s arterial'noj gipertenziej [The effect of sleep disturbance on the fetal condition in pregnant women with arterial hypertension] // *Akusherstvo i ginekologija – Obstetrics and Gynecology*. 2012; 5: 17–22.
54. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Семенова Н.В., Гребенкина Л.А., Сутурина Л.В., Долгих М.И., Гнусина С.В. Lipid peroxidation and antioxidant protection in girls with type 1 diabetes mellitus during reproductive system development // *Medicina (Kaunas, Lithuania)*. 2015; 51 (2): 107–111. DOI: 10.1016/j.medici.2015.01.009.
55. Колесникова Л., Семенова Н., Мадаева И., Сутурина Л., Солодова Е., Гребенкина Л., Даренская М. Antioxidant status in peri- and postmenopausal women // *Maturitas*. 2015; 81 (1): 83–87. DOI: 10.1016/j.maturitas.2015.02.264.
56. Колесникова Л.И., Мадаева И.М., Семёнова Н.В., Осипова Е.В., Даренская М.А. Гендерные особенности процессов свободно-радикального окисления липидов при возрастных гормонально-дефицитных состояниях // *Вестник РАМН*. 2016; 71 (3): 248–254. DOI: 10.15690/vramn629.
- Kolesnikova L.I., Madaeva I.M., Semenova N.V., Osipova E.V., Darenskaya M.A. Gendernye osobennosti processov svobodno-radikal'nogo okislenija lipidov pri vozrastnyh gormonal'no-deficitnyh sostojanijah [Gender differences in parameters of lipid metabolism and of level of antioxidants in groups of juveniles-Evensks and Europeans] // *Vestnik RAMN – Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016; 71 (3): 248–254 (in Russian).
57. Колесникова Л.И., Гребенкина Л.А., Власов В.Я., Даренская М.А., Лыбина А.В., Долгих М.И. Metabolic role of lipid peroxidation processes and antioxidant defense system in the pathogenesis of hypothalamic syndrome // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014; 156 (3): 303–305. DOI: 10.1007/s10517-014-2335-1.
58. Колесникова Л.И., Колесников С.И., Даренская М.А., Гребенкина Л.А., Никитина О.А., Лазарева Л.М., Сутурина Л.В., Данусевич И.Н., Друзинина Е.В., Семдяев А.А. Activity of LPO processes in women with polycystic ovarian syndrome and infertility // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017; 162 (3): 320–322. DOI: 10.1007/s10517-017-3605-5.
59. Mehrotra A., Katiyar D.K., Agarwal A., Das V., Pant K.K. Role of total antioxidant capacity and lipid peroxidation in fertile and infertile men // *Biomedical Research*. 2013; 24 (3): 347–352.
60. Колесникова Л.И., Курашова Н.А., Долгих М.И., Осадчук Л.В., Осадчук А.В., Дашиев В.Г. Parameters of pro- and antioxidant status in ejaculate of men of fertile age // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015; 159 (6): 726–728. DOI: 10.1007/s10517-015-3059-6.
61. Колесникова Л.И., Вантеева О.А., Курашова Н.А., Дашиев В.Г. Глутатионзависимые ферменты и глутатион при бесплодии мужчин с различной массой тела // *Вестник РАМН*. 2015; 1: 12–16.
- Kolesnikova L.I., Vanteeva O.A., Kurashova N.A., Dashiev B.G. Glutathionzavisimye fermenty i glutation pri besplodii muzhchin s razlichnoj massoj tela [Glutathione-dependent enzymes and glutathione in infertility of men with different body mass] // *Vestnik RAMN – Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2015; 1: 12–16 (in Russian).
62. Колесникова Л.И., Мадаева И.М., Семенова Н.В., Сутурина Л.В., Бердина О.Н., Шолохов Л.Ф., Солодова Е.И. Pathogenic role of melatonin in sleep disorders in menopausal women // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013; 156 (1): 104–106. DOI: 10.1007/s10517-013-2289-8.
63. Колесникова Л.А., Мадаева И.М., Семенова Н.В., Власов В.Я., Гребенкина Л.А., Даренская М.А., Долгих М.И. Antioxidant potential of the blood in men with obstructive sleep breathing disorders // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013; 154 (6): 731–733. DOI: 10.1007/s10517-013-2041-4.
64. Колесникова Л.И., Колесников С.И., Даренская М.А., Гребенкина Л.А., Тимофеева Е.В., Лещенко О.Я., Вантеева О.А., Рашидова М.А. Оценка про- и антиоксидантного статуса у женщин с ВИЧ и коинфекцией // *Терапевтический архив*. 2016; 88 (11): 17–21. DOI: 10.17116/terarkh2016881117-21.
- Kolesnikova L.I., Kolesnikov S.I., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A., Timofeeva E.V., Leshchenko O.Ya., Vanteeva O.A., Rashidova M.A. Ocenka pro- i antioksidantnogo statusa u zhenshhin s VICH i koinfekciej [Evaluation of pro- and antioxidant status in women with HIV and co-infection] // *Terapevticheskij arxiv – Therapeutic Archive*. 2016; 88 (11): 17–21 (in Russian).
65. Колесникова Л.И., Колесников С.И., Даренская М.А., Гребенкина Л.А., Тимофеева Е., Лещенко О.Я., Вантеева О. Menstrual and reproductive function in women with HIV-infection and antioxidant vitamins deficiency // *Journal of AIDS and Clinical Research*. 2014; 5 (12): 1–5.

66. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Рашидова М.А., Шолохов Л.Ф., Гребенкина Л.А., Вантеева О.А. Состояние липоперекисных процессов у женщин репродуктивного возраста, больных острой формой вирусного гепатита // *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2016; 71 (1): 11–15. DOI: 10.15690/vramn525.
- Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Rashidova M.A., Sholokhov L.F., Grebenkina L.A., Vanteeva O.A. Costojanie lipoperekisnyh processov u zhenshhin reproduktivnogo vozrasta, bol'nyh ostroj formoj virusnogo gepatita [The state of lipid peroxidation processes in women of reproductive age, patients with acute form of viral hepatitis] // *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskib nauk – Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016; 71 (1): 11–15. DOI: 10.15690/vramn525 (in Russian).
67. Kolesnikova L.I., Prokhorova Z.V., Vlasov B.Y., Polyakov V.M. Redox status as a metabolic stage, integrating emotional pattern and blood pressure in adolescents // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015; 158 (1): 9–12. DOI: 10.1007/s10517-014-2679-6.
68. Колесникова Л.И., Гребенкина Л.А., Долгих В.В., Натяганова Л.В., Осипова Е.В., Старостенко О.В. Оценка процессов липопероксидации у подростков с эссенциальной артериальной гипертензией с помощью интегрального показателя // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 6: 29–31.
- Kolesnikova L.I., Grebenkina L.A., Dolgikh V.V., Natyaganova L.V., Osipova E.V., Starostenko O.V. Ocenka processov lipoperoksidacii u podrostkov s jessencial'noj arterial'noj gipertenziej s pomoshh'ju integral'nogo pokazatelja [Evaluation of lipid peroxidation processes in adolescents with essential hypertension using the integral indicator] // *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika – Clinical Laboratory Diagnostics*. 2012; 6: 29–31 (in Russian).
69. Bairova T.A., Kolesnikov S.I., Kolesnikova L.I., Pervushina O.A., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A. Lipid peroxidation and mitochondrial superoxide dismutase-2 gene in adolescents with essential hypertension // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015; 158 (2): 181–184. DOI: 10.1007/s10517-014-2717-4.
70. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Гребенкина Л.А., Сутурина Л.В., Лобыгина А.В., Семенова Н.В., Цыренов Т.Б., Даржаев З.Ю., Курашова Н.А., Толпыгина О.А. Особенности состояния антиоксидантной системы у здоровых лиц основных этнических групп Прибайкалья // *Вопросы питания*. 2012; 81 (3): 46–55.
- Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A., Suturina L.V., Labygina A.V., Semenova N.V., Tsyrenov T.B., Darzhayev Z.Yu., Kurashova N.A., Tolpygina O.A. Osobennosti sostojanija antioksidantnoj sistemy u zdorovyh lic osnovnyh jetnicheskikh grupp Pribajkal'ja [Features of the state of the antioxidant system in healthy individuals of the main ethnic groups of the Baikal region] // *Voprosy pitaniya – Questions of Nutrition*. 2012; 81 (3): 46–55 (in Russian).
71. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Гребенкина Л.А., Осипова Е.В., Долгих М.И., Семенова Н.В. Адапционно-компенсаторные реакции у подростков, представителей коренных народностей севера иркутской области // *Физиология человека*. 2014; 40 (2): 80–86. DOI: 10.7868/S0131164614020088.
- Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A., Osipova E.V., Dolgikh M.I., Semenova N.V. Adaptacionno-kompensatornye reakcii u podrostkov, predstavitelej korennyh narodnostej severa irkutskoj oblasti [Adaptive-compensatory responses in the adolescents belonging to indigenous northern ethnic groups in Irkutsk Oblast] // *Fiziologija cheloveka – Fiziologija Cheloveka*. 2014; 40 (2): 80–86 (in Russian).
72. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Гребенкина Л.А., Шолохов Л.Ф., Рашидова М.А., Долгих М.И., Семенова Н.В., Михалевич И.М. Тиреоидный статус и витамины-антиоксиданты у девушек различных этносов // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2015; 101 (2): 214–221.
- Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A., Sholokhov L.F., Rashidova M.A., Dolgikh M.I., Semenova N.V., Mikhalevich I.M. Tireoidnyj status i vitaminy-antioxidanty u devushek razlichnyh jetnosov [Thyroid status and antioxidant vitamins in girls of different ethnic groups] // *Rossijskij fiziologicheskij zbornik im. I.M. Sechenova – Russian Journal of Physiology I.M. Sechenov*. 2015; 101 (2): 214–221 (in Russian).
73. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Гребенкина Л.А., Шолохов Л.Ф., Семенова Н.В., Долгих М.И., Осипова Е.В. Особенности компенсаторно-приспособительных реакций организма у представительниц эвенкийского этноса // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2016; 52 (6): 393–397.
- Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A., Sholokhov L.F., Semenova N.V., Dolgikh M.I., Osipova E.V. Osobennosti kompensatorno-prisposobitel'nyh reakcij organizma u predstavitel'nic evenkijskogo jetnosa [Features of compensatory-adaptive reactions of the organism in representatives of the Evenks] // *Zbornik jevoljucionnoj biobimii i fiziologii – Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2016; 52 (6): 393–397 (in Russian).
74. Колесникова Л.И., Даренская М.А., Долгих В.В., Шолохов Л.Ф., Шенин В.А., Гребенкина Л.А., Долгих М.И. Особенности изменений показателей гипофизарно-тиреоидной системы и липидного обмена у подростков разных этнических групп // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 2: 19–22.
- Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Dolgikh V.V., Sholokhov L.F., Shenin V.A., Grebenkina L.A., Dolgikh M.I. Osobennosti izmenenij pokazatelej gipofizarno-tireoidnoj sistemy i lipidnogo obmena u podrostkov raznyh jetnicheskikh grupp [Indicators of pituitary-thyroid system and lipid metabolism in female representatives of the Buryat ethnos and Europeoids] // *Klinicheskaja laboratornaja*

- diagnostika – Clinical Laboratory Diagnostics*. 2012; 2: 19–22 (in Russian).
75. Ershova O.A., Bairova T.A., Kolesnikov S.I., Kalyuzhna-ya O.V., Darenskaya M.A., Kolesnikova L.I. Oxidative stress and catalase gene // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016; 161 (3): 400–403. DOI: 10.1007/s10517-016-3424-0.
76. Колесникова Л.И., Байрова Т.А., Первушина О.А., Гребенкина Л.А. Связь полиморфизма (192) q>r гена параоксоназы с липидным профилем и компонентами перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в популяциях русских и бурят Восточной Сибири // *Генетика*. 2015; 51 (2): 236–241 DOI: 10.7868/S0016675815020095.
- Kolesnikova L.I., Bairova T.A., Pervushina O.A., Grebenkina L.A. Svjaz' polimorfizma (192) q>r gena paraoksonazy s lipidnym profilom i komponentami perekisnogo okislenija lipidov i antioksidantnoj zashhity v populjacijah russkih i burjat Vostochnoj Sibiri [Association of (192) q>r polymorphism of the paraoxonase gene with a lipid profile and components of lipid peroxidation and antioxidant protection in populations of Russians and Buryats from Eastern Siberia] // *Genetika – Genetics*. 2015; 51 (2): 236–241 (in Russian).
77. Kolesnikova L.I., Vlasov B.Y., Kolesnikov S.I., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A., Semenova N.V., Vanteeva O.A. Intensity of oxidative stress in Mongoloid and Caucasian patients with type 1 diabetes mellitus // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016; 161 (6): 767–769.
78. Kolesnikova L.I., Kolesnikov S.I., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A., Semenova N.V., Osipova E.V., Gnusina S.V., Bardymova T.P. Lipid status and predisposing genes in patients with diabetes mellitus type 1 from various ethnic groups // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015; 160 (2): 278–280. DOI: 10.1007/s10517-015-3149-5.
79. Дедов И.И., Колесникова Л.И., Иванова О.Н., Бардымова Т.П., Карлова Н.Г., Атаманова Т.М., Прокофьев С.А. Полиморфизм генов HLA класса II и CTLA4 здоровых бурят и больных сахарным диабетом 1 типа в Бурятской республике // *Сахарный диабет*. 2006; 1: 2–8.
- Dedov I.I., Kolesnikova L.I., Ivanova O.N., Bardymova T.P., Karlova N.G., Atamanova T.M., Prokofiev S.A. Polimorfizm genov HLA klassa II i CTLA4 zdorovyh burjat i bol'nyh saharным диабетом 1 tipa v Burjatskoj respub-
- like [Polymorphism of genes HLA class II and CTLA4 healthy Buryats and patients with type 1 diabetes mellitus in the Buryat Republic] // *Sabarnyj diabet – Diabetes Mellitus*. 2006; 1: 2–8 (in Russian).
80. Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Vlasov B.Ya., Grebenkina L.A., Semenova N.V., Dolgikh M.I., Bardymova T.P., Gnusina S.V. Oxidative stress in Mongoloids and Caucasians with type 1 diabetes // *Journal of Diabetes & Metabolism*. 2014; 5 (5): 1–4. DOI: 10.4172/2155-6156.1000376.
81. Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A., Labygina A.V., Suturina L.V., Dolgikh M.I., Shiphinee-va T.I., Darzhaev Z.Yu., Tsyrenov T.B., Rinchindorzhie-va M.P. Activity of lipid peroxidation in infertile women from different populations // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013; 154 (2): 203–205. DOI: 10.1007/s10517-012-1912-4.
82. Колесникова Л.И., Байрова Т.А., Первушина О.А. Гены ферментов антиоксидантной системы // *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2013; 12: 83–88.
- Kolesnikova L.I., Bairova T.A., Pervushina O.A. Geny fermentov antioksidantnoj sistemy [Genes of antioxidant system enzymes] // *Vestnik RAMN – Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2013; 12: 83–88 (in Russian).
83. Колесникова Л.И., Курашова Н.А., Байрова Т.А., Долгих М.И., Ершова О.А., Натяганова Л.В., Дашиев Б.Г., Гутник И.Н., Королева Н.В. Особенности липопероксидации, антиоксидантной защиты и тиолдисульфидной системы в патогенезе бесплодия у мужчин, носителей нефункциональных вариантов полиморфизмов генов GSTT1 и GSTM1 // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 3: 363–366.
- Kolesnikova L.I., Kurashova N.A., Bairova T.A., Dolgikh M.I., Ershova O.A., Natyaganova L.V., Dashiev B.G., Gutnik I.N., Koroleva N.V. Osobennosti lipoperoksidacii, antioksidantnoj zashhity i tioldisulfidnoj sistemy v patogeneze besplodija u muzhchin, nositelej nefunkcional'nyh variantov polimorfizmov genov GSTT1 i GSTM1 [Features of lipoperoxidation, antioxidant defense and thiol disulfide system in the pathogenesis of infertility in men, carriers of non-functional variants of polymorphisms of the GSTT1 and GSTM1 genes] // *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017; 3: 363–366 (in Russian).

Поступила в редакцию 13.05.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Колесникова Любовь Ильинична, академик РАН, профессор, д-р мед. наук, науч. руководитель НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск.

Даренская Марина Александровна, д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория патофизиологии, НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск.

Колесников Сергей Иванович, академик РАН, профессор, д-р мед. наук, гл. науч. сотрудник, НЦ проблем здоровья семьи и репродукции человека, г. Иркутск.

(✉) Даренская Марина Александровна, e-mail: marina_darenskaya@inbox.ru.

УДК 616-098:577.125.33:577.121.7

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-16-29

For citation: Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Kolesnikov S.I. Free radical oxidation: a pathophysiological view. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 16–29.

Free radical oxidation: a pathophysiological view

Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Kolesnikov S.I.

ABSTRACT

Significant progress in the field of free radical biology and medicine since the middle of the century has been made. Subsequently, the spectrum of diseases and pathological states believed to be associated with free radicals significantly has been expanded. At present, the development of oxidative stress molecular-cellular mechanisms investigations is extremely topical for medical science because it involves in a number of pathologies, including social-significance disorders .

The important role of the lipid peroxidation (LPO) system and deficiency of antioxidant defense (AOD) factors in general pathological processes has been proved by authors and their assistants in the laboratories of the Institute of Clinical and Experimental Medicine of Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences (Novosibirsk), since 1972. A list of these processes: cold and toxic stress, tumor growth, inflammation, physiologic and pathologic pregnancies (including experimental models). In fact the first clinical investigations were not only in the USSR, but also in the whole world. Several patents proved this.

In the experiments on rodents, the phenomenon of imprinting on the offspring's LPO and drug metabolism after LPO inducing toxicants action during pregnancy was discovered.

The research series continued at the Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (Irkutsk). Technology for oxidative stress evaluation and the use of antioxidants in the complex therapy of complicated and uncomplicated pregnancy, reproductive disorders in men and women, sleep disorders, socially-significant diseases, pediatric practice were created here. The analysis of lipid peroxidation changes during the physiological development of the reproductive function performed. The gender and ethnic dependence of lipid peroxidation was noted. Ethno-specific changes in the LPO-AOD system among the representatives of the Buryat ethnic group at different pathologic conditions (diabetes mellitus type 1, essential arterial hypertension, complicated pregnancy, endocrine infertility, endometriosis, male infertility), were revealed. The LPO-AOD was used to define "relative ethnic norm" for Buryat ethnic group. The "specificity" of features of nonspecific process of free radical oxidation in different pathologic situations was postulated. It is very important for personalized diagnosis, prevention and treatment.

Key words: free radical oxidation, oxidative stress, lipid peroxidation, antioxidant defense, pathological states, ethnoses.

Received July 16.2017
Accepted November 08.2017

Kolesnikova Lyubov I., Academician of the Russian Academy of Sciences, DM, Professor, Scientific Supervisor, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation.

Darenskaya Marina A., DBSc, Leading Researcher, Pathophysiology Laboratory, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation.

Kolesnikov Sergey I., Academician of the Russian Academy of Sciences, DM, Professor, Chief Researcher, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation.

(✉) **Darenskaya Marina A.**, e-mail: marina_darenskaya@inbox.ru.

УДК 615.214.21-06:616-008.9

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-30-41

Для цитирования: Насырова Р.Ф., Толмачев М.Ю., Сычев Д.А., Яхин К.К., Незнанов Н.Г. Механизмы развития антипсихотик-индуцированных метаболических нарушений: фармакогенетический аспект. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 30–41.

Механизмы развития антипсихотик-индуцированных метаболических нарушений: фармакогенетический аспект

Насырова Р.Ф.¹, Толмачев М.Ю.¹, Сычев Д.А.², Яхин К.К.³, Незнанов Н.Г.¹

¹ *Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии имени В.М. Бехтерева Россия, 192019, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 3/1*

² *Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Россия, 125993, г. Москва, ул. Баррикадная, 2/1/1*

³ *Казанский государственный медицинский университет Россия, 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49*

РЕЗЮМЕ

Антипсихотики являются основными лекарственными препаратами в терапии расстройств шизофренического спектра. Антипсихотические препараты требуют длительного применения, обладают узкой терапевтической широтой, большим спектром и выраженностью нежелательных лекарственных реакций, проявление которых во многом определяется генотипом пациента. Выраженность нежелательных лекарственных реакций у препаратов первой и второй генераций антипсихотиков различна.

Применение атипичных антипсихотиков, в отличие от типичных, реже вызывает экстрапирамидные расстройства, но индуцирует, прежде всего, метаболические нарушения: изменение веса, дисрегуляцию метаболизма глюкозы, дислипидемию. Перечисленные нежелательные лекарственные реакции в значительной мере снижают приверженность пациентов к терапии и могут привести к серьезным осложнениям в дальнейшем. Клинический опыт применения антипсихотиков показал, что выраженность нежелательных реакций одного препарата, принимаемого различными пациентами, является переменным показателем в связи с полиморфизмом генов фармакокинетических и фармакодинамических факторов, задействованных в реализации фармакологического действия антипсихотиков. В связи с этим изучение влияния различных комбинаций полиморфных вариантов генов фармакокинетических и фармакодинамических факторов на развитие антипсихотик-индуцированных метаболических нарушений является приоритетной задачей персонализированной психиатрии.

Ключевые слова: фармакогенетика, антипсихотики, метаболические нарушения, набор веса, фармакодинамические факторы, фармакокинетические факторы.

ВВЕДЕНИЕ

Основными препаратами для терапии психических расстройств шизофренического спектра являются антипсихотики, требующие длительного применения. Антипсихотические препараты

обладают узкой терапевтической широтой, большим спектром и выраженностью нежелательных лекарственных реакций, проявление которых во многом определяется генотипом пациента [1]. Антипсихотики принято классифицировать на две категории: препараты первой генерации (FGAs) и препараты второй генерации (SGAs), также именуемые как типичные и атипичные

✉ Насырова Регина Фаритовна, e-mail: reginaf@bekhterev.ru.

антипсихотики. Данная классификация основана на механизме действия препаратов: способностью блокировать D_2 -рецепторы к дофамину обладают как препараты первой, так и второй генерации антипсихотиков, но SGAs демонстрируют значительно более низкую специфичность к D_2 -рецептору и реализуют терапевтический эффект через иные механизмы. В механизме действия атипичных антипсихотиков преобладает серотонин-дофаминовый антагонизм ($5HT2A/D_{2,3,4}$), который сочетается с выраженным аффинитетом к холинергическим, адренергическим и гистаминовым рецепторам. В связи с этим выраженность нежелательных лекарственных реакций у препаратов первой и второй генерации антипсихотиков различна [2]. Атипичные антипсихотики, в отличие от типичных, значительно реже вызывают экстрапирамидные расстройства, но индуцируют метаболические нарушения, включающие значительное изменение веса, дисрегуляцию метаболизма глюкозы, дислипидемию. Перечисленные нежелательные лекарственные реакции в значительной мере снижают приверженность пациентов к терапии и могут привести к серьезным осложнениям в дальнейшем [3].

АНТИПСИХОТИК-ИНДУЦИРОВАННЫЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СИНДРОМ

Термин «метаболический синдром» не является общепринятым, но чаще всего под ним понимают сочетание следующих патологических состояний: ожирение, дислипидемия, диабет II типа, жировая инфильтрация печени, подагра и артериальная гипертензия, связанная с атеросклеротическими изменениями в сосудах [4]. Наиболее частая комбинация – абдоминальное ожирение, диабет II типа и артериальная гипертензия встречается у 20–25% всего взрослого населения планеты [5]. Установлено, что пациенты с психотическими расстройствами в два раза чаще страдают от ожирения, чем представители общей популяции [6]. Пациенты с тяжелыми психическими расстройствами, такими как шизофрения, еще больше подвержены риску за счет вредных привычек, часто регистрируемых в их анамнезе – курение, алкогольная зависимость, малоподвижный образ жизни [7]. Среди всех метаболических изменений, вызываемых приемом антипсихотиков, набор веса является манифестным и способен в короткие сроки привести к ожирению, осложненному дислипидемией и толерантностью к глюкозе. В дальнейшем эти состояния переходят в диабет II типа, артериальную

гипертензию и сердечно-сосудистые заболевания [8]. Эпидемиологические исследования показали, что пациенты, страдающие шизофренией, в 2,5 раза чаще умирают от сердечно-сосудистых осложнений и их средняя продолжительность жизни на 20% меньше, чем в общей популяции [9]. Согласно критериям, разработанным Международной диабетической федерацией, метаболический синдром диагностируется при наличии трех критериев, из которых длина окружности талии обязательна. Предлагаемые федерацией критерии: длина окружности талии – более 94 см у мужчин, 80 см у женщин, артериальное давление – свыше 130/85 мм рт. ст., липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) – менее 40 мг/мл у мужчин и 50 мг/мл у женщин, концентрация триацилглицеролов – свыше 150 мг/мл, концентрация глюкозы свыше 100 мг/мл.

Ожирение – увеличение массы тела за счет жировой ткани, оцениваемое по индексу массы тела. Индекс массы тела рассчитывается как отношение массы тела к квадрату роста ($кг/м^2$); значения, лежащие в диапазоне 18,5–24,9 $кг/м^2$, считаются нормальными, индекс массы тела – 25,0–29,9 $кг/м^2$ считается избыточным, свыше 30 $кг/м^2$ позволяет диагностировать ожирение [10]. Установлено, что прием антипсихотиков второго поколения у 50–80% пациентов вызывают 10%-ю прибавку в весе за счет жировой ткани [11]. Многочисленными исследованиями установлено, что прием клозапина и оланзапина вызывает наибольшую прибавку в весе, затем следует рисперидон, наиболее безопасными в этом отношении являются зипрасидон и арипипразол [12]. Наблюдение в течение года за пациентами с шизофренией, принимающими атипичные антипсихотики, проводимое после первого психотического эпизода и осуществляемое под эгидой The European First Episode Schizophrenia Trial, показало, что прием оланзапина провоцировал прибавку в весе на уровне 13,9 кг, кветиапина – 10,5 кг, зипразидона – 4,8 кг и галоперидола 7,3 кг [13]. Набор веса у пациентов с манифестацией психотических расстройств подтвержден также в рандомизированном двойном слепом исследовании. В качестве критерия антипсихотик-индуцированного набора веса учитывалось изменение массы тела не менее 7%, которую имели 80, 58 и 50% пациентов, принимающих оланзапин, рисперидон, кветиапин соответственно [14].

Антагонизм рецепторов на центральном уровне регуляции, вызываемый приемом атипичных антипсихотиков, провоцирует повышение аппетита, характеризующееся заметным увеличением

частоты и объема принимаемой пищи, и снижает возможность получить чувство насыщения [15]. Атипичные антипсихотики вносят разобщение в центральные механизмы регуляции пищевого поведения, воздействуя на рецепторы 5-HT_{2C} (серотониновые) и H₁ (гистаминовые) [16]. Было показано, что мыши, нокаутные по гену серотонинового рецептора 5-HT_{2C}, страдают ожирением и имеют значительно более высокую концентрацию глюкозы, лептина и инсулина в периферической крови [17]. Этот эффект достигается за счет того, что серотонин усиливает чувство насыщения, стимулируя синтез проопиомеланокортина (РОМС) в дугообразном ядре гипоталамуса [18]. В свою очередь, РОМС является прекурсором в синтезе α -меланоцитостимулирующего гормона – лиганда МС₃- и МС₄-рецепторов, дефицит которых является одной из самых распространенных причин эссенциального ожирения [19].

Гистамин, синтезируемый туберомамиллярным ядром, расположенным в заднем отделе гипоталамуса, действует на гистаминовые рецепторы H₁, тем самым угнетая потребность в пище и усиливая термогенез, а также симпатическую активацию адипоцитов, что активирует процесс липолиза. Стимуляция β_2 -адренорецепторов приводит к активации аденилатциклазы, что создает повышенную концентрацию цАМФ, переводящую протеинкиназу А в активное состояние. Данная киназа фосфорилирует липазу адипоцитов, запуская распад жиров [20]. Гистаминовые H₁-рецепторы являются необходимым звеном в пути синтеза лептина, который подавляет синтез орексигенных пептидов (Y и agouti-зависимый пептид) в дугообразном ядре [21].

Лептин напрямую вовлечен в регуляцию углеводного обмена и формирование инсулинорезистентности [22]. Более того, появляются сведения, что прием атипичных антипсихотиков может спровоцировать лептинорезистентность по аналогии с инсулиновой резистентностью [23]. Показано, что изменения пищевой регуляции и метаболизма при приеме атипичных антипсихотиков происходят через адренорецепторы и белки, связывающие стероидный регуляторный элемент (SPERBs) [24]. SPERBs является важным транскрипционным фактором клеточного биосинтеза холестерина и триацилглицеролов, и активируется в гепатоцитах при действии антипсихотиков как первой, так и второй генерации [25]. Атипичные антипсихотики обладают также сродством и к мускариновым холинергическим рецепторам (M₃). Блокада M₃-рецепторов β -клеток поджелудочной железы приводит к измене-

ниям метаболизма глюкозы, снижению секреции инсулина и развитию толерантности к нему [26].

Вторым ключевым звеном метаболического синдрома является инсулинорезистентность, обуславливающая в дальнейшем развитие сахарного диабета II типа. Соотношение частоты встречаемости сахарного диабета I и II типов составляет 1 : 9 [27]. Как правило, у больных психотическими расстройствами на фоне ожирения развивается вялотекущий сахарный диабет II типа [28]. Наиболее частый механизм развития сахарного диабета II типа, в том числе у больных с психотическими расстройствами, – пострецепторная инсулинорезистентность на фоне гиперинсулинемии, при которой связь инсулина с рецептором не приводит к активации внутриклеточных реакций, сопряженных с транслокацией переносчика глюкозы на поверхность клеток инсулинозависимых тканей [29].

Ожирение и диабет при хроническом течении являются патологией не только углеводного, но также липидного и белкового обменов, проявляются дислипотеинемией – повышением содержания хиломикрон, липопротеинов низкой и очень низкой плотности (ЛПНП, ЛПОНП) при снижении концентрации липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в крови, изменением состава этих фракций и гиперхолестеремией [30]. Кроме того, течение патологического процесса осложняется появлением гликированных фракций ЛПНП и ЛПВП [31]. Происходит накопление липопротеина – фракции ЛПНП, в которой аполипопротеин В соединен дисульфидным мостиком с белком, гомологичным плазмину. Липопротеин обладает повышенной атерогенностью [32]. Изменения качественного и количественного состава липидных фракций приводят к невозможности клеточного захвата ЛПНП и их постоянной циркуляции в кровяном русле. Причиной торможения созревания ЛПВП является нарушение этерификации холестерина при действии лецитинхолестеролацилтрансферазы (ЛХАТ) [33]. Длительный дисбаланс липопротеинов приводит к стойкой циркуляции ЛПНП в кровяном русле и формированию атеросклеротических бляшек с последующей артериальной гипертензией атеросклеротического генеза.

С учетом того, что терапия антипсихотиками – длительный, а при частых обострениях практически пожизненный процесс, он с большой вероятностью будет сопровождаться побочными эффектами в виде метаболических нарушений. Выраженность метаболических побочных эффектов при приеме атипичных антипсихотиков

детерминируется генотипом человека: с одной стороны, генами фармакокинетических факторов, определяющих изменение концентрации препарата во времени, с другой стороны, – генами фармакодинамических факторов, определяющих механизмы взаимодействия лекарственного средства и таргетных рецепторов. Персонализированный подход к снижению антипсихотик-индуцированного набора веса позволит повысить приверженность к терапии, что особенно важно для лечения социально значимых расстройств шизофренического спектра, а также снизить риск возникновения патологических процессов, опосредуемых антипсихотик-индуцированным набором веса.

ГЕНЫ, КОДИРУЮЩИЕ ПРОДУКТЫ, КОТОРЫЕ УЧАСТВУЮТ В ФАРМАКОКИНЕТИКЕ АНТИПСИХОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Следует отметить, что одинаковая доза препарата не всегда обуславливает одинаковую концентрацию лекарственного средства и его метаболитов во внутренней среде организма. Различие в концентрациях является следствием полиморфности генов, кодирующих фармакокинетические факторы, и определяется разной активностью ферментных систем. Повышенная концентрация препарата увеличивает риск возникновения и выраженность проявлений антипсихотик-индуцированного набора веса. Контроль над концентрацией препарата может быть достигнут за счет предикции активности фармакокинетических факторов, основанной на анализе их генных полиморфизмов.

Большинство антипсихотиков метаболизируются системой цитохромов, представленной семейством полиморфных ферментов CYP, включающим CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4, CYP2C19 [34]. Метаболизм через CYP2D6 является главным путем для биотрансформации галоперидола, палиперидона и рисперидона [35]. Ген *CYP2D6* имеет 80 полиморфных вариантов, чьи аллели формируют следующие гаплотипы метаболитов: ультрабыстрые (являются носителями более двух функциональных аллелей), нормальные (имеют два функциональных аллеля), промежуточные (обладают набором из двух частично дефектных аллелей или одного нефункционального аллеля) и медленные (со слабой активностью фермента, детерминированной двумя нефункциональными аллелями) [36]. Эпидемиологические исследования установили, что 1–2% европеоидов

являются ультрабыстрыми, а 5–10% – медленными метаболиторами; в азиатской популяции – 1–2% медленных метаболиторов; 30–40% представителей народов Северной Африки являются ультрабыстрыми метаболиторами [37]. У носителей дефектных полиморфных вариантов генов *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*5*, *CYP2D6*6* показано 80%-е увеличение концентрации рисперидона в сыворотке крови по сравнению с нормальными метаболиторами [38]. Установлено, что полиморфизмы генов *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4*, *CYP2D6*10* ассоциированы с антипсихотик-индуцированным набором веса [39].

Полиморфизмы гена *CYP2D6* также оказывают влияние на фармакодинамику: промежуточным продуктом биотрансформации рисперидона является активный метаболит 9-гидроксирисперидон, обладающий более выраженным аффинитетом к D₂-рецепторам и меньшим сродством к 5-HT_{2A}-рецепторам [40]. Однако некоторые исследователи указывают, что полиморфизм гена *CYP2D6* не играет существенной роли, как это было показано для оланзапина [41]. На примере пациентов, получавших рисперидон, установлено значительное снижение активности CYP2D6 у носителей аллеля T в полиморфизме 188C/T гена *CYP2D6*; более того, у гомозигот обращало на себя внимание значительно более выраженное увеличение массы тела [42].

Семейство ферментов CYP3A задействовано в метаболизме широкого спектра ксенобиотиков и кодируется четырьмя генами, расположенными на одном локусе 7q21 – 7q22: *CYP3A1*, *CYP3A2*, *CYP3A3*, *CYP3A4* и тремя псевдогенами *CYP3AP1*, *CYP3AP2*, *CYP3AP3* [43]. При этом в случае носительства полиморфизма *CYP3A4* активность метаболических процессов, протекающих с участием ферментов, и концентрация последних неодинаковы и увеличиваются в течении жизни [44]. По актуальным данным, обнаружено, что 20 белковых вариантов CYP3A4, *6, *17, *20 обладают пониженной активностью. Это подтверждается исследованием, в котором добровольцы принимали кветипин, при этом носители мутации в промоторном регионе гена *CYP3A4*1B* (-392 G>A) имели значительно более низкую активность фермента [45].

АТФ-связывающие переносчики экспрессируются во внутренних органах, являются частью гематоэнцефалического барьера, в почках они вовлечены в абсорбцию и экскрецию лекарственных средств, при этом большая часть антипсихотиков является их субстратами [46]. Большинство фармакогенетических исследований направлены

на изучение экзонных полиморфизмов 3435C/T (rs1045642), 2677G/T (rs2032582) и 1236C/T (rs1128503) гена Р-гликопротеина *MDR1* [47]. При этом показано, что женщины – носители аллеля Т в однонуклеотидных полиморфизмах (ОНП) С2667Т и С3435Т гена *MDR1* – имеют значительно большую прибавку в весе при терапии оланзипином и рисперидоном. Все три полиморфизма в европейской популяции находятся в сильном неравновесном сцеплении друг с другом, при этом гомозиготы по аллелю 3435(Т) гена *MDR1* обладают значительно сниженной активностью транспортеров [48]. Исследования, проводимые в европейской популяции, показали также взаимосвязь аллеля 2877(Т) гена *MDR1* и повышенной плазменной концентрации оланзипина [49]. Установлено, что аллели 3435(Т) и 2677(Т) гена *MDR1* ассоциированы с повышенной концентрацией клозапина в сыворотке крови и их носители имели такой же терапевтический ответ, как и группа сравнения, но при меньшей дозировке препарата [50]. При изучении ОНП G2677Т/А и С3435Т гена *MDR1* оптимальный лекарственный ответ обнаружен у носителей аллеля Т [51]. Другие исследователи не выявили подобных ассоциаций, но показали лучший терапевтический ответ у носителей С1236Т гена *MDR1* [52]. В Корее у здоровых носителей генов *MDR1* 3435C>Т и СУ-Р2D6*10 установлены симптомы передозировки после разового приема рисперидона в дозе 2 мг [53].

ГЕНЫ, КОДИРУЮЩИЕ ПРОДУКТЫ, КОТОРЫЕ УЧАСТВУЮТ В ФАРМАКОДИНАМИКЕ АНТИПСИХОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Атипичные антипсихотики взаимодействуют с разнообразными рецепторами, различные варианты которых определяют характер и силу эффекта этого взаимодействия. Гены, кодирующие фармакодинамические факторы, имеют выраженную полиморфность, которая определяет различие в величине экспрессии рецепторов на поверхности клеточных мембран, аминокислотном составе и функциональной активности рецепторов. Этим создаются предпосылки для увеличения риска развития антипсихотик-индуцированного набора веса у лиц с определенными изменениями в фармакодинамических факторах.

Изучение дофаминовых рецепторов второго типа (D_2) считается приоритетной задачей, так как все без исключения антипсихотики их блокируют [54]. Считается, что блокада 65% D_2 -ре-

цепторов является оптимальной для достижения терапевтического эффекта, при блокаде 72% резко возрастает риск проявления побочных эффектов [55]. К тому же известно, что D_2 -рецепторы (*DRD2*) вовлечены в механизмы набора веса [56]. Установлено, что аллель с делецией -141С в промоторном регионе гена *DRD2* приводит к снижению активности и плотности экспрессии рецепторов [57]. Кроме того, он является предиктором отсроченного ответа на оланзипин, рисперидон и слабого ответа на хлорпромазин. Таq1В (rs1079597) расположен в первом интроне гена *DRD2*, и его аллель С ассоциируют со снижением плотности D_2 -рецепторов в стриатуме [58]. Вариант Таq1А (rs1800487 Т/С) гена *DRD2* расположен в пределах 8-го экзона, рядом с геном *ANKK1* и четко коррелирует с низкой плотностью рецепторов в стриатуме [59]. С.А. Calarge и соавт. (2009) выявлена взаимосвязь между Таq1А и гиперпролактинемией у молодых пациентов и связанными с ней побочными эффектами при приеме рисперидона [60]. Вполне вероятно, что аллель Таq1А1 является маркером гаплотипа в промежутке от 3'-конца *DRD2* до *ANKK1* с выраженной неравновесностью сцепления, носительство которого приводит к гиперпролактинемии при приеме оланзипина и рисперидона [61].

Так как атипичные антипсихотики связываются с *DRD4*, полиморфизмы их генов считаются кандидатными в отношении антипсихотик-индуцированного набора веса. Полиморфный вариант Variable Number Tandem Repeats (48-bp VNTR), состоящий из повторных участков, расположенный в 3-м экзоне, активно изучался, однако дал противоречивые данные с подавляющим большинством негативных результатов [62]. VNTR считается особенно важным, так как кодирует участок рецептора, вовлеченного в стыковку с G-белком, и чем длиннее этот участок за счет повторений, тем меньше становится аффинность рецептора к клозипину [63]. Более того, способность дофамина ингибировать образование цАМФ снижается в два раза при наличии семи повторов в этом кодирующем участке [64]. Гипофункциональный 7-кратный повтор (7R) аллеля гена рецептора дофамина *DRD4* ассоциирован с более выраженным увеличением массы тела у пациентов с булимией [65]. Этот вариант связан также со значительно превосходящим набором веса у европеоидов пациентов [66].

Антипсихотики второй генерации блокируют 5-НТ-рецепторы, в связи с чем ген серотонинового рецептора (*HTR2A*) является кандидатным геном [67]. Однонуклеотидный полиморфизм

-1438A/G гена *HTR2A* расположен в промоторном регионе и оказывает сильное влияние на промоторную активность. При этом ОНП 102T/C и -1438A/G гена *HTR2A* находятся в сильном неравновесном сцеплении [68]. В японских и китайских популяциях выявлена значимая ассоциация между ОНП 102T/C гена *HTR2A* и антипсихотик-индуцированным набором веса при приеме оланзипина и рисперидона [69]. О.О. Poleskaya et al. (2002) показали, что носители аллеля С/С гена *HTR2A* меньше экспрессируют 5HTR2A, что ведет к снижению плотности рецепторов [70].

Перспективным в отношении предикции антипсихотик-индуцированного набора веса считается еще один ОНП – His452Tyr гена *HTR2A*, при этом носительство 452Tyr ассоциировано с меньшей эффективностью антипсихотической терапии [71]. Исследование несинонимичных полиморфизмов T25N, I197V, A447V, H452Y гена *HTR2A* дало статистически значимое изменение аффинности рецептора с атипичными антипсихотиками по сравнению с диким типом. Двукратное увеличение аффинности зарегистрировано у носителей варианта I197V при приеме арипипразола, десятикратное увеличение – при полиморфизме I197V на фоне приема клозапина, четырехкратное увеличение – у носителей полиморфизма T25N при приеме кветиапина и трехкратное увеличение – при полиморфизме H452Y у принимавших рисперидон; тридцатикратное снижение аффинности выявлено при приеме арипипразола у носителей полиморфизма T25N [72].

Поскольку атипичные антипсихотики взаимодействуют с адренорецепторами, ОНП последних также может играть важную роль в фармакодинамике препарата. Однонуклеотидный полиморфизм 1291C/G гена *ADRA2A* с аллельным вариантом G/G ассоциирован с высоким риском развития антипсихотик-индуцированного набора веса [73]. Полученные данные подтверждают исследования A. Bolonna et al. (2000) [74]. Установлено, что гены *ADRA2A* и *ADRB3* вовлечены в механизмы реализации антипсихотик-индуцированного набора веса, в частности, у носителей аллеля С полиморфизма -1291C/G гена *ADRA2A* выявлено значимо большее увеличение веса при терапии оланзипином [75]. Носительство полиморфизма 64Tyr/Arg rs4993 гена *ADRB3* связано с большим риском возникновения антипсихотик-индуцированного набора веса, развития диабета и артериальной гипертензии, носительство полиморфизма 64SArg/Arg гена *ADRB3* ассоциировано с более выраженным набором веса у пациентов, принимающих оланза-

пин [76]. Выявлены ассоциации между полиморфизмом Gly389Arg гена *ADRB1* и набором веса у женщин [77]. Для гена *ADRB2* получены схожие результаты – полиморфизм Gln27Glu оказался связанным с ожирением среди представителей японской популяции [78], а полиморфизм Q/E27 – с излишним набором веса и дислиппротеинемией с преобладанием триацилглицерол-богатых липидов [79].

Перспективными являются направления в исследовании влияния на антипсихотик-индуцированные метаболические нарушения ОНП генов лептина, нейропептида Y, гистамина. Данные факторы взаимосвязаны, так как лептин угнетает синтез нейропептида Y, который оказывает орексигенный эффект. В свою очередь блокада гистаминовых рецепторов вторично создает лептинорезистентность – повышение уровня лептина, обусловленное разрастанием жировой ткани. Недавние исследования направлены на поиск ассоциаций между антипсихотик-индуцированными метаболическими нарушениями и ОНП 2548G/A (rs7799039) в промоторном регионе гена лептина *LEP* и *Q223R* (rs1137101) гена, кодирующего рецептор к лептину *LEPR*. По данным отдельных авторов, аллельные варианты AA гена *LEP* 2548 G/A ассоциированы с набором веса [80–82]. В то же время вышли публикации, указывающие на отсутствие взаимосвязи между ОНП 2548G/A гена *LEP* и метаболическими нарушениями [83]. Несмотря на предполагаемое важное значение нейропептида Y в механизме регуляции пищевого поведения, достоверных исследований, показывающих влияние полиморфности генов данного фактора не так много. А.К. Tiwari et. al. (2013) показали, что полиморфизмы rs16147 (аллель С), rs5573 и rs5574 гена нейропептида Y ассоциированы с повышенным риском набора веса [84]. Немногочисленны и противоречивы исследования полиморфизмов генов гистаминовой системы. Найдена связь ОНП rs346074 и rs346070 гена H₁-рецептора *H1R* с набором веса [85]. В то же время существует ряд работ, опровергающих связь полиморфизмов генов рецепторов гистамина *H1R/H2R/H3R* с прибавкой массы тела при приеме нейролептиков [86].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Терапия расстройств шизофренического спектра – это длительный процесс, сопряженный с приемом лекарственных антипсихотических препаратов. Лечение препаратами второй генерации – атипичными антипсихотиками – становится

наиболее распространенным в клинической практике. Шизофренические расстройства относятся к группе социально значимых расстройств, и приверженность к терапии в огромной степени определяется не только состоянием пациента, но и качеством его жизни, степенью социализации и др. Минимизация побочных эффектов от психофармакотерапии позволит повысить комплаенс пациентов и снизить риски возникновения патологических состояний, ассоциированных с приемом атипичных антипсихотиков.

Большая продолжительность приема препаратов сопряжена с повышенными рисками возникновения нежелательных явлений. Антипсихотик-индуцированный набор веса является наиболее выраженным побочным эффектом при приеме атипичных антипсихотиков и может привести к развитию метаболического синдрома и сопутствующим ему заболеваниям. Персонализированный подбор препарата и его дозы позволяют снизить риски развития антипсихотик-индуцированного набора веса и метаболических нарушений. Данный подход достигается за счет анализа генов фармакокинетических и фармакодинамических факторов индивида. Изучение взаимодействия данных факторов, популяционной встречаемости однонуклеотидных полиморфизмов генов фармакокинетических и фармакодинамических факторов становится важной и перспективной задачей клинической медицины.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых - докторов наук (МД-7471.2016.7).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Мосолов С.Н. Биологические методы терапии психических расстройств. Доказательная медицина – клинической практике. Москва, 2012: 1080.
2. Насырова Р.Ф., Иванов М.В., Незнанов Н.Г. Введение в психофармакогенетику. Издательский центр СПб НИПНИ им. В.М. Бехтерева. Санкт-Петербург, 2015: 272.
3. Nasyrova R.F., Ivanov M.V., Neznanov N.G. Vvedeniye v psikhofarmakogenetiku [Introduction to psychopharmacogenetics]. Izdatel'skiy tsentr SPb NIPNI im. V.M. Bekhtereva. Publ. Saint-Petersburg, 2015: 272 (in Russian).
4. Üçok A., Gaebel W. Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview // *World Psychiatry*. 2008; 7 (1): 58–62. DOI: 10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x.
5. Cornier M.A., Dabelea D., Hernandez T.L., Lindstrom R.C., Steig A.J., Nicole R.S., Van Pelt R.E., Wang H., Eckel R.H. The metabolic syndrome // *Endocrine Reviews*. 2008; 29 (7): 777–822. DOI: 10.1210/er.2008-0024.
6. Stern M.P., Williams K., Gonzalez-Villalpando C., Hunt K.J., Haffner S.M. Does the Metabolic Syndrome Improve Identification of Individuals at Risk of Type 2 Diabetes and/or Cardiovascular Disease // *Diabetes Care*. 2004; 27 (11): 2676–2681. DOI: 10.2337/diacare.27.11.2676.
7. Dickerson F.B., Brown C.H., Kreyenbulh J.A., Fang L., Goldberg R.W., Wohlheiter K., Dixon L.B. Obesity among individuals with serious mental illness // *Acta Psychiatrica Scand*. 2006; 113 (4): 306–313. DOI: 10.1111/j.1600-0447.2005.00637.x.
8. Connolly M. Lifestyle and physical health in schizophrenia // *Advances in Psychiatric Treatment*. 2005; 11 (2): 125–132. DOI: 10.1192/apt.11.2.125.
9. Kenchaiah S., Gaziano J.M., Vasan R.S. Impact of obesity on the risk of heart failure and survival after the onset of heart failure // *Medical Clinics of North America*. 2004; 88 (5): 1273–1294. DOI: 10.1016/j.mcna.2004.04.011.
10. Haslam D.W., James W.P.T. Obesity // *The Lancet*. 2005; 366 (9492): 1197–1209. DOI: 10.1016/s0140-6736(05)67483-1.
11. Cornier M.A., Dabelea D., Hernandez T.L., Lindstrom R.C., Steig A.J., Stob N.R., Van Pelt R.E., Wang H., Eckel R.H. The metabolic syndrome // *Endocr Rev*. 2008; 29 (7): 777–822. DOI: 10.1210/er.2008-0024.
12. Reist C., Mintz J., Albers L.J., Jamal M.M., Szabo S., Ozdemir V.. Second-Generation Antipsychotic Exposure and Metabolic-Related Disorders in Patients With Schizophrenia // *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 2007; 27 (1): 46–51. DOI: 10.1097/jcp.0b013e31802e5126.
13. Deng C., Weston-Green K., Huang X-F. The role of histaminergic H1 and H3 receptors in food intake: A mechanism for atypical antipsychotic-induced weight gain? // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2010; 34 (1): 1–4. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2009.11.009.
14. McQuade R.D., Stock E., Marcus R., Jody D., Gharbia N.A., Vanveggel S., Archibald D., Carson W.H. A comparison of weight change during treatment with olanzapine or aripiprazole: results from a randomized, double-blind study // *J. Clin. Psychiatry*. 2004; 65: 47–56.

14. Holt R.I.G., Peveler R.C. Obesity, serious mental illness and antipsychotic drugs // *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2009; 11 (7): 665–679. DOI:10.1111/j.1463-1326.2009.01038.x.
15. Reynolds G.P., Kirk S.L. Metabolic side effects of antipsychotic drug treatment – pharmacological mechanisms // *Pharmacology and Therapeutics*. 2010; 125 (1): 169–179. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2009.10.010.
16. Álvarez-Jiménez M., González-Blanch C., Crespo-Facorro B., Hetrick S., Rodríguez-Sánchez J.M., Pérez-Iglesias R., Vázquez-Barquero J.L. Antipsychotic-Induced Weight Gain in Chronic and First-Episode Psychotic Disorders // *NS Drugs*. 2008; 22 (7): 547–562. DOI: 10.2165/00023210-200822070-00002.
17. Tecott L.H., Sun L.M., Akana S.F., Strack A.M., Lowenstein D.H., Dallman M.F., Julius D. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2C} serotonin receptors // *Nature*. 1995; 374 (6522): 542–546. DOI:10.1038/374542a0.
18. Xu Y., Jones J.E., Kohno D., Williams K.W., Lee C.E., Choi M.J., Elmquist J.K. 5-HT_{2C}Rs Expressed by Pro-Opiomelanocortin Neurons Regulate Energy Homeostasis // *Neuron*. 2008; 60 (4): 582–589. DOI:10.1016/j.neuron.2008.09.033.
19. Farooqi IS, O'Rahilly S. Genetics of Obesity in Humans // *Endocrine Reviews*. 2006; 27 (7): 710–718. DOI: 10.1210/er.2006-0040.
20. Balt S.L., Galloway G.P., Baggott M.J., Schwartz Z., Mendelson J. Mechanisms and Genetics of Antipsychotic-Associated Weight Gain // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2011; 90 (1): 179–183. DOI: 10.1038/clpt.2011.97.
21. Freyberg Z., Aslanoglou D., Shah R., Ballon J.S. Intrinsic and Antipsychotic Drug-Induced Metabolic Dysfunction in Schizophrenia // *Front Neurosci*. 2017; 28 (11): 432. DOI: 10.3389/fnins.2017.00432.
22. Popovic V., Doknic M., Maric N., Pekic S., Damjanovic A., Miljic D., Casanueva F.F. Changes in Neuroendocrine and Metabolic Hormones Induced by Atypical Antipsychotics in Normal-Weight Patients with Schizophrenia // *Neuroendocrinology*. 2007; 85 (4): 249–256. DOI:10.1159/000103868.
23. Tiwari A.K., Zai C.C., Likhodi O., Lisker A., Singh D., Souza R.P., Müller D.J. A Common Polymorphism in the Cannabinoid Receptor 1 (CNR1) Gene is Associated with Antipsychotic-Induced Weight Gain in Schizophrenia // *Neuropsychopharmacology*. 2010; 35 (6): 1315–1324. DOI: 10.1038/npp.2009.235.
24. Reynolds G.P. The 5-HT_{2C} receptor and antipsychotic-induced weight gain - mechanisms and genetics // *Journal of Psychopharmacology*. 2006; 20 (4): 15–18. DOI: 10.1177/1359786806066040.
25. Antipsychotic Induced Weight Gain in Schizophrenia: Mechanisms and Management // *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*. 2008; 42 (5): 369–381. DOI: 10.1080/00048670801961123.
26. Correl C.U. Weight Gain and Metabolic Effects of Mood Stabilizers and Antipsychotics in Pediatric Bipolar Disorder: A Systematic Review and Pooled Analysis of Short-Term Trials // *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*. 2007; 46 (6): 687–700. DOI: 10.1097/chi.0b013e318040b25f
27. Monteleone P., Martiadis V., Maj M. Management of Schizophrenia with Obesity, Metabolic, and Endocrinological Disorders // *Psychiatric Clinics of North America*. 2009; 32 (4): 775–794. DOI: 10.1016/j.psc.2009.08.003.
28. Müller D.J., Kennedy J.L. Genetics of antipsychotic treatment emergent weight gain in schizophrenia // *Pharmacogenomics*. 2006; 7 (6): 863–887. DOI: 10.2217/14622416.7.6.86.
29. Patti M.E., Virkamaki A., Landaker E.J., Kahn C.R., Yki-Jarvinen H. Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle // *Diabetes*. 1999; 48 (8): 1562–1571. DOI: 10.2337/diabetes.48.8.1562.
30. Vergus B. New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes // *Diabetes & Metabolism*. 2005; 31 (5): 429–439. DOI: 10.1016/s1262-3636(07)70213-6.
31. Lopes-Virella M.F., Virella G. Diabetes and Atherosclerosis // *Diabetes and Cardiovascular Disease*. 2005; 225–258. DOI: 10.1385/1-59259-908-7:225.
32. Singh R., Barden A., Mori T., Beilin L. Diabetologia // *Diabetes*. 1998; 44: 129–146.
33. Dobiášová M., Frohlich J.J. Advances in understanding of the role of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) in cholesterol transport // *Clinica Chimica Acta*. 1999; 286 (1–2): 257–271. DOI: 10.1016/s0009-8981(99)00106-0.
34. Bertilsson L., Dahl M-L., Dalén P, Al-Shurbaji A. Molecular genetics of CYP2D6: Clinical relevance with focus on psychotropic drugs // *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2002; 53 (2): 111–122. DOI: 10.1046/j.0306-5251.2001.01548.x.
35. Urichuk L., Prior T., Dursun S., Baker G. Metabolism of Atypical Antipsychotics: Involvement of Cytochrome P450 Enzymes and Relevance for Drug-Drug Interactions // *Current Drug Metabolism*. 2008; 9 (5): 410–418. DOI: 10.2174/138920008784746373.
36. Gaedigk A., Simon S., Pearce R., Bradford L., Kennedy M., Leeder J. The CYP2D6 Activity Score: Translating Genotype Information into a Qualitative Measure of Phenotype // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2007; 83 (2): 234–242. DOI: 10.1038/sj.clpt.6100406.
37. Vetti H., Molven A., Eliassen A., Steen V. Er farmakogenetisk CYP2D6-testing nyttig? // *Tidsskrift for Den Norske Lægeforening*. 2010; 130 (22): 2224–2228. DOI: 10.4045/tidsskr.09.1445.
38. Hendset M., Molden E., Refsum H., Hermann M. Impact of CYP2D6 Genotype on Steady-State Serum Concentrations of Risperidone and 9-Hydroxyrisperidone in Patients Using Long-Acting Injectable Risperidone // *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 2009; 29 (6): 537–541. DOI: 10.1097/jcp.0b013e3181c17df0.

39. Lane H-Y., Liu Y-C., Huang C-L., Chang Y-C., Wu P-L., Lu C-T., Chang W-H. Risperidone-related Weight Gain // *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 2006; 26 (2): 128–134. DOI: 10.1097/01.jcp.0000203196.65710.2b.
40. De Leon J., Wynn G., Sandson N.B. The Pharmacokinetics of Paliperidone Versus Risperidone // *Psychosomatics*. 2010; 51 (1): 80–88. DOI: 10.1016/s0033-3182(10)70664-2.
41. Arranz M.J., Munro J., Sham P., Kirov G., Murray R.M., Collier D.A., Kerwin R.W. Meta-analysis of studies on genetic variation in 5-HT_{2A} receptors and clozapine response // *Schizophrenia Research*. 1998; 32 (2): 93–99. DOI: 10.1016/s0920-9964(98)00032-2.
42. Lane H-Y., Liu Y-C., Huang C-L., Chang Y-C., Wu P-L., Lu C-T., Chang W-H. Risperidone-related Weight Gain // *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 2006; 26 (2): 128–134. DOI: 10.1097/01.jcp.0000203196.65710.2b.
43. Finta C., Zaphiropoulos P.G. The human cytochrome P450 3A locus. Gene evolution by capture of downstream exons // *Gene*. 2000; 260 (1–2): 13–23. DOI: 10.1016/s0378-1119(00)00470-4.
44. Lacroix D., Sonnier M., Moncion A., Cheron G., Cresteil T. Expression of CYP3A in the Human Liver - Evidence that the Shift between CYP3A7 and CYP3A4 Occurs Immediately After Birth // *European Journal of Biochemistry*. 1997; 247 (2): 625–634. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.00625.x.
45. Vehof J., Risselada A.J., Al Hadithy A.F., Burger H., Snieder H., Wilffert B., Arends J., Wunderink L., Knegtering H., Wiersma D., Cohen D., Mulder H., Bruggeman R. Association of genetic variants of the histamine H₁ and muscarinic M₃ receptors with BMI and HbA_{1c} values in patients on antipsychotic medication // *Psychopharmacology (Berl)*. 2011; 216 (2): 257–265. DOI: 10.1007/s00213-011-2211-x.
46. Moons T., de Roo M., Claes S., Dom G. Relationship between P-glycoprotein and second-generation antipsychotics // *Pharmacogenomics*. 2011; 12 (8): 1193–1211. DOI: 10.2217/pgs.11.55.
47. Kimchi-Sarfaty C., Oh J.M., Kim I-W., Sauna Z.E., Calcagno A.M., Ambudkar S.V., Gottesman M.M. A “Silent” Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity // *Science*. 2007; 315 (5811): 525–528. DOI: 10.1126/science.1135308.
48. Kuzman M.R., Medved V., Bozina N., Hotujac L., Sain I., Bilusic H. The influence of 5-HT_{2C} and MDR1 genetic polymorphisms on antipsychotic-induced weight gain in female schizophrenic patients // *Psychiatry Research*. 2008; 160 (3): 308–315. DOI: 10.1016/j.psychres.2007.06.00.
49. Skogh E., Sjödin I., Josefsson M., Dahl M-L. High Correlation Between Serum and Cerebrospinal Fluid Olanzapine Concentrations in Patients With Schizophrenia or Schizoaffective Disorder Medicating With Oral Olanzapine as the Only Antipsychotic Drug // *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 2011; 31 (1): 4–9. DOI: 10.1097/jcp.0b013e318204d9e2.
50. Consoli G., Lastella M., Catena M., Ciapparelli A., Ciofi L., Paggini R., Di Paolo, A. Clozapine plasma levels, ABCB1 haplotype and clinical response to treatment in psychotic patients // *European Neuropsychopharmacology*. 2007; 17: 458–459. DOI: 10.1016/s0924-977x(07)70696-x.
51. Bozina N., Kuzman M.R., Medved V., Jovanovic N., Sertic J., & Hotujac L. Associations between MDR1 gene polymorphisms and schizophrenia and therapeutic response to olanzapine in female schizophrenic patients // *Journal of Psychiatric Research*. 2008; 42 (2): 89–97. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2006.10.002.
52. Xing Q., Gao R., Li H., Feng G., Xu M., Duan S., He L. Polymorphisms of the ABCB1 gene are associated with the therapeutic response to risperidone in Chinese schizophrenia patients // *Pharmacogenomics*. 2006; 7 (7): 987–993. DOI: 10.2217/14622416.7.7.987.
53. Yoo H-D., Cho H-Y., Lee S-N., Yoon H., Lee Y-B. Population pharmacokinetic analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone with genetic polymorphisms of CYP2D6 and ABCB1 // *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2012; 39 (4): 329–341. DOI: 10.1007/s10928-012-9253-5.
54. Kapur S., Mamo D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D₂ receptors // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2003; 27 (7): 1081–1090. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2003.09.004.
55. Tauscher J., Kapur S. Choosing the Right Dose of Antipsychotics in Schizophrenia // *CNS Drugs*. 2001; 15 (9): 671–678. DOI: 10.2165/00023210-200115090-00001.
56. Müller D.J., Kennedy J.L. Genetics of antipsychotic treatment emergent weight gain in schizophrenia // *Pharmacogenomics*. 2006; 7 (6): 863–887. DOI: 10.2217/14622416.7.6.86.
57. Lencz T., Robinson D.G., Xu K., Ekholm J., Sevy S., Gunduz-Bruce H., Malhotra A.K. DRD2 Promoter Region Variation as a Predictor of Sustained Response to Antipsychotic Medication in First-Episode Schizophrenia Patients // *American Journal of Psychiatry*. 2006; 163 (3): 529–531. DOI: 10.1176/appi.ajp.163.3.529.
58. Hwang R., Shinkai T., De Luca V., Müller D.J., Ni X., Macciardi F., Kennedy J.L. Association study of 12 polymorphisms spanning the dopamine D₂ receptor gene and clozapine treatment response in two treatment refractory/intolerant populations // *Psychopharmacology*. 2005; 181 (1): 179–187. DOI: 10.1007/s00213-005-2223-5.
59. Jönsson E.G., Nöthen M.M., Grünhage F., Farde L., Nakashima Y., Propping P., Sedvall G.C. Polymorphisms in the dopamine D₂ receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers // *Molecular Psychiatry*. 1999; 4 (3): 290–296. DOI: 10.1038/sj.mp.4000532.
60. Calarge C.A., Ellingrod V.L., Zimmerman B., Acion L., Sivitz W.I., Schlechte J.A. Leptin Gene -2548G/A variants predict risperidone-associated weight gain in children and adolescents // *Psychiatric Genetics*. 2009; 19 (6): 320–327. DOI: 10.1097/ypg.0b013e318283328e06.
61. Houston J., Dharia S., Bishop J.R., Ellingrod V.L., Fijal B., Jacobson J.G., Hoffmann V.P. Association of DRD2 and

- ANKK1 polymorphisms with prolactin increase in olanzapine-treated women // *Psychiatry Research*. 2011; 187 (1–2): 74–79. DOI: 10.1016/j.psychres.2010.10.020.
62. Ikeda M., Yamanouchi Y., Kinoshita Y., Kitajima T., Yoshimura R., Hashimoto I.N. Variants of dopamine and serotonin candidate genes as predictors of response to risperidone treatment in first-episode schizophrenia // *Pharmacogenomics*. 2008; 9 (10): 1437–1443. DOI: 10.2217/14622416.9.10.1437.
 63. Hwu H-G., Hong C-J., Lee Y-L., Lee P-C., Lee S.F. Dopamine D4 receptor gene polymorphisms and neuroleptic response in schizophrenia // *Biological Psychiatry*. 1998; 44 (6): 483–487. DOI: 10.1016/s0006-3223(98)00134-6.
 64. Zhao A-L., Zhao J-P., Zhang Y-H., Xue Z-M., Chen J-D., Chen X-G. Dopamine d4 receptor gene exon iii polymorphism and interindividual variation in response to clozapine // *International Journal of Neuroscience*. 2005; 115 (11): 1539–1547. DOI: 10.1080/00207450590957863.
 65. Levitan R.D., Kaplan A.S., Davis C., Lam R.W., Kennedy J.L. A Season-of-Birth/DRD4 Interaction Predicts Maximal Body Mass Index in Women with Bulimia Nervosa // *Neuropsychopharmacology*. 2010; 35: 1729–1733. DOI: 10.1038/npp.2010.38.
 66. Popp J., Leucht S., Heres S., Steimer W. DRD4 48 bp VNTR but not 5-HT2C Cys23Ser receptor polymorphism is related to antipsychotic-induced weight gain // *The Pharmacogenomics Journal*. 2008; 9 (1): 71–77. DOI: 10.1038/tpj.2008.5.
 67. Celada P., Bortolozzi A., Artigas F. Serotonin 5-HT1A Receptors as Targets for Agents to Treat Psychiatric Disorders: Rationale and Current Status of Research // *CNS Drugs*. 2013; 27 (9): 703–716. DOI: 10.1007/s40263-013-0071-0.
 68. Parsons M.J., D'Souza U.M., Arranz M-J., Kerwin R.W., Makoff A.J. The –1438A/G polymorphism in the 5-hydroxytryptamine type 2A receptor gene affects promoter activity // *Biological Psychiatry*. 2004; 56 (6): 406–410. DOI: 10.1016/j.biopsych.2004.06.020.
 69. Lane H-Y., Liu Y-C., Huang C-L., Chang Y-C., Wu P-L., Lu C-T., Chang W-H. Risperidone-related Weight Gain // *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 2006; 26 (2): 128–134. DOI: 10.1097/01.jcp.0000203196.65710.2b.
 70. Polsskaya O.O., Sokolov B.P. Differential expression of the C and T alleles of the 5-HT2A receptor gene in the temporal cortex of normal individuals and schizophrenics // *Journal of Neuroscience Research*. 2002; 67 (6): 812–822. DOI: 10.1002/jnr.10173.
 71. Calarge C.A., Ellingrod V.L., Acion L., Miller D.D., Moline J., Tansey M.J., Schlechte J.A. Variants of the dopamine D2 receptor gene and risperidone-induced hyperprolactinemia in children and adolescents // *Pharmacogenetics and Genomics*. 2009; 19 (5): 373–382. DOI: 10.1097/fpc.0b013e328329a60f.
 72. Davies M.A., Setola V., Strachan R.T., Sheffler D.J., Salay E., Hufeisen S.J., Roth B.L. Pharmacologic analysis of non-synonymous coding h5-HT2A SNPs reveals alterations in atypical antipsychotic and agonist efficacies // *The Pharmacogenomics Journal*. 2005; 6 (1): 42–51. DOI: 10.1038/sj.tpj.6500342.
 73. Park Y-M., Chung Y-C., Lee S-H., Lee K-J., Kim H., Byun Y-C., Lee H-J. Weight gain associated with the α 2a-adrenergic receptor –1291 C/G polymorphism and olanzapine treatment // *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2006; 141B (4): 394–397. DOI:10.1002/ajmg.b.30311
 74. Bolonna A., Arranz M., Munro J., Osborne S., Petouni M., Martinez M., Kerwin R. No influence of adrenergic receptor polymorphisms on schizophrenia and antipsychotic response // *Neuroscience Letters*. 2000; 280 (1): 65–68. DOI: 10.1016/s0304-3940(99)01000-9.
 75. Sickert L., Müller D.J., Tiwari A.K., Shaikh S., Zai C., De Souza R., De Luca V., Meltzer H.Y., Lieberman J.A., Kennedy J.L. Association of the alpha 2A adrenergic receptor –1291C/G polymorphism and antipsychotic-induced weight gain in European-Americans // *Pharmacogenomics*. 2009; 10 (7): 1169–1176. DOI: 10.2217/pgs.09.43.
 76. Ujike H., Nomura A., Morita Y., Morio A., Okahisa Y., Kotaka T., Kuroda S. Multiple Genetic Factors in Olanzapine-Induced Weight Gain in Schizophrenia Patients // *The Journal of Clinical Psychiatry*. 2008; 69 (9): 1416–1422. DOI: 10.4088/jcp.v69n0909.
 77. Dionne I.J., Garant M.J., Nolan A.A., Pollin T.I., Lewis D.G., Shuldiner A.R., Poehlman E.T. Association between obesity and a polymorphism in the β 1-adrenoceptor gene (Gly389Arg ADRB1) in Caucasian women // *International Journal of Obesity*. 2002; 26 (5): 633–639. DOI: 10.1038/sj.ijo.0801971.
 78. Mori Y., Kim-Motoyama H., Ito Y., Katakura T., Yasuda K., Ishiyama-Shigemoto Kadowaki T. The Gln-27Glu β 2-Adrenergic Receptor Variant Is Associated with Obesity Due to Subcutaneous Fat Accumulation in Japanese Men // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999; 258 (1): 138–140. DOI: 10.1006/bbrc.1999.0607.
 79. Ehrenborg E., Skogsberg J., Ruotolo G., Large V., Eriksson P., Arner P., Hamsten A. The Q/E27 polymorphism in the beta2-adrenoceptor gene is associated with increased body weight and dyslipoproteinaemia involving triglyceride-rich lipoproteins // *Journal of Internal Medicine*. 2000; 247 (6): 651–656. DOI: 10.1046/j.1365-2796.2000.00669.x.
 80. Zhang X.Y., Tan Y.L., Zhou D.F., Haile C.N., Cao L.Y., Xu Q., Kosten T.R. Association of Clozapine-Induced Weight Gain With a Polymorphism in the Leptin Promoter Region in Patients With Chronic Schizophrenia in a Chinese Population // *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 2007; 27 (3): 246–251. DOI: 10.1097/jcp.0b013e3180582412.
 81. Kang S-G., Lee H-J., Park Y-M., Choi J-E., Han C., Kim Y-K., Kim L. Possible association between the –2548A/G polymorphism of the leptin gene and olanzapine

- ine-induced weight gain // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2008; 32 (1): 160–163. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2007.08.002.
82. Calarge C.A., Ellingrod V.L., Zimmerman B., Acion L., Sivitz W.I., Schlechte J.A. Leptin Gene –2548G/A variants predict risperidone-associated weight gain in children and adolescents // *Psychiatric Genetics*. 2009; 19 (6): 320–327. DOI: 10.1097/ypg.0b013e3283328e06.
83. Gregoor J.G., Weide J., Looovers H.M., van Megen H.J., Egberts T.C., Heerdink E.R. Polymorphisms of the LEP, LEPR and HTR2C gene: obesity and BMI change in patients using antipsychotic medication in a naturalistic setting // *Pharmacogenomics*. 2011; 12 (6): 919–923. DOI: 10.2217/pgs.11.40.
84. Tiwari A.K., Brandl E.J., Weber C., Likhodi O., Zai C.C., Hahn M.K., Lieberman J.A., Meltzer H.Y., Kennedy J.L., Müller D.J. Association of a functional polymorphism in neuropeptide Y with antipsychotic-induced weight gain in schizophrenia patients // *J. Clin. Psychopharmacol.* 2013; 33 (1): 11–17. DOI: 10.1097/jcp.0b013e31827d145a.
85. Vehof J., Risselada A.J., Al Hadithy A.F., Burger H., Snieder H., Wilffert B., Arends J., Wunderink L., Knegtering H., Wiersma D., Cohen D., Mulder H., Bruggeman R. “Association of genetic variants of the histamine H1 and muscarinic M3 receptors with BMI and HbA1c values in patients on antipsychotic medication” // *Psychopharmacology (Berl)*. 2011; 216 (2): 257–265. DOI:10.1007/s00213-011-2211-x.
86. Godlewska B.R., Olajosy-Hilkesberger L., Olajosy M., Limon J., Landowski J. Polymorphisms of the Histamine Receptor (H1HR) Gene Are Not Associated With Olanzapine-Induced Weight Gain // *Journal of Clinical Psychopharmacology*. 2013; 33 (3): 436–437. DOI: 10.1097/jcp.0b013e3182900c9e.

Поступила в редакцию 16.07.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Насырова Регина Фаритовна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, руководитель отделения персонализированной психиатрии и неврологии, Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии имени В.М. Бехтерева, г. Санкт-Петербург.

Толмачев Михаил Юрьевич, мл. науч. сотрудник, отделение персонализированной психиатрии и неврологии, Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии имени В.М. Бехтерева, г. Санкт-Петербург.

Сычев Дмитрий Алексеевич, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой клинической фармакологии и терапии, Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, г. Москва.

Яхин Каусар Камиллович, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой психиатрии с курсом наркологии, Казанский государственный медицинский университет, г. Казань.

Незнанов Николай Григорьевич, д-р мед. наук, профессор, директор, Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии имени В.М. Бехтерева, г. Санкт-Петербург.

(✉) Насырова Регина Фаритовна, e-mail: reginaf@bekhterev.ru.

УДК 615.214.21-06:616-008.9

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-30–41

For citation: Nasyrova R.F., Tolmachev M.Yu., Sychev D.A., Yakhin K.K., Neznanov N.G. Mechanisms of development of antipsychotic-induced metabolic disorders: pharmacogenetic aspect. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 30–41.

Mechanisms of development of antipsychotic-induced metabolic disorders: pharmacogenetic aspect

Nasyrova R.F.¹, Tolmachev M.Yu.¹, Sychev D.A.², Yakhin K.K.³, Neznanov N.G.¹

¹ V.M. Bekhterev National Medical Research Centre for Psychiatry and Neurology
3, Bekhtereva Str., St.-Petersburg, 192019, Russian Federation

² Russian Medical Academy of Continuous Professional Education
2/1, Barrikadnaya Str., Moscow, 125993, Russian Federation

³ Kazan State Medical University
49, Bulterova Str., Kazan, 420012, Russian Federation

ABSTRACT

Antipsychotics are the main drug group in the treatment of disorders of the schizophrenic spectrum. At the same time, this drug group requires long-term use, has a narrow therapeutic breadth and a large spectrum and high severity of undesirable drug reactions, the manifestation of which is largely determined by the patient's genotype. In this connection, the severity of undesirable drug reactions in drugs of the first and second generation of antipsychotics is different. Atypical antipsychotics, unlike typical antipsychotics, have a significantly lower chance of causing extrapyramidal disorders, though they primarily induce metabolic side effects, consisting of significant weight changes, glucose metabolism dysregulation, and dyslipidemia. These unwanted drug reactions significantly reduce adherence to therapy and can lead to serious complications in the future. At the same time, experience with the use of atypical antipsychotics has shown that the severity of unwanted reactions differs within the group of atypical antipsychotics and, more importantly, even for one drug taken by different patients, is a variable index. The reason for this phenomenon lies in the polymorphism of the pharmacokinetic and pharmacodynamic factors involved in the metabolism of atypical antipsychotics and the different chemical structure of the drugs. The study of the effect of various combinations of polymorphic variants of the pharmacokinetic and pharmacodynamics factors on the development of antipsychotic-induced metabolic disorders is a complex and high-priority task of personalized medicine.

Key words: pharmacogenetics, antipsychotics, metabolic disorders, weight gain, pharmacodynamics factor, pharmacokinetic factor.

Received July 16.2017
Accepted November 08.2017

Nasyrova Regina F., DM, Leading Researcher, Head of the Department of Personalized Psychiatry and Neurology, V.M. Bekhterev National Medical Research Centre for Psychiatry and Neurology, St.-Petersburg, Russian Federation.

Tolmachev Mikhail Yu., Junior Researcher, Department of Personalized Psychiatry and Neurology, V.M. Bekhterev National Medical Research Centre for Psychiatry and Neurology, St.-Petersburg, Russian Federation.

Sychev Dmitry A., DM, Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Therapy, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation.

Yakhin Kausar K., DM, Professor, Head of the Department of Psychiatry and Narcology, Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation.

Neznanov Nikolay G., DM, Professor, Director of the V.M. Bekhterev National Medical Research Centre for Psychiatry and Neurology, St.-Petersburg, Russian Federation.

(✉) **Nasyrova Regina F.**, e-mail: reginaf@bekhterev.ru.

УДК 577.121:616-018.7-092.18

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-42-60

Для цитирования: Пономарчук О.О., Максимов Г.В., Орлов С.Н. Регуляция объема клеток эпителия в норме и при патологии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 42–60.

Регуляция объема клеток эпителия в норме и при патологии

Пономарчук О.О.^{1,2}, Максимов Г.В.¹, Орлов С.Н.¹

¹ *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Россия, 119991, г. Москва, Ленинские Горы, 1/12*

² *Научно-исследовательский центр Монреальского университета
Канада, H2X 0A9, г. Монреаль, ул. Сент-Дени, 900*

РЕЗЮМЕ

Способность регулировать объем в ответ на изменения внутриклеточной и внеклеточной осмолярности среды является одной из фундаментальных функций клеток. Изменения клеточного объема приводят к запуску множества внутриклеточных сигнальных каскадов, активирующих защитные и адаптивные механизмы. Как правило, регулирование объема происходит за счет транспорта осмолитов, результатом которого является восстановление объема внутриклеточной воды и нормализация клеточных функций. В данном обзоре показано физиологическое значение процессов регуляторного уменьшения объема и регуляторного увеличения объема в ответ на флуктуации вне- и внутриклеточной осмолярности на примере эпителиальных клеток.

Ключевые слова: регуляция объема, эпителиальные клетки, пролиферация, миграция, канцерогенез.

ВВЕДЕНИЕ

Клетки животных характеризуются отсутствием нерастяжимой клеточной стенки (как, например, клетки растений или бактерий) и высокой проницаемостью плазматической мембраны для воды. Неравномерное распределение осмолитов или изменения внеклеточной тоничности создают осмотический градиент на плазматической мембране, согласно которому происходит движение воды, приводящее к набуханию или сжатию клетки. В этой связи клетки животных выработали способность адаптироваться к изменениям объема за счет систем его регуляторного восстановления, механизм которых, а также их физиологическое и патофизиологическое значение в данном обзоре будут изложены на примере клеток эпителиального происхождения. Выбор объекта настоящего обзора обусловлен тем, что

процессы всасывания и выделения ионов и осмотически связанной воды как основные физиологические функции эпителия напрямую связаны с процессом изменения объема клетки. Кроме того, именно клетки эпителия подвержены изменениям осмолярности внеклеточной жидкости, приводящим к изменению их объема.

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯТОРНОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ ОБЪЕМА

Так как мембрана клетки непроницаема для большинства органических молекул, но проницаема для ионов и воды, между внеклеточной и внутриклеточной средой создается значительная осмотическая сила, движущая поток воды в клетку. В стационарных условиях накопление воды компенсируется за счет выведения неорганических ионов (в основном Na^+ и Cl^- , рис. 1, *b*) [1]. Na^+/K^+ -АТФаза откачивает три иона натрия (Na^+) в обмен на два иона калия (K^+). Такое распределение ионов натрия и калия, а также высо-

✉ Орлов Сергей Николаевич, e-mail: sergeiorlov@yandex.ru.

кая проницаемость мембраны для K^+ определяют отрицательный потенциал на мембране, движущий Cl^- вне клетки, что также компенсирует наличие отрицательно заряженных органических молекул внутри клетки. В результате вышеописанных процессов создается асимметричное распределение органических и неорганических ионов на мембране, что получило название «равновесие Гиббса – Доннана» [2, 3].

Так, например, в эпителиальных клетках легкого второго типа (АТII) $NaCl$ поступает в клет-

ку за счет Na^+/H^+ - и Cl^-/HCO_3^- -обменников, расположенных на базальной мембране, а также через Na^+ - и Cl^- -каналы, локализованные на апикальной мембране [4]. Ионы натрия выводятся Na^+/K^+ -АТФазой [5, 6], в то время как K^+ и Cl^- выходят через каналы, расположенные на базальной мембране, при этом ионы калия возвращаются обратно в клетку Na^+/K^+ -насосом (рис. 2). Таким образом, вход вышеупомянутых ионов уравновешен с их выходом, что поддерживает систему в стационарном состоянии.

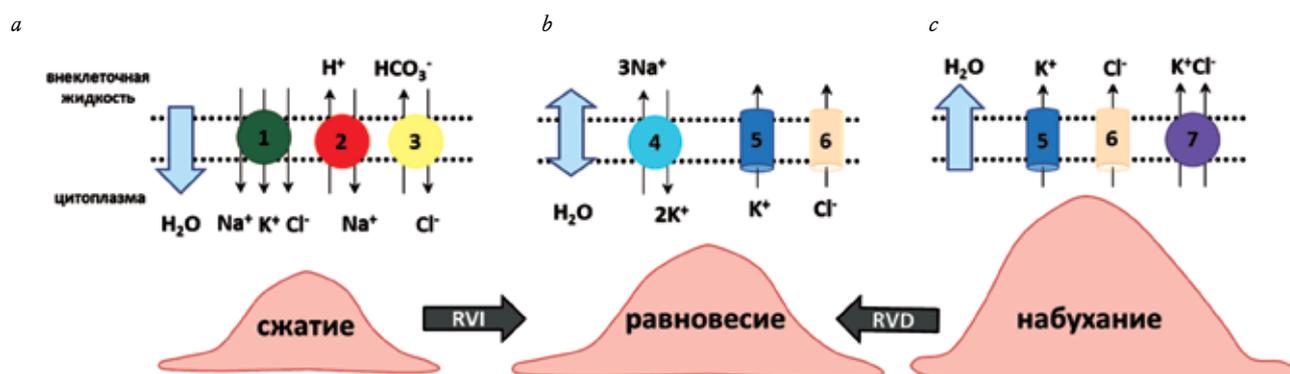


Рис. 1. Ион-транспортные системы, участвующие в регуляции объема клеток: *a* – регуляторное увеличение объема (RVI); *b* – стационарное состояние; *c* – регуляторное уменьшение объема (RVD). 1 – Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ -котранспортер, 2 – Na^+ , H^+ -обменник, 3 – анионный обменник (АЕ), 4 – Na^+ , K^+ -АТФаза, 5 – K^+ -каналы, 6 – Cl^- -каналы, 7 – K^+ , Cl^- -котранспорт. Схема адаптирована из [183]

Fig. 1. Ion transport systems involved in the regulation of cell volume: *a* – regulatory increase in volume (RVI); *b* – stationary state; *c* – in regulatory volume reduction (RVD). 1 – Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ -cotransporter, 2 – Na^+ , H^+ -exchanger, 3 – anion exchanger (AE), 4 – Na^+ , K^+ -ATPase, 5 – K^+ channels, 6 – Cl^- channels, 7 – K^+ + Cl^- -cotransport. The circuit is adapted from [183]

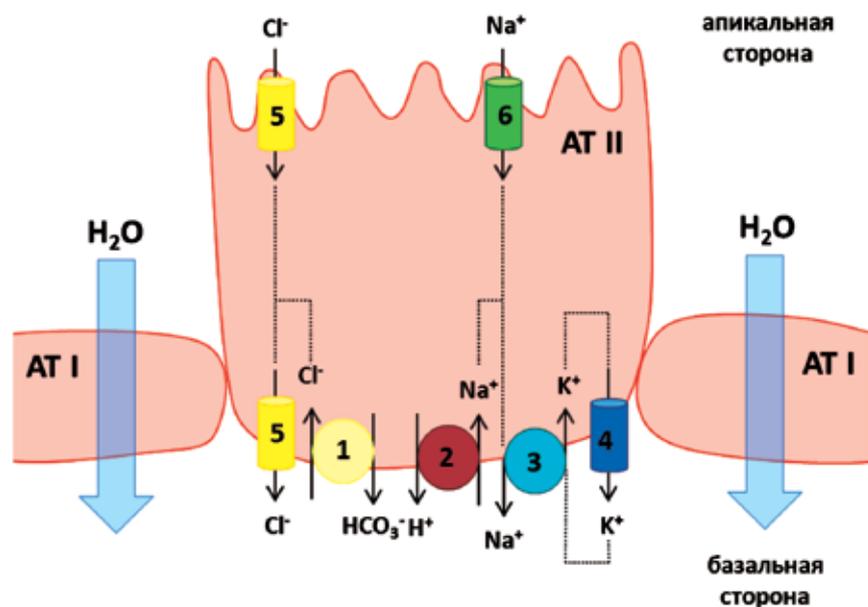


Рис. 2. Регуляция объема альвеолярными клетками второго типа АТII в стационарных условиях. Схема построена согласно [4]. 1 – анионный обменник (АЕ), 2 – Na^+ , H^+ -обменник, 3 – Na^+ , K^+ -АТФаза, 4 – K^+ -каналы, 5 – Cl^- -каналы, 6 – Na^+ -каналы (ENaC)

Fig. 2. Volume regulation by alveolar cells of the second type АТII in stationary conditions. The circuit was constructed according to [4]. 1 – Anion exchanger (AE), 2 – Na^+ , H^+ -exchange, 3 – Na^+ , K^+ -ATPase, 4 – K^+ -channels, 5 – Cl^- -channels, 6 – Na^+ -channels (ENaC)

В нестационарных условиях клетки способны противостоять изменениям объема за счет системы его регуляторного восстановления. Механизм регуляции объема включает сенсор клеточного объема, запускающий внутриклеточные системы сигнализации, которые активируют мембранные транспортеры, осуществляющие поглощение или высвобождение осмотически активных веществ в ответ на сжатие или набухание. При увеличении объема клетки компенсируют изменения объема посредством выброса осмолитиков в процессе, называемом «регуляторное уменьшение объема» (regulatory volume decrease, RVD) [7]. В ответ на сжатие клетки восстанавливают объем за счет накопления осмолитиков – процесс, называемый «регуляторное увеличение объема» (regulatory volume increase, RVI) [7].

Регуляторное уменьшение объема (RVD). Гипотонические условия приводят к набуханию и последующему RVD в эпителиальных клетках кишечника [8], бронхов [9], трахеи [10], роговицы [11], эпителиальных клетках линии Calu-3 [12]. В большинстве эпителиальных клеток RVD осуществляется путем одновременной активации калиевых и анионных каналов (рис. 1, *с*), ионные токи которых связаны между собой мембранным потенциалом. Отток K^+ приводит к гиперполяризации мембраны, что увеличивает движущую силу для выхода ионов хлора [13]. В противоположность этому выход ионов хлора приводит к деполяризации мембраны, что в свою очередь усиливает отток ионов калия. Результатом вышеописанного является электронейтральный выход KCl и осмотически связанной воды.

Электрофизиологическое описание объем-чувствительного тока хлора впервые было предпринято на клетках кишечника линии 407 [14]. Впоследствии опосредующие этот ток объем-чувствительные анионные каналы (volume-regulated anion channel, VRAC) были найдены во всех изученных клетках [13, 15]. В клетках воздухоносного эпителия отток ионов хлора в процессе RVD может осуществляться через потенциал-зависимые хлорные каналы (chloride channels, ClC) [16]. Есть данные о том, что Ca^{2+} -активируемые Cl^- -каналы аноктамин-1 (anoctamin-1, Ano 1; также называемые transmembrane member 16A, TMEM16A) участвуют в процессе RVD после стимуляции клеток гипотоническим шоком [15, 17]. Результаты исследований при муковисцидозе о вовлечении в регуляцию объема клеток эпителия регулятора трансмембранной проводимости (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR), осуществляющего

высвобождение ионов хлора, противоречивы. В пользу этого свидетельствуют результаты экспериментов на клетках линии Calu-3 (характеризующиеся большим количеством CFTR), в которых показано, что фармакологическое ингибирование CFTR значительно уменьшало способность клеток восстанавливать объем в ответ на гипотоническое набухание [12]. Последние эксперименты на клетках линии Calu-3, клетках линии СНО и на изолированных из двенадцатиперстной кишки криптах поддерживают необходимость активности CFTR-канала во время RVD [18].

Известно также несколько видов K^+ -каналов, участвующих в процессах RVD. Так, например, показано участие потенциал-зависимых K^+ -каналов KCNQ1 в RVD эпителиальных клеток молочной железы линии MCF-7 [19] и гепатоцитов крысы [20]. Фармакологические эксперименты показывают ключевую роль потенциал-активируемых K^+ -каналов Kv4.1 и (или) Kv4.3 в RVD клеток Calu-3 [12]. Установлено также, что Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы большой K_{Ca} 1.1 и средней K_{Ca} 3.1 проводимости (big potassium, BK, и intermediate potassium, IK, соответственно) тоже участвуют в восстановлении объема этих клеток [12]. Восстановление объема в гипотонической среде путем активации каналов BK и IK было показано в эпителиальных клетках бронхов и трахеи [9, 10]. Активирование BK продемонстрировано при набухании клеток проксимального извитого канальца и толстого сегмента восходящей части петли Генле [21], в то время как вовлечение IK отмечено в эпителиальных клетках почек линии A6 [22], клетках кишечника линии 407 [23] и эпителия человеческого хрусталика [24]. Результаты исследований R. Roman et al. [25] предполагают, что Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы низкой проводимости (small potassium, SK) активируются в ответ на увеличение объема и участвуют в RVD эпителиальных клеток печени человека.

Электронейтральный котранспорт K^+ и Cl^- (KCC) также может быть задействован в процессе RVD в ряде эпителиальных клеток, имеющих достаточно высокую концентрацию Cl^- и направленный наружу электрохимический градиент K^+ и Cl^- [1]. Изоформы данного котранспортера широко экспрессированы в различных типах клеток [26, 27], и, как правило, активируются набуханием [28, 29]. Установлено, что активность $KCC1$ является необходимым условием для регуляции объема эпителиальных клеток роговицы человека [30]. Изоформы $KCC3$ и $KCC4$ обнаружены в базальной мембране клеток эпителия почечных канальцев и их роль в RVD не установлена.

Если внутриклеточная концентрация хлора является низкой, то активация анионных каналов низкой селективности в ответ на набухание клеток сопровождается высвобождением органических анионов [31, 32]. Так, например, при набухании клеток эпителиального рака легкого человека линии A 549 был показан транспорт таких органических осмолитов, как таурин и α -(метиламино)изомасляная кислота, осуществляемый VRAC [33].

Регуляторное увеличение объема (RVI). Быстрые процессы RVI осуществляются, как правило, за счет накопления Na^+ и Cl^- [3]. В большинстве клеток RVI опосредован активацией котранспортера Na^+ , K^+ , 2Cl^- (NKCC) и (или) Na^+/H^+ -обменника (NHE) (рис. 1, а) [13]. Обусловленная работой данных транспортеров увеличенная проницаемость для Na^+ , как следствие, стимулирует Na^+/K^+ -АТФазу [13]. NKCC осуществляет электронейтральный котранспорт ионов (1 Na^+ , 1 K^+ и 2 Cl^-), нетто-поток которых направлен в клетку. У млекопитающих известно две изоформы котранспортера (NKCC1 и NKCC2), при этом обе они активируются сжатием клетки [34]. Отметим, что в некоторых типах клеток активация изоформы NKCC1 (также известной как SLC12A2) гипертоническим сжатием не сопровождается RVI предположительно в связи с отсутствием направленного в клетку градиента ионов Na^+ , K^+ , 2Cl^- [1]. Примером могут быть клетки линии Calu-3, помещение которых в гипертонические условия приводило к сжатию, но не характеризовалось компенсаторным восстановлением их объема [12]. Изоформа NKCC2 (SLC12A1) в основном экспрессирована в клетках толстого сегмента восходящей части петли Генле в почках, где располагается на апикальной мембране и опосредует реабсорбцию ионов [35]. Ее роль в регуляции объема клеток эпителия остается малоизученной.

Как упоминалось ранее, другая транспортная система, участвующая в RVI, – Na^+/H^+ -обменник. Стимуляция NHE приводит к закислению внутриклеточной среды, что активирует анионный обмен $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, как правило опосредованный изоформой обменника AE2 (SLC4A2) [13]. Результатом спаренной работы данных обменников является накопление NaCl и выведение H_2CO_3 [3, 36]. Снаружи клетки H_2CO_3 превращается в CO_2 , который посредством диффузии возвращается в клетку и пополняет резерв H^+ и HCO_3^- . Существует около десятка изоформ NHE, образующих семейство SLC9A [7]. Учитывая повсеместную распространенность и ярко выраженную активацию

сжатием, универсальная изоформа NHE1 выполняет, как правило, главную роль в процессе RVI в большинстве клеток. Изоформы NHE2 и NHE4 могут также вносить вклад в процесс RVI, что играет особенную роль в тканях, подверженных воздействию внеклеточной среды с высокой осмолярностью, как например мозговое вещество почек [37, 38]. В противоположность NHE1, -2, и -4, NHE3 ингибируется сжатием в большинстве эпителиальных клеток [39, 40]. Активация набуханием этой изоформы была показана в большинстве клеток, включая клетки толстого сегмента восходящего отдела петли Генле [39] и клетки эпителия собаки линии MDCK [41]. Однако есть данные, указывающие на то, что чувствительность изоформы NHE3 к изменениям объема может зависеть от типа клеток [7]. Как правило, NHE1 и NKCC1 коэкспрессированы и оба переносчика вносят вклад в RVI [42].

Отметим, что в некоторых клетках NKCC1 отсутствует, и RVI осуществляется за счет NHE1 параллельно с анионным обменником [43], в то время как в других клетках NHE1 может быть минимально экспрессирован или отсутствовать вовсе, и NKCC1 является единственным переносчиком, осуществляющим RVI [43].

ФАКТОРЫ, ПРИВОДЯЩИЕ К ИЗМЕНЕНИЯМ ОБЪЕМА

В физиологических условиях клетки животных точно регулируют осмолярность внеклеточной среды (около 285 мосм/кг H_2O), поэтому большинство клеток животных не подвергается значительным осмотическим градиентам [7]. Тем не менее некоторые типы клеток все-таки подвержены изменениям внеклеточной осмолярности. Например, анизоосмотическим условиям подвержены эпителиальные клетки кишечника в процессе абсорбции [44]. Клетки мозгового вещества почек претерпевают резкие изменения осмолярности внеклеточной жидкости в процессе антидиуреза [45]. Клетки эпителия легкого могут быть подвержены внеклеточным изменениям осмолярности вследствие утопления в пресной или морской воде [46], учитывая, что пресная вода является гипотонической средой в сравнении с плазмой крови (20 мосм/кг H_2O), а морская вода – гипертонической (1 000 мосм/кг H_2O) [47].

В действительности клетки более часто подвержены изменениям во внутриклеточной осмолярности, чем внеклеточной. Причинами изменения внутриклеточной осмолярности могут быть несбалансированный транспорт ионов и органических

осмолитов через мембрану или сдвиги во внутриклеточном балансе между высокомолекулярными полимерами и их осмотически активными низкомолекулярными прекурсорами и метаболитами [1]. Например, клетки регулируют объем в процессе трансэпителиального транспорта, накопления питательных веществ и продуктов распада, или в результате нейрональной, гормональной или аутокринной активации объем-чувствительных ионных транспортеров и каналов [48].

Изменения объема могут происходить также при ряде патологических состояний. Например, набухание происходит при гипонатриемии, что случается в случае нарушения гормональной и почечной функций; при гипотермии, приводящей к ингибированию Na^+/K^+ -АТФазы; при увеличении внутриклеточной концентрации калия; при внутриклеточном ацидозе или диабетическом кетоацидозе [7]. Напротив, сжатие происходит при гипернатриемии, при сниженной внутриклеточной концентрации калия, гипергликемии и алкалозе [7].

Как правило, при патологии анизоосмотические условия развиваются медленно [7], что дает возможность клетке адаптироваться к новым условиям за счет системы регуляторного восстановления объема. Длительная подверженность анизоосмотическим условиям способствует изменению в клетках уровня экспрессии белков, являющихся объем-чувствительными транспортерами, и ферментов, вовлеченных в процесс синтеза и (или) деградации органических осмолитиков [49]. Например, органические осмолитики играют особенно важную роль в мозговом веществе почек [50], где внеклеточная осмолярность может увеличиваться в 4–5 раз по сравнению с изотоническими условиями [51].

ЗНАЧЕНИЕ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Одной из основных функций эпителия является транспорт ионов, питательных веществ, жидкости в процессе секреции или абсорбции, что тесно связано с изменениями объема клеток. Трансэпителиальный транспорт и регулирование объема осуществляются за счет скоординированной работы ионных транспортеров [52]. Так как задействованные в регуляции объема транспортные системы могут участвовать в нескольких физиологических процессах, регуляция объема клетки сложным образом связана с другими клеточными функциями [13]. Изменение объема оказывает влияние на целый ряд реакций клетки, включая пролиферацию, дифференцировку,

смерть и миграцию клеток как в норме, так и при патологии [48]. Изменения объема влияют на частоту биения ресничек в клетках бронхов [53], секрецию сурфактанта и абсорбцию Na^+ в альвеолярных клетках [4]. В данном обзоре рассмотрены лишь некоторые примеры, актуальные в контексте эпителиальной ткани.

Трансэпителиальный транспорт. Как упоминалось выше, характерной особенностью эпителиальной ткани является постоянный транспорт ионов, питательных веществ и жидкости. Вход или выход осмотически активных веществ в процессе эпителиального транспорта приводит к изменениям объема клеток, что обычно компенсируется регуляторной системой восстановления объема [13]. При этом изменения объема эпителиальных клеток могут быть полностью скомпенсированы системами RVI и RVD и быть неотъемлемой частью эпителиальной функции [7]. Так, например, известно, что изменения объема задействованы в процессе сопряжения транспорта ионов и жидкости через базолатеральную и апикальную мембраны эпителиальной клетки [54]. Следует отметить, что объем не является единственным фактором в данном процессе [55] и в нем принимают участие такие параметры, как pHi и $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [56].

Известно, что в процессах эпителиального транспорта задействованы транспортные системы, участвующие в регуляции объема, – NHE1, NKCC1, катионные каналы семейства transient receptor potential vanilloid (TRPV), а также анионные каналы VRAC, K^+ -каналы KCNQ1 , $\text{K}_{2\text{P}}$, BK и IK [7].

Во всасывающем эпителии транспорт ионов, как правило, осуществляется за счет апикально расположенных каналов и транспортеров, использующих градиент натрия для транспорта солей и питательных веществ, результатом чего является набухание клетки [48]. Предполагается, что изоосмотический транспорт и восстановление объема происходят за счет активации базолатерально расположенных калиевых каналов, VRAC и Na^+ , K^+ -АТФазы, что приводит к выходу ионов и осмотически связанной воды [57]. Например, в эпителиальных клетках проксимального извитого канальца почек и желчного пузыря на апикальной мембране происходит поглощение Na^+ , сопряженного с субстратом, в роли которого может быть глюкоза или аминокислота, что приводит к набуханию клеток и последующей активации базолатерально расположенных K^+ -каналов (рис. 3, а) [58, 59]. Активация K^+ -каналов в свою очередь препятствует

набуханию клеток и поддерживает тем самым электродвижущую силу для поглощения указанных выше соединений. Другим примером могут быть эпителиальные клетки толстой кишки, где поглощение натрия через апикально расположенные Na^+ -каналы скоординировано с работой базолатерально расположенных Na^+ , K^+ -АТФазы и K^+ -каналов [60].

Секреторные клетки испытывают значительные изменения объема, так как выбрасывают содержимое гранул и большое количество внутриклеточных осмолитиков [12]. Например, серозные клетки подслизистых желез воздухоносных путей ответственны за секрецию ионов и воды, муцинов, антимикробных пептидов в люмен железы, что поддерживает стерильность среды в легком [61]. Секреция экзокринными железами опосредована открытием Cl^- - и K^+ -каналов, результатом чего является уменьшение внутриклеточной концентрации Cl^- и объема, что в свою очередь стимулирует активность NKCC1 и NHE1 [62, 63]. В темных вестибулярных клетках (dark vestibular cells) (рис. 3, *b*) секреция K^+ осуществляется за счет базолатерально расположенных NKCC и Na^+ , K^+ -АТФазы, Cl^- -каналов, а также апикально локализованных потенциал-зависимых K^+ -каналов KCNE1 [64]. Увеличение котранспорта NKCC приводит к набуханию клетки, что в свою очередь активирует апикально расположенные K^+ -каналы, в то же время увеличенная активность K^+ -каналов стимулирует NKCC , результатом чего является сопряжение транспорта на двух противоположных мембранах эпителиальной клетки [3]. Следует указать, что некоторые клетки секреторного эпителия (поджелудочной железы, слюнных желез, прямой кишки, желудка) не могут полностью восстанавливать свой объем в процессе секреции [52]. Например, стимуляция секреции приводит к уменьшению объема клеток ацинусов околоушной слюнной железы более чем на 20%, при этом клетки остаются в сжатом состоянии до момента окончания секреторного воздействия [65].

Участие объем-чувствительных транспортных систем было отмечено в процессе адаптации всасывающего или экскретирующего соль эпителия к большим изменениям внеклеточной осмолярности. Например, в поглощающем NaCl эпителии толстого сегмента восходящей части петли Генле (рис. 3, *c*) вход NaCl сопровождается работой люминально расположенного NKCC2 , базолатерально расположенных Cl^- -каналов и Na^+ , K^+ -АТФазы, а также апикально и базолатерально локализованных K^+ -каналов [66].

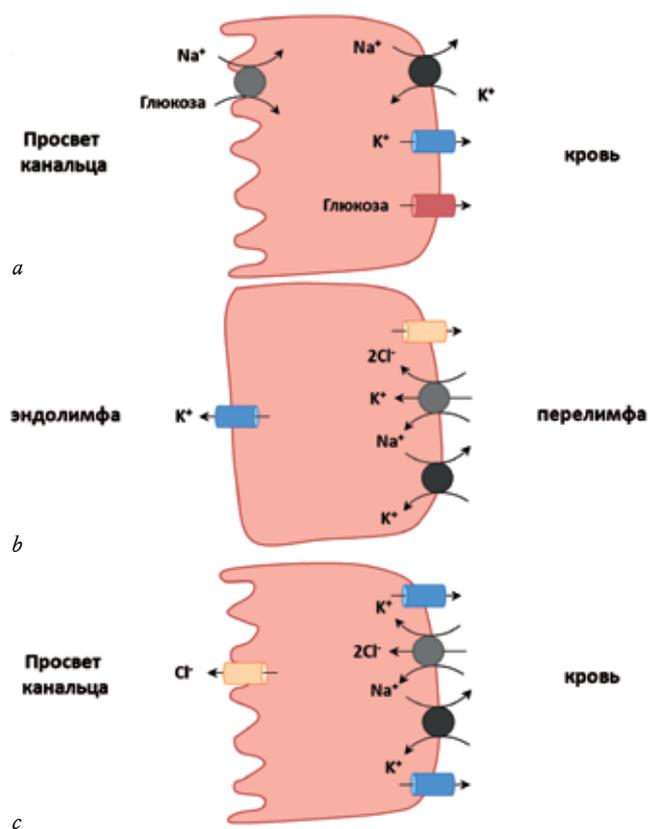


Рис. 3. Вовлечение объема в процесс сопряжения транспорта ионов и жидкости на апикальной и базолатеральной мембранах: *a* – в эпителиальных клетках проксимального канальца нефрона спаренный транспорт натрия и субстрата (в роли которого может быть, например, глюкоза или аминокислота) на апикальной мембране приводит к увеличению объема, что активирует базолатерально расположенные K^+ -каналы; *b* – в темных вестибулярных клетках ушной улитки поглощение ионов Na^+ , K^+ , Cl^- за счет базолатерально расположенного NKCC котранспортера приводит к набуханию и последующей активации люминальных K^+ -каналов; *c* – в секретирующих клетках канальца нефрона стимуляция апикально расположенных Cl^- -каналов приводит к потере ионов хлора и ионов калия как следствие деполяризации. Результатом вышеописанного является сжатие, что стимулирует базолатерально расположенные NKCC -котранспортеры. Изображения заимствованы из [3] и модифицированы

Fig. 3. Involvement of the volume in the process of ion conjugation and liquid transport on the apical and basolateral membranes: *a* – in the epithelial cells of the nephron proximal tubule, the paired sodium transport and the substrate (for example, glucose or amino acid) on the apical membrane leads to an increase in volume, which activates the basolaterally located K^+ -channels; *b* – in the dark vestibular cells of the ear snail, the uptake of Na^+ , K^+ , Cl^- ions due to the basolateral located NKCC cotransporter results in swelling and subsequent activation of the luminal K^+ – channels; *c* – in the secreting cells of the nephron tubule, stimulation of apical Cl^- channels leads to the loss of chloride ions and potassium ions, as a result of depolarization. The result of the above described is compression, which stimulates the basolaterally located NKCC cotransporter. Images are borrowed from [3] and modified

Изменения объема могут быть задействованы также в процессе изоосмотического транспорта, при котором эпителий сохраняет изоосмотичность транспортируемой жидкости по отношению к внеклеточным растворам [7]. Объяснение данному явлению было предложено Н. Ussing и К. Eskesen и заключалось в том, что регулируемый кругооборот активно выбрасываемого иона натрия контролирует тоничность транспортируемой жидкости [67]. Позже Н. Ussing дополнил эту гипотезу, объясняя изоосмотичность транспортируемой жидкости следующим образом: «рециркулирование натрия регулируется осмолярностью секетируемой жидкости за счет действия на объем клетки и, как следствие, на объем-чувствительные транспортеры и каналы натрия» [68]. Чрезмерная гипотоничность секетируемой жидкости приводит к набуханию клетки и сниженной рециркуляции натрия, в результате чего секреция NaCl повышается и, как следствие, увеличивается тоничность секетируемой жидкости. Чрезмерная гипертоничность секетируемой жидкости приводит к сжатию клетки, что активирует транспорт Na^+ и увеличивает его рециркуляцию. В результате снижается секреция NaCl, что понижает тоничность секетируемой жидкости. Эта теория впоследствии получила название «круговорот натрия» [69–71].

Результатом изменений объема может быть также стимуляция транспорта осмолитиков [72]. Например, в клетках печени набухание стимулирует трансэпителиальный перенос таурохолатов и лейкотриенов [73, 74]. В почечных клетках гиперосмолярность стимулирует транспорт мочевины [75] в клетках эпителия собирательных трубочек почечного канальца [76] и клетках подчелюстной слюнной железы [77] ингибирует транспорт NaCl. Предполагается, что гипотонические условия стимулируют секрецию гуморального фактора в легочном эпителии, что приводит к расширению бронхов [78].

Пролиферация клеток. Процесс пролиферации характеризуется увеличением размера родительской клетки, результатом которого являются деление и образование двух дочерних клеток [7]. Изменение клеточного объема считается необходимым фактором в продвижении клетки по клеточному циклу [79], что подкрепляется следующими фактами. Во-первых, на различных типах клеток показано, что пролиферация коррелирует с увеличением объема клетки [80, 81]. Во-вторых, множество митогенных факторов активируют NHE и стимулируют НКСС [82], что приводит к увеличению объема клеток [83, 84]. В третьих,

отмечено, что изменения объема, вызванные анизоосмотическими условиями, могут оказывать действие на пролиферацию клеток [79]. Как правило, пролиферация клеток стимулируется набуханием [85, 86] и ингибируется сжатием [87, 88]. Например, сжатие клеток мозгового вещества почек приводило к увеличению количества клеток, находящихся в фазах S и G_2/M клеточного цикла [89]. В клетках асцитной карциномы Эрлиха (ELA) поглощение воды и набухание наблюдались во время S-фазы [90]. Изменения объема на протяжении клеточного цикла также отмечены в клетках линии CNE-2Z [7], где клетки имели наибольший объем в течении M-фазы и наименьший во время G_1 -фазы.

Известно, что концентрация внутриклеточного кальция $[\text{Ca}^{2+}]_i$ варьирует на протяжении клеточного цикла [91]. Есть предположение, что катионные каналы TRPC1 определяют приток кальция, RVD и продвижение по клеточному циклу. Осцилляции $[\text{Ca}^{2+}]_i$ могут активировать НКСС1 и NHE1, что приводит к увеличению объема и стимулирует пролиферацию клеток [88]. С другой стороны, изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ оказывают влияние на Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы, активация которых приводит к сжатию клеток [92]. Эти и множество других типов K^+ -каналов вовлечены в регуляцию пролиферации [81, 93] и продвижения по клеточному циклу [94]. Увеличенная активность K^+ -каналов характерна для карцином эпителиального происхождения [93, 95], где особая роль отводится двупоровым K^+ -каналам K_{2p} [96]. На примере раковых клеток простаты показано, что увеличенная экспрессия канала $\text{K}_{2p.2.1}$ (TREK-1), являющегося представителем семейства двупоровых каналов, связана с нарушениями пролиферации клеток [97]. Есть данные, что активация потенциал-зависимых K^+ -каналов (KV10.1) является необходимой для продвижения клеточного цикла [98]. Помимо потенциал-зависимых K^+ -каналов [99] в процесс пролиферации в клетках аденокарциномы поджелудочной железы вовлечены Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы средней проводимости [100]. Cl^- -каналы также часто вовлечены в регуляцию пролиферации. Так, установлено, что блокаторы хлорных каналов ингибируют пролиферацию клеток назофарингеальной карциномы (рак носоглотки) [101] и клеток Эрлиха [90]. Известно, что экспрессия каналов VRAC [90, 102] и CIC-3 [103] зависит от стадии клеточного цикла (Wang, Chen et al., 2004). В раковых клетках носоглотки активность VRAC-каналов играет ключевую роль при прохождении клеток через точку рестрикции в G_1 -фазе клеточного цикла [101].

Вовлечение в процесс пролиферации Ca^{2+} -активируемых Cl^- -каналов ANO1/TMEM16A, а также увеличенная экспрессия этих каналов были показаны на клетках карциномы простаты человека [104], клетках плоскоклеточного рака головы и шеи [105], клетках рака молочной железы [106]. Учитывая высокую пролиферативность эпителиальных клеток, изучение специфичных блокаторов K^+ - и Cl^- -каналов может быть полезным при поиске новых лекарственных средств лечения рака [52, 107].

Миграция клеток. Миграция эпителиальных клеток может иметь как физиологическое, так и патологическое значение. Миграция клеток является одним из первых событий в процессе восстановления целостности эпителиальной ткани при заживлении ран, например на слизистой желудочно-кишечного тракта [108, 109]. Миграция опухолевых клеток является одним из определяющих шагов в метастатическом каскаде, который влечет распространение опухоли по всему орга-

низму [110, 111].

Миграция клеток представляет собой повторяющийся цикл выпячивания ламеллоподий и втягивания задней части клетки, результатом чего является продвижение клетки вперед [112]. На ведущем конце мигрирующей клетки преобладает полимеризация актиновых филаментов, а на заднем конце актиновые филаменты деполимеризуются [113, 114]. Сообщается, что в процесс миграции вовлечены объем-регулируемые транспортеры и каналы (рис. 4) [115]. Известно также, что осмотический стресс влияет на процессы миграции клеток. Так, например, гипотонически стимулированное набухание и гипертонически вызванное сжатие приводят к ингибированию миграции трансформированных клеток эпителия почек [116]. Предполагается, что процесс миграции основан на взаимозависимых процессах перестройки цитоскелета, а также увеличения активности объем-чувствительных транспортеров и каналов [117].

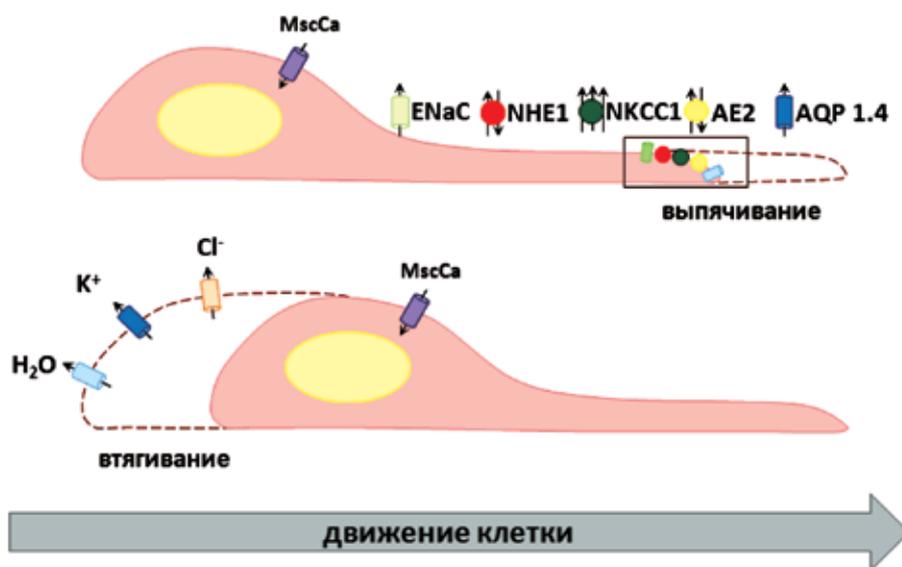


Рис. 4. Предполагаемая модель вовлечения изменения объема в процесс миграции клеток: миграция клеток может быть описана как изоосмотическое увеличение объема на переднем конце клетки и изоосмотическое уменьшение объема на заднем. Изображение модифицировано из [112]

Fig. 4. The proposed model of involving volume changes in the process of cell migration: cell migration can be described as an isosmotic increase in volume at the anterior end of the cell and an isoosmotic decrease in volume in the posterior end of the cell. The image was modified from [112]

Как правило, активируемые сжатием транспортеры располагаются на ведущем конце мигрирующей клетки, а активируемые набуханием каналы – на ведомом конце, в результате чего ведущий конец клетки набухает и ведомый сжимается, облегчая продвижение клетки (см. рис. 4) [112]. На различных типах клеток была установлена ведущая роль NHE1 в процессах миграции и хемотаксиса [118, 119]. Этот обмен-

ник, активируемый сжатием, располагается на ведущем конце мигрирующей клетки [120, 121]. Ингибирование NHE1 приводит к нарушению набухания клеток и подвижности, необходимых для миграции [122]. Котранспортер Na^+ , K^+ , 2Cl^- является одним из первых переносчиков, для которых была установлена роль в процессе миграции клеток. На клетках глиомы показано, что NKCC1 располагается на ведущем конце

клетки [123]. Ингибирование НКСС буметанидом предотвращало миграцию трансформированных эпителиальных клетках почек [124].

Как упоминалось выше, на ведомом конце происходит уменьшение объема за счет выхода K^+ и Cl^- . Действительно, в нескольких исследованиях было продемонстрировано, что для миграции клеток необходима активация объем-чувствительного хлорного тока [125, 126]. В поддержку этого свидетельствуют эксперименты, где использование блокаторов анионных каналов VRAC приводит к ингибированию миграции клеток карциномы носоглотки [127]. В некоторых мигрирующих раковых клетках отток Cl^- может осуществляться за счет котранспортера K^+ , Cl^- [128]. Как и в случае пролиферации, множество K^+ -каналов вовлечены в процессы миграции клеток [112]. Так, например, потенциал-активируемые калиевые каналы Kv1.1 задействованы при заживлении ран в эпителиальных клетках кишечника и желудка [129, 130]. На эпителиальных клетках почек и бронхов показано вовлечение в процесс миграции IK (K_{Ca} 3.1), которые также активируются при набухании клеток [116, 131]. Кроме того, в эпителиальных клетках толстой кишки экспрессия Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов SK (K_{Ca} 2.3) коррелирует с подвижностью клеток [132]. За последнее время достаточно быстро накопился материал, позволяющий утверждать, что катионные каналы семейства TRP также являются важным элементом в процессе миграции [112]. Так, например, TRPV1-каналы вовлечены в процесс миграции эпителиальных клеток роговицы [133]. Осмотически чувствительные каналы TRPV1 и TRPV4 ускоряют миграцию клеток гепатобластомы [134].

Одним из значительных достижений в данной области исследования является обнаружение участия водных каналов (аквапоринов) в процессах миграции клеток [135–137]. Это было показано для ряда клеток, включая клетки проксимального канальца почек [138], эпителиальные клетки роговицы [139], эпителиальные клетки желудка [140], кератоциты [141], клетки аденокарциномы легкого [142]. Несколько исследований показали сосредоточенность аквапоринов на ведущем конце мигрирующей клетки [138, 143]. По-видимому, аквапорины облегчают осмотический поток воды в выпячиваемой части мембраны, обеспечивая ее продвижение.

Таким образом, для успешного осуществления процесса миграции клетки необходима согласованная работа целого набора зависящих друг от друга транспортирующих систем, что получило название «транспорт» (transportome) [112]. Аквапорины,

Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы (K_{Ca} 3.1), обменник NHE1 найдены в большинстве мигрирующих клеток [112]. Другие же транспортные системы, как например протонные каналы [144], экспрессируются в зависимости от типа мигрирующей клетки.

Программируемая клеточная смерть. Как упоминалось ранее, в физиологических условиях в ответ на осмотические изменения клетки набухают или сжимаются, после чего следует регуляторное восстановление объема. В условиях патологии, когда регуляция объема нарушена, клетки претерпевают постоянное некомпенсированное RVD и RVI (сжатие или набухание), что демонстрирует начальные этапы апоптоза или некроза клетки соответственно [107, 145]. Считается, что апоптотическое уменьшение объема (AVD) осуществляется за счет потери KCl через калиевые и хлорные каналы [107, 145, 146]. В некоторых типах клеток сжатие может быть вторичным после увеличения $[Ca^{2+}]_i$ [147], что приводит к активации Ca^{2+} -зависимых каналов [148]. На клетках Эрлиха [149] и эндотелиальных клетках линии ECV304 [150] было показано вовлечение в AVD анионных каналов VRAC. В клетках аденокарциномы человека линии KB добавление запускающего апоптоз цисплатина вызывало стимуляцию токов, опосредованных VRAC [151]. Огромное разнообразие K^+ -каналов участвует в AVD: потенциал-зависимые K^+ -каналы, BK, IK, K2P [146, 152].

В ряде случаев AVD предшествует высвобождению цитохрома c, активации каспаз и фрагментации ДНК [153]. Данный факт привел к предположению, что раннее сжатие участвует в запуске механизмов клеточной смерти (рис. 5) [154].

Эта гипотеза подтверждается результатами исследований, в которых длительное сжатие в гипертонических условиях приводило к смерти альвеолярных клеток II типа крысы [155], клеток HeLa [156], мозгового вещества почек [89], эпителия проксимального извитого канальца почек [157] и карциномы Эрлиха [158]. В гепатоцитах гипертонические условия вызывали перемещение рецептора смерти CD95 на плазматическую мембрану [159]. Предполагается существование трех механизмов проведения сигнала, связывающего сжатие клетки и апоптоз [145]. В первом случае сжатие клетки активирует ГТФ-связывающий белок Rac и сигнальный путь, задействующий митоген-активируемые протеинкиназы MAPK p38, что влечет за собой фосфорилирование транскрипционного фактора p53 и его перенос в ядро, конечным результатом чего является активация каспазы 3 [160]. Во втором случае сжатие,

вызванное гипертоническими условиями, блокирует активацию рецептора фактора роста тромбоцитов PDGF_{ββ} и зависимую от него активацию протеинкиназ MEKS-ERKS и протеинкиназы B (Akt/ПКВ), что приводит к снижению выживаемости клеток [161]. Третий случай предполагает,

что гиперосмотическое сжатие стимулирует перемещение расположенного внутриклеточно рецептора смерти CD95 на плазматическую мембрану, что влечет активацию каспаз и повышает чувствительность клеток к CD95L-индуцированному апоптозу [159].

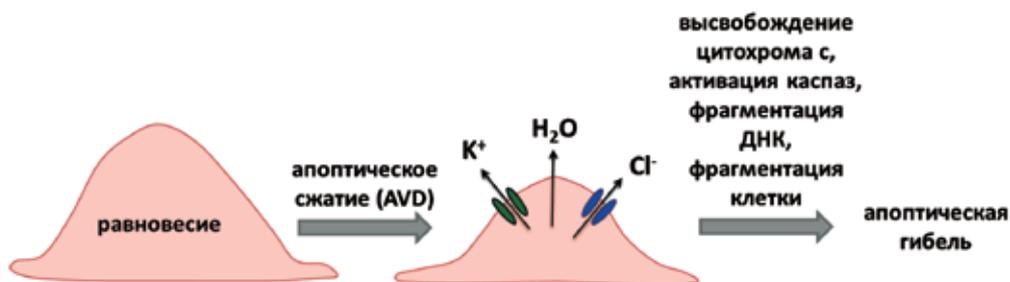


Рис. 5. Схема процессов, происходящих во время апоптоза [154]

Fig. 5. Processes occurring during apoptosis [154]

Нужно отметить наличие случаев, когда PCD может происходить без раннего AVD [162, 163]. Так, например, показано, что гипертоническое сжатие не оказывало влияния на жизнеспособность эпителиальных клеток почек MDCK [164] и клеток линий GH3 и HeLa [165]. Более того, на клетках гладкой мускулатуры, трансфицированных аденовирусом E1A (E1A-VSMC), были продемонстрированы разнонаправленные изменения объема при стимуляции индукторами апоптоза (применение стауроспорина и отсутствие факторов роста) [166]. Исследователи наблюдали увеличение объема клеток перед вызванной отсутствием ростовых факторов апоптотической смертью и сжатие клеток перед апоптозом, стимулированным стауроспорином. Подавление набухания ингибиторами апоптоза убаином (ингибитор Na⁺/K⁺-АТФазы) и форсколином (активатор аденилатциклазной системы сигнализации) при апоптозе, вызванном отсутствием факторов роста, привело к предположению, что не только сжатие, но и набухание могут быть вовлечены в запуск и процессы апоптоза [166]. Данная гипотеза была опровергнута в экспериментах, где гипоосмотическое набухание, изоосмотическое и гиперосмотическое сжатие клеток E1A-VSMC не вызывали характерных признаков апоптотической гибели (увеличение активности каспазы 3 и разрушение хроматина). Таким образом, результаты исследования показали, что сжатие не является универсальным маркером апоптоза [166].

Взаимосвязь между клеточной гибелью и предшествующими ей изменениями объема также изучалась на клетках эпителия почек *madin-darby canine kidney* (C11-MDCK) [167]. Применение ингибито-

ра Na⁺/K⁺-АТФазы убаина вызывало набухание клеток вследствие увеличения соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ и при длительном воздействии приводило к некрозу клеток C11-MDCK [167]. Сходное увеличение соотношения $[Na^+]_i/[K^+]_i$ наблюдалось при ингибировании Na⁺/K⁺-АТФазы безкальциевой средой, однако в этом случае проведенные манипуляции не влияли на выживаемость клеток почек [167]. Для того чтобы установить, являются ли изменения объема причиной разрыва мембраны, исследователи оценивали стимулированное гипотоническими условиями набухание клеток и содержание лактатдегидрогеназы (ЛДГ) во время набухания, выброс которой происходит при разрыве мембраны претерпевающих некроз клеток [167]. Результаты исследований утверждают, что разрушение плазматической мембраны в подвергнутых действию убаина C11-MDCK клетках не является прямым следствием набухания, стимулированного ингибированием Na⁺, K⁺-АТФазы [167].

Развитие карцином. Характерными чертами эпителиальной ткани являются ее высокая пролиферативная активность и необходимость постоянно регулировать объем, что создает высокий риск вовлечения этого типа клеток в развитие карцином [52]. Действительно, рак эпителиального происхождения составляет около 90% от общего числа злокачественных новообразований [168]. Особенно это характерно для секреторного эпителия различных типов тканей. Примеры включают рак простаты, молочной железы, прямой кишки, легких и бронхов, поджелудочной железы, желудка, матки [168]. В этой связи следует отметить, что в эпителиальных тканях наблюдается изменение уровня экспрессии объем-чув-

ствительных ионных транспортеров и каналов, что используется как маркер канцерогенеза [169].

В здоровом эпителии ионные транспортные системы располагаются в зависимости от их функционального назначения на апикальной или базолатеральной мембране, что создает полярность клеточного монослоя. При начальных стадиях развития рака эпителиальный слой теряет свою организацию, а именно, межклеточные контакты разрушаются, клетки теряют межклеточную адгезию и меняют полярность с апикально-базальной на передне-заднюю, присущую мигрирующим мезенхимальным клеткам (рис. 6). Такое явление известно в литературе как эпите-

лиально-мезенхимальный переход (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) и наиболее полно изучено на примерах аденокарциномы молочной и поджелудочной желез [170, 171]. На данный момент роль и регуляция полярно расположенных ион-транспортных систем во время EMT-перехода не изучена. Известно лишь, что некоторые апикально расположенные каналы и транспортеры перемещаются на задний конец клетки, а расположенные базолатерально перемещаются на передний ее конец [52], что типично для мигрирующих клеток [112]. Предполагается, что дисрегуляция ион-транспортующих систем может быть задействована в процессе EMT [52].

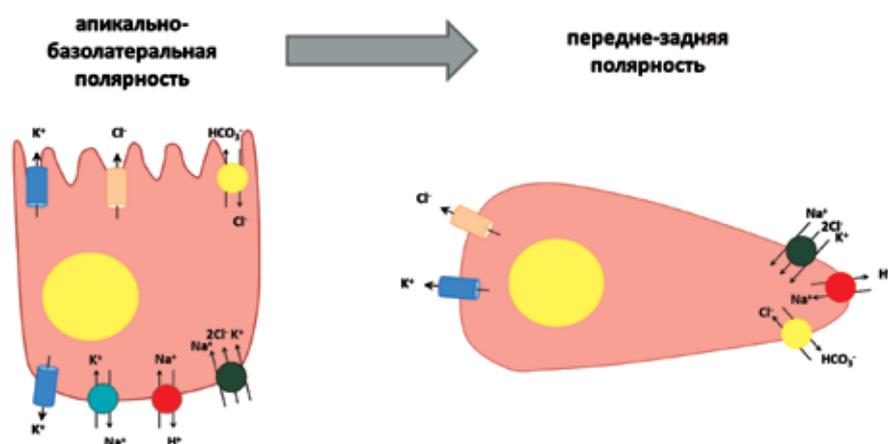


Рис. 6. Эпителиально-мезенхимальный переход, в результате которого клетка теряет апикально-базолатеральную полярность и приобретает передне-заднюю. Ранее апикально расположенные транспортеры перемещаются на задний конец клетки, а базолатеральные каналы – на передний конец клетки. Изображение модифицировано из [52]

Fig. 6. Epithelial-mesenchymal transition, as a result of which the cell loses apical-basolateral polarity and acquires an anterior-posterior one. Previously, the apically placed conveyors move to the posterior end of the cell, and the basolateral channels to the anterior end of the cell. The image was modified from [52]

Химиотерапия на основе проапоптотических соединений (например, цисплатин) – это стандартная процедура при лечении рака, однако ее эффективность строго ограничена развитием устойчивости к противораковому средству. Различные факторы вносят вклад в устойчивость раковых клеток к средствам специфической антибластомной терапии, например, снижение поглощения препарата, ускоренное выведение препарата из организма, удлинение репарации ДНК, нарушение сигнализации, приводящей к апоптозу [172]. S.F. Pedersen et al. [52] утверждают, что дисрегуляция экспрессии или доставки к мембране ион-транспортующих систем приводит к изменениям в регуляции объема и таким образом к увеличению пролиферации раковых клеток и их устойчивости к индукции апоптоза.

В норме клетки сопротивляются апоптотическому сжатию путем активации RVI [173]. В клетках

HeLa, претерпевающих апоптоз, продемонстрирован ослабленный RVI-ответ [174]. Таким образом, увеличенная экспрессия или функциональность ион-транспортных систем, вовлеченных в RVI (NKCC1, NHE1 и рассмотренные выше ионные каналы), может быть причиной развития устойчивости к апоптозу [52]. Клетки яичников китайского хомячка не имеют NHE1, поэтому для них не характерен RVI-ответ, что делает эти клетки более склонными к апоптозу по сравнению с клетками, экспрессирующими NHE1 [175]. На клетках HeLa было продемонстрировано, что гипертонически стимулируемые катионные каналы препятствуют апоптозу, вызванному стауроспорином [174]. При различных типах рака отмечают подавленную экспрессию потенциал-зависимых K^+ -каналов $K_v1.5$. При этом восстановление их экспрессии способствует апоптозу и ингибированию роста опухоли [176].

Уменьшение проницаемости для K^+ и Cl^- вносит вклад в развитие устойчивости к химиотерапии [52, 177]. Так, например, в раковых клетках желудка человека сниженная экспрессия $K_v1.5$ -каналов увеличивает устойчивость клеток к проапоптотическим веществам, в частности к цисплатину [178]. На линиях клеток рака легкого и гортани было показано, что увеличение проницаемости для калия с помощью калиевого ионофора амфотерицина В препятствует развитию устойчивости к цисплатину [179, 180]. Ингибирование объем-чувствительных двупоровых K^+ -каналов ($K_{2p}5.1$) клофилиумом в клетках Эрлиха нарушало апоптоз, стимулированный цисплатином [149].

Уменьшение хлорной проницаемости мембраны было отмечено также в нескольких клеточных моделях мультирезистентности к лекарственным препаратам [52]. Например, дисфункция объем-чувствительных хлорных каналов вносит вклад в развитие устойчивости к цисплатину в клетках аденокарциномы легкого человека [181]. Устойчивость к цисплатину и сниженная активность VRAC-каналов отмечались в мультирезистентной модели клеток Эрлиха и устойчивых к цисплатину клетках эпидермоидной карциномы [149, 182]. Более того, из экспериментов на клетках эпидермоидной карциномы, проведенных E.L. Lee et al. (2007), известно, что восстановление функциональной активности VRAC-каналов приводит к уменьшению устойчивости к цисплатину [182].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрены основные механизмы регуляции объема клеток и связанные с этим нарушения клеточного гомеостаза применительно к эпителиальной ткани. Показана взаимосвязь изменений объема с такими функциями эпителиальных клеток, как трансэпителиальный транспорт, обеспечивающий секрецию и абсорбцию солей и осмотически связанной воды, пролиферация, миграция и апоптоз. Проанализирована возможность вовлечения объем-чувствительных транспортных систем в развитие карциномы. Дальнейшие исследования в этом направлении приведут к созданию новых инструментов коррекции патологических процессов, ассоциированных с дисрегуляцией объема клеток.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и по-

тенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Mongin A.A. and Orlov S.N. Mechanisms of cell volume regulation and possible nature of the cell volume sensor // *Pathophysiology*. 2001; 8 (2): 77–88.
2. Macknight A.D. and Leaf A. Regulation of cellular volume in Membrane Physiology. Springer, 1987: 311–328.
3. Lang, F. et al. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms // *Physiological reviews*. 1998; 78 (1): 247–306.
4. Murao H. et al. Cell shrinkage evoked by Ca^{2+} -free solution in rat alveolar type II cells: Ca^{2+} regulation of Na^+-H^+ exchange // *Experimental physiology*. 2005; 90 (2): 203–213.
5. Hosoi K. et al. Terbutaline-induced triphasic changes in volume of rat alveolar type II cells: the role of cAMP // *The Japanese journal of physiology*. 2002; 52 (6): 561–572.
6. Hosoi K. et al., Delayed shrinkage triggered by the Na^+-K^+ pump in terbutaline-stimulated rat alveolar type II cells // *Experimental physiology*. 2004; 89 (4): 373–385.
7. Hoffmann E.K., Lambert I.H. and Pedersen S.F. Physiology of cell volume regulation in vertebrates // *Physiol Rev*. 2009; 89 (1): 193–277.
8. MacLeod R. and Hamilton J. Ca^{2+} /calmodulin kinase II and decreases in intracellular pH are required to activate K^+ channels after substantial swelling in villus epithelial cells // *Journal of Membrane Biology*. 1999; 172 (1): 59–66.
9. Fernández-Fernández J.M. et al. Maxi K^+ channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2002; 283 (6): C1705–C1714.
10. Vázquez E., Nobles M. and Valverde M.A. Defective regulatory volume decrease in human cystic fibrosis tracheal cells because of altered regulation of intermediate conductance Ca^{2+} -dependent potassium channels // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001; 98 (9): 5329–5334.
11. Wu X. et al. Regulatory volume decrease by SV40-transformed rabbit corneal epithelial cells requires ryanodine-sensitive Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release // *Journal of Membrane Biology*. 1997; 158 (2): 127–136.
12. Harron S.A. et al. Volume regulation in the human airway epithelial cell line Calu-3 // *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2009; 87 (5): 337–346.
13. Jentsch T.J. VRACs and other ion channels and transporters in the regulation of cell volume and beyond//

- Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2016; 17 (5): 293–307.
14. Hazama A. and Okada Y. Ca^{2+} sensitivity of volume-regulatory K^+ and Cl^- -channels in cultured human epithelial cells // *The Journal of Physiology*. 1988; 402 (1): 687–702.
 15. Hoffmann E.K., Holm N.B. and Lambert I.H. Functions of volume-sensitive and calcium-activated chloride channels // *IUBMB life*. 2014; 66 (4): 257–267.
 16. Mummery J.L., Killey J. and Linsdell P. Expression of the chloride channel ClC-K in human airway epithelial cells // *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2005; 83 (12): 1123–1128.
 17. Almaza J. et al. TMEM16 proteins produce volume-regulated chloride currents that are reduced in mice lacking TMEM16A // *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284 (42): 28571–28578.
 18. Xie C. et al. Mechanosensitivity of wild-type and G551D cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) controls regulatory volume decrease in simple epithelia // *The FASEB Journal*. 2016; 30 (4): 1579–1589.
 19. Missan S. et al. Contribution of KCNQ1 to the regulatory volume decrease in the human mammary epithelial cell line MCF-7 // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2007; 293 (3): C1010–C1019.
 20. Lan W.Z., Wang P.Y. and C.E. Hill, Modulation of hepatocellular swelling-activated K^+ currents by phosphoinositide pathway-dependent protein kinase C // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2006; 291 (1): C93–C103.
 21. Dube L., Parent L. and Sauve R. Hypotonic shock activates a maxi K^+ channel in primary cultured proximal tubule cells // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1990; 259 (2): F348–F356.
 22. Urbach V. et al. Mechanosensitive calcium entry and mobilization in renal A6 cells // *The Journal of membrane biology*. 1999; 168 (1): 29–37.
 23. Wang J., S. Morishima and Y. Okada. IK channels are involved in the regulatory volume decrease in human epithelial cells // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2003; 284 (1): C77–C84.
 24. Lauf P.K. et al., Apparent intermediate K conductance channel hyposmotic activation in human lens epithelial cells // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2008; 294 (3): C820–C832.
 25. Roman R. et al. Molecular characterization of volume-sensitive SKCa channels in human liver cell lines // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2002; 282 (1): G116–G122.
 26. Gamba G. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters // *Physiological reviews*. 2005; 85 (2): 423–493.
 27. Hebert S.C., Mount D.B. and Gamba G. Molecular physiology of cation-coupled Cl^- cotransport: the SLC12 family // *Pflügers Archiv*. 2004; 447 (5): 580–593.
 28. Mercado A. et al. Functional comparison of the K^+ - Cl^- cotransporters KCC1 and KCC4 // *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275 (39): 30326–30334.
 29. Race J.E. et al. Molecular cloning and functional characterization of KCC3 , a new K - Cl cotransporter // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1999; 277 (6): C1210–C1219.
 30. Cappy-Aponte J.E., Iserovich P. and Reinach P. Characterization of regulatory volume behavior by fluorescence quenching in human corneal epithelial cells // *Journal of Membrane Biology*. 2005; 207 (1): 11–22.
 31. Strange K., Emma F. and P.S. Jackson. Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1996; 270 (3): C711–C730.
 32. Kirk K. and Strange K. Functional properties and physiological roles of organic solute channels // *Annual Review of Physiology*. 1998; 60 (1): 719–739.
 33. Holm J.B., Grygorczyk R. and Lambert I.H. Volume-sensitive release of organic osmolytes in the human lung epithelial cell line A549: role of the 5-lipoxygenase // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2013; 305 (1): C48–C60.
 34. Di Ciano-Oliveira C. et al. Is myosin light-chain phosphorylation a regulatory signal for the osmotic activation of the Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransporter? // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2005; 289 (1): C68–C81.
 35. Russell J.M. Sodium-potassium-chloride cotransport // *Physiological Reviews*. 2000; 80 (1): 211–276.
 36. O'Neill, W.C., Physiological significance of volume-regulatory transporters // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1999; 276 (5): C995–C1011.
 37. Bookstein C. et al. Characterization of the rat Na^+/H^+ exchanger isoform NHE4 and localization in rat hippocampus // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1996; 271 (5): C1629–C1638.
 38. Bookstein, C. et al. A unique sodium-hydrogen exchange isoform (NHE-4) of the inner medulla of the rat kidney is induced by hyperosmolarity // *Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269: 29704–29704.
 39. Good D.W., Di Mari J.F. and B.A. Watts. Hyposmolality stimulates Na^+/H^+ exchange and HCO_3^- absorption in thick ascending limb via PI 3-kinase // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2000; 279 (5): C1443–C1454.
 40. Soleimani M. et al. Effect of high osmolality on Na^+/H^+ exchange in renal proximal tubule cells // *Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269 (22): 15613–15618.
 41. Alexander R.T. et al. Membrane curvature alters the activation kinetics of the epithelial Na^+/H^+ exchanger, NHE3 // *Journal of Biological Chemistr*. 2007; 282 (10): 7376–7384.
 42. Wehner, F. and H. Tinel, Role of Na^+ conductance, Na^+ - H^+ exchange, and Na^+ - K^+ - 2Cl^- symport in the regulatory

- volume increase of rat hepatocytes // *The Journal of Physiology*. 1998; 506 (1): 127–142.
43. Pedersen S. et al. Physiology and pathophysiology of Na⁺/H⁺ exchange and Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport in the heart, brain, and blood // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2006; 291 (1): R1–R25.
 44. Haberich F., Aziz O. and Nowacki P. Über einen osmorezeptorisch tätigen Mechanismus in der Leber // *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*. 1965; 285 (1): 73–89.
 45. Beck F.X., Dürge A. and Thurau K. Cellular osmoregulation in renal medulla // *Kidney and Blood Pressure Research*. 1988; 11 (3–5): 174–186.
 46. Bierens J.J. et al. Physiology of drowning: a review // *Physiology*. 2016; 31 (2): 147–166.
 47. De Boer J. et al. The effects of aspirated and swallowed water in drowning // *Anesthesiology*. 1970; 32 (1): 51–59.
 48. Lambert I., Hoffmann E. and Pedersen S. Cell volume regulation: physiology and pathophysiology // *Acta physiologica*. 2008; 194 (4): 255–282.
 49. Burg M.B., Kwon E.D. and Koltz D. Osmotic regulation of gene expression // *The FASEB Journal*. 1996; 10 (14): 1598–1606.
 50. Burg M.B. Molecular basis for osmoregulation of organic osmolytes in renal medullary cells // *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 1994; 268 (2): 171–175.
 51. Beck F. et al. Intra- and extracellular element concentrations of rat renal papilla in antidiuresis // *Kidney international*. 1984; 25 (2): 397–403.
 52. Pedersen S.F., Hoffmann E.K. and I. Novak. Cell volume regulation in epithelial physiology and cancer // *Frontiers in physiology*. 2013. 4: 233.
 53. Shiima-Kinoshita C. et al. β 2-adrenergic regulation of ciliary beat frequency in rat bronchiolar epithelium: potentiation by isosmotic cell shrinkage // *The Journal of physiology*. 2004; 554 (2): 403–416.
 54. Reuss L. and Cotton C.U. Volume regulation in epithelia: transcellular transport and cross-talk // *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*. 1994: 31–47.
 55. Lang F., Messner G. and Rehwald W. Electrophysiology of sodium-coupled transport in proximal renal tubules // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1986; 250 (6): F953–F962.
 56. Harvey B.J. Crosstalk and epithelial ion transport. Current opinion in nephrology and hypertension. 1994; 3 (5): 523–528.
 57. Schultz S. and Dubinsky W. Sodium absorption, volume control and potassium channels: in tribute to a great biologist // *Journal of Membrane Biology*. 2001; 184 (3): 255–261.
 58. Furlong T.J. and Spring K.R. Mechanisms underlying volume regulatory decrease by *Necturus* gallbladder epithelium // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1990; 258 (6): C1016–C1024.
 59. Breton S. et al. Cell volume increases of physiologic amplitude activate basolateral K and Cl conductances in the rabbit proximal convoluted tubule // *Journal of the American Society of Nephrology*. 1996; 7 (10): 2072–2087.
 60. Bachmann O. et al. Basolateral ion transporters involved in colonic epithelial electrolyte absorption anion secretion and cellular homeostasis // *Acta physiologica*. 2011; 201(1): 33–46.
 61. Verkman A., Song Y. and Thiagarajah J.R. Role of airway surface liquid and submucosal glands in cystic fibrosis lung disease // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2003; 284 (1): C2–C15.
 62. Greger R. et al. The Na⁺ 2Cl⁻-K⁺ cotransporter in the rectal gland of *Squalus acanthias* is activated by cell shrinkage // *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 1999; 438 (2): 165–176.
 63. Foskett J.K., Wong M.M. and Robertson M.A. Isosmotic modulation of cell volume and intracellular ion activities during stimulation of single exocrine cells // *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 1994; 268 (2): 104–110.
 64. Wangemann P. Comparison of ion transport mechanisms between vestibular dark cells and strial marginal cells // *Hearing research*. 1995; 90 (1): 149–157.
 65. Dissing S. et al. Inhibitory effects of amitriptyline on the stimulation-induced Ca²⁺ increase in parotid acini // *European journal of pharmacology*. 1990; 177 (1–2): 43–54.
 66. Sun A.M. and Hebert S.C. Volume regulation in renal medullary nephron segments // *Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation*, 1993: 49.
 67. Ussing H. and Eskesen K. Mechanism of isotonic water transport in glands // *Acta Physiologica*. 1989; 136 (3): 443–454.
 68. Hoffmann E.K. and Ussing H.H. Membrane mechanisms in volume regulation in vertebrate cells and epithelia in *Membrane transport in biology*. Springer, 1992: 317–399.
 69. Nedergaard S., Larsen E.H. and Ussing H.H. Sodium recirculation and isotonic transport in toad small intestine // *The Journal of membrane biology*. 1999; 168 (3): 241–251.
 70. Larsen E.H. and Mølbjerg N. Na⁺ recirculation and isosmotic transport // *The Journal of membrane biology*. 2006; 212 (1): 1–15.
 71. Larsen E.H., Smørens J.B. and Smørens J.N. Analysis of the sodium recirculation theory of solute-coupled water transport in small intestine // *The Journal of physiology*. 2002; 542 (1): 33–50.
 72. Wehner F. et al. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction, in *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. Springer, 2003: 80.
 73. Haussinger D. et al. Involvement of microtubules in the swelling-induced stimulation of transcellular taurocholate transport in perfused rat liver // *Biochemical Journal*. 1993; 291 (2): 355–360.

74. Wettstein M., Noe B. and Hüssinger D. Metabolism of cysteinyl leukotrienes in the perfused rat liver: the influence of endotoxin pretreatment and the cellular hydration state // *Hepatology*. 1995; 22 (1): 235–240.
75. Gillin A.G., Star R.A. and Sands J.M. Osmolarity-stimulated urea transport in rat terminal IMCD: role of intracellular calcium // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1993; 265 (2): F272–F277.
76. Green R.B. et al. Hyperosmolality inhibits sodium absorption and chloride secretion in mIMCD-K2 cells // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1996; 271 (6): F1248–F1254.
77. Nakahari T. et al. Osmotic flow transients during acetylcholine stimulation in the perfused rat submandibular gland // *Experimental physiology*. 1997; 82 (1): 55–70.
78. Gao Y. and Vanhoutte P.M. Hypotonic solutions induce epithelium-dependent relaxation of isolated canine bronchi // *Lung*. 1992; 170 (6): p. 339–347.
79. Lang F. et al. Ion channels and cell volume in regulation of cell proliferation and apoptotic cell death, in Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation. Karger Publishers, 2006: 142–160.
80. Needham D. Possible role of cell cycle-dependent morphology, geometry, and mechanical properties in tumor cell metastasis // *Cell Biochemistry and Biophysics*. 1991; 18 (2): 99–121. H.
81. Takahashi A., Yamaguchi H. and Miyamoto. Change in K⁺ current of HeLa cells with progression of the cell cycle studied by patch-clamp technique // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1993; 265 (2): 328–336.
82. Ritter M. and Wüßl E. Modification of cellular ion transport by the Ha-ras oncogene: Steps towards malignant transformation // *Cellular Physiology and Biochemistry*. 1996; 6 (5): 245–270.
83. Bianchini L. and Grinstein S. Regulation of volume-modulating ion transport systems by growth promoters, in Advances in comparative and environmental physiology. Springer, 1993: 249–277.
84. Palfrey H.C. and O'Donnell M.E. Characteristics and regulation of the Na/K/2Cl cotransporter // *Cellular Physiology and Biochemistry*. 1992; 2 (6): 293–307.
85. Dubois J.-M. and Rouzair-Dubois B. The influence of cell volume changes on tumour cell proliferation // *European Biophysics Journal*. 2004; 33 (3): 227–232.
86. Rouzair-Dubois B., O'regan S. and Dubois J.M. Cell size-dependent and independent proliferation of rodent neuroblastoma x glioma cells // *Journal of cellular physiology*. 2005; 203 (1): 243–250.
87. Burg M.B. Response of renal inner medullary epithelial cells to osmotic stress // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2002; 133 (3): 661–666.
88. Lang F. et al. Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death // *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2000; 10 (5-6): 417–428.
89. Michea L. et al. Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells // *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2000; 278 (2): F209–F218.
90. Klausen T.K. et al. Monovalent ions control proliferation of Ehrlich Lettre ascites cells // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2010; 299 (3): C714–C725.
91. Schreiber R. Ca²⁺ signaling, intracellular pH and cell volume in cell proliferation // *The Journal of membrane biology*. 2005; 205 (3): 129.
92. Wöll E. et al. The role of calcium in cell shrinkage and intracellular alkalization by bradykinin in Ha-ras oncogene expressing cells // *FEBS letters*. 1993; 322 (3): 261–265.
93. Wang Z. Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis // *Pflügers Archiv*. 2004; 448 (3): 274–286.
94. Wang S. et al. Evidence for an early G1 ionic event necessary for cell cycle progression and survival in the MCF-7 human breast carcinoma cell line // *Journal of cellular physiology*. 1998; 176 (3): 456–464.
95. Felipe A. et al. Potassium channels: new targets in cancer therapy // *Cancer detection and prevention*. 2006; 30 (4): 375–385.
96. Patel A.J. and Lazdunski M. The 2P-domain K⁺ channels: role in apoptosis and tumorigenesis // *Pflügers Archiv*. 2004; 448 (3): 261–273.
97. Voloshyna I. et al. TREK-1 is a novel molecular target in prostate cancer // *Cancer research*. 2008; 68 (4): 1197–1203.
98. Pardo L.A. et al. Approaches targeting Kv10. 1 open a novel window for cancer diagnosis and therapy // *Current medicinal chemistry*. 2012; 19 (5): 675–682.
99. Gyme-Varela D. et al. Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity // *Cancer Research*. 2007; 67 (15): 7343–7349.
100. Jäger H. et al. Blockage of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro // *Molecular pharmacology*. 2004; 65 (3): 630–638.
101. Chen L. et al. Roles of volume-activated Cl⁻ currents and regulatory volume decrease in the cell cycle and proliferation in nasopharyngeal carcinoma cells // *Cell proliferation*. 2007; 40 (2): 253–267.
102. Varela D. et al. NAD (P) H oxidase-derived H₂O₂ signals chloride channel activation in cell volume regulation and cell proliferation // *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279 (14): 13301–13304.
103. Wang L., Chen L. and Jacob T. CIC-3 expression in the cell cycle of nasopharyngeal carcinoma cells // *Sheng li xue bao: [Acta physiologica Sinica]*. 2004; 56 (2): 230–236.
104. Liu W. et al. Inhibition of Ca²⁺-activated Cl⁻ channel ANO1/TMEM16A expression suppresses tumor growth and invasiveness in human prostate carcinoma // *Cancer letters*. 2012; 326 (1): 41–51.

105. Duvvuri U. et al. TMEM16A induces MAPK and contributes directly to tumorigenesis and cancer progression // *Cancer research*. 2012; 72 (13): 3270–3281.
106. Britschgi A. et al. Calcium-activated chloride channel ANO1 promotes breast cancer progression by activating EGFR and CAMK signaling // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013; 110 (11): E1026–E1034.
107. Kunzelmann K. Ion channels in regulated cell death // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016; 73 (11–12): 2387–2403.
108. Blikslager A.T. et al. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa // *Physiological reviews*. 2007; 87 (2): 545–564.
109. Dignass A.U. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair // *Inflammatory bowel diseases*. 2001; 7 (1): 68–77.
110. Lohela M. and Werb Z. Intravital imaging of stromal cell dynamics in tumors // *Current opinion in genetics & development*. 2010; 20 (1): 72–78.
111. Schwab A. and Stock C. Ion channels and transporters in tumour cell migration and invasion // *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2014; 369 (1638): 20130102.
112. Schwab A. et al. Role of ion channels and transporters in cell migration // *Physiological reviews*. 2012; 92 (4): 1865–1913.
113. Cooper J.A. The role of actin polymerization in cell motility // *Annual Review of Physiology*. 1991; 53 (1): 585–605.
114. Stossel T.P. On the crawling of animal cells // *Science - New York then Washington*. 1993; 260: 1086–1086.
115. Jakab M. and Ritter M. Cell volume regulatory ion transport in the regulation of cell migration, in Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation // *Karger Publishers*. 2006; 161–180.
116. Schwab A. et al. Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K⁺ channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume // *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 1999; 438 (3): 330–337.
117. Ridley A.J. et al. Cell migration: integrating signals from front to back // *Science*. 2003; 302 (5651): 1704–1709.
118. Chiang Y. et al. EGF upregulates Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 by post-translational regulation that is important for cervical cancer cell invasiveness // *Journal of cellular physiology*. 2008; 214 (3): 810–819.
119. Lauritzen G. et al. The Na⁺/H⁺ exchanger NHE1, but not the Na⁺, cotransporter NBCn1, regulates motility of MCF7 breast cancer cells expressing constitutively active ErbB2 // *Cancer letters*. 2012; 317 (2): 172–183.
120. Lagana A. et al. Regulation of the formation of tumor cell pseudopodia by the Na (+)/H (+) exchanger NHE1 // *Journal of cell science*. 2000; 113 (20): 3649–3662.
121. Stock C. et al. pH nanoenvironment at the surface of single melanoma cells // *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2007; 20 (5): 679–686.
122. Ritter M. et al. Effect of inhibitors of Na⁺/H⁺-exchange and gastric H⁺/K⁺ ATPase on cell volume, intracellular pH and migration of human polymorphonuclear leucocytes // *British journal of pharmacology*. 1998; 124 (4): 627–638.
123. Haas B.R. and Sontheimer H. Inhibition of the sodium-potassium-chloride cotransporter isoform-1 reduces glioma invasion // *Cancer research*. 2010; 70 (13): 5597–5606.
124. Schwab A. et al. Oscillating activity of a Ca (2+)-sensitive K⁺ channel. A prerequisite for migration of transformed Madin-Darby canine kidney focus cells // *Journal of Clinical Investigation*. 1994; 93 (4): 1631.
125. Ransom C.B., O'Neal J.T. and Sontheimer H. Volume-activated chloride currents contribute to the resting conductance and invasive migration of human glioma cells // *Journal of Neuroscience*. 2001; 21 (19): 7674–7683.
126. Soroceanu L., Manning T.J. and Sontheimer H. Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl⁻ and K⁺ ion channel blockers // *Journal of Neuroscience*. 1999; 19 (14): 5942–5954.
127. Mao J. et al. Blockage of volume-activated chloride channels inhibits migration of nasopharyngeal carcinoma cells // *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2007; 19 (5–6): 249–258.
128. Chen Y.-F. et al. Motor Protein-Dependent Membrane Trafficking of KCl Cotransporter-4 Is Important for Cancer Cell Invasion // *Cancer research*. 2009; 69 (22): 8585–8593.
129. Rao J.N. et al. Activation of K⁺ channels and increased migration of differentiated intestinal epithelial cells after wounding // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2002; 282 (4): C885–C898.
130. Shin V.Y. et al. Nicotine suppresses gastric wound repair via the inhibition of polyamine and K⁺ channel expression // *European journal of pharmacology*. 2002; 444 (1): 115–121.
131. Trinh N.T.N. et al. EGF and K⁺ channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2008; 295 (5): L866–L880.
132. Potier M. et al. Altered SK3/KCa2. 3-mediated migration in adenomatous polyposis coli (Apc) mutated mouse colon epithelial cells // *Biochemical and biophysical research communications*. 2010; 397 (1): 42–47.
133. Yang H. et al. Epidermal growth factor receptor transactivation by the cannabinoid receptor (CB1) and transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) induces differential responses in corneal epithelial cells // *Experimental eye research*. 2010; 91 (3): 462–471.
134. Waning J. et al. A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels: involvement in cell migration // *Cell calcium*. 2007; 42 (1): 17–25.
135. Hu J. and Verkman A. Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin

- water channels // *The FASEB Journal*. 2006; 20 (11): 1892–1894.
136. Loitto V.M., Karlsson T. and Magnusson K.E. Water flux in cell motility: expanding the mechanisms of membrane protrusion // *Cell motility and the cytoskeleton*. 2009; 66 (5): 237–247.
 137. Verkman A.S. Aquaporins at a glance // *J. Cell. Sci.* 2011; 124 (13): 2107–2112.
 138. Hara-Chikuma M. and Verkman A. Aquaporin-1 facilitates epithelial cell migration in kidney proximal tubule // *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006; 17 (1): 39–45.
 139. Levin M.H. and Verkman A. Aquaporin-3-dependent cell migration and proliferation during corneal re-epithelialization // *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006; 47 (10): 4365–4372.
 140. Hayashi S. et al. Involvement of aquaporin-1 in gastric epithelial cell migration during wound repair // *Biochemical and biophysical research communications*. 2009; 386 (3): 483–487.
 141. Ruiz-Ederra J. and Verkman A. Aquaporin-1-facilitated keratocyte migration in cell culture and in vivo corneal wound healing models // *Experimental eye research*. 2009; 89 (2): 159–165.
 142. Chen Z. et al. Impaired migration and cell volume regulation in aquaporin 5-deficient SPC-A1 cells // *Respiratory physiology & neurobiology*. 2011; 176 (3): 10–117.
 143. Saadoun S. et al. Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation // *Journal of cell science*. 2005; 118 (24): 5691–5698.
 144. Chemaly A. et al. VSOP/Hv1 proton channels sustain calcium entry, neutrophil migration, and superoxide production by limiting cell depolarization and acidification // *Journal of Experimental Medicine*. 2010; 207 (1): 129–139.
 145. Lang F. and Hoffmann E.K. Role of ion transport in control of apoptotic cell death // *Comprehensive Physiology*. 2012;
 146. Pasantes-Morales H. Channels and volume changes in the life and death of the cell // *Molecular pharmacology*. 2016; 90 (3): 358–370.
 147. Trump B. and Berezsky I. Calcium-mediated cell injury and cell death // *The FASEB Journal*. 1995; 9 (2): p. 219–228.
 148. Lehen'kyi V.Y. et al. Ion channels and transporters in cancer. 5. Ion channels in control of cancer and cell apoptosis // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2011; 301 (6): C1281–C1289.
 149. Poulsen K.A. et al. Deregulation of apoptotic volume decrease and ionic movements in multidrug-resistant tumor cells: role of chloride channels // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2010; 298 (1): C14–C25.
 150. Porcelli A. et al. Apoptosis induced by staurosporine in ECV304 cells requires cell shrinkage and upregulation of Cl⁻ conductance // *Cell Death & Differentiation*. 2004; 11 (6): 655–662.
 151. Ise T. et al. Roles of volume-sensitive Cl⁻ channel in cisplatin-induced apoptosis in human epidermoid cancer cells // *The Journal of membrane biology*. 2005; 205 (3): 139–145.
 152. Bortner C.D. and Cidlowski J.A. Ion channels and apoptosis in cancer // *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2014; 369 (1638): 20130104.
 153. Okada Y. et al. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD) // *The Journal of physiology*. 2001; 532 (1): 3–16.
 154. Okada Y. and Maeno E. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2001; 130 (3): 377–383.
 155. Edwards Y.S. et al. Osmotic stress induces both secretion and apoptosis in rat alveolar type II cells // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1998; 275 (4): L670–L678.
 156. Maeno E. et al. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000; 97 (17): 9487–9492.
 157. Terada Y. et al. Hyperosmolality activates Akt and regulates apoptosis in renal tubular cells // *Kidney international*. 2001; 60 (2): 553–567.
 158. Pedersen S.F. et al. The Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1, differentially regulates mitogen-activated protein kinase subfamilies after osmotic shrinkage in Ehrlich Lettre Ascites cells // *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2007; 20 (6): 735–750.
 159. Reinehr R., Schliess F. and Hüssinger D. Hyperosmolarity and CD95L trigger CD95/EGF receptor association and tyrosine phosphorylation of CD95 as prerequisites for CD95 membrane trafficking and DISC formation // *The FASEB Journal*. 2003; 17 (6): 731–733.
 160. Friis M.B. et al. Cell shrinkage as a signal to apoptosis in NIH 3T3 fibroblasts // *The Journal of physiology*. 2005; 567 (2): 427–443.
 161. Nielsen M.-B., Christensen S.T. and Hoffmann E.K. Effects of osmotic stress on the activity of MAPKs and PDGFR- β -mediated signal transduction in NIH-3T3 fibroblasts // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2008; 294 (4): C1046–C1055.
 162. Bortner C.D. and Cidlowski J.A. Uncoupling cell shrinkage from apoptosis reveals that Na⁺ influx is required for volume loss during programmed cell death // *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278 (40): 39176–39184.
 163. Franco R., Bortner C. and Cidlowski J. Potential roles of electrogenic ion transport and plasma membrane depolarization in apoptosis // *The Journal of membrane biology*. 2006; 209 (1): 43–58.

164. Orlov S. et al. Apoptosis in serum-deprived vascular smooth muscle cells: evidence for cell volume-independent mechanism // *Apoptosis*. 2004; 9 (1): 55–66.
165. Bortner C.D. and Cidlowski J.A. Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1996; 271 (3): C950–C961.
166. Platonova A. et al. Swelling rather than shrinkage precedes apoptosis in serum-deprived vascular smooth muscle cells // *Apoptosis*. 2012; 17 (5): 429–438.
167. Platonova A. et al. The death of ouabain-treated renal epithelial C11-MDCK cells is not mediated by swelling-induced plasma membrane rupture // *J. Membr Biol*. 2011; 241 (3): 145–154.
168. Siegel R., Naishadham D. and Jemal A. Cancer statistics, 2013 // *CA: a cancer journal for clinicians*. 2013; 63 (1): 11–30.
169. Prevarskaya N., Skryma R. and Shuba Y. Ion channels and the hallmarks of cancer // *Trends in molecular medicine*. 2010; 16 (3): 107–121.
170. Feroni C. et al. Epithelial–mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact // *Cancer treatment reviews*. 2012; 38 (6): 689–697.
171. Rhim A.D. et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation // *Cell*. 2012; 148 (1): 349–361.
172. Krishna R. and Mayer L.D. Multidrug resistance (MDR) in cancer: mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000; 11 (4): 265–283.
173. Maeno E., Takahashi N. and Okada Y. Dysfunction of regulatory volume increase is a key component of apoptosis // *FEBS letters*. 2006; 580 (27): 6513–6517.
174. Numata T. et al. Hypertonicity-induced cation channels rescue cells from staurosporine-elicited apoptosis // *Apoptosis*. 2008; 13 (7): 895.
175. Rotin D. and Grinstein S. Impaired cell volume regulation in Na (+)-H⁺ exchange-deficient mutants // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1989; 257 (6): C1158–C1165.
176. Bonnet S. et al. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth // *Cancer cell*. 2007; 11 (1): 37–51.
177. Hoffmann E.K. and Lambert I.H. Ion channels and transporters in the development of drug resistance in cancer cells // *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2014; 369 (1638): 20130109.
178. Han Y. et al. Detection of potassium currents and regulation of multidrug resistance by potassium channels in human gastric cancer cells // *Cell biology international*. 2007; 31 (7): 741–747.
179. Morikage T. et al. Modulation of cisplatin sensitivity and accumulation by amphotericin B in cisplatin-resistant human lung cancer cell lines // *Cancer research*. 1993; (14): 3302–3307.
180. Beketic-Oreskovic L. and Osmak M. Modulation of resistance to cisplatin by amphotericin B and aphidicolin in human larynx carcinoma cells // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1995; 35 (4): 327–333.
181. Min X.-j. et al. Dysfunction of volume-sensitive chloride channels contributes to cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells // *Experimental Biology and Medicine*. 2011; 236 (4): 483–491.
182. Lee E.L. et al. Impaired activity of volume-sensitive Cl⁻ channel is involved in cisplatin resistance of cancer cells // *Journal of cellular physiology*. 2007; 211 (2): 513–521.
183. Mongin A.A. and Orlov S.N. MECHANISMS OF CELL VOLUME REGULATION // *Physiology and Maintenance-Volume I: General Physiology*. 2009; 1: 130.

Поступила в редакцию 07.07.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Пономарчук О.О., биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва; научно-исследовательский центр Монреальского университета, г. Монреаль, Канада.

Максимов Г.В., биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва.

Орлов Сергей Николаевич, д-р мед. наук, профессор, биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва.

(✉) Орлов Сергей Николаевич, e-mail: sergeiorlov@yandex.ru.

УДК 577.121:616-018.7-092.18

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-42-60

For citation: Ponomarchuk O.O., Maximov G.V., Orlov S.N. The regulation of epithelial cells volume in norm and pathology. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 42–60.

Ponomarchuk O.O.^{1,2}, Maximov G.V.¹, Orlov S.N.¹

¹ *M.V. Lomonosov Moscow State University
1/12, Leninskie Gory, 119991, Moscow, Russian Federation*

² *Centre de Recherche, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)
900, Tour Viger, rue St-Denis, Montreal, Quebec, H2X 0A9, Canada*

The regulation of epithelial cells volume in norm and pathology

ABSTRACT

The ability to regulate volume in response to changes in intracellular and extracellular osmolarity is one of the fundamental cell functions. Cell volume changes stimulate a variety of intracellular signaling cascades that activate protective and adaptive mechanisms. In general, the regulation of volume occurs due to the transport of osmolytes, which results in the restoration of the intracellular water volume and the normalization of cellular functions. In this review we focused on the physiological significance of regulatory volume decrease (RVD) and regulatory volume increase (RVI) in response to fluctuations of extra- and intracellular osmolarity in the context of epithelial cells.

Key words: volume regulation, epithelial cells, proliferation, migration, carcinogenesis.

Received July 07.2017

Accepted November 08.2017

Ponomarchuk O.O., Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation; CRCHUM, Montreal, Canada.

Maximov G.V., Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation.

Orlov Sergei N., DM, Professor, Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation.

(✉) Orlov Sergei N., e-mail: sergeiorlov@yandex.ru.

УДК 615-006.04-097:612.017.1

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-61-74

Для цитирования: Чердынцева Н.В., Митрофанова И.В., Булдаков М.А., Стахеева М.Н., Патышева М.Р., Завьялова М.В., Кжышковска Ю.Г. Макрофаги и опухолевая прогрессия: на пути к макрофаг-специфичной терапии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 61–74.

Макрофаги и опухолевая прогрессия: на пути к макрофаг-специфичной терапии

Чердынцева Н.В.^{1,2}, Митрофанова И.В.^{1,2}, Булдаков М.А.^{1,2}, Стахеева М.Н.¹,
Патышева М.Р.¹, Завьялова М.В.^{1,4}, Кжышковска Ю.Г.^{2,3}

¹ Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (РАН)
Россия, 634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

² Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТГУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

³ Университет Гейдельберга
Германия, 68167, г. Маннхайм, Theodor-Kutzer-Ufer, 1-3

⁴ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Согласно современной парадигме, предложенной Peter Novell [1], канцерогенез – это процесс клональной эволюции, в котором последовательные циклы клональной селекции в адаптивном тканевом микроокружении дают начало опухолям с разнообразными генетическими и другими молекулярными изменениями, определяющими особенности биологического поведения каждой индивидуальной опухоли. Отбор разных по биологическим свойствам клонов приводит к гетерогенности клеток внутри одной опухоли и обеспечивает тем самым низкий эффект химиотерапии.

В среднем только 40–60% пациентов с онкологическими заболеваниями эффективно отвечают на химиотерапию, и даже в случае первоначальной полной регрессии опухолей остается высокая вероятность рецидива [2, 3]. Повышение эффективности терапии солидных опухолей и снижение вероятности рецидива требует не только выбора оптимальных индивидуальных для каждого пациента схем терапии, но и разработки комбинированных подходов, направленных как на уничтожение опухолевых клеток, так и на противоопухолевое программирование микроокружения, где основную регуляторную роль играют иммунные клетки. Ключевыми клетками иммунной системы, определяющими взаимоотношения клеток опухоли с микроокружением, начиная с ранних стадий роста опухоли, включая регуляцию неангиогенеза и до терминальной стадии диссеминации злокачественного процесса, являются опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) [4–6]. Идентификация путей, ответственных за поддерживающую опухоль функцию макрофагов, дает возможность разработки терапевтических подходов, которые сочетают в себе химиотерапию, в том числе таргетную, со стратегией блокирования макрофагов. Инструментом блокирования макрофагов может быть ингибция их инфильтрации в опухоль, их уничтожение с помощью антимacroфагальных лекарственных агентов, выключение функции макрофагального колоние-стимулирующего фактора. Перспективны подходы одновременного воздействия на стволовые раковые

✉ Чердынцева Надежда Викторовна, e-mail: nvch@tnimc.ru.

клетки и ОАМ для отмены химиорезистентности и торможения опухолевой прогрессии. Развиваются стратегии перепрограммирования макрофагов с проопухолевыми функциями в клетки с противоопухолевым фенотипом.

Таким образом, чрезвычайно широкий спектр регуляторной и эффекторной активности, с одной стороны, и высокая функциональная пластичность макрофагов, с другой, указывают на перспективность разработки макрофаг-направленных воздействий с целью создания таких условий для взаимоотношений опухоли и микроокружения, которые бы препятствовали прогрессии опухолевого процесса.

Ключевые слова: опухолеассоциированные макрофаги, метастазирование, химиотерапия, гетерогенность опухоли, хитиназо-подобные белки, перепрограммирование макрофагов.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема заболеваемости злокачественными новообразованиями носит глобальный характер и связана с объективными демографическими причинами – увеличением доли пожилых лиц, имеющих более высокий риск заболеть раком. Ежегодно в мире регистрируется более 12 млн новых случаев рака и около 6,2 млн смертей от него [7]. Злокачественные новообразования являются причиной каждого четвертого летального исхода в развитых странах и каждого восьмого в мире в целом [8]. По сведениям комиссии журнала *Lancet Oncology*, расходы, связанные с преждевременной смертью и инвалидностью, вызванными онкологическими заболеваниями, во всем мире в 2008 г. достигли 895 млрд. долларов [9]. При этом следует заметить, что заболеваемость злокачественными новообразованиями продолжает неуклонно расти. Скорость прироста заболеваемости раком превышает скорость прироста населения [10]. По прогнозу к 2020 г. прирост заболеваемости составит около 33,7% [7].

Снижение смертности от рака может быть достигнуто за счет разработки подходов ранней диагностики злокачественного процесса, поскольку лечение пациентов с ранними стадиями более эффективно, чем распространенных форм заболевания. В целом совершенствование комбинированной терапии рака, как правило, включающей лекарственное лечение, также может повлиять на показатели смертности. В настоящее время появляются новые критерии оценки эффективности лечения, не ограничивающиеся оценкой степени регрессии опухоли или показателями продолжительности жизни после проведенного лечения. В социальном плане это, прежде всего, показатели качества жизни и снижение стоимости лечения. Полная элиминация опухоли не является единственной целью, которая, как оказалось, практически недостижима. Невозможность полной эрадикации злокачественного новообразования

из организма обусловлена клональным характером эволюции опухоли под влиянием химио- или лучевой терапии, что приводит к экспансии резистентных к лечению клонов, усилению феномена внутриопухолевой гетерогенности, и, в конечном счете, к отсутствию терапевтического эффекта и диссеминации опухолевого процесса. Доказана принципиально важная роль опухолевого микроокружения в определении судьбы опухоли. Регуляторное действие факторов микроокружения, важнейшим компонентом которого выступают воспалительные клетки, наряду с архитектурно-стромальной составляющей может приводить к остановке прогрессии злокачественного процесса без физической деструкции опухолевых клеток. Поэтому стабилизация процесса даже в условиях, когда не происходит полной элиминация опухоли, может рассматриваться как критерий клинической эффективности (end point) [11]. Смена целеполагания с точки зрения конечного результата лечения (остановка прогрессии) означает необходимость создания новых методологических подходов к предсказанию риска прогрессирования, выбору эффективных средств и методов воздействия на опухолевый процесс с учетом закономерностей процесса клональной эволюции опухоли, неразрывно сопряженной с адаптивным функционированием опухолевого микроокружения.

КЛОНАЛЬНАЯ ЭВОЛЮЦИЯ ОПУХОЛИ – ОСНОВА ВНУТРИОПУХОЛЕВОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ И ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛИ

Современная парадигма онкологии была сформулирована Peter Nowell, который предложил рассматривать злокачественный рост как эволюционный процесс с клональной селекцией по типу естественного отбора Ч. Дарвина. Его концепция была опубликована в журнале *Science*

в 1976 г. в статье *Clonal evolution of tumor cell population* [1]. Основным принципом дарвиновской эволюционной системы – случайная генетическая изменчивость репродуктивных индивидуумов, объединенных общим происхождением, наряду с естественным отбором наиболее приспособленных вариантов может быть перенесен на опухолевую экосистему. Полагают, что опухоль возникает из единичной клетки и прогрессирует благодаря приобретенной генетической вариативности этого клона с последующей селекцией наиболее агрессивных субклиннов в адаптивном микроокружении и формированием клонов с определенными биологическими характеристиками, имеющих преимущество перед другими и обеспечивающих успешное развитие злокачественного новообразования. Следовательно, для каждого пациента требуется индивидуальная специфическая терапия, и даже соблюдение этого условия не исключает возникновение резистентных к лечению субклиннов [2].

Терапевтические вмешательства уничтожают определенные опухолевые клоны, но при этом может также обеспечиваться селективная экспансия резистентных клонов. Именно клональная эволюция опухолей под влиянием таких факторов, как химиотерапия и радиотерапия, следствием которой может быть доминирующее распространение нечувствительных опухолевых клонов, является важнейшей причиной опухолевой прогрессии и связанных с этим неудач противоопухолевого лечения.

Динамика эволюции соматических клеток зависит от скорости мутационных процессов, генетического разнообразия и клональной селекции [12–14]. Тканевые экосистемы обеспечивают пространство и определяющие детерминанты для соответствующего отбора, то есть так называемый адаптивный ландшафт [15]. Опухолевое микроокружение состоит из множества динамично взаимодействующих компонентов, которые могут определять эволюцию опухолевых клонов. Взаимодействие между клетками опухоли и микроокружением взаимно направлено, регулируется как системными факторами (нутриенты, гормоны), так и медиаторами, которые продуцируются инфильтрирующими воспалительными или эндотелиальными клетками. Клеточный состав опухолевого микроокружения является важным фактором формирования злокачественного потенциала. В частности показано, что плотность и состав клеток иммунной системы в опухолях толстой кишки может служить критерием прогноза, по точности превосходящим традиционные кри-

терии, такие как стадия и распространенность опухолевого процесса [16].

Характер взаимодействия клеток опухоли с микроокружением может быть изменен под влиянием химио- или лучевой терапии. Несмотря на то что большинство клеток может быть уничтожено под влиянием цитотоксических агентов, ремоделирование ландшафта создает условия для селективного отбора и экспансии минорных вариантов опухолевых клеток, не чувствительных к лечению [17]. Особенности биологического поведения каждой опухоли определяются специфическими молекулярно-генетическими изменениями как опухолевых клеток, так и компонентов микроокружения. Иммунная система является одним из ключевых участников клональной эволюции, формирует адаптивное микроокружение опухоли [18–20]. Нормальное микроокружение клеток играет критическую роль в супрессии рака, и его изменения могут выступать ключевым фактором инициации, прогрессии и чувствительности опухоли к лечению [21–25].

ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫЕ МАКРОФАГИ

Опухолеассоциированные макрофаги являются основными клетками врожденного иммунитета, которые регулируют взаимоотношения инфильтрирующих иммунокомпетентных клеток с опухолевыми клетками и с другими компонентами микроокружения, а также пролиферацию опухолевых клеток и ангиогенез [18, 26, 27]. Например, при раке молочной железы ОАМ составляют до 50% от опухолевой массы и играют важную роль в формировании и прогрессии рака молочной железы (РМЖ) [28]. Они происходят из циркулирующих моноцитов, которые привлекаются в опухоль и под влиянием внутриопухолевых факторов программируются в клетки, либо способствующие опухолевой прогрессии, либо ей препятствующие [6]. Моноциты составляют до 10% от циркулирующих клеток крови, морфологически и фенотипически неоднородны и являются предшественниками тканевых макрофагов различных органов. На мышиной модели было показано, что моноциты крови продуцируются костным мозгом (КМ) из клеток-предшественниц макрофагов или дендритных клеток (*macrophage dendritic precursors, MDP*). Установлено, что хемокиновый рецептор CCR2 и белок-хемоаттрактант 3 (*macrophage chemotactic protein, MCP-3*) имеют решающее значение для мобилизации моноцитов из костного мозга и поддержания тканевого гомеостаза [29].

Опухолеассоциированные макрофаги появляются в опухолях и связаны с конкретными злокачественными новообразованиями. Изучение их специфической поляризации показало, что ОАМ представлены М2-подобными макрофагами. Однако существуют также экспериментальные данные, предполагающие, что ОАМ участвуют как в М1-, так и М2-поляризации [30]. На основании различий в спектре активирующих молекул и секреторном цитокиновом паттерне макрофаги разделили на две функционально различающиеся популяции, по-разному влияющие на воспалительные процессы [31].

Классически активированные макрофаги (М1) формируются под влиянием липополисахарида (LPS), интерферона (IFN) γ и являются важными продуцентами провоспалительных цитокинов. Альтернативно активированные макрофаги (М2) отвечают на такие стимулы, как интерлейкин (IL) 4 или IL-13, и являются продуцентами противовоспалительных цитокинов. Недавно Р.Д. Murray et al. (2014) предложили номенклатуру и разработали экспериментальные указания по формированию М1- и М2-субпопуляций *in vitro* с целью получения данных, воспроизводимых в разных лабораториях [32]. Появление этого руководства указывает на актуальность изучения парадигмы популяций М1/М2, которые играют провоспалительную или противовоспалительную роль во время иммунных реакций при разных патологических состояниях, в том числе при формировании и прогрессии злокачественных новообразований.

Микроокружение солидных опухолей, клетки которого продуцируют множество хемоаттрактантов, обладает способностью привлекать циркулирующие моноциты, которые могут дифференцироваться в ОАМ и формировать там воспалительный инфильтрат. Показано, что ОАМ могут индуцировать ангиогенез, лимфангиогенез, ремоделирование стромы, подавление иммунитета и способствовать метастазированию. ОАМ продуцируют различные ферменты, включающие плазмин, урокиназный активатор плазминогена uPA, матриксные металлопротеиназы ММР и катепсин В, способствующие инвазии опухолевых клеток и метастазированию [33]. В 2014 г. R.A. Franklin et al. подтвердили в эксперименте, что воспалительные моноциты могут дифференцироваться в ОАМ; на последнем этапе их дифференцировки повышается уровень экспрессии рецептора интегрина vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), но терминальная дифференцировка зависит от регулятора транскрипции Notch сигналинга, RBPJ [34]. D. Laoui et al. (2011) выделили

несколько субпопуляций ОАМ при раке молочной железы, описав их маркеры и функции [35].

Установлено, что при гепатоцеллюлярной карциноме ОАМ продуцируют высокие уровни хемокина IL-8, одного из индукторов эпителиально-мезенхимального перехода как необходимого ключевого события для отдаленного метастазирования и клеточную миграцию через сигнальный путь JAK2/STAT3 [36]. Эти данные указывают на то, что транскрипционный фактор STAT3 имеет прямое отношение к опухолевой прогрессии и может рассматриваться в качестве молекулы-мишени в противоопухолевой терапии.

Как уже отмечено, макрофаги поддерживают многие важные процессы, обеспечивающие прогрессирование опухолей, включая ангиогенез, инвазию опухолевых клеток, подвижность и интравазацию, а также метастазирование. При этом большое значение имеет стимулирование экстравазации опухолевых клеток и поддержание их устойчивого роста во вторичных очагах. Каждый из этих процессов регулируется различными субпопуляциями макрофагов [6]. Эти данные вместе с экспериментальными исследованиями, демонстрирующими ингибирование опухолевой прогрессии и метастазирования путем истощения популяции макрофагов, подтверждают, что взаимодействие опухолевых клеток с иммунной системой играет существенную роль для приобретения ими агрессивного фенотипа. Следовательно, функционал этих клеток может выступать в роли важной терапевтической мишени для лечения опухолей. Переключение направления дифференцировки макрофагов с фенотипа М2 на М1 было предложено в качестве терапевтического подхода для лечения злокачественных новообразований [4].

Колонистимулирующий фактор 1 (CSF-1) является хемоаттрактантом и основным регулятором функций большинства популяций макрофагов разного происхождения [37]. Высокая концентрация CSF-1 в опухолях ассоциирована с плохим прогнозом [6, 38]. Вместе с этими клиническими наблюдениями показано, что генетический нокаут CSF-1 приводит к замедлению инициирования прогрессирования (РМЖ, рак поджелудочной железы) и метастазирования (РМЖ), которое связано с отсутствием ОАМ. Генетический нокаут CSF-1, использование нейтрализующих антител, низкомолекулярных ингибиторов или антисмысловых РНК для ингибирования CSF-1R сигналинга уменьшает агрессивность ксенотрансплантатов опухолей, что ассоциировано с отсутствием ОАМ [6, 39, 40]. Сосудистый фактор vascular endothelial growth factor A (VEGFA) при-

влекает клетки-предшественницы макрофагов, которые затем дифференцируются в ОАМ (макрофаги M2) под влиянием IL-4 [41]. Удаление этих макрофагов ингибирует рост, ангиогенез и инвазию опухоли [41].

Макрофаги оказывают супрессорное действие на противоопухолевые эффекторы иммунной системы, в частности цитотоксические Т-лимфоциты. Моноциты и макрофаги могут сами экспрессировать молекулы семейства ингибирующих рецепторов LILRB leukocyte immunoglobulin-like receptors (LIT-2 и LIT-4), связывание которых с молекулой главного комплекса гистосовместимости HLA-G приводит к приобретению ими иммуносупрессорного фенотипа посредством секреции IL-10 и TGF- β 1 [42].

В дополнение к молекулам главного комплекса гистосовместимости, макрофаги экспрессируют лиганды ингибирующих рецепторов – белок программируемой гибели клеток 1 (programming death, PD-1) и антиген цитотоксических Т-лимфоцитов 4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen, CTLA-4). Эти ингибирующие лиганды обычно высоко экспрессированы в активированных иммунных эффекторных клетках: Т-, В- и НКТ-клетках, макрофагах, дендритных клетках как часть иммунного ответа, контролирующего его интенсивность и уровень воспалительного процесса (так называемые контрольные точки – check-point – иммунной системы). Активация PD-1 и CTLA-4 их лигандами (PD-L1, PD-L2 и B7-1 [CD80], B7-2 [CD86] соответственно) напрямую ингибирует T-cell receptor (TCR) и B-cell receptor (BCR) сигналинг, цитотоксические функции Т-клеток и их активацию [43]. PD-L1 и L2 регулируются в ОАМ и супрессорных клетках миелоидного происхождения (MDSC) [44]. Оказалось, что механизм действия уже внедренных в практику ингибиторов контрольных точек – моноклональных антител, снимающих иммуносупрессию (например, ипилимумаб – антитела против CTLA-4), – вовлекает макрофаги, экспрессирующие Fc γ -рецептор, и инициирует прямую антителозависимую цитотоксичность макрофагов против Т-регуляторных клеток с иммуносупрессорной активностью (Treg) [45]. Тестирование макрофагов может послужить основой для разработки показаний к применению антител против контрольных точек, отсутствие которых в настоящее время приводит к клинической и экономической неэффективности этих препаратов.

Трансформирующий фактор роста (TGF) β и IL-10, продуцируемые макрофагами, ингибируют цитотоксические Т-лимфоциты, Th1 и Th2 CD4+ Т-клетки [46, 47].

ОАМ секретируют множество цитокинов, хемокинов и ферментов, которые прямо или косвенно могут подавлять эффекторные функции CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток путем рекрутирования естественных Т-регуляторов (nTreg) в опухолевое микроокружение, а также за счет индукции регуляторной фракции CD4⁺ лимфоцитов (iTreg) и поддержания их выживаемости. Хемокиновые рецепторы CCR4, CCR5, CCR6 и CCR10, которые экспрессируются клетками nTreg, участвуют в их миграции в опухолевое микроокружение [48]. Клетки-супрессоры миелоидного происхождения (M-MDSCs) обладают более выраженным иммуносупрессивным потенциалом, чем гранулоциты, и распознаются как F4/80⁺ (маркер, экспрессируемый также на воспалительных моноцитах) [49].

Деление макрофагов на две разные по функциям субпопуляции, как оказалось, не отражает действительной сложности картины, наблюдающейся в опухоли. Результаты исследования экспрессионного профиля разных субпопуляций макрофагов в разных контекстах опухолевого микроокружения показали наличие целого ряда отличных друг от друга субпопуляций макрофагов, обладающих различными функциональными свойствами. Существование определенного подтипа ОАМ обусловлено взаимодействием макрофагов с факторами, секретируемыми опухолевым микроокружением, что приводит к транскрипционной перестройке генного профиля ОАМ. ОАМ являются высокопластичными клетками и способны переключаться между подтипами в зависимости от специфических сигналов и стимулов внутри опухоли. Ангиогенезпромотирующие макрофаги вырабатывают трансформирующий фактор роста (TGF) β , сосудистые эндотелиальные факторы роста (VEGF-A), (VEGF-C), PDGF. Макрофаги, способствующие метастазированию, секретируют TGF- β , катепсин В, матричную металлопротеиназу 9 (MMP9), антимикробный пептид LL-37, фактор некроза опухоли (TNF) α . Макрофаги, оказывающие иммуносупрессорное действие, продуцируют другой спектр цитокинов: индуцибельную синтазу оксида азота (iNOS), аргиназу 1, индол-2,3-диоксигеназу (IDO), IL-10, TGF- β , B7-H1, H3, H4. Выявлена субпопуляция макрофагов, поддерживающих раковые стволовые клетки, для них характерна экспрессия LL-37 и ISG-15 [50].

МАКРОФАГИ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ

В развитых странах мира 95% случаев смерти от солидных опухолей обусловлены метастазированием. Моноциты и макрофаги являются

необходимыми компонентами метастазирования, которые стимулируют неоангиогенез, экстравазацию клеток, их выживание и создают условия для устойчивого роста метастатических клеток в отдаленных сайтах [51]. Специфическое микроокружение в метастатических нишах состоит из макрофагов, эндотелиальных, мезенхимальных клеток-предшественниц, способствующих пролиферации опухолевых клеток и формированию макрометастазов. Макрофаги также участвуют в образовании метастатических ниш в первичной опухоли, которые хорошо распознаются при гистологическом исследовании и указывают на высокий метастатический потенциал опухоли, в частности при раке молочной железы у человека [52].

Ингибирование сигнального пути хемокинового рецептора CCR2 на макрофагах блокирует экстравазацию опухолевых клеток и ингибирует метастазирование [53]. Моноциты во вторичном сайте дифференцируются в CCR2⁺VEGFR1⁺Ly6C-F4/80⁺ ассоциированные с метастазами макрофаги (МММ). Удаление или ингибирование функции МММ популяции с использованием генетических и химических манипуляций препятствует метастазированию и росту вторичного опухолевого очага [53, 54]. Миелоидные клетки также способствуют обратному мезенхимально-эпителиальному переходу циркулирующих клеток опухоли, который необходим для заселения метастатической ниши опухолевыми клетками, и стимулируют их пролиферацию путем ингибирования TGF- β сигналинга в эпителиальных метастатических клетках [55].

Российские исследователи В.М. Перельмутер и В.Н. Манских высказали гипотезу о возможности образования более раннего звена метастазирования – так называемых прениш, которые еще не заселены опухолевыми клетками [56]. Прениша может формироваться в органах, богатых органоспецифическими макрофагами (легкие, печень, мозг и т.д.), где эндотелий имеет врожденную способность к интенсивному рекрутированию миелоидных клеток-предшественниц макрофагов, особенно в процессе воспаления, при этом создаются условия «почвы» для привлечения опухолевых клеток и развития макрометастазов. Полагают, что введение понятия «прениша» позволяет ликвидировать затруднения в создании концепции метастатических ниш, главным образом в связи с феноменом избирательной локализации метастазов в определенных органах (печень, легкие, костный мозг), сформулировать ряд предсказаний для эксперимен-

тальной проверки и указать путь для возможной профилактики метастазирования у части онкологических больных [56].

МАКРОФАГИ И ХИМИОТЕРАПИЯ

Химиотерапия рассматривается в качестве направляющего фактора клонального разнообразия опухоли и обеспечивает условия для вовлечения иммунной системы в цитотоксическую реакцию на опухолевые клетки. Эти условия создаются при использовании противоопухолевых препаратов, способных повреждать структуру ДНК опухолевых клеток, что приводит к иммуногенной гибели клеток опухоли за счет экспрессии на опухолевых клетках неоантигенов, возникающих при повреждении клеточной ДНК. К числу наиболее известных и широко используемых в настоящее время препаратов такого рода относятся cyclophosphamide, doxorubicin, epirubicin, idarubicin, mitoxantrone, oxaliplatin, bortezomib, а также радиотерапия [57].

В последние годы экспериментально выявлены и теоретически обоснованы феномены вовлечения иммунной системы в реализацию противоопухолевого эффекта цитостатической терапии при участии механизмов врожденного и адаптивного иммунитета. Нарушение функционирования иммунной системы может быть причиной снижения эффективности цитостатических воздействий. Модуляция иммунной системы цитостатическими агентами проявляется на уровне повышения антигенных свойств опухолевых клеток, что способствует их распознаванию иммунной системой; увеличения противоопухолевой активности эффекторов иммунной системы; удаления элементов, обладающих иммуносупрессорной активностью; а также системного влияния противоопухолевого лечения. Транзиторная системная лимфопения влечет за собой восстановление противоопухолевой активности вновь пришедших в циркуляцию лимфоцитов, еще не подвергшихся негативному влиянию опухолевых супрессорных факторов.

Понимание принципиально важной роли иммунной системы в определении эффективности противоопухолевой цитостатической терапии открывает перспективы по разработке новых терапевтических подходов для лечения злокачественных новообразований на основе сбалансированного синергического действия цитостатических агентов и инновационных иммуномодулирующих подходов. Однако нередки случаи, когда клетки иммунной системы могут

модифицировать эффективность химиотерапии в направлении опухолевой прогрессии. Ниже представлены данные о разном влиянии макрофагов на эффективность химиотерапии [58] (таблица).

Неоадьювантная химиотерапия (НАХТ) является традиционным предоперационным лечением для многих типов опухолей, включая РМЖ [59]. Однако рецидивы опухоли после такого лечения встречаются достаточно часто [60]. Исследования показали, что миелоидные клетки, в особенности ОАМ, как правило, аккумулируются в опухолях после химиотерапии либо после радиотерапии и вносят вклад в рецидивирование опухоли [61, 62]. Сопутствующие механизмы включают индуци-

рованную макрофагами супрессию Т-клеточного иммунитета, поддержание выживаемости опухолевых клеток и активацию ревазуляризации опухоли [62]. Усиление химиотерапевтического ответа путем удаления макрофагов при различных условиях дает основания для испытаний комбинированных подходов терапии. Химиотерапевтический препарат трабектедин оказывает цитотоксическое действие на моноциты и макрофаги, в эксперименте показана его противоопухолевая активность [63]. Антиангиогенная терапия в сочетании с удалением макрофагов блокирует метастазирование экспериментальных опухолей [64], что открывает перспективы комбинированного воздействия.

Т а б л и ц а

Взаимодействие макрофагов и химиотерапии: проопухолевое или противоопухолевое действие	
Механизм	Препарат
<i>Проопухолевое действие</i>	
Ошибка репарации тканей	Доксорубин
M2-подобная проопухолевая поляризация	Платина
Увеличение продукции CSF-1 и CCL2, M2-подобная проопухолевая поляризация, подавление CD8 ⁺ Т-клеточного противоопухолевого ответа	Паклитаксел
Ограничение адаптивного иммунитета	Гемцитабин+ 5-фторурацил
Хемопротекция опухолевых стволовых клеток макрофагами	
<i>Противоопухолевое действие</i>	
Рекрутирование миелоидных клеток, дифференцировка антигенпрезентирующих клеток и активация иммунного ответа	Доксорубин
Иммуногенная гибель опухолевых клеток	Доксорубин
Противоопухолевая M1-подобная поляризация макрофагов	СрG Anti-CSF-1R
Удаление супрессорных клеток миелоидного происхождения (myeloid-derived suppressor cells, MDSC)	Доксорубин Гемцитабин
Сокращение числа ОАМ	Трабектедин Anti-CSF-1 Anti-CCL2 и другие антитела к хемокинам
Антителозависимая цитотоксичность против опухолевых клеток или ингибция Т-регуляторных клеток	Anti-CD20 Anti-CTLA4

В то же время другими авторами было показано, что некоторые химиотерапевтические агенты, такие как доксорубин и циклофосфамид, активируют макрофаги для поддержания противоопухолевого ответа в моделях РМЖ и лейкемии [65]. Получены данные о том, что при аденокарциноме пищевода химиотерапия влияет на структуру распределения и фенотип ОАМ и может изменять характер связи макрофагов с определяющими клиническое течение параметрами, такими как лимфогенное метастазирование. Важно отметить, что химиотерапия индуцирует перераспределение и привлечение новых макрофагальных субпопуляций в опухо-

левую ткань [62, 66]. Однако пока не получены данные, объясняющие биологическую сущность корреляции субпопуляций макрофагов с клиническим течением заболевания после химиотерапии, в частности при РМЖ. Это связано с двумя принципиально важными феноменами, которые практически никогда не принимаются во внимание исследователями при построении корреляций макрофагальной инфильтрации и клинического течения: внутриопухолевой гетерогенностью (паренхиматозный компонент) и существенной гетерогенностью адаптивного опухолевого микроокружения (стромально-воспалительный компонент).

МАКРОФАГИ И ГЕТЕРОГЕННОСТЬ МИКРООКРУЖЕНИЯ

Внутриопухолевая гетерогенность – недавно охарактеризованный биологический феномен как результат клональной эволюции опухоли в естественных условиях или при химиотерапии, вносит решающий вклад в формирование стромально-воспалительного микроокружения. В совместных исследованиях сотрудников НИИ онкологии Томского НИМЦ показаны различия характера распределения и фенотипического состава клеток воспалительного инфильтрата вокруг разных морфологических структур опухоли молочной железы. Морфологические структуры на основании их генетической и экспрессионной разнородности, установленной авторами, рассматриваются как функционально обособленные популяции опухолевых клеток, обладающих разным метастатическим потенциалом, в обеспечение которого очевидно могут вносить вклад и компоненты микроокружения [67–70].

Высокая пластичность макрофагов обеспечивает возможность их функционального программирования под влиянием факторов микроокружения. Необходимо принимать во внимание гетерогенность микроокружения, а, следовательно, его разный макрофаг-полярирующий потенциал.

Нами проведены исследования характера распределения и состава макрофагальной инфильтрации в различных компартментах опухоли молочной железы. Оценивали наличие цитоплазматической экспрессии CD68 и стабилина 1 (stabilin 1) в клетках воспалительного инфильтрата в разных сегментах опухоли молочной железы: 1) в участках с нежнволокнистой стромой; 2) в участках с грубоволокнистой стромой; 3) в областях с так называемым максимальным стромально-паренхиматозным взаимодействием, где отдельные опухолевые клетки, короткие тяжи и группы опухолевых клеток располагались в нежнволокнистой строме; 4) среди паренхиматозных элементов; 5) в просветах протоковых опухолевых структур [71].

Рецептор CD68 присущ практически всем популяциям макрофагов, участвует в фагоцитарной активности тканевых макрофагов, во внутриклеточном лизосомальном метаболизме, внеклеточных взаимодействиях «клетка – клетка» и «клетка – патоген», связывается с лектинами и селектинами, что позволяет макрофагу оставаться в определенном участке ткани [27, 32, 71, 72]. Молекула стабилина экспрессируется на

альтернативно активированных макрофагах M2, осуществляет клиренс, участвует в ангиогенезе, хоминге лимфоцитов, адгезии клеток [37, 71, 72].

Важными маркерами макрофагов рассматриваются хитиназо-подобные белки (ХПБ), которые продуцируются несколькими типами клеток и сочетают в себе свойства цитокинов и факторов роста [73, 74]. Уровень циркулирующих ХПБ возрастает при воспалительных заболеваниях и различных видах опухолей [75, 76]. Способность ХПБ действовать в качестве факторов роста и индуцировать пролиферацию и миграцию клеток-мишеней делает их привлекательными объектами для противоопухолевой терапии. Хитиназо-подобные белки YKL-39, YKL-40, SI-CLP (chitinase-like proteins, содержат Glyco_18-домен) не обладают ферментативной активностью. Недавно идентифицированный взаимодействующий со стабилином 1 хитиназо-подобный протеин SI-CLP (связанный со стабилином 1 CLP), как оказалось, сверхэкспрессирован в альтернативно активированных макрофагах и секретируется с участием лизосом [77]. ХПБ – новый класс секретируемых лектинов, которые сочетают в себе свойства цитокинов и факторов роста и опосредуют межклеточные взаимодействия, являются маркерами хронического воспаления и связанных с ним патологических процессов.

Согласно полученным нами результатам, CD68⁺-клетки (макрофаги) детектировались в нежнволокнистой строме с наибольшей частотой, в то время как в участках грубоволокнистой стромы они встречались втрое реже. Конфокальная микроскопия идентифицировала три типа внутриопухолевых макрофагов: CD68⁺/stabilin-1⁻; CD68⁺/stabilin-1⁺ (более половины всех случаев); CD68⁻/stabilin-1⁺, что указывает на гетерогенность субпопуляций макрофагов в опухоли.

Состояние лимфатической системы – наиболее важный прогностический фактор для пациентов, получавших НАХТ [78]. Нами обосновано, что НАХТ при РМЖ изменяет ассоциацию пространственно-разграниченных субпопуляций ОАМ с лимфогенным метастазированием. В частности было показано, что после НАХТ CD68⁺, но не стабилин-позитивные макрофаги, среди паренхиматозных элементов обратно коррелируют с лимфогенным метастазированием. Однако в участках с грубоволокнистой стромой как CD68⁺, так и стабилин-1-позитивные макрофаги положительно коррелируют с количеством лимфатических узлов, вовлеченных в метастазирование. Содержание CD68-позитивных макрофагов

в грубоволокнистой строме коррелировало с эффективностью НАХТ. Отмечено, что увеличение количества CD68⁺ ОАМ в протоковых структурах оказывает протективный эффект в отношении лимфогенного метастазирования [71, 72]. Все эти данные указывают на то, что функция ОАМ у больных после предоперационной терапии зависит от места их локализации и соответственно влияния локального микроокружения, которое играет существенную роль в направлении поляризации макрофагов в проопухолевый или противоопухолевый фенотип [72]. Подобные данные были получены A. Casazza et al. (2013), которые показали, что локализация ОАМ в нормоксической области опухоли по сравнению с их инфильтрацией гипоксического ареала может быть использована в качестве терапии, направленной на изменение проопухолевого фенотипа макрофагов с достижением противоопухолевого эффекта [79].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важным выводом феномена опухолевой гетерогенности является то, что внутри опухоли клетки различны по биологическим свойствам, к ним не может быть применима одинаковая терапия. Всякий агент, направленный на какой-либо один механизм-мишень и удаляющий клетки данного фенотипа, приводит к экспансии резистентных к нему клонов и прогрессированию опухоли, сводя эффективность воздействия к нулю. Новые подходы видят цель противоопухолевого лечения не в элиминации каждой опухолевой клетки, а в остановке их пролиферации и поддержании равновесия между резистентными и чувствительными клонами, обеспечении условий для дремлющего состояния опухоли [8].

В этом аспекте трудно переоценить значимость микроокружения опухоли, состоящего из стромально-воспалительных компонентов, открывающего возможности функционального перепрограммирования патогенетически значимых его представителей, в числе которых первоочередной мишенью рассматриваются макрофаги, обладающие высоким пластическим потенциалом и широчайшим спектром регуляторной активности наряду со способностью к прямому цитотоксическому действию на опухолевые клетки.

Функциональная «переориентировка» макрофагов в противоопухолевый фенотип запускает каскад событий, приводящих к нарушению экосистемы, способствующей опухолевому росту, в результате чего прекращается пролиферация клеток опухоли, блокируется их метастатиче-

ский потенциал и могут быть созданы условия для достижения своеобразного паритета между опухолью и организмом хозяина, приводящие к остановке прогрессии заболевания.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №14-15-00350.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Nowell P.C. The clonal evolution of tumor cell populations // *Science*. 1976; 194 (4260): 23–28. DOI: 10.1126/science.959840.
2. Greaves M., Maley C.C. Clonal evolution in cancer // *Nature*. 2012; 481 (7381): 306–313. DOI: 10.1038/nature10762.
3. Bhatia S., Frangioni J.V., Hoffman R.M., Iafrate A.J., Polyak K. The challenges posed by cancer heterogeneity // *Nat. Biotechnol.* 2012; 30 (7): 604–610. DOI: 10.1038/nbt.2294.
4. Mantovani A., Germano G., Marchesi F., Locatelli M., Biswas S.K. Cancer-promoted tumor-associated macrophages: new vistas and open questions // *Eur. J. Immunol.* 2011; 41 (9): 2522–2525. DOI:10.1002/eji.201141894.
5. Pollard J.W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis // *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4: 71–78. DOI: 10.1038/nrc1256.
6. Qian B.Z., Pollard J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis // *Cell*. 2010; 141: 39–51. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.014.
7. Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 // *Int. J. Cancer*. 2010; 127 (12): 2893–2917. DOI: 10.1002/ijc.25516.
8. Thomas F., Fisher D., Fort P. et al. Applying ecological and evolutionary theory to cancer: a long and winding road // *Evol. Appl.* 2013; 6 (1): 1–10. DOI: 10.1111/eva.12021.
9. Keogh B. Era of Personalized Medicine May Herald End of Soaring Cancer Costs // *Oxford J. Medicine & Health JNCI. J. Natl. Cancer Inst.* 2012; 104 (1): 12–17.
10. Напалков Н.П. Рак и демографический переход // *Вопросы онкологии*. 2004; 50 (2): 127–144.
11. Napalkov N.P. Rak i demographicheskii perekhod [Cancer and demographic transition] // *Voprosy onkologii*. 2004; 50 (2): 127–144 (in Russian).
12. Кжышкова Ю.Г., Митрофанова И.В., Завьялова М.В., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Опухолеассоциированные макрофаги. М.: Наука, 2017: 224.

- Kzhyshkowska J.G., Mitrofanova I.V., Zavyalova M.V., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V. Opucholeassocirovannye makrofagi [Tumor-associated macrophages]. Moscow: Nauka Publ.: 224.
12. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell*. 2011; 144: 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
 13. Loeb L.A. Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting // *Nat. Rev. Cancer*. 2011; 11 (6): 450–57. DOI: 10.1038/nrc3063.
 14. Weisenberger D.J., Siegmund K.D., Campan M., Young J., Long T.I., Faasse M.A. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer // *Nat. Genet.* 2006; 38 (7): 787–793. DOI: 10.1038/ng1834.
 15. Gatenby R.A., Silva A.S., Gillies R.J., Frieden B.R. Adaptive Therapy // *Cancer Res.* 2009; 69 (11): 4894–4903. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3658.
 16. Galon J., Mlecnik B., Bindea G., Angell H.K., Berger A., Lagorce C. Towards the introduction of the ‘Immunoscore’ in the classification of malignant tumours // *J. Pathol.* 2014; 232 (2): 199–209. DOI: 10.1002/path.4287.
 17. Gilbert L.A., Hemann M.T. DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche // *Cell*. 2010; 143 (3): 355–366. DOI: 10.1016/j.cell.2010.09.043.
 18. Yang J., Li X., Liu X., Liu Y. The role of tumor-associated macrophages in breast carcinoma invasion and metastasis // *Int. J. Clin. Exp. Patol.* 2015; 8 (6): 6656–6664.
 19. Place A.E., Jin Huh S., Polyak K. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment // *Breast Cancer Res.* 2011. 13 (6): 227. DOI: 10.1186/bcr2912.
 20. Pollard J.W. 2008. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer // *J. Leukoc. Biol.* 2008; 84 (3): 623–630. DOI: 10.1189/jlb.1107762.
 21. Correia A.L., Bissell M.J. The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance // *Drug. Resist. Updat.* 2012; 15 (0): 39–49. DOI: 10.1016/j.drug.2012.01.006.
 22. Nakasone E.S., Askautrud H.A., Kees T. et al. Imaging tumor-stroma interactions during chemotherapy reveals contributions of the microenvironment to resistance // *Cancer Cell*. 2012. 21 (4): 488–503. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.02.017.
 23. Pontiggia O., Sampayo R., Raffo D. et al. The tumor microenvironment modulates tamoxifen resistance in breast cancer: a role for soluble stromal factors and fibronectin through $\beta 1$ integrin // *Breast. Cancer Res. Treat.* 2012; 133(2): 459–471. DOI: 10.1007/s10549-011-1766-x.
 24. Bissell M.J., Hines W.C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression // *Nat. Med.* 2011. 17 (3): 320–329. DOI: 10.1038/nm.2328.
 25. Bissell M.J., Radisky D. Putting tumours in context // *Nat. Rev. Cancer*. 2001; 1 (1): 46–54. DOI: 10.1038/35094059.
 26. Noy R., Pollard J.W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy // *Immunity*. 2014; 41: 49–61. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.010.
 27. Riabov V., Gudima A., Wang N., Mickley A., Orekhov A., Kzhyshkowska J., Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis // *Front. Physiol.* 2014; 5: 75. DOI: 10.3389/fphys.2014.00075.
 28. Obeid E., Nanda R., Fu Y.X., Olopade O.I. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression // *Int. J. Oncol.* 2013; 43 (1): 5–12. DOI: 10.3892/ijo.2013.1938.
 29. Tsou C.L., Peters W., Si Y., Slaymaker S., Aslanian A.M., Weisberg S.P., Mack M., Charo I.F. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites // *J. Clin. Invest.* 2007; 117 (4): 902–909. DOI: 10.1172/JCI29919.
 30. Allavena P., Sica A., Garlanda C., Mantovani A. The yin-yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance // *Immunol. Rev.* 2008; 222: 155–161. DOI:10.1111/j.1600-065X.2008.00607.x.
 31. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm // *J. Immunol.* 2000; 164 (12): 6166–6173.
 32. Murray P.J., Allen J.E., Biswas S.K., Fisher E.A., Gilroy D.W., Goerdt S., Gordon S., Hamilton J.A., Ivashkiv L.B., Lawrence T. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines // *Immunity*. 2014; 41: 14–20. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.
 33. Wang R., Zhang J., Chen S., Lu M., Luo X., Yao S. et al. Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression // *Lung Cancer*. 2011; 74 (2): 188–196. DOI: 10.1016/j.lungcan.2011.04.009.
 34. Franklin R.A., Liao W., Sarkar A., Kim M.V., Bivona M.R., Liu K., Pamer E.G., Li M.O. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages // *Science*. 2014; 344 (6186): 921–925. DOI: 10.1126/science.1252510.
 35. Laoui D., Movahedi K., Van Overmeire E., Van den Bossche J., Schouppe E., Mommer C., Nikolaou A., Morias Y., De Baetselier P., Van Ginderachter J.A. Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions // *Int. J. Dev. Biol.* 2011; 55: 861–867. DOI: 10.1387/ijdb.113371dl.
 36. Fu X.T., Dai Z., Song K., Zhang Z.J., Zhou Z.J., Zhou S.L., Zhao Y.M., Xiao Y.S., Sun Q.M., Ding Z.B., Fan J. Macrophage-secreted IL-8 induces epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells by activating the JAK2/STAT3/Snail pathway // *Int. J. Oncol.* 2015; 46 (2): 587–596. DOI: 10.3892/ijo.2014.2761.
 37. Chitu V., Stanley E.R. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation // *Curr. Opin. Immunol.* 2006; 18 (1): 39–48. DOI: 10.1016/j.coi.2005.11.006.
 38. Smith H.O., Stephens N.D., Qualls C.R., Fligelman T., Wang T., Lin C.Y., Burton E., Griffith J.K., Pollard J.W. The clinical significance of inflammatory cytokines in primary cell culture in endometrial carcinoma // *Mol. Oncol.* 2013; 7: 41–54. DOI: 10.1016/j.molonc.2012.07.002.

39. Wyckoff J.B., Wang Y., Lin E.Y., Li J.F., Goswami S., Stanley E.R., Segall J.E., Pollard J.W., Condeelis J. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors // *Cancer. Res.* 2007; 67: 2649–2656. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1823.
40. Abraham D., Zins K., Sioud M., Lucas T., Schäfer R., Stanley E.R., Aharinejad S. Stromal cell-derived CSF-1 blockade prolongs xenograft survival of CSF-1-negative neuroblastoma // *Int. J. Cancer.* 2010; 126: 1339–1352. DOI: 10.1002/ijc.24859.
41. Linde N., Lederle W., Depner S., van Rooijen N., Gutschalk C.M., Mueller M.M. Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and alternative activation of macrophages // *J. Pathol.* 2012; 227:17–28. DOI: 10.1002/path.3989.
42. Brown D., Trowsdale J., Allen R. The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease // *Tissue antigens.* 2004; 64: 215–225. DOI: 10.1111/j.0001-2815.2004.00290.x.
43. Loke P., Allison J.P. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100: 5336–5341. DOI: 10.1073/pnas.0931259100.
44. Belai E.B., de Oliveira C.E., Gasparoto T.H., Ramos R.N., Torres S.A., Garlet G.P., Cavassani K.A., Silva J.S., Campanelli A.P. PD-1 blockage delays murine squamous cell carcinoma development // *Carcinogenesis.* 2014; 35: 424–431. DOI: 10.1093/carcin/bgt305.
45. Simpson T.R., Li F., Montalvo-Ortiz W., Sepulveda M.A., Bergerhoff K., Arce F., Roddie C., Henry J.Y., Yagita H., Wolchok J.D., Peggs K.S., Ravetch J.V., Allison J.P., Quezada S.A. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells codefines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma // *J. Exp. Med.* 2013; 210: 1695–1710. DOI: 10.1084/jem.20130579.
46. Oh S.A., Li M.O. TGF- β : guardian of T cell function // *J. Immunol.* 2013; 191 (8): 3973–3979. DOI: 10.4049/jimmunol.1301843.
47. Ng T.H., Britton G.J., Hill E.V., Verhagen J., Burton B.R., Wraith D.C. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10 // *Front. Immunol.* 2013; 4: 129. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00129.
48. Adeegbe D.O., Nishikawa H. Natural and induced T regulatory cells in cancer // *Frontiers in immunology.* 2013; 4: 190. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00190.
49. Gabrilovich D.I., Ostrand-Rosenberg S., Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumors. Nature reviews // *Immunology.* 2012; 12: 253–268. DOI: 10.1038/nri3175.
50. Sainz J.B., Martín B., Tatari M., Heeschen C., Guerra S., ISG15 is a critical microenvironmental factor for pancreatic cancer stem cells // *Cancer Research.* 2014; 74 (24): 7309–7320, 2014. DOI: 10.18632/oncotarget.9383.
51. Joyce J.A., Pollard J.W. Microenvironmental regulation of metastasis // *Nature reviews. Cancer.* 2009; 9: 239–252. DOI: 10.1038/nrc2618.
52. Rohan T.E., Xue X., Lin H.M., D'Alfonso T.M., Ginter P.S., Oktay M.H., Robinson B.D., Ginsberg M., Gertler F.B., Glass A.G., Sparano J.A., Condeelis J.S., Jones J.G. Tumor microenvironment of metastasis and risk of distant metastasis of breast cancer // *J. Natl. Cancer Inst.* 2014; 106 (8): dju136. DOI: 10.1093/jnci/dju136.
53. Qian B.Z., Li J., Zhang H. et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis // *Nature.* 2011; 475 (7355): 222–5. DOI: 10.1038/nature10138.
54. Qian B., Deng Y., Im J.H., Muschel R.J., Zou Y., Li J., Lang R.A., Pollard J.W. A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth // *PLoS one.* 2009; 4: e6562. DOI: 10.1371/journal.pone.0006562.
55. Gao D., Vahdat L.T., Wong S., Chang J.C., Mittal V. Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer // *Cancer. Res.* 2012; 72 (19): 4883–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1223.
56. Перельмутер В.М., Манских В.Н. Прениша как отсутствующее звено концепции метастатических ниш, объясняющее избирательное метастазирование злокачественных опухолей и форму метастатической болезни // *Биохимия.* 2012; 77 (1): 130–139.
- Perelmuter V.M., Manskih V.N. Prenisha kak otsutstvuyushchee zveno koncepcii metastaticheskikh nish, ob'yasnyayushchee izbiratelnoe metastazirovanie zlokachestvennykh opukholei i formu metastaticheskoi bolezni [Preniche as missing link of the metastatic niche concept explaining organ-preferential metastasis of malignant tumors and the type of metastatic disease] // *Biokhimiya – Biochemistry.* 2012; 77 (1): 130–139 (in Russian).
57. Zitvogel L., Galluzzi L., Smyth M.J., Kroemer G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance // *Immunity.* 2013; 39 (1): 74–88. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.06.014.
58. Bracci L., Schiavoni G., Sistigu A., Belardelli F. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer // *Cell. Death. and Differentiation.* 2014. 21: 15–25. DOI:10.1038/cdd.2013.67.
59. Gampenrieder S.P., Rinnerthaler G., Greil R. Neoadjuvant chemotherapy and targeted therapy in breast cancer: past, present, and future // *J. Oncol.* 2013; 2013:732047. DOI: 10.1155/2013/732047.
60. Thompson A.M., Moulder-Thompson S.L. 2012. Neoadjuvant treatment of breast cancer // *Ann. Oncol.* 23 Suppl. 10, x231. DOI: 10.1093/annonc/mds324.
61. De Palma M., Lewis C.E. Cancer: Macrophages limit chemotherapy // *Nature.* 2011; 472 (7343): 303–304. DOI: 10.1038/472303a.
62. Hughes R., Qian B.Z., Rowan C., Muthana M., Keklikoglou I., Olson O.C., Tazzyman S., Danson S., Addison C., Clemons M., Gonzalez-Angulo A.M., Joyce J.A., De Palma M., Pollard J.W., Lewis C.E. Perivascular M2

- macrophages stimulate tumor relapse after chemotherapy // *Cancer Res.* 2015; 75 (17): 3479–3491. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3587.
63. Germano G., Frapolli R., Belgiovine C., Anselmo A., Pesce S., Liguori M., Erba E., Ubaldi S., Zucchetti M., Pasqualini F. Role of macrophage targeting in the anti-tumor activity of trabectedin // *Cancer Cell.* 2013; 23: 249–262. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.01.008.
 64. Srivastava K., Hu J., Korn C., Savant S., Teichert M., Kapel S.S., Jugold M., Besemfelder E., Thomas M., Pasparakis M., Augustin H.G. Postsurgical adjuvant tumor therapy by combining anti-angiopoietin-2 and metronomic chemotherapy limits metastatic growth // *Cancer Cell.* 2014; 26: 880–895. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.11.005.
 65. Mantovani A., Allavena P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages // *J. Exp. Med.* 2015; 212 (4): 435–445. DOI: 10.1084/jem.20150295.
 66. De Palma, M., Lewis C.E. 2013. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies // *Cancer Cell.* 23: 277–286. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.02.013.
 67. Zavyalova M.V., Denisov E.V., Tashireva L.A., Gerashchenko T.S., Litviakov N.V., Skryabin N.A., Vtorushin S.V., Telegina N.S., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Phenotypic drift as a cause for intratumoral morphological heterogeneity of invasive ductal breast carcinoma not otherwise specified // *Biores. Open Access.* 2013; 2 (2): 148–54. DOI: 10.1089/biores.2012.0278.
 68. Tashireva L.A., Denisov E.V., Gerashchenko T.S., Pautova D.N., Buldakov M.A., Zavyalova M.V., Kzhyshkowska J., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Intratumoral heterogeneity of macrophages and fibroblasts in breast cancer is associated with the morphological diversity of tumor cells and contributes to lymph node metastasis // *Immunobiology.* 2017; 222 (4): 631–640. DOI: 10.1016/j.imbio.2016.11.012.
 69. Denisov E.V., Skryabin N.A., Gerashchenko T.S., Tashireva L.A., Wilhelm J., Buldakov M.A., Sleptcov A.A., Lebedev I.N., Vtorushin S.V., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. Clinically relevant morphological structures in breast cancer represent transcriptionally distinct tumor cell populations with varied degrees of epithelial-mesenchymal transition and CD44+CD24- stemness // *Oncotarget.* 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.18022.
 70. Gerashchenko T.S., Denisov E.V., Litviakov N.V., Zavyalova M.V., Vtorushin S.V., Tsyganov M.M., Perelmuter V.M., Cherdyntseva N.V. Intratumor heterogeneity: nature and biological significance // *Biochemistry (Mosc).* 2013; 78: 1201. DOI: 10.1134/S0006297913110011.
 71. Buldakov M., Zavyalova M., Krakhmal N., Telegina N., Vtorushin S., Mitrofanova I., Riabov V., Yin S., Song B., Cherdyntseva N., Kzhyshkowska J. CD68+, but not stabilin-1+ tumor associated macrophages in gaps of ductal tumor structures negatively correlate with the lymphatic metastasis in human breast cancer // *Immunobiology.* 2015; 222 (1): 31–38. DOI: 10.1016/j.imbio.2015.09.011.
 72. Mitrofanova I., Zavyalova M., Telegina N., Buldakov M., Riabov V., Cherdyntseva N., Kzhyshkowska J. Tumor-associated macrophages in human breast cancer parenchyma negatively correlate with lymphatic metastasis after neoadjuvant chemotherapy // *Immunobiology.* 2017; 222 (1): 101–109. DOI: 10.1016/j.imbio.2016.08.001.
 73. Shao R., Hamel K., Petersen L., Cao Q.J., Arenas R.B., Bigelow C., Bentley B., Yan W. YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis // *Oncogene.* 2009; 28 (50): 4456–68. DOI: 10.1038/onc.2009.292.
 74. Kzhyshkowska J., Yin S., Liu T., Riabov V., Mitrofanova I. Role of chitinase-like proteins in cancer // *Biol. Chem.* 2016; 397 (3): 231–247. DOI: 10.1515/hsz-2015-0269.
 75. Kzhyshkowska J., Gratchev A., Goerdts S. Human chitinases and chitinase-like proteins as indicators for inflammation and cancer // *Biomark Insights.* 2007; 2: 128–246.
 76. Biggar R.J., Johansen J.S., Smedby K.E., Rostgaard K., Chang E.T., Adami H.O., Glimelius B., Molin D., Hamilton-Dutoit S., Melbye M., Hjalgrim H. Serum YKL-40 and interleukin 6 levels in Hodgkin lymphoma // *Clin. Cancer Res.* 2008; 14 (21): 6974–6978. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1026.
 77. Kzhyshkowska J., Mamidi S., Gratchev A., Kremmer E., Schmuttermaier C., Krusell L., Haus G., Utikal J., Schledzewski K., Scholtze J., Goerdts S. Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway // *Blood.* 2006; 107: 3221–3228. DOI: 10.1182/blood-2005-07-2843.
 78. Faneyte I.F., Schrama J.G., Peterse J.L., Remijnse P.L., Rodenhuis S., van de Vijver M.J. Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: predictive markers and relation with outcome // *Br. J. Cancer* 2003; 88 (3): 406–412. DOI: 10.1038/sj.bjc.6600749.
 79. Casazza A., Laoui D., Wenes M., Rizzolio S., Bassani N., Mambretti M., Deschoemaeker S., Van Ginderachter J.A., Tamagnone L., Mazzone M. Impeding macrophage entry into hypoxic tumor areas by Sema3A/Nrp1 signaling blockade inhibits angiogenesis and restores antitumor immunity // *Cancer Cell.* 2013; 24: 695–709. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.11.007>.

Поступила в редакцию 19.07.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Чердынцева Надежда Викторовна, д-р биол. наук, профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАН; вед. науч. сотрудник, лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, г. Томск.

Митрофанова Ирина Валерьевна, мл. науч. сотрудник, лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ; аспирант, Томский НИМЦ РАН, г. Томск.

Булдаков Михаил Александрович, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория молекулярной онкологии и иммунологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАН; ст. науч. сотрудник, лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, г. Томск.

Стахеева Марина Николаевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория молекулярной онкологии и иммунологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАН, г. Томск.

Патышева Марина Ренатовна, врач-лаборант, лаборатория молекулярной онкологии и иммунологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАН, г. Томск.

Завьялова Марина Викторовна, д-р мед. наук, профессор, вед. науч. сотрудник, НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАН; зав. кафедрой патологической анатомии, СибГМУ, г. Томск.

Кжышкowska Юлия Георгиевна, д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины, НИ ТГУ, г. Томск; зав. отделом врожденного иммунитета и толерантности, Институт трансфузионной медицины и иммунологии, г. Маннхайм, Университет Гейдельберга, Германия.

(✉) Чердынцева Надежда Викторовна, e-mail: nvch@tnimc.ru.

УДК 615-006.04-097:612.017.1

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-61-74

For citation: Cherdyntseva N.V., Mitrofanova I.V., Buldakov M.A., Stakheeva M.N., Patysheva M.R., Zavjalova M.V., Kzhyshkowska J.G. Macrophages and tumor progression: on the way to macrophage-specific therapy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 61–74.

Macrophages and tumor progression: on the way to macrophage-specific therapy

Cherdyntseva N.V.^{1,2}, Mitrofanova I.V.^{1,2}, Buldakov M.A.^{1,2}, Stakheeva M.N.¹, Patysheva M.R.¹, Zavjalova M.V.^{1,4}, Kzhyshkowska J.G.^{2,3}

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (NRMC) of the Russian Academy of Sciences (RAS) 5, Per. Kooperativny, Tomsk, 634050, Russian Federation

² National Research Tomsk State University (NR TSU) 36, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

³ University of Heidelberg 1-3, Theodor-Kutzer-Ufer, Mannheim, 68167, Germany

⁴ Siberian Medical State University 2, Moskov Tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

According to the current paradigm proposed by Piter Novell [1], carcinogenesis is a process of clonal evolution in which consequent cycles of clonal selection in the adaptive tissue microenvironment give rise to tumors with a variety of genetic and other molecular changes determining the biological behavior of each individual tumor. Selection of clones with different properties provides heterogeneity of cancer cells within one tumor and thus results in a low effectiveness of chemotherapy.

On the average, only 40–60% of cancer patients respond to chemotherapy, and even in the case of complete regression, there is a high probability of tumor recurrence [2, 3]. Increasing the effectiveness of solid tumor therapy and reducing the possibility of recurrence requires not only the use of optimal individual schemes of therapy for each patient, but also the development of combined approaches aimed at both the destruction of tumor cells and antitumor programming of the microenvironment, where immune cells plays a prominent regulatory role. The key cells of the immune system that determine the relationship between tumor cells and the microenvironment, from early stages of tumor growth, including the regulation of neoangiogenesis,

and to terminal stage of dissemination of malignant process, are tumor-associated macrophages (TAM) [4–6]. Identification of the pathways responsible for the tumor-supporting function of macrophages makes it possible to develop therapeutic approaches combining chemotherapy with the macrophage blocking strategy. Inhibition of macrophage infiltration into tumor, their removal with anti-macrophagal agents, and switching off the function of the macrophage colony-stimulating factor can be the macrophage blocking tools. Approaches of simultaneous alteration of cancer stem cells and TAM to abolish chemoresistance and inhibit tumor progression are promising. Strategies for reprogramming of macrophages to switch off towards the antitumor phenotype are developing.

Thus, an extremely wide range of regulatory and effector activity and high functional plasticity of macrophages promise the development of macrophage-targeted therapeutic agents to modulate relationships between tumor and microenvironment to prevent the tumor progression.

Key words: tumor associated macrophages, metastasing, chemotherapy, tumor heterogeneity, chitinase like proteins, macrophage reprogramming.

Received July 19.2017

Accepted November 08.2017

Cherdyntseva Nadezhda V., DBSc, Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Molecular Oncology and Immunology Laboratory, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC of the RAS; Senior Researcher, Laboratory Translational Cellular and Molecular Biomedicine, NR TSU, Tomsk, Russian Federation.

Mitrofanova Irina V., Junior Researcher, Laboratory of Translational Cellular and Molecular Biomedicine, NR TSU; Postgraduate Student, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC of the RAS, Tomsk, Russian Federation.

Buldaikov Mikhail A., PhD, Molecular Oncology and Immunology Laboratory, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC of the RAS; Senior Researcher, Laboratory Translational Cellular and Molecular Biomedicine, NR TSU, Tomsk, Russian Federation.

Stakheyeva Marina N., DM, Molecular Oncology and Immunology Laboratory, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC of the RAS, Tomsk, Russian Federation.

Patysheva Marina R., Molecular Oncology and Immunology Laboratory, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC of the RAS, Tomsk, Russian Federation.

Zavjalova Marina V., DM, Professor, Senior Researcher, Overall and Molecular Pathology Department, Cancer Research Institute, Tomsk NRMC of the RAS; Head of Pathological Anatomy Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Kzhyshkowska Julia G., DBSc, Professor, Head of the Laboratory of Translational Cellular and Molecular Biomedicine, NR TSU, Russian Federation; Head of Department of Innate Immunity and Tolerance, Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany.

(✉) **Cherdyntseva Nadezhda V.**, e-mail: nvch@tnimc.ru.

УДК 616-018.2

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-75-85

Для цитирования: Шкурупий В.А., Ким Л.Б., Ковнер А.В., Черданцева Л.А. Соединительная ткань и проблемы ее патологических состояний. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 75–85.

Соединительная ткань и проблемы ее патологических состояний

Шкурупий В.А.^{1,2}, Ким Л.Б.¹, Ковнер А.В.¹, Черданцева Л.А.¹

¹ Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины (НИИЭКМ) Россия, 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² Новосибирский государственный медицинский университет Россия, 630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

РЕЗЮМЕ

Статья носит обзорный дискуссионный характер, посвящена проблемам физиологии и патологии системы соединительной ткани, ее взаимодействиям с системой мононуклеарных фагоцитов (СМФ) в инициации и реализации процессов фиброобразования. Изложен и аргументован собственными данными и результатами исследований иных авторов взгляд на фибротические состояния как на «гипертрофированную» неспецифическую реакцию организма, направленную на сохранение гомеостаза, в которой иницирующую роль играет патологическая (по масштабам и продолжительности проявлений) активация клеток СМФ как результат эндоцитоза ими биосовместимых факторов различной природы, сопряженный с неспецифической активацией экспрессии, синтеза и секреции ими лизосомальных ферментов и ростовых факторов.

Приведены собственные данные, аргументирующие и иллюстрирующие эти положения результатами модуляции функционального состояния макрофагов и фибробластических клеток, профилактики и коррекции фибротических процессов при различных патологических состояниях в эксперименте.

Ключевые слова: соединительная ткань, фиброз, внеклеточный матрикс, макрофаги, фибробласты.

Соединительная ткань, включающая внеклеточный матрикс, резидентные и транзиторные клеточные элементы, наряду с регуляторными системами организма, объединяет различные органы в полифункциональную саморегулирующуюся суперсистему. Вместе с тем в этой системе происходят различные недостаточно изученные, но часто встречающиеся патологические процессы, которые принято обозначать терминами: склероз, фиброз, цирроз, келоидный рубец. По-видимому, они являются взаимосвязанными патологическими состояниями соединительной ткани, но понимание генеза этих процессов со

временем не становится более ясным. Эти процессы рассматривают как осложнение ряда заболеваний различной этиологии на разных этапах их патогенеза, для которых характерен феномен активации клеток системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ) и клеток фибробластического ряда. Они привлекают внимание в связи с тяжестью проявлений у пациентов, прогрессивностью течения, сложностью их профилактики и лечения.

Часть из них отнесена к самостоятельным нозологиям, классифицированным по этиопатогенетическим признакам. Термином «склероз» обозначают патологический процесс, при котором избыточное образование соединительной ткани сопровождается ее уплотнением [1]. Что

✉ Шкурупий Вячеслав Алексеевич, e-mail: sck@centercem.ru.

касается фиброза, то, согласно общепринятым представлениям, это избыточное образование соединительной ткани в местах ее гистоанатомического расположения в норме, либо вне таковых. При этом на ранних этапах формирования фиброза структура коллагеновых волокон сохранена. Развитие фиброза чаще связывают с процессами гибели клеток механизмом некроза, последующего воспаления и его репаративной фазой. В современной литературе, однако, не существует однозначного разграничения понятий «склероз» и «фиброз». Но в определениях этих процессов есть своего рода неопределенность. Не ясно, что такое «уплотнение» и «избыточное образование» соединительной ткани, и какова их мера? Можно полагать, что мера – это степень уменьшения (изменения) функций органов и тканей, подверженных этому и упомянутым выше состояниям соединительной ткани в репаративной фазе воспаления (так называемой неполноценной регенерации), либо после его завершения. Но для отнесения этого процесса к репаративной регенерации следует определиться – какова функциональная роль вновь сформированной соединительной ткани? Например, в локусе трансмурального инфаркта миокарда в динамике репаративного (заместительного) фиброза. В полной мере этот вопрос актуален и при подобных ситуациях в других органах. Следует отметить, что обсуждаемая проблема, видимо, не касается утраты субклеточных структур путем аутофагоцитоза. Не доказана также прямая связь утраты дифференцированных клеток механизмом апоптоза с процессами их «заместительного» фиброза – неполноценной репаративной регенерацией, возможно, в связи с методическими трудностями верификации этих процессов *in vivo*.

При так называемых постдеструктивных заместительных фиброзах причинно-следственные отношения между процессами повреждения и фиброзированию (неполноценной регенерацией) кажутся логично связанными. В частности, при инфаркте миокарда некроз кардиомиоцитов сопровождается изменением содержания компонентов внеклеточного матрикса, участвующих в формировании рубца: фибронектина [2], гликозаминогликанов [3] в зависимости от размеров очага некроза и гидроксипролина (маркера коллагена) в зависимости от возраста пациентов [4]. С первых дней заболевания отмечается повышение концентрации аминокислотного пептида проколлагена III типа – маркера синтеза коллагена III типа [5]. Вместе с тем имеются данные

о том, что процессы фиброзирования органов могут развиваться одновременно с процессами деструкции, но не в этих локусах. В них фиброзная ткань формируется уже после прекращения действия повреждающего фактора, то есть как заместительный фиброз. Так, например, согласно нашим наблюдениям, ранний фиброз и некрозы развивались в легких мышей параллельно после их инфицирования вирусом гриппа птиц А/Н5N1 [6, 7]. Особенно это было выражено в лимфоидных органах у одних и тех же животных [8]. Подобную закономерность наблюдали также в легких после инфицирования мышей вирусами гриппа А/Н1N1 (проявления раннего пневмофиброза) [9, 10].

Однако не всегда процессы фиброзирования развиваются в связи с деструкцией клеток и тканей. Так, ранее нами было показано, что процессы фиброзирования начинают формироваться задолго до развития процессов деструкции как в структурах, которые не принято относить к органам и тканям (туберкулезные гранулемы), так и в паренхиме органов [11–13]. На модели генерализованного БЦЖ-гранулематоза у мышей признаки фиброзирования органов обнаруживали уже на 3-и сут после инфицирования. В этот период признаков некроза в печени и легких не наблюдали. Однако количество фуксинофильных волокон в гранулемах, где деструктивные процессы отсутствовали, к 90-м сут после инфицирования увеличивалось в 19 раз, а содержание гидроксипролина в легких увеличивалось более значительно, чем в печени [14].

Репаративная регенерация структур самой соединительной ткани также представляет собой актуальную проблему, поскольку при ее разрушении тоже формируется заместительный фиброз. Но, согласно нашим наблюдениям, в эксперименте с ожоговой травмой кожи степени 3Б у крыс при соответствующем лечении (ежедневное наложение мази из окисленного декстрана с добавлением антисептика и наноразмерных алмазов) был достигнут положительный результат. Через 32 сут лечения площадь ожоговой травмы уменьшилась в 2,3 раза по сравнению с таковой у крыс в контроле, леченных патентованным средством «Пантенол». При этом у крыс, леченных окисленным декстраном, в отличие от леченных «Пантенолом», в волокнах вновь образованной соединительной ткани, выстилающей раневую поверхность, преобладали ретикулиновые и эластические волокна, но не коллагеновые как в контроле. Площадь раневой поверхности сокращалась за счет наползания вновь образован-

ных кератиноцитов, среди них образовывались волосяные фолликулы и сальные железы, чего не было в контроле (нелеченные животные), а у крыс, леченных «Пантенолом», их было в 2,5 раза меньше [15, 16]. Кроме этого, нами получены данные об антифибротических эффектах окисленных декстранов в составе гибридных молекул с гидразидами никотиновой кислоты при лечении экспериментального туберкулеза [11, 17]. Все это свидетельствует о том, что есть некоторые возможности и инструменты для изучения механизмов регуляции обменных процессов в соединительной ткани как в онтогенезе, так и условиях патологии. Однако механизмы достигнутых результатов требуют продолжения исследований.

Очевидно, что к процессам гомеостазирования соединительной ткани имеют отношение не только клетки фибробластического ряда, но и макрофаги. Лизосомальные протеазы и семейство матриксных металлопротеиназ макрофагов способны реализовать свой потенциал в случае их вероятных контактов с элементами соединительной ткани и при соответствующих условиях для взаимодействия. В настоящее время молекулярные механизмы, лежащие в основе процессов деградации коллагена, исследованы недостаточно. Метаболизм коллагена представляет собою двухстадийный процесс, который включает внеклеточное расщепление с помощью протеаз с последующим поглощением клетками СМФ и внутриклеточным этапом лизосомальной деполимеризации. Внеклеточная деградация коллагена предполагает этап идентификации специфических сайтов расщепления ферментами матриксных металлопротеиназ (ММРаз) [18].

Большинство ММРаз состоят из каталитического домена и домена гемопексина [19]. Предполагается, что домен гемопексина связывает и разматывает коллаген, обеспечивая доступ к сайтам расщепления. Фрагменты расщепленного фибриллярного коллагена быстро денатурируются (теряют свою тройную спиральную структуру) при 37 °С и затем могут быть дополнительно расщеплены катепсинами [20]. Лизосомальные протеазы также могут быть активны и во внеклеточном пространстве при кислых значениях рН среды. Синтез и секреция катепсинов сопряжены с локусами воспаления и расщепляют коллаген I и III типов. Вместе с тем не существует логичных и определенных представлений о роли лизосомальных гидролаз, равно как и металлопротеиназ в процессах гомеостазирования соединительной ткани [21].

Отдельной и важной, хотя очевидно и связанной с ранее изложенной информацией представляется проблема вероятной общности разных патологических форм соединительной ткани при ее состояниях, квалифицируемых как склероз, фиброз, цирроз, келоидные рубцы. Можно предположить, что их объединяет изначально одинаковое строение, но в дальнейшем различия структурного состояния и химического состава, детерминируются свойствами окружающей среды и трофического пространства, то есть внеклеточного матрикса. Кроме того, видимо, имеет значение и фактор времени существования соединительной ткани, детерминирующий частоту вероятных патологических коллизий с ней. Возможно, эти процессы могут происходить постепенно либо быстро и реализовываться по единообразному сценарию изначально путем деструктуризации молекул соединительной ткани в различной степени и с разной скоростью. При наличии условий они могут быть инфильтрированы различными молекулами при непосредственном контакте. Однако факторы и механизмы дестабилизации нормальной структуры соединительной ткани вне связи с прямыми химическими и физическими воздействиями остаются плохо изученными.

Проблема трофики соединительной ткани и потенциальных факторов, обуславливающих данное состояние, чрезвычайно важна. Так, изменения гомеостаза соединительной ткани могут быть вне связи с какой-либо патологией и обусловлены физиологическим старением организма. У крыс в возрасте 1–12 мес обнаружены существенные различия в обмене коллагена. Так, обмен коллагена I–II типов снижался, тогда как IV–V типов и бигликана повышался у старых крыс по сравнению с молодыми. При этом обмен коллагена III и VI типов и эластина не был связан с возрастом. Поддержание гомеостаза соединительной ткани в условиях патологии и развития организма представляет собой сложный механизм и, вероятно, не всегда успешный. Так, при моделировании фиброза печени путем отравления тетрахлорметаном у крыс было выявлено увеличение содержания коллагенов I, III–VI типов и бигликана. Обнаружено, что по мере роста организма формируется тонкий баланс между отдельными коллагенами и протеогликанами, но он легко нарушается при формировании фиброза печени [22].

Фактор окружающей среды также чрезвычайно важен в детерминации гомеостаза соединительной ткани. Анализ основных компонентов

внеклеточного матрикса у практически здоровых жителей Арктики работоспособного возраста обнаружил их возрастную зависимость – изменялись их соотношения и количество. С увеличением возраста содержание общих глюкозамингликанов и гиалуронана, фибронектина, гидроксипролина и его фракций возрастало. При этом содержание коллагена IV типа существенно не изменялось, оставаясь высоким во всех возрастных группах [23]. Наличие положительной корреляционной связи между компонентами внеклеточного матрикса и показателями биологического старения свидетельствует о взаимосвязи двух процессов – старения, которое на европейском севере, видимо, ускорено [24], и патологического ремоделирования внеклеточного матрикса, поскольку последнее связано с ускоренным старением. Наряду с этим повышенное содержание общих гликозаминогликанов, гиалуронана и коллагена IV типа, а также общего и пептидно-связанного гидроксипролина у северян относительно подобных параметров у жителей Западной Сибири позволяет предполагать у северян ускоренный метаболизм основных компонентов внеклеточного матрикса [23]. Проблемы трофики и обновления структур соединительной ткани чрезвычайно важны еще и потому, что эти факторы могут детерминировать динамику и исход таких состояний как, например, аневризма аорты и других сосудов, аневризмы желудочков сердца после формирования трансмурального инфаркта миокарда и в последующем крупноочагового кардиосклероза и т.д. Эти структуры живые, и поддержание их жизнеспособности предполагает некие механизмы поддержания оптимальной диффузии в них кислорода, аминокислот, глюкозы, микроэлементов и др., возможно, процессов репарации структур соединительной ткани. Следует принимать во внимание, что внеклеточный матрикс детерминирует трофику многих клеток органов в постсосудистом пространстве, а также эффекты гормонов, цитокинов и других сигнальных молекул, равно как и транслокацию лекарственных средств ко многим клеткам в многоклеточном организме. В этой связи представляется оправданным выделять во внеклеточном матриксе его важнейшую функцию – функцию интегративно-буферной метаболической среды, включающей гликоконъюгаты (гликопротеины и протеогликаны, воду с растворенными в ней молекулами и солями) [25].

Причастность макрофагов и фибропластических клеток к процессам воспаления и фиброобразования исследуют давно. Касаясь проблемы

факторов и механизмов инициации процесса синтеза соединительной ткани в условиях патологии, предполагают, что таковыми являются продукты некроза клеток и структур, разных по химическому составу, либо продукты переваривания этих структур в макрофагах после их захвата. Это инициирует эндоцитозную активность, синтез и секрецию макрофагами ряда провоспалительных цитокинов, а также лизосомальных ферментов и ростовых факторов. Последние детерминируют пролиферативную и синтетическую активность фибробластов, миофибробластов и жиронакапливающих клеток, возможно, иных клеток – продуктов эпителиально-мезенхимальной трансформации [26, 27]. Таким образом, существует некая способность фагоцитирующих клеток участвовать в инициации процесса фиброгенеза, сопряженная с реализацией ими своего процесса переваривания, или отдельных его этапов. Однако гибель клеток в результате апоптоза и поглощение апоптотических тел макрофагами как будто бы не ассоциируются с индукцией воспаления и заместительным фиброзом. Хотя есть экспериментальные данные, подтверждающие, что в определенных случаях апоптоз влечет за собой активацию иммунного ответа.

Апонекроз, или иммуногенная клеточная гибель, сопряжен с активацией макрофагов как по классическому провоспалительному типу M1, так и по альтернативному, или репаративному пути, M2. Очевидно, макрофаги являются фактором детерминации в инициации процесса фиброза путем секреции фактора некроза опухоли (TNF) α , интерлейкина (IL) IL-6, IL-1 β , трансформирующего фактора роста (TGF) β 1 и тромбоцитарного фактора роста (PDGF), индуцируя пролиферацию миофибробластов, которые участвуют в синтезе коллагена [28]. Тканевые макрофаги секретируют ММРаза, которые способствуют деградации внеклеточного матрикса, и поэтому привлекают все больше воспалительных клеток к месту повреждения и воспаления, создавая условия для формирования фиброзной ткани [29]. По всей видимости для экспрессии, синтеза и секреции провоспалительных цитокинов, ростовых факторов и лизосомальных ферментов достаточно только акта эндоцитоза макрофагами биосовместимых ингредиентов любой природы, а процесс переваривания не столь важен, но важен факт эндоцитоза, биосовместимости и времени пребывания поглощенного фактора в вакуолярном аппарате макрофага. Роль продолжительности этих процессов (пребывания и переваривания) или просто пребывания в вакуолярном аппарате макрофагов

эндоцитированных объектов, и последствия этого могут быть чрезвычайно важными аспектами обсуждаемой проблемы. Макрофаги с учетом их клиринговой функции и способности избирательного и неизбирательного, в том числе, захвата различных факторов биологической и небιологической природы могут определять «судьбу» поглощенного материала: перевариванием либо путем регургитации, возможно, сохранения в качестве остаточных телец неопределенно долго.

Для реализации всех этих процессов, видимо, необходимы время и некие механизмы «принятия и реализации решений», но каковы они? Возможно, что все это при условии биосовместимости поглощенного материала будет проявляться неспецифической активацией обменных процессов у макрофагов, равно как и увеличением синтеза лизосомальных гидролаз, провоспалительных цитокинов и ростовых факторов. Так, в наших экспериментах *in vitro* было показано, что сокультивирование перитонеальных макрофагов с наноразмерными алмазами было сопряжено с их захватом и модуляцией провоспалительного и профиброгенного статуса макрофагов. Это проявлялось стимуляцией экспрессии колониестимулирующего фактора гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF) и интерферона (IFN) γ , а также повышением экспрессии, синтеза и секреции ростовых факторов – эпидермального (EGF), трансформирующего (TGF β 1/TGF- β) и кератиноцитов (KGF/FGF-7), потенциально способных модулировать процессы воспаления, регенерации и фиброобразования.

Примечательно, что все это сопровождалось увеличением экспрессии, продукции и стимуляцией секреции макрофагами лизосомальных ферментов: катепсина В, катепсина D и металлопротеиназ MMP-1 и MMP-9, которые также способны модулировать процессы повреждения, регенерации и фиброобразования. При этом наблюдали отсутствие прямой зависимости между синтезом и секрецией протеаз. Следует также отметить, что экспрессия провоспалительного цитокина IL-1 α несколько снижалась, а экспрессия TNF- α , не изменялась [30–32]. При сокультивировании перитонеальных макрофагов с микобактериями вакцины БЦЖ регистрировали некоторое увеличение экспрессии провоспалительных цитокинов (IL-1 α), выраженное увеличение экспрессии ростовых факторов (bFGF, TGF- β), лизосомальных протеаз MMP-1 и катепсина D [33]. В первом случае (наноразмерные алмазы) – это биосовместимый, но не биодеградируемый фактор, тогда как микобактерии в составе вакцины

БЦЖ – биосовместимый, но медленно биодеградируемый в вакуолярном аппарате фагоцитирующих клеток фактор [11].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что захват химически инертного, небιодеградабельного агента через 24 ч был сопряжен с активацией экспрессии, синтеза и секреции протеаз, активных при разной по величине рН среды, увеличением продукции ряда ростовых факторов. Что примечательно, это происходило без увеличения экспрессии провоспалительных цитокинов. Захват медленно биодеградируемого фактора (БЦЖ) также был сопряжен с увеличением экспрессии как про-, так и антифибротических факторов. Складывается впечатление, что у макрофагов клиринговая функция, процессы эндоцитоза, внутриклеточного переваривания либо сегрегации специфичных по своей природе факторов – продуктов распада собственных (организма) структур и возможно, живых организмов (бактерий, вирусов и пр.) – биосовместимых, относительно быстро или медленно деградируемых лизосомальными ферментами веществ (зимозана, декстранов и др.), а также небιодеградируемых факторов (угля, кремния, алмазов, асбеста и др.), сопряжены с неспецифической активацией вероятного сигнального пути. По-видимому, это реализуется экспрессией и увеличением синтеза белков – лизосомальных гидролаз (с оптимумами активности при кислом и (или) нейтральной рН), а также одновременно ростовых факторов, стимулирующих пролиферацию, дифференцирование, фибропластическую активность клеток фибробластического ряда, возможно, активированных метаболитов кислорода.

Можно предположить, что время пребывания в вакуолярном аппарате факторов биологической и небιологической природы имеет большое значение в детерминации функционального статуса фагоцитирующих клеток и самой возможности сохранения их жизнеспособности после акта поглощения, особенно небιодеградируемых факторов. По крайней мере, об этом свидетельствуют данные о так называемых пылевых гранулематозах с выраженными фибротическими осложнениями [34], равно как и о гранулематозах, инициируемых грибами, микобактериями туберкулеза, имеющими свои системы «антидеградации» в виде факторов, препятствующих слиянию первичных эндосом с лизосомами, например, у микобактерий туберкулеза. Примечательно, что при использовании эффективных противотуберкулезных средств, подавляющих микобактерии, размеры гранулем и их количество резко

уменьшались, и это не было сопряжено с процессами деструкции. Это было сопряжено с элиминацией фактора, активирующего макрофаги – живых *M. tuberculosis* [11]. При захвате макрофагами всех биосовместимых факторов инициация ответной реакции макрофагов реализуется, видимо, сходными механизмами. На ранних этапах – гиперактивацией макрофагов, возможно, всей СМФ, и последующей стимуляцией пролиферации фибробластов, их фибропластической активности еще в донекротическую фазу, как при БЦЖ-гранулематозе. Далее при развитии состояния гипоксии и ишемии макрофагов и их производных в гранулемах в связи с нарушениями трофики их эпителиодно-клеточного «ядра» развиваются локальные процессы деструкции макрофагов и лишь затем развивается заместительный фиброз в этих локусах [11]. Поскольку захваченный, генерирующий активацию макрофагов фактор как при гранулематозах, так и при других патологических состояниях, активирующих клетки СМФ, по разным причинам может продолжать персистировать в переваривающем аппарате макрофагов, а повышенная численность макрофагов в гранулемах постоянно поддерживается за счет костномозговых предшественников, повреждение и фиброзирование в этом варианте развития патологического процесса, очевидно, «самоподдерживаются». При этом процессы деструкции в гранулемах также «самоподдерживаются» секретацией лизосомальных гидролаз активированными макрофагами в связи с закислением окружающей макрофаги среды в гранулемах с их гигантским гидролитическим потенциалом. Но активность многочисленного и сложно организованного семейства ММРаз в отношении волокон соединительной ткани или их предшественников поэтому, в условиях локуса воспаления с «кислым» рН среды, видимо, не может быть реализована. Но эти ферменты, вероятно, могут играть чрезвычайно важную роль в преобразованиях всех производных внеклеточного матрикса вне локусов воспаления.

Полученный нами выраженный антифибротический эффект от профилактического введения модифицированного декстрана мышам перед их инфицированием вирусами гриппа, является значимым фактом, свидетельствующим о возможности регуляции процесса фиброирования. Возможно, антифибротический эффект в этих экспериментах был сопряжен с механизмами препятствия «сборке» молекул коллагена вне локусов деструкции в органах в условиях гиперактивации СМФ [7, 35]. Вероятно, подобный меха-

низм реализовался и в экспериментах по лечению туберкулеза гибридными молекулами гидразида изоникотиновой кислоты и модифицированного декстрана. В этих экспериментах был получен выраженный антифибротический эффект [11, 17]. Наряду с этим можно допустить и другой механизм, связанный с действием декстрана в качестве антагониста взаимодействия «протеогликан-патоген» [37]. Микобактерии туберкулеза при осуществлении инвазии реализуют некий механизм «хоуминга», приликая к клеткам организма-хозяина с помощью адгезина гепарин-связывающего гемагглютинаина (НВНА), который также способствует диссеминации инфекции [38]. Выступая в роли имитатора поверхностно расположенных гепарансульфатных протеогликанов клеток, декстран может связываться с НВНА и предупреждать инфицирование [39], образование гранулем и нарушение метаболизма основных структур соединительной ткани и внеклеточного матрикса, что предупреждает фиброзирование органов. Полагают, что протеогликаны и гликозамингликаны представляют интригующую цель для разработки новых подходов в получении диагностических и терапевтических агентов при инфекционных заболеваниях [40]. Исследования взаимодействий «глюкозамин гликан» позволит создавать новые методы лечения, способные более эффективно затруднять или блокировать инфекции, содействовать преодолению устойчивости к противомикробным средствам [39].

Нельзя исключить также причастность к процессу фиброирования механизмов эпителиально- и эндотелиально-мезенхимальной трансформации клеток, при которой было обнаружено, что именно макрофаги являются наиболее активными в экспрессии SMAD-факторов, реализующих сигнальный путь данного процесса [10, 41]. Вместе с тем не понятна сопряженность всех этих процессов экспрессии, синтеза и секреции макрофагами лизосомальных гидролаз, ростовых факторов и SMAD-факторов, а также детерминации их профибротических и антифибротических проявлений с механизмами гомеостаза в системе соединительной ткани по масштабу и времени. Не ясны также механизмы и факторы очевидной органоспецифичности проявлений процесса фиброирования [11, 42]. Приведенные свидетельства того, что активация фибропластических процессов изначально может быть не сопряжена с наличием деструктивных процессов означает, что этот процесс (фиброирования) не может быть квалифи-

цирован как репаративная регенерация, даже неполноценная.

Следует подчеркнуть, что процессы фиброзируются развиваются только в многоклеточном организме, состоящем из клеток различных типов, часть из которых имеет непосредственный контакт с внешней средой, а для других такой внешней средой, видимо, являются рядом расположенные клетки (того или иного гистотипа) и внеклеточный матрикс, либо инородные тела. При этом очевидно, что при утрате клеток одного или нескольких клеток других гистотипов механизмом некроза, фиброз развивается по заместительному принципу. Но при этом вне зоны некроза и, вообще, еще до формирования некроза в организме при наличии в нем активированных макрофагов среди неповрежденных клеток паренхимы, пролиферируют и активируются конститутивные фибробласты и синтез ими структур соединительной ткани.

Таким образом, можно полагать, что процесс фиброзируются является неспецифической реакцией организма, и инициируется активированными макрофагами в многоклеточном организме, «целью» которого в самом общем виде, вероятно, является изолирование клеток от контактов с внешней средой при потенциальной или реальной их возможности, как фактора нарушения гомеостаза в организме. Допустимо, что внешней средой макрофагами могут «восприниматься» не только живые организмы, но и контакты с неживыми структурами (протезы и пр.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа проводилась в рамках научно-исследовательской работы «Исследование молекулярно-клеточных основ патогенеза новых и наиболее распространенных на территории Сибири инфекционных заболеваний вирусной этиологии для разработки средств их специфической и неспецифической профилактики» (№ гос. регистрации 01201353865, уникальный № научной темы 0535-2014-0008), а также в рамках научно-исследовательской работы «Разработка новых молекулярно-наносомальных фармацевтических композиций направленного транспорта лекарственных средств для лечения гранулема-

тозов инфекционной этиологии и их осложнений на основе изучения молекулярно-клеточных механизмов патогенеза» (№ гос. регистрации 01201353866, уникальный № научной темы 0535-2014-0007).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Струков А.И., Серов В.В., Саркисов Д.С. Общая патология человека: руководство / под ред. АМН ССР. М.: Медицина, 1982: 656.
2. Kim L.B., Serov V.V., Sarkisov D.S. Obshchaya patologiya cheloveka: rukovodstvo [General pathology of man: a guide] / pod red. AMN SSR. M.: Medicina Publ., 1982: 656 (in Russian).
3. Ким Л.Б., Березовская Г.А., Лайвин А.Н., Цыба Л.П., Котова И.И., Калмыкова Е.Ю., Куликов В.Ю. Динамика содержания фибронектина у больных в процессе раннего постинфарктного ремоделирования // *Бюллетень СО РАМН*. 2002; 4: 63–66.
4. Kim L.B., Berezovskaya G.A., Lajvin A.N., Cyba L.P., Kotova I.I., Kalmykova E.YU., Kulikov V.Yu. Dinamika sodержaniya fibronektina u bol'nyh v processe rannego postinfarktogo remodelirovaniya [Dynamics of fibronectin content in patients in the process of early postmyocardial remodeling] // *Byulleten' SO RAMN*. 2002; 4: 63–66 (in Russian).
5. Ким Л.Б., Лайвин А.Н., Березовская Г.А., Цыба Л.П., Котова И.И., Куликов В.Ю. Динамика содержания гликозаминогликанов и активность церулоплазмينا у больных в процессе раннего постинфарктного ремоделирования левого желудочка // *Бюллетень СО РАМН*. 2003; 3: 24–28.
6. Kim L.B., Lajvin A.N., Berezovskaya G.A., Cyba L.P., Kotova I.I., Kulikov V.Yu. Dinamika sodержaniya glikozaminoglikanov i aktivnost' ceruloplazminpa u bol'nyh v processe rannego postinfarktogo remodelirovaniya levogo zheludochka [Dynamics of glycosaminoglycan content and activity of ceruloplasmin in patients during early postinfarction remodeling of the left ventricle] // *Byulleten' SO RAMN*. 2003; 3: 24–28 (in Russian).
7. Путятина А.Н., Ким Л.Б. Биохимические маркеры постинфарктного заместительного фиброза у мужчин различного возраста // *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2011; 4: 57–60.
8. Putyatina A.N., Kim L.B. Biohimicheskie markery postinfarktogo zamestitel'nogo fibroza u muzhchin razlichnogo vozrasta [Biochemical markers of postinfarction replacement fibrosis in men of various ages] // *Patologiya krovoobrascheniya i kardiobirurgiya – Pathology of Blood Circulation and Cardiosurgery*. 2011; 4: 57–60 (in Russian).
9. Uusimaa P., Risteli J., Niemeld M., Lumme J., Ikdheimo M., Jounela A., Peuhkurinen K. Collagen Scar Formation After Acute Myocardial Infarction: Relationships to Infarct Size, Left Ventricular Function, and Coronary Artery Patency // *Circulation*. 1997; 96 (8): 2565–2572.

6. Шестопалова Л.В., Шкурупий В.А., Шаркова Т.В., Потапова О.В., Зайковская А.В., Шестопалов А.М. Структурные изменения легких у мышей, инфицированных вирусом гриппа птиц H5N1 субтипа // *Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина*. 2008; 6: 3–10.
- Shestopalova L. V., Shkurupij V.A., Sharkova T.V., Potapova O.V., Zajkovskaya A.V., Shestopalov A.M. Strukturnye izmeneniya legkih u myshey, inficirovannyh virusom gripa ptic H5N1 subtipa [Structural changes in lungs in mice infected with the avian influenza virus H5N1 subtype] // *Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya, klinicheskaya medicina*. 2008; 6: 3–10 (in Russian).
7. Anikina A.G., Potapova O.V., Shkurupy V.A. Morphofunctional characteristics of fibroblasts and fibrogenesis in the lungs of mice infected with influenza A/H5N1 A/goose/Krasnoozerskoye/627/05 virus // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013; 154 (3): 361–364.
8. Потапова О.В., Шкурупий В.А., Лузгина Н.Г., Шестопапов А.М., Дроздов И.Г., Одарченко И.В., Шестопалова Л.В. Структурные изменения в лимфоидных органах мышей, инфицированных вирусом гриппа птиц H5N1-субтипа a/goose/krasnoozerskoye/627/05 // *Сибирский научный медицинский журнал*. 2008; 133 (5): 162–165.
- Potapova O.V., Spkurupij V.A., Luzgina N.G., Shestopalov A.M., Drozdov I.G., Odarchenko I.V., Spestopalova L.V. Strukturnye izmeneniya v limfoidnyh organah myshey, inficirovannyh virusom gripa ptic H5N1-subtipa a/goose/krasnoozerskoye/627/05 [Structural changes in the lymphoid organs of mice infected with the avian influenza virus H5N1 subtype a / goose / krasnoozerskoye / 627/05] // *Sibirskij nauchnyj medicinskiy zhurnal – The Siberian Scientific Medical Journal*. 2008; 133 (5): 162–165 (in Russian).
9. Аникина А.Г., Потапова О.В., Ковнер А.В., Черданцева Л.А., Шаркова Т.В., Шкурупий В.А., Иванов Г.Я. Иммуноморфологические особенности постинфекционного пневмофиброза у человека при гриппе А/Н1N1 // *Фундаментальные исследования*. 2014; 10: 18–23.
- Anikina A.G., Potapova O.V., Kovner A.V., Cherdanceva L.A., Sparkova T.V., Spkurupij V.A., Ivanov G.YA. Immunomorfologicheskie osobennost i postinfekcionnogo pnevmofibroza u cheloveka pri grippe A/H1N1 [Immunomorphological features and postinfection pneumofibrosis in humans with influenza A / H1N1] // *Fundamental'nye issledovaniya – Fundamental Research*. 2014; 10: 18–23 (in Russian).
10. Shatskaya E.V., Kovner A.V., Potapova O.V., Cherdantseva L.A., Shkurupy V.A., Shestopalov A.M. Study of SMAD-dependent signal pathway in the development of early pulmonary fibrosis in mice infected with influenza A/H1N1 virus // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017; 162 (5): 647–649. DOI: 10.1007/s10517-017-3678-1.
11. Шкурупий В.А. Туберкулезный гранулематоз. Цитофизиология и адресная терапия. М.: Издательство РАМН, 2007: 536.
- Shkurupij V.A. Tuberkuleznyj granulematoz. Citofiziologiya i adresnaya terapiya. [Tuberculosis granulomatosis. Cytophysiology and targeted therapy]. M.: Izdatel'stvo RAMN Publ., 2007: 536 (in Russian).
12. Shkurupy V.A., Nadeev A.P., Karpov M.A., Bugrимова Y.S. Experimental cytomorphological studies of the reaction of mononuclear phagocyte system in granulomatosis of mixed (silicotic and tuberculous) etiology // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2010; 149 (4): 462–465.
13. Ковнер А.В., Потапова О.В., Шкурупий В.А. Патоморфологические изменения легких и функциональный статус легочных макрофагов при генерализованной форме кандидоза, вызванного *Candida albicans* // *Успехи современного естествознания*. 2014; 12: 335–339.
- Kovner A.V., Potapova O.V., Shkurupij V.A. Patomorfologicheskie izmeneniya legkih i funktsional'nyj status legochnyh makrofagov pri generalizovannoj forme kandidoza, vyzvannogo *Candida albicans* [Pathomorphological changes in the lung and functional status of pulmonary macrophages in the generalized candidiasis form caused by *Candida albicans*] // *Uspekhi sovremennoego estestvoznaniya – Advances in Current Natural Sciences*. 2014; 12: 335–339 (in Russian).
14. Шкурупий В.А., Ким Л.Б., Потапова О.В., Шаркова Т.В., Путятина А.Н., Никонова И.К. Исследование фибротических осложнений и концентрации гидроксипролина в печени мышей в различные периоды развития генерализованного БЦЖ-гранулематоза // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014; 157 (4): 463–467.
- Shkurupij V.A., Kim L.B., Potapova O.V., Sharkova T.V., Putyatina A.N., Nikonova I.K. Issledovanie fibroticheskikh oslozhnenij i koncentracii gidroksiprolina v pecheni myshey v razlichnye periody razvitiya generalizovannogo BCG-granulematoza [The study of fibrotic complications and the concentration of hydroxyproline in the liver of mice at different periods of development of generalized BCG-granulomatosis] // *Bulleten' eksperimental'noj biologii i mediciny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014; 157 (4): 463–467 (in Russian).
15. Шкурупий В.А., Жарков А.С., Троицкий А.В., Певченко Б.В., Беляев В.Н. Композиция для лечения ожогов. Патент № 2559087 от 02.09.2014 г.
- Shkurupij V.A., Zharkov A.S., Troickij A.V., Pevchenko B.V., Belyaev V.N. Kompoziciya dlya lecheniya ozhogov [Composition for the treatment of burns]. Patent № 2559087 ot 02.09.2014 (in Russian).
16. Шкурупий В.А. Карпов М.А., Троицкий А.В., Архипов С.А., Нецадим Д.В. Исследование эффективности композиции на основе окисленного декстрана при лечении термического ожога кожи крыс ПШБ степени //

- Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014; 158 (11): 576–579.
- Shkurupij V.A., Karpov M.A., Troickij A.V., Arhipov S.A., Neshchadim D.V. Issledovanie ehffektivnosti kompozicii na osnove okislennogo dekstrana pri lechenii termicheskogo ozhoga kozhi kryss IIIB stepeni [A study of the effectiveness of a composition based on oxidized dextran in the treatment of thermal skin burn of rats IIIB degree] // *Byulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014; 158 (11): 576–579 (in Russian).
17. Шкурупий В.А., Курунов Ю.Н., Пупышев А.Б., Панасенко С.Г., Козяев М.А., Шорина Г.Н. Средство для лечения туберкулеза с низким уровнем фибротических осложнений. Патент РФ № 2185166 от 03.04.2000 г.
- Spkurupij V.A., Kurunov YU.N., Pupyshv A.B., Panasenko S.G., Kozyaev M.A., Sporina G.N. Sredstvo dlya lecheniya tuberkuleza s nizkim urovnem fibroticheskikh oslozhnenij [An agent for the treatment of tuberculosis with a low level of fibrotic complications]. Patent RF № 2185166 ot 03.04.2000 (in Russian).
18. Giannandrea M., Parks W.C. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis // *Dis. Model. Mech.* 2014; 7 (2): 193–203. DOI: 10.1242/dmm.012062.
19. Hu J., Van den Steen P.E., Sang Q.X., Opdenakker G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2007; 6 (6): 480–498.
20. Mott J.D., Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases // *Curr Opin Cell Biol.* 2004; 16 (5): 558–564. DOI: 10.1016/j.ceb.2004.07.010
21. Robert S., Gicquel T., Victoni T., Valenza S., Barreto E., Bailly-Maotre B., Boichot E., Lagente V. Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and inflammasome pathway in molecular mechanisms of fibrosis // *Biosci. Rep.* 2016; 36 (4): 00360. DOI: 10.1042/BSR20160107.
22. Karsdal M.A., Genovese F., Madsen E.A. Manon-Jensen T., Schuppan D. Collagen and tissue turnover as a function of age: Implications for fibrosis // *J. Hepatol.* 2016; 64 (1): 103–109.
23. Ким Л.Б., Белишева Н.К., Русских Г.С., Путятина А.Н., Кожин П.М., Цыпышева О.Б. Возрастная динамика основных компонентов внеклеточного матрикса у жителей Российской Арктики // *Успехи геронтологии*. 2017; 30 (3): 332–340.
- Kim L.B., Belisheva N.K., Russkikh G.S., Putyatina A.N., Kozhin P.M., Tsypysheva O.B. Vozrastnaya dinamika osnovnykh komponentov vnekletochnogo matriksa u zhitel'ey Rossijskoj Arktiki [Age dynamics of the main components of the extracellular matrix in the inhabitants of the Russian Arctic] // *Uspekhi gerontologii – The Successes of Gerontology*. 2017; 30 (3): 332–340 (in Russian).
24. Kim L.B., Belisheva N.K., Putyatina A.N., Russkikh G.S., Kozhin P.M., Tsypysheva O.B. Quality of Life for Men of Different Ages in the European Russian North and Its Relationsip with Self-Rated Health and Hormonal Status // *Advances in Gerontology*, 2016; 6 (4): 343–351. DOI: 10.1134/S207905701604007X).
25. Омельченко Н.Н., Слуцкий Л.И., Миронова С.П. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). Т. I. М., 2009. 380 с.
- Omel'chenko N.N., Sluckij L.I., Mironova S.P. Soedinitel'naya tkan' (gistofiziologiya i biohimiya) [Connective tissue (histophysiology and biochemistry)]. Т. I. М., 2009: 380 (in Russian).
26. Piera-Velazquez S., Li Z., Jimenez S.A. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders // *Am. J. Patbol.* 2011; 179 (3): 1074–1080. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.06.001.
27. Stone R.C., Pastar I., Ojeh N., Chen V., Liu S., Garzon K.I., Tomic-Canic M. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis // *Cell. Tissue. Res.* 2016; 365 (3): 495–506. DOI: 10.1007/s00441-016-2464-0.
28. Sun Y.Y., Li X.F., Meng X.M., Huang C., Zhang L., Li J. Macrophage Phenotype in Liver Injury and Repair // *Scand. J. Immunol.* 2017; 85 (3): 166–174. DOI: 10.1111/sji.12468.
29. Gwyer Findlay E., Hussell T. Macrophage-mediated inflammation and disease: a focus on the lung // *Mediators Inflamm.* 2012; 140937. DOI: 10.1155/2012/140937.
30. Шкурупий В.А., Архипов С.А., Ахраменко Е.С., Троицкий А.В. Исследование влияния частиц наноразмерных алмазов на макрофаги *in vitro* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014; 158 (10): 503–506.
31. Shkurupij V.A., Arhipov S.A., Ahramenko E.S., Troickij A.V. Issledovanie vliyaniya chastic nanorazmernihalmazov na makrofagi *in vitro* [Investigation of the influence of nano-sized diamond particles on macrophages *in vitro*] // *Byulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014; 158 (10): 503–506 (in Russian).
32. Нецадим Д.В., Архипов С.А., Шкурупий В.А., Ахраменко Е.С., Троицкий А.В. Модифицирующее влияние наноразмерных алмазов на гидролитический потенциал макрофагов *in vitro* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015; 159 (3): 383–385.
- Neshchadim D.V., Arhipov S.A., Shkurupij V.A., Ahramenko E.S., Troickij A.V. Modificiruyushchee vliyanie nanorazmernihalmazov na gidroliticheskij potencial makrofagov *in vitro* [Modifying effect of nanosized diamonds on the hydrolytic potential of macrophages *in vitro*] // *Byulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015; 159 (3): 383–385 (in Russian).
33. Нецадим Д.В., Архипов С.А., Шкурупий В.А., Ахраменко Е.С., Троицкий А.В., Карпов М.А. Исследование влияния наноалмазов на прорегенераторный потенциал макрофагов *in vitro* // *Фундаментальные исследования*. 2015; 2 (6): 1222–1226.
- Neshchadim D.V., Arhipov S.A., Shkurupij V.A., Ahramenko E.S., Troickij A.V., Karpov M.A. Issledovanie vliyani-

- ya nanoalmazov na proregeneratornyj potencial makrofagov in vitro [Investigation of the effect of nanodiamonds on the progenerator potential of macrophages in vitro] // *Fundamental'nye issledovaniya – Fundamental Research*. 2015; 2 (6): 1222–1226 (in Russian).
34. Ильин Д.А., Архипов С.А., Шкурупий В.А. Исследование экспрессии: интерлейкин 1 α , β FGF, TGF- β 1, IFN- γ , MMP-1, CathD многоядерными макрофагами *in vitro* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 5.
- П'ин Д.А., Архипов С.А., Шкурупий В.А. Исследование экспрессии: интерлейкин 1 α , β FGF, TGF- β 1, IFN- γ , MMP-1, CathD многоядерными макрофагами *in vitro* [Expression studies: interleukin 1 α , β FGF, TGF- β 1, IFN- γ , MMP-1, CathD by multinucleated macrophages *in vitro*] // *Byulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017, 5 (in Russian).
35. Архипов С.А., Шкурупий В.А., Бугримова Ю.С. Влияние предварительной нагрузки макрофагов частицами диоксида кремния на фагоцитов микобактерий штамма БЦЖ макрофагами и их антимикобактериальную активность // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2010; 2: 103–106.
- Arhipov S.A., Shkurupij V.A., Bugrimova Yu.S. Vliyanie predvaritel'noj nagruzki makrofagov chasticami dioksida kremniya na fagocitov mikobakterij shtamma BCZH makrofagami i ih antimikobakterial'nyu aktivnost' [Effect of preload of macrophages with silica particles on phagocytes of mycobacteria of BCG strain by macrophages and their antimycobacterial activity] // *Kltochnye tekhnologii v biologii i medicine – Cell Technologies in Biology and Medicine*. 2010; 2: 103–106 (in Russian).
36. Potapova O.V., Shkurupiy V.A., Sharkova T.V., Troitskiy A.V., Lusgina N.G., Shestopalov A.M. Preventive efficacy of oxidized dextran and pathomorphological processes in mouse lungs in avian influenza A/H5N1 // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011; 150 (6): 707–710.
37. Shkurupiy V.A., Nadeev A.P., Karpov M.A. Analysis of Fibrotic Depositions in Granulomas in Chronic Silicotuberculosis in Mice // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2010; 149 (5): 659–661.
38. Bartlett A.H., Park P.W. Proteoglycans in host-pathogen interactions: molecular mechanisms and therapeutic implications // *Expert Rev Mol Med*. 2010; 12: e5. DOI: 10.1017/S1462399409001367.
39. Menozzi F.D., Reddy V.M., Cayet D., Raze D., Debrerie A.S., Dehouck M.P., Cecchelli R., Lochet C. Mycobacterium tuberculosis heparin-binding haemagglutinin adhesion (HBHA) triggers receptor-mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions // *Microbes Infect.* 2006; 8: 1–9. DOI: 10.1016/j.micinf.2005.03.023.
40. Garcha B., Merayo-Llodes J., Martin C., Alcalde I., Quirys L.M., Vazquez F. Surface Proteoglycans as Mediators in Bacterial Pathogens Infections // *Front Microbiol.* 2016; 7: 220. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00220. eCollection 2016.
41. Kamhi E., Joo E.J., Dordick J.S., Linhardt R.J. Glycosaminoglycans in infectious disease // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2013; 88 (4): 928–943. DOI: 10.1111/brv.12034.
42. Derynck R., Muthusamy B.P., Saeteurn K.Y. Signaling pathway cooperation in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2014; 31: 56–66. DOI: 10.1016/j.ceb.2014.09.001.
43. Shkurupiy V.A., Kim L.B., Nikonova I.K., Potapova O.V., Cherdantseva L.A., Sharkova T.V. Hydroxyproline Content and Fibrogenesis in Mouse Liver and Lungs during the Early Stages of BCG Granulomatosis // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013; 154 (3): 299–302.

Поступила в редакцию 14.06.2017
Утверждена к печати 08.11.2017

Шкурупий Вячеслав Алексеевич, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, науч. руководитель НИИЭКМ; НГМУ, г. Новосибирск.

Ким Лена Борисовна, д-р мед. наук, гл. науч. сотрудник, рук. группы биохимии соединительной ткани, НИИЭКМ, г. Новосибирск.

Ковнер Анна Владимировна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория структурных основ патогенеза социально значимых заболеваний, НИИЭКМ, г. Новосибирск.

Черданцева Лилия Александровна, канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник, и.о. зав. лабораторией структурных основ патогенеза социально значимых заболеваний, НИИЭКМ, г. Новосибирск.

(✉) Шкурупий Вячеслав Алексеевич, e-mail: sck@centercem.ru.

УДК 616-018.2

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-75-85

For citation: Shkurupy V.A., Kim L.B., Kovner A.V., Cherdantseva L.A. Connective tissue and the problems of its pathological conditions. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 75–85.

Connective tissue and the problems of its pathological conditions

Shkurupy V.A.^{1,2}, Kim L.B.¹, Kovner A.V.¹, Cherdantseva L.A.¹

¹ *Research Institute of Experimental and Clinical Medicine (RIECM)
2, Str. Timakova, Novosibirsk, 630117, Russian Federation*

² *Novosibirsk State Medical University (NSMU)
52, Krasnuy Av., Novosibirsk, 630091, Russian Federation*

ABSTRACT

This review and discussion article focuses on the physiology and pathology of connective tissue system and its interaction with mononuclear phagocyte system (MPS) in initiation and development of fibrosis. The study presents the perspective on fibrotic conditions as hypertrophied nonspecific body reactions aimed at maintaining homeostasis and initiated by pathologic (in terms of scale and duration of manifestations) activation of MPS cells resulting from their endocytosis of biocompatible factors of different origin accompanied by nonspecific activation of expression, synthesis, and secretion of lysosomal enzymes and growth factors by MPS cells. This perspective is supported by the authors' own findings as well as evidence published in studies of other authors. Authors' findings support and illustrate the above conclusions using data on the modulation of functional status of macrophages and fibroblasts as well as data on prevention and correction of fibrotic processes in different experimental pathologic conditions.

Key words: connective tissue, fibrosis, extracellular matrix, macrophages, fibroblasts.

Received June 14, 2017
Accepted November 08, 2017

Shkurupy Vyacheslav A., DM, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Research Supervisor of the RIECM; NSMU, Novosibirsk, Russian Federation.

Kim Lena B., DM, Chief Research Officer, Head of the Connective Tissue Biochemistry Group, RIECM, Novosibirsk, Russian Federation.

Kovner A.V., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Structural Foundations of the Pathogenesis of Socially Significant Diseases, RIECM, Novosibirsk, Russian Federation.

Cherdantseva L.A., PhD, Leading Researcher, Acting, Head of the Laboratory of Structural Foundations of the Pathogenesis of Socially Significant Diseases, RIECM, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) **Shkurupy Vyacheslav A.**, , e-mail: sck@centercem.ru.

УДК 611-018.2:577.112

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-86-93

Для цитирования: Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Зеленин Н.В., Аюшинова Н.И. Воздействие на митогенактивируемые протеинкиназы как новое направление регуляции роста соединительной ткани. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 86–93.

Воздействие на митогенактивируемые протеинкиназы как новое направление регуляции роста соединительной ткани

Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Зеленин Н.В., Аюшинова Н.И.

Иркутский научный центр хирургии и травматологии (ИНЦХТ)
Россия, 664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1

РЕЗЮМЕ

В обзоре представлена современная классификация, функции основных групп митогенактивируемых протеинкиназ (МАРК). Приведены данные о путях их активации и функционирования. Основное внимание уделено семейству p38 МАРК. В обзоре воздействие на данные сигнальные каскады рассмотрено как перспективное направление воздействия на рост соединительной ткани. В этом аспекте обобщен мировой опыт по активации и блокаде внутриклеточных каскадов. Обобщен собственный опыт работы в данном направлении. В частности продемонстрировано, что стимуляция p38 МАРК при подавлении активности JNK каскада ведет к ускоренному образованию соединительной ткани в зоне послеоперационного хирургического рубца, доказана возможность управления ростом соединительной ткани при воздействии на МАР-киназные каскады. Пролонгированная блокада p38 МАРК снижает ширину кожного рубца и плотность коллагеновых волокон в зоне формирования послеоперационного рубца, снижает интенсивность спайкообразования в брюшной полости при травме брюшины.

Таким образом, учитывая важную роль и универсальность МАР-киназных механизмов регуляции клеточного роста и дифференцировки, перспективно изучение участия данных механизмов в универсальных биологических процессах, таких как воспаление, апоптоз, регенерация, а также разработка на этой основе способов управления течением этих процессов. Использование стимуляторов и блокаторов МАР-киназных механизмов перспективно как новое направление в лечении многих заболеваний, патогенез которых связан с нарушением клеточной дифференцировки, пролиферации, избыточной выработки цитокинов, управлением ростом соединительной ткани.

Ключевые слова: митогенактивируемая протеинкиназа, p38 МАРК, JNK МАРК, ERK МАРК, ингибитор МАРК, соединительная ткань.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время распространенность патологий, при которых избыточный рост соединительной ткани является одним из основных факторов патогенеза (кардиосклероз и связанная с ним сердечная недостаточность, контрактуры суставов, спаечная болезнь, пневмосклероз, цир-

роз печени и др.), неуклонно возрастает. Соответственно возрастают и потребности медицины в новых методах и способах управления морфогенезом при данных заболеваниях. Однако каких-либо значимых успехов в этой области за многие годы так и не было достигнуто.

По нашему мнению, одним из перспективных способов влияния на рост соединительной ткани может стать воздействие на компоненты внутриклеточных сигнальных каскадов. При этом

✉ Шурыгина Ирина Александровна, e-mail: irinashurygina@gmail.com.

в качестве мишеней могут выступать белки, обеспечивающие передачу сигналов с мембранных рецепторов в ядро клетки. Это позволяет регулировать пролиферативную и синтетическую активность клеток при различных исходных стимулах. В частности, такими свойствами обладают внутриклеточные протеинкиназы, активирующиеся под действием митогенов (mitogen activated protein kinases, MAPK). Как известно, MAPK – важное звено в регуляции экспрессии генов при делении клеток, дифференцировке, апоптозе под действием внешних стимулов [1].

КЛАССИФИКАЦИЯ MAPK

Современная классификация выделяет 13 MAP-киназ, которые по функциональным характеристикам объединены в шесть групп:

1) киназы, регулируемые внеклеточными сигналами (extracellular signal-regulated kinases, ERK), активируются при воздействии факторов роста, цитокинов, канцерогенов, вирусных инфекций [2, 3];

2) киназы N-концевой части фактора транскрипции Jun (JNK) – это так называемые стресс-активируемые протеинкиназы, обнаружены во всех клетках и тканях, активируются под действием цитокинов, ультрафиолетового облучения. Участвуют в процессах клеточной дифференцировки и пролиферации, апоптозе, воспалении, влияют на экспрессию генов в ответ на различные стимулы [4, 5];

3) группа p38 MAP-киназ, активируются при воздействии провоспалительных цитокинов, ультрафиолетового облучения, липополисахаридов, факторов роста. Отвечают за дифференцировку клеток, воспаление, апоптоз [6];

4) ERK5 активируется факторами роста и стрессовыми факторами, участвует в клеточной пролиферации;

5) ERK3/4 относятся к атипичным MAP-киназам, транслоцируются в ядро при активации, вызывая фосфорилирование факторов транскрипции [7];

6) ERK7/8 – новейший член семейства MAP-киназ, до настоящего времени недостаточно изучен. Активируется стрессом и митогенами. Суперэкспрессия может ингибировать клеточный цикл в S-фазе [8, 9].

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ MAPK

Функциональная активность MAP-киназ реализуется тремя разными способами:

1) MAP-киназа может сама непосредственно транслоцироваться в ядро и фосфорилировать факторы транскрипции (например, белки c-Мус и Elk-1);

2) MAP-киназа может фосфорилировать фактор транскрипции в цитоплазме, который затем проникает в ядро и активирует транскрипцию генов;

3) MAP-киназа может фосфорилировать ингибитор фактора транскрипции, с которым этот фактор связан [10].

Даже очень слабый сигнал, приходящий к поверхности клеток (фактор роста, цитокин, УФ-облучение, изменение осмотического градиента) внутри клетки многократно усиливается благодаря существованию MAPK-каскада, вызывая ответную реакцию со стороны клетки в виде изменения экспрессии генов, дифференцировки, апоптоза и т.д. Данный способ передачи сигнала очень удобен для формирования резких, скачкообразных ответов [11].

Таким образом, стимуляторами активности MAP-киназных каскадов могут выступать различные стимулы как химической (гормоны, цитокины, факторы роста и т.д.), так и физической природы (УФ-воздействие). В то же время для активного воздействия на данные системы производится поиск веществ как широкого, так и селективного действия, способных блокировать MAP-киназные каскады. Единой химической классификации данных веществ на настоящий момент не существует, и данные соединения рассматриваются как потенциальные лекарственные средства. Только фирмой Tocris Bioscience (United Kingdom) производится 23 ингибитора p38 MAPK, 12 ингибиторов JNK MAPK и 8 – ERK MAPK.

Доказано, что активация p38 MAPK наблюдается в сердце при ишемии, повышении внутриполостного давления [12–14]. Экспрессия JNK1и p38 MAPK увеличивается также при ишемии-реперфузии [15]. Описано, что некоторые представители семейства MAPK (MAPK групп ERK, ERK5, p38, JNK) могут быть активированы при механическом стрессе, а также при снижении pH, воздействии факторов роста, ряда гормонов, реактивных форм кислорода [16].

Показано, что MAPK могут быть активированы как в результате активного мышечного сокращения [17, 18], так и после пассивного растяжения [19]. Пассивное растяжение мышцы и соединительной ткани стимулирует p38 MAPK [20]. Тот факт, что и растяжение мышцы, и деформация фибробластов активирует MAPK, говорит

о том, что адаптивный процесс в межмышечной соединительной ткани тесно связан с процессом в мышце при механической нагрузке [21]. Более того, активация MAPK зависит от типа нагрузки. Так, в скелетных мышечных клетках крысы концентрическая активация мышцы связана с метаболическими и ионными изменениями в результате увеличения ERK, тогда как эксцентрическая нагрузка – с активацией p38 MAPK [18].

Изменение активности p38 MAPK значительно влияет на уровень продукции провоспалительных цитокинов. Так, активация p38 MAPK приводит к активации генов, отвечающих за транскрипцию провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1, поэтому применение антагониста MAPK p38 RWJ67657 (4-[4-(4-Fluorophenyl)-1-(3-phenylpropyl)-5-(4-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]-3-butyn-1-ol) снижало уровень экспрессии цитокинов и эффектов, индуцированных эндотоксином [6].

M. Li et al. также подтверждают активное участие MAP-киназы p38 в регуляции продукции провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-6 [12]. Авторами показано, что активация p38 в кардиомиоцитах за счёт воздействия активатора у трансгенных мышей MKK6bE существенно влияет на экспрессию и выделение провоспалительных цитокинов. Напротив, подавление активности p38 при применении селективного блокатора SB 239063 (trans-4-[4-(4-Fluorophenyl)-5-(2-methoxy-4-pyrimidinyl)-1H-imidazol-1-yl]cyclohexanol) блокирует выход из клеток провоспалительных цитокинов, тем самым снижая их внеклеточную концентрацию и повышая их аккумуляцию в клетках.

Активация MAPK ведет не только к продукции факторов транскрипции, которые определяют экспрессию генов, но также к активации синтеза белков [22].

МАРК КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Установлено, что активация p38 MAPK ведет к усилению фиброза. Такой эффект зафиксирован X.J. Yue et al. (2016) [23] при развитии лептотомингеального фиброза. При этом активация p38 MAPK достигалась воздействием трансформирующего фактора роста β 1 на первичные менингеальные мезотелиальные клетки – наблюдалось значительное повышение экспрессии фактора роста соединительной ткани и p38 MAPK. Авторам удалось снизить экспрессию указанных факторов при применении блокатора p38 MAPK.

Об аналогичных наблюдениях в отношении гипертрофированной желтой связки сообщили [24], фибробластов оболочки глаза [25].

Y.Q. Xiao et al. (2009) установили, что применение селективного ингибитора трансформирующего фактора роста β 1 SB 431542 в эксперименте ингибирует образование рубцов после операции по поводу глаукомы. Авторы считают, что данный эффект может быть обусловлен ингибированием TGF-бета-индуцированной трансдифференцировки фибробластов [26]. Эндогенная стимуляция p38 MAPK, выявленная при подавлении активности JNK каскада, ведет к ускоренному образованию соединительной ткани в зоне послеоперационного хирургического рубца [27, 28].

M. Li et al. доказали, что активация p38 прямо влияет на ремоделирование внеклеточного матрикса в миокарде и развитие контрактальной дисфункции [12]. Так, применение активатора MKK6bE существенно повышало фиброз, а блокатора p38 – снижало интенсивность данного процесса. Таким образом, ингибция p38 может быть полезна для профилактики прогрессирования сердечной недостаточности.

Из этого разнообразия сигнальных каскадов в качестве мишени для целенаправленного изменения активности клеток в тканях при репаративных процессах и ремоделировании с нашей точки зрения наиболее интересна и перспективна группа p38 MAP-киназ, отвечающая за дифференцировку клеток, воспаление и апоптоз. Экспериментально доказана возможность управления ростом соединительной ткани при воздействии на MAP-киназные каскады. Пролонгированная блокада p38 MAPK снижает как ширину кожного рубца и плотность коллагеновых волокон в зоне формирования послеоперационного рубца [29–31], так и интенсивность спайкообразования в брюшной полости при травме брюшины [32].

Как известно, для гипертрофического кожного рубца характерна гиперпродукция коллагена фибробластами [33]. По мнению ряда авторов, фосфорилирование MAPK (ERK1/2, p38, JNK) под воздействием трансформирующего фактора роста β 1 играет роль в патогенезе развития гипертрофического кожного рубца [34–37].

В опыте *in vitro* [38] при воздействии на фибробласты из гипертрофического рубца циклического механического воздействия (растяжение – сжатие) наблюдается усиление фосфорилирования p38 MAPK, повышение экспрессии α -гладкомышечного актина и трансформирующего фактора роста β 1. Предварительная обработка фибробластов блокатором p38 MAPK SB 203580 (4-[5-

(4-Fluorophenyl)-2-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-1H-imidazol-4-yl]pyridine) нивелирует эти эффекты.

Примечательно исследование, касающееся возможного участия активации MAPK в развитии фиброза в печени. I.M. Westra et al. (2016) при изучении фиброза в дольках печени при инкубировании срезов *in vitro* в течение 48 ч выявили повышение уровня экспрессии белка теплового шока (HSP47), проколлагена 1A1 и повышение уровня коллагена 1-го типа. Применение блокатора p38 MAPK SB 203580 продемонстрировало снижение уровня экспрессии теплового шока (HSP47), проколлагена 1A1 [39].

Однако развитие внеклеточного компонента соединительной ткани зависит не только от уровня продукции матрикса фибробластами, но и от процессов перестройки соединительнотканых волокон с участием ферментов – металлопротеаз [40]. Как известно, сигнальные каскады митоген-активируемой протеинкиназы регулируют экспрессию металлопротеаз. При этом эффекты различаются для разных типов клеток [41, 42]. MAPK группы p38 играют важную роль в индукции металлопротеаз, отвечающих за перестройку внеклеточного матрикса [43], а ERK медирует их репрессию в фибробластах [44].

Усиление продукции матричных металлопротеаз церамидом и TNF- α в фибробластах кожи опосредуется координированной активацией ERK 1/2, JNK и p38 MAPK. Вовлечение p38 MAPK в регуляцию экспрессии матричной металлопротеазы 1 подтверждается тем фактом, что ингибирование p38 при помощи специфического ингибитора SB 203580 блокирует IL-1-опосредуемую экспрессию матричных металлопротеаз 1 и 3 в фибробластах и эндотелиоцитах человека [45]. Индукция матричной металлопротеазы 13 при контакте с коллагеном также зависит от активации p38 MAPK [45].

Поскольку известно, что одними из наиболее значимых активаторов MAP-киназ являются факторы роста, достаточно широкий спектр работ посвящен этой проблеме. Например, фактор роста фибробластов FGF передает сигнал ядру через взаимодействие с FGFR, что активирует многие сигнальные пути, включая MAPK (ERK, p38 MAPK, JNK) [46, 47]. Engel F.V. et al. (2006) показали, что применение FGF1/p38 MAPK ингибитора после острого инфаркта миокарда повышает митоз кардиомиоцитов, уменьшает образование рубца, но не влияет на насосную функцию сердца [48].

К сожалению, клиническое применение ингибиторов MAPK в настоящее время ограничено недостаточной эффективностью ингибиторов

p38, возможно, обусловленной недостаточным дозированием данных препаратов из-за побочных эффектов или индукции других киназ, которые могут взять на себя роль p38 при активации клеток. Исследования показали ограниченную эффективность данных препаратов при ревматоидном артрите и болезни Крона [49, 50].

К побочным эффектам применения, в частности ингибитора p38 MAPK Pamaipimod (6-(2,4-Difluorophenoxy)-2-[[3-hydroxy-1-(2-hydroxyethyl)propyl]amino]-8-methylpyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-one), относят повышение уровня цитолитических печеночных ферментов, сыпь на коже и повышение восприимчивости к инфекционным заболеваниям [51]. Данные побочные эффекты, однако, не зарегистрированы для другого ингибитора p38 MAPK – losmapimod (6-[5-(cyclopropylcarbonyl)-3-fluoro-2-methylphenyl]-N-(2,2-dimethylpropyl)pyridine-3-carboxamide), проходящего в настоящее время широкомасштабные испытания в рамках исследования LATITUDE-TIMI 60 для первичной и вторичной профилактики и замедления прогрессирования атеросклероза, предотвращения будущих сердечно-сосудистых событий [50].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая важную роль и универсальность MAP-киназных каскадов в регуляции клеточного роста и дифференцировке, перспективно изучение участия данных механизмов в универсальных биологических процессах, таких как воспаление, регенерация, ремоделирование. Все они связаны с развитием и (или) перестройкой соединительнотканых структур. Понимание роли MAPK каскадов в этих процессах открывает возможность разработки способов воздействия на рост соединительной ткани. Использование стимуляторов и блокаторов MAP-киназных механизмов перспективно как новое направление в лечении многих заболеваний, патогенез которых связан с избыточным или недостаточным ростом соединительнотканых структур.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания по проекту 0543-2014-0003.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kyriakis J.M., Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update // *Physiol. Rev.* 2012; Apr. 92 (2): 689–737. DOI: 10.1152/physrev.00028.2011.
2. Yao Y., Li W., Wu J., Germann U.A., Su M.S., Kuida K., Boucher D.M. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; Oct. 100 (22): 12759–12764.
3. Pages G., Guerin S., Grall D., Bonino F., Smith A., Anjuere F., Auburger P., Pouyssegur J. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice // *Science.* 1999; Nov. 286 (5443): 1374–1377.
4. Bode A.M., Dong Z. The functional contrariety of JNK // *Mol. Carcinog.* 2007; Aug. 46 (8): 591–598.
5. Waetzig V., Herdegen T. Context-specific inhibition of JNKs: overcoming the dilemma of protection and damage // *Trends Pharmacol. Sci.* 2005; Sep. 26 (9): 455–461.
6. De Boer W.I. Perspectives for cytokine antagonist therapy in COPD // *Drug Discov. Today.* 2005; Jan. 10 (2): 93–106.
7. Kant S., Schumacher S., Singh M.K., Kispert A., Kotlyarov A., Gaestel M. Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5 // *J. Biol. Chem.* 2006; Nov. 281 (46): 35511–35519.
8. Coulombe P., Meloche S. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007; Aug. 1773(8): 1376–1387.
9. Boutros T., Chevet E., Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer // *Pharmacol. Rev.* 2008; Sep. 60 (3): 261–310. DOI: 10.1124/pr.107.00106.
10. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Зеленин Н.В., Гранина Г.Б. Роль MAP-киназных механизмов в регуляции клеточного роста (обзор литературы) // *Сиб. мед. журн. (Иркутск).* 2009; 89 (6): 36–40.
- Shurygina I.A., Shurygin M.G., Zelenin N.V., Grani-na G.B. Rol' MAR-kinaznykh mekhanizmov v regulyatsii kletochного rosta (obzor literatury) [Role of MAP-kinase mechanisms in the regulation of cell growth (review)] // *Sibirskiy meditsinskiy zbornal (Irkutsk) – Siberian Medical Journal (Irkutsk).* 2009;. 89 (6): 36–40 (in Russian).
11. Атауллаханов Ф.И. Каскады ферментативных реакций и их роль в биологии // *Соросовский образовательный журнал.* 2000; 6 (7): 2–10.
- Ataullakhanov F.I. Kaskady fermentativnykh reaktsiy i ikh rol' v biologii [The cascades of enzymatic reactions and their role in biology] // *Sorosovskiy obrazovatel'nyy zbornal – Soros Educational Journal.* 2000; 6 (7): 2–10 (in Russian).
12. Li M., Georgakopoulos D., Lu G., Hester L., Kass D.A., Hasday J., Wang Y. p38 MAP kinase mediates inflammatory cytokine induction in cardiomyocytes and extracellular matrix remodeling in heart // *Circulation.* 2005; May. 111 (19): 2494–2502.
13. Maulik N. Effect of p38 MAP kinase on cellular events during ischemia and reperfusion: possible therapy // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005; Dec. 289 (6): 2302–2303.
14. Das D.K., Maulik N. Preconditioning potentiates redox signaling and converts death signal into survival signal // *Arch. Biochem. Biophys.* 2003; Dec. 420 (2): 305–311.
15. Sato M., Cordis G.A., Maulik N., Das D.K. SAPKs regulation of ischemic preconditioning // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000; Sep. 279 (3): 901–907.
16. Loufrani L., Lehoux S., Tedgui A., Levy B.I., Henrion D. Stretch induces mitogen-activated protein kinase activation and myogenic tone through 2 distinct pathways // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999; Dec. 19 (12): 2878–2883.
17. Ryder J.W., Fahlman R., Wallberg-Henriksson H., Ales-si D.R., Krook A., Zierath J.R. Effect of contraction on mitogen-activated protein kinase signal transduction in skeletal muscle. Involvement Of the mitogen- and stress-activated protein kinase 1 // *J. Biol. Chem.* 2000; Jan. 275 (2): 1457–1462.
18. Wretman C., Lionikas A., Widegren U., Lannergren J., Westerblad H., Henriksson J. Effects of concentric and eccentric contractions on phosphorylation of MAPK(erk1/2) and MAPK(p38) in isolated rat skeletal muscle // *J. Physiol.* 2001; Aug. 535 (1): 155–164.
19. Martineau L.C., Gardiner P.F. Insight into skeletal muscle mechanotransduction: MAPK activation is quantitatively related to tension // *J. Appl. Physiol.* 2001; Aug. 91 (2): 693–702.
20. Boppart M.D., Hirshman M.F., Sakamoto K., Fielding R.A., Goodyear L.J. Static stretch increases c-Jun NH2-terminal kinase activity and p38 phosphorylation in rat skeletal muscle // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001; Feb. 280 (2): 352–358.
21. Kjaer M., Magnusson P., Krogsgaard M., Boysen Moller J., Olesen J., Heinemeier K., Hansen M., Haraldsson B., Koskinen S., Esmarck B., Langberg H. Extracellular matrix adaptation of tendon and skeletal muscle to exercise // *J. Anat.* 2006. Apr. 208 (4): 445–450.
22. Garrington T.P., Johnson G.L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999. Apr. 11 (2): 211–218.
23. Yue X.J., Guo Y., Yang H.J., Feng Z.W., Li T., Xu Y.M. Transforming growth factor-β1 induces fibrosis in rat meningeal mesothelial cells via the p38 signaling pathway // *Mol. Med. Rep.* 2016. Aug. 14 (2): 1709–1713. DOI: 10.3892/mmr.2016.5411.
24. Cao Y.L., Duan Y., Zhu L.X., Zhan Y.N., Min S.X., Jin A.M. TGF-β1, in association with the increased expression of connective tissue growth factor, induce the hypertrophy of the ligamentum flavum through the p38 MAPK pathway // *Int. J. Mol. Med.* 2016; Aug. 38 (2): 391–398. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2631.

25. Luo Y.H., Ouyang P.B., Tian J., Guo X.J., Duan X.C. Rosiglitazone inhibits TGF- β 1 induced activation of human Tenon fibroblasts via p38 signal pathway // *PLoS One*. 2014; Aug. 9 (8): e105796. DOI: 10.1371/journal.pone.0105796.
26. Xiao Y.Q., Liu K., Shen J.F., Xu G.T., Ye W. SB-431542 inhibition of scar formation after filtration surgery and its potential mechanism // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2009; Apr. 50 (4): 1698–1706. DOI: 10.1167/iovs.08-1675.
27. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Granina G.B., Zelenin N.V. Application of mitogen-activated protein kinase inhibitor SP 600125 for wound healing control // *J. Regenerative Medicine & Tissue Engineering*. 2013; 2. DOI: <http://dx.doi.org/10.7243/2050-1218-2-9>.
28. Гранина Г.Б., Зеленин Н.В., Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Лепехова С.А., Зеленин В.Н. Подавление активности Jnk MAPK в регуляции синтеза коллагена при раневом процессе // *Бюл. Восст.-Сиб. научн. центра СО РАМН*. 2010; 5; 177–179.
- Granina G.B., Zelenin N.V., Shurygina I.A., Shurygin M.G., Lepekhova S.A., Zelenin V.N. Podavlenie aktivnosti Jnk MAPK v regulyatsii sinteza kollagena pri ranevom protsesse [Suppression of activity of Jnk MAPK in regulation of collagen synthesis at wound process] // *Bulleten' Vostocno-Sibirskogo nauchnogo centra – Bulletin of the East Siberian Scientific Center SB RAMS*. 2010; 5; 177–179 (in Russian).
29. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Гранина Г.Б., Зеленин Н.В., Аюшинова Н.И. Активность MAP-киназных систем при репаративном процессе: оценка с использованием лазерной конфокальной микроскопии // *Изв. РАН. Сер. физическая*. 2016; 80 (1): 19–21. DOI: 10.7868/S036767651601021X.
- Shurygin M.G., Shurygina I.A., Granina G.B., Zelenin N.V., Ayushinova N.I. Aktivnost' MAP-kinaznykh sistem pri reparativnom protsesse: otsenka s ispol'zovaniem lazernoy konfokal'noy mikroskopii [Activity of MAP-kinase systems in reparative process: evaluation using laser confocal microscopy] // *Izv. RAN. Ser. fizicheskaya – Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. 2016; 80 (1): 19–21 (in Russian). DOI: 10.7868/S036767651601021X.
30. Шурыгина И.А., Мантурова Н.Е., Зеленин Н.В., Гранина Г.Б., Шурыгин М.Г. Использование блокатора р38 митогенактивируемой протеинкиназы для формирования послеоперационного рубца // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. 2014; 3: 41–45.
- Shurygina I.A., Manturova N.E., Zelenin N.V., Granina G.B., Shurygin M.G. Ispol'zovanie blokatora r38 mitogenaktiviruemoy proteinkinazy dlya formirovaniya posleoperatsionnogo rubtsa [Using p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor for the formation of the postoperative scar] // *Annaly plasticheskoy, rekonstruktivnoy i esteticheskoy khirurgii – Annals of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*. 2014; 3: 41–45 (in Russian).
31. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Ayushinova N.I., Granina G.B., Zelenin N.V. Mechanisms of connective tissue formation and blocks of mitogen activated protein kinase // *Front. Chem. Sci. Eng*. 2012; 6 (2): 232–237. DOI: 10.1007/s11705-012-1286-1.
32. WO 2012156938. Compounds, pharmaceutical compositions and a method for the prophylaxis and treatment of the adhesion process / Shurygin M.G., Shurygina I.A.; published 22.11.2012.
33. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Аюшинова Н.И., Кая О.В. Фибробласты и их роль в развитии соединительной ткани // *Сиб. мед. журн. (Иркутск)*. 2012; 110 (3): 8–12.
- Shurygina I.A., Shurygin M.G., Ayushinova N.I., Kanya O.V. Fibroblasty i ikh rol' v razvitii soedinitel'noy tkani [Fibroblasts and their role in the development of connective tissue] // *Sibirskiy meditsinskiy zbornal (Irkutsk) – Siberian Medical Journal (Irkutsk)*. 2012; 110 (3): 8–12 (in Russian).
34. Liang C.J., Yen Y.H., Hung L.Y., Wang S.H., Pu C.M., Chien H.F., Tsai J.S., Lee C.W., Yen F.L., Chen Y.L. Thalidomide inhibits fibronectin production in TGF- β 1-treated normal and keloid fibroblasts via inhibition of the p38/Smad3 pathway // *Biochem. Pharmacol*. 2013; Jun. 85 (11): 1594–1602. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.02.038.
35. Song J., Xu H., Lu Q., Xu Z., Bian D., Xia Y., Wei Z., Gong Z., Dai Y. Madecassoside suppresses migration of fibroblasts from keloids: involvement of p38 kinase and PI3K signaling pathways // *Burns*. 2012; Aug. 38 (5): 677–684. DOI: 10.1016/j.burns.2011.12.017.
36. He S., Liu X., Yang Y., Huang W., Xu S., Yang S., Zhang X., Roberts M.S. Mechanisms of transforming growth factor beta(1)/Smad signalling mediated by mitogen-activated protein kinase pathways in keloid fibroblasts // *Br. J. Dermatol*. 2010; Mar. 162 (3): 538–546. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2009.09511.x.
37. Xia W., Longaker M.T., Yang G.P. P38 MAP kinase mediates transforming growth factor-beta2 transcription in human keloid fibroblasts // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2006; Mar. 290 (3): 501–508.
38. Du Q.C., Zhang D.Z., Chen X.J., Lan-Sun G., Wu M., Xiao W.L. The effect of p38MAPK on cyclic stretch in human facial hypertrophic scar fibroblast differentiation // *PLoS One*. 2013; Oct. 8 (10): e75635. DOI: 10.1371/journal.pone.0075635.
39. Westra I.M., Mutsaers H.A., Luangmonkong T., Hadi M., Oosterhuis D., de Jong K.P., Groothuis G.M., Olinga P. Human precision-cut liver slices as a model to test anti-fibrotic drugs in the early onset of liver fibrosis // *Toxicol. In Vitro*. 2016; Sep. 35: 77–85. DOI: 10.1016/j.tiv.2016.05.012.
40. Rohani M.G., Parks W.C. Matrix remodeling by MMPs during wound repair // *Matrix Biol*. 2015; May-Jul. 44–46: 113–121. DOI: 10.1016/j.matbio.2015.03.002.
41. Holmstrom K.M., Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling //

- Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2014; Jun. 15 (6): 411–421. DOI: 10.1038/nrm3801.
42. Nelson K.K., Melendez J.A. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases // *Free Radic. Biol. Med.* 2004; Sep. 37 (6): 768–784.
43. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремина Н.Н., Каня О.В. Матриксная металлопротеаза 9 и ремоделирование при инфаркте миокарда // *Бюл. Вост.-Сиб. научн. центра СО РАМН.* 2013; 90 (2–1): 138–141.
- Shurygin M.G., Shurygina I.A., Dryomina N.N., Kanya O.V. Matriksnaya metalloproteaza 9 i remodelirovanie pri infarkte miokarda [Matrix metalloproteinase 9 and remodeling after myocardial infarction] // *Bulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo centra – Bulletin of the East Siberian Scientific Center SB RAMS.* 2013; 90 (2–1): 138–141 (in Russian).
44. Ravanti L., Heino J., Lypcz-Ottn C., Kahari V.M. Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase // *J. Biol. Chem.* 1999; Jan. 274 (4): 2446–2455.
45. Westermarck J., Li S.P., Kallunki T., Han J., Kahari V.M. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression // *Mol. Cell. Biol.* 2001; Apr. 21 (7): 2373–2383.
46. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А. Фактор роста фибробластов как стимулятор ангиогенеза при инфаркте миокарда // *Сибирский научный медицинский журнал.* 2010; 30 (6): 89–92.
- Shurygin M.G., Shurygina I.A. Faktor rosta fibroblastov kak stimulyator angiogeneza pri infarkte miokarda [Fibroblast growth factor as a stimulator of angiogenesis at myocardial infarction] // *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal – Siberian Journal of Medical Research.* 2010; 30 (6): 89–92 (in Russian).
47. Coumoul X., Deng C.X. Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases // *Birth. Defects Res. C Embryo Today.* 2003; Nov. 69, (4): 286–304.
48. Engel F.B., Hsieh P.C., Lee R.T., Keating M.T. FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; Oct. 103 (42): 15546–15551.
49. Kytтары V.C. Kinase inhibitors: a new class of antirheumatic drugs // *Drug Des. Devel. Ther.* 2012; 6: 245–250.
50. Kragholm K., Newby L.K., Melloni C. Emerging treatment options to improve cardiovascular outcomes in patients with acute coronary syndrome: focus on losmapimod // *Drug Des. Devel. Ther.* 2015; Aug. 9: 4279–4286.
51. Cohen S.B., Cheng T.T., Chindalore V., Damjanov N., Burgos-Vargas R., Delora P., Zimany K., Travers H., Caulfield J.P. Evaluation of the efficacy and safety of pamapimod, a p38 MAP kinase inhibitor, in a double-blind, methotrexate-controlled study of patients with active rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* 2009; Feb. 60 (2): 335–344.

Поступила в редакцию 24.08.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Шурыгина Ирина Александровна, д-р мед. наук, профессор РАН, зам. директора по научной работе, ИНЦХТ, г. Иркутск.

Шурыгин Михаил Геннадьевич, д-р мед наук, зав. научно-лабораторным отделом, ИНЦХТ, г. Иркутск.

Зеленин Николай Вадимович, пластический врач-хирург, ИНЦХТ, г. Иркутск.

Аюшинова Наталья Ильинична, врач-хирург высшей квалификационной категории, отделение гнойной хирургии № 1, ИНЦХТ, г. Иркутск.

(✉) Шурыгина Ирина Александровна, e-mail: irinashurygina@gmail.com.

УДК 611-018.2:577.112

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-86–93

For citation: Shurygina I.A., Shurygin M.G., Zelenin N.V., Ayushinova N.I. Influence on mitogen-activated protein kinases as a new direction of connective tissue growth regulation. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2017; 16 (4): 86–93.

Influence on mitogen-activated protein kinases as a new direction of connective tissue growth regulation

Shurygina I.A., Shurygin M.G., Zelenin N.V., Ayushinova N.I.

Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology (ISCST)
1, Bortsov Revolutsii Str., Irkutsk, 664003, Russian Federation

ABSTRACT

This review presents current classification, functions of main groups of mitogen-activated protein kinases (MAPK) and summarizes data on the ways of their activation and functioning, giving particular emphasis to p38 MAPK. The authors consider the influence on these signaling cascades as a promising direction for activation of connective tissue growth. This article summarizes international practices on the activation and blocking of intracellular cascades and also the authors' own experience in this field. In particular, the article shows that p38 MAP-kinase stimulation while JNK inactivation causes accelerated formation of connective tissue in the area of postoperative surgical scar. The authors prove the opportunity to manage connective tissue growth influencing MAPK cascades – prolonged blockade of p38 MAPK reduces scar width and collagen fiber density in the area of postoperative scars and decreases intensity of adhesions in the abdominal cavity in abdominal trauma.

Therefore, considering the importance and flexibility of MAP-kinase mechanisms of cell growth regulation and differentiation, studying the use of these mechanisms in biological processes (such as inflammation, apoptosis, regeneration) and the development the methods of management of these processes show promise. Using stimulators and inhibitors of MAP-kinase mechanisms is a promising new direction in treatment of the diseases with pathogeny related to the disorder of cellular differentiation, proliferation, excessive cytokine production and regulation of connective tissue growth.

Key words: mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK, JNK MAPK, ERK MAPK, MAPK inhibitor, connective tissue.

Received August 24.2017
Accepted November 08.2017

Shurygina Irina A., DM, Professor, Deputy Director for Research, ISCST, Irkutsk, Russian Federation.

Shurygin Michail G., DM, Head of Scientific and Laboratory Department, ISCST, Irkutsk, Russian Federation.

Zelenin Nikolaj V., Surgeon, ISCST, Irkutsk, Russian Federation.

Ayushinova Natalia I., Surgeon, Department of Purulent Surgery No. 1, ISCST, Irkutsk, Russian Federation.

(✉) Shurygina Irina A., e-mail: irinashurygina@gmail.com.

УДК 577.27

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-94-105

Для цитирования: Юшков Б.Г. Клетки иммунной системы и регуляция регенерации. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 94–105.

Клетки иммунной системы и регуляция регенерации

Юшков Б.Г.

*Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения (УрО) Российской академии наук (РАН)
Россия, 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106*

*Институт медицинских клеточных технологий
Россия, 620026, г. Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22а*

РЕЗЮМЕ

Предложена теория иммунологической регуляции регенерации тканей. Дана оценка роли макрофагов, лимфоцитов, тучных клеток, тромбоцитов, эндотелиоцитов в восстановлении структуры функционального элемента поврежденного органа. Обсуждаются механизмы взаимодействия клеток иммунной системы в процессе регенерации. Представлены основные факторы, определяющие дифференцировку стволовых клеток. В качестве одного из компонентов восстановительного процесса рассматривается апоптоз.

Ключевые слова: регенерация, клетки иммунной системы.

Эффективность регенерации определяется, с одной стороны, качеством восстановления отдельного функционального элемента, а с другой, – долей восполнения утраченных функциональных элементов в поврежденном органе. При этом важную роль в восстановительных процессах играют клетки иммунной системы.

МАКРОФАГИ И РЕГЕНЕРАЦИЯ

Обычно макрофагам приписывают роль «мусорщиков», подготавливающих поле для регенераторных процессов. Однако, вероятно, их следует рассматривать как регуляторы этого процесса.

На регуляторную роль макрофагов в репаративных процессах указывает ряд фактов: макрофаги концентрируются в тканевых зонах роста [1], находятся в центре эритробластических островков, принимая участие в образовании клеток крови [2, 3]. Угнетение или стимуляция системы мононуклеарных фагоцитов соответственно ослабляет или усиливает развитие грануляционной ткани в очаге гнойного воспаления. Если у

мышей с поврежденными скелетными мышцами создать искусственный дефицит макрофагов, мышечная ткань восстанавливается медленно, но в большом количестве образуются фиброзные рубцы [4]. Темп регенерации мышц, поврежденных кардиотоксином, у мышей с дефицитом гена *Sbl-b* зависит от функционального состояния макрофагов [5]. У новорожденных мышей регенерация миокарда и неангиогенез при экспериментальном инфаркте миокарда также зависят от макрофагов [6].

Известно, что у млекопитающих глубокие обширные раны заживают продолжительно, при этом поврежденные ткани никогда не восстанавливаются полностью, на месте повреждения мышц и кожи образуются коллагеновые рубцы, остаются шрамы. В то же время аксолотль (*Ambystoma mexicanum*, способная к размножению личинка амбистомы, близкого родственника настоящих саламандр) легко восстанавливает утраченные конечности. При этом состав биологически активных веществ, участвующих в регенерации и у млекопитающих, и у аксолотля примерно одинаков. Основное отличие между ними заключается в том, когда они начинают действо-

✉ Юшков Борис Германович, e-mail: b.yushkov@iip.uran.ru.

вать. Так, у аксолотля макрофаги прибывают в рану существенно раньше, чем у млекопитающих. Они появляются в ране аксолотля уже в 1-е сут после ампутации лапки, достигают пика численности на 4–6-е сут пребывают в поврежденных тканях и регенерирующей конечности 2 нед, до завершения ранней стадии регенерации. У млекопитающих же количество макрофагов в поврежденной ткани возрастает спустя 48–96 ч после травмы. После инъекции аксолотлю за 1 сут до ампутации клодроната, специфически связывающего циркулирующие в крови моноциты и находящиеся в тканях макрофаги, первые 6 сут регенерация проходит при остром дефиците макрофагов, ростовых факторов и других молекул, необходимых для полноценного заживления ран и регенерации конечностей. Несмотря на то что спустя 1 нед количество макрофагов приходит в норму, конечность вырастает куцая. Если сделать аксолотлю не одну инъекцию, а три, количество макрофагов в ране падает практически до нуля – вместо лапы образуется покрытая шрамами фиброзная культя, как у млекопитающих. После ампутации культя, которая не превратилась в конечность, при наличии макрофагов в должном количестве аксолотль отращивает нормальную лапу. Восстановление возможно даже на 150-е сут после первой ампутации. Отсутствие макрофагов на поздней стадии регенерации, когда уже образовалась бластема (скопление однородных неспециализированных клеток, формирующих ткань отрастающего органа), замедляет регенерацию, но не блокирует ее [4].

Доказано, что для полноценной регенерации поврежденной ткани необходимо восстановление ее соединительнотканного каркаса. В этом процессе ведущее место отводится фибробластам. Пролиферация фибробластов начинается в 1-е ч после тканевого повреждения и достигает максимума между 2–10-ми сут. Фибробласты синтезируют коллагенолитические ферменты, продукция которых усиливается под влиянием тучных клеток и активированных макрофагов. Стимулы, регулирующие активность фибробластов, не могут считаться окончательно выясненными; однако известно, что к ним относятся продукты макрофагов (монокины) и, в частности, интерлейкин (IL) 1, трансформирующий фактор роста (TGF) β и фактор некроза опухоли (TNF) α , через секрецию которых макрофаг посылает сигналы фибробласту [7, 8].

Повышенная экспрессия макрофагами TNF α при низком уровне экспрессии TGF β_1 в соединительной ткани в зоне введения аллогенного био-

материала способствует дифференциации фибробластов с умеренной продукцией коллагена. Напротив, низкий уровень экспрессии TNF α и выраженная экспрессия TGF β_1 в соединительной ткани при имплантации ксеногенного биоматериала приводят к дифференциации миофибробластов и фибробластов с избыточной продукцией коллагена и фиброзу [9].

Примечательно, что макрофаги не только способны активировать деление фибробластов и синтез коллагена, но и секретируют коллагеназу, взаимодействующую с продуцируемым фибробластами коллагеном. С другой стороны, новообразованный коллаген обладает хемотаксическими свойствами по отношению к макрофагам. В связи с этим макрофаги и фибробласты могут рассматриваться как содружественная клеточная система, функционирующая при повреждении и структурном восстановлении соединительной ткани. Значение соединительнотканной основы для полноценной регенерации поврежденного органа показывают эксперименты с использованием формирующейся вокруг инородного тела соединительнотканной капсулы для протезирования поврежденного органа. В нашей лаборатории мы использовали ее при пластике сосудов, кожи и мочевого пузыря. Во всех случаях на основе соединительнотканного каркаса формировалась ткань протезируемого органа [10–13]. В качестве основы можно использовать соединительнотканый каркас целого органа, например сердца после удаления специфических клеток [14].

Повреждение тканей уже само по себе формирует сильные хемотаксические сигналы для стволовых клеток, создавая основу для их рекрутирования в направлении поврежденных клеток. На примере инфаркта миокарда показано, что при внутримиекардиальном, интракоронарном или внутривенном введении мезенхимальных стволовых клеток (MSC) они мигрируют в сторону поврежденного участка сердца, предотвращают ремоделирование желудочка, а также в значительной мере восстанавливают сердечную функцию. Оказалось, что только подвергшиеся апоптозу кардиомиоциты обеспечивают рекрутирование MSC. Ни живые, ни некротизированные кардиомиоциты этим свойством не обладают [15].

Связь между апоптотически погибающими клетками и рекрутируемыми клетками с регенераторным потенциалом обеспечивается их взаимодействием с фактором роста гепатоцитов (hepatocyte growth factor, HGF) и его рецептором – MET-рецептором [15]. Таким образом, миграция

MSC к апоптотическим клеткам ткани является HGF-опосредованной.

Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) – еще один важный медиатор, участвующий в обороте стволовых клеток и обеспечивающий ир-регуляцию после ишемии миокарда. В экспериментах на мышцах показана роль SDF-1/CXCR4-рецептора в индукции (запуске) рекрутирования костномозговых клеток-предшественниц в левый желудочек после внутривенного их введения [16]. Совсем недавно появилось исследование, касающиеся роли insulin-like growth factor 1 (IGF-1) в регуляции хоуминга MSCs [17, 18].

Метаболический фон в поврежденной ткани влияет на пролиферацию и дифференцировку мигрировавших клеток-предшественниц. Ежедневные инъекции различных метаболитов мышам-реципиентам в течение 6 сут, предшествующих летальному облучению и трансплантации сингенного костного мозга, приводят к образованию на селезенках большего количества колоний, чем у неподготовленных животных: при введении сукцината натрия на 78,6%, а β -оксибутирата натрия, инозина или цАМФ на 67,9; 74,1 и 108% соответственно. Три последних метаболита обладают также способностью повышать скорость роста колоний на селезенке [19]. Кислые гликозаминогликаны поддерживают дифференцировку гемопоэтических клеток-предшественниц в гранулоцитарном направлении, а нейтральные – в эритроидном [19].

Однако только одного каркаса и соответствующих физических и химических воздействий далеко недостаточно для полноценного развития стволовых клеток. Так, при их выращивании на каркасе сердца всего через 4 сут клетки размножаются настолько, что начинается сокращение новой ткани, а через 8 сут реконструированное сердце уже может выполнять насосную функцию, но лишь всего на уровне 2% от мощности здорового взрослого сердца и 17% от сердца эмбриона [14]. Следовательно, в репаративных процессах требуется участие и других структур функционального элемента. Известно, что макрофаги способны посылать регенеративные сигналы морфогенетическому лимфоциту [20], тучной клетке и эндотелиоциту через vascular endothelial growth factor (VEGF) [21, 22].

ЛИМФОЦИТЫ И РЕГЕНЕРАЦИЯ

В настоящее время накоплен большой фактический материал, который показывает, что лимфоциты при восстановительных процессах во

многих органах приобретают цитогенетическую активность и при пересадке неоперированному животному стимулируют клеточное деление преимущественно в его гомологичных органах. Это показано при регенерации печени, почек, тонкой кишки, кроветворной ткани, легких, слюнных желез, гипертрофии миокарда. Феномен получил название «передача регенерационной информации» [23, 24]. Вместе с тем это явление оказалось более сложным, чем представлялось первоначально. По всей видимости, речь идет о нескольких различных популяциях лимфоцитов, оказывающих на регенерацию различное действие и образующих единую регуляторную систему.

D. Burzup и соавт. (2013) выделили отдельную популяцию регуляторных Т-лимфоцитов Foxp3(+)/CD4(+), находящихся в поврежденной мышце длительное время и после того, как процесс воспаления завершается, и отличающиеся от других регуляторных Т-клеток [25]. Если эти клетки в мышце отсутствуют, то регенерация происходит медленнее.

S. Reinke и соавт. (2013) выделили еще одну популяцию Т-лимфоцитов, участвующих в регуляции регенерации костной ткани – терминально дифференцированные Т-клетки-эффекторы памяти CD8(+) (TEMRA) (CD3(+)/CD8(+)/CD11a(++)/CD28(-)/CD57(+), которые накапливаются в гематоме, образующейся в области перелома кости. При повышении их содержания в периферической крови переломы заживают медленнее. Показано, что эта популяция лимфоцитов продуцирует IFN γ (интерферон гамма) и TNF α , которые ингибируют приживаемость и остеогенную дифференцировку мезенхимальных стромальных клеток. По данным авторов, истощение популяции Т-лимфоцитов CD8(+) у мышей ускоряет заживление у животных костных переломов, в то время как трансплантация этих клеток тормозит процесс [26].

На примере регенерирующей печени показано, что передача спленоцитами и тимоцитами морфогенетического сигнала и его характер обусловлены различными клетками иммунной системы: внутриклеточный тип регенерации – преимущественно независимыми от макрофагов Т-лимфоцитами, а клеточный – макрофагами и зависимыми от них лимфоцитами. При этом существенную роль играет функциональное состояние лимфоидных клеток регенерирующей ткани. Активация иммунных функций Т-лимфоцитов приводит к уменьшению их способности стимулировать клеточный тип регенерации, следовательно, между морфогенетической и иммунной функциями имеют место реципрокные взаимоотношения [20].

Приведенные данные свидетельствуют, что типирование морфогенетических лимфоцитов и анализ их взаимодействия требуют специальных исследований. Вместе с тем целый ряд возможных механизмов лимфоцитарной регуляции репаративных процессов уже установлен:

- Т-лимфоциты, выделяя TNF α , тормозят секрецию фибробластами коллагена;

- Т-лимфоциты, выделяя IFN γ и стимулируя продукцию матриксной металлопротеиназы макрофагов, тормозят деление гладкомышечных клеток и синтез коллагена;

- активированные Т-лимфоциты индуцируют дегрануляцию и секрецию цитокинов, в том числе TNF α , тучными клетками в результате клеточ-но-клеточного контакта;

- Т-лимфоциты участвуют в ангиогенезе. Показано, что Т-лимфоциты периферической крови и лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, экспрессируют VEGF; выявлен особый фенотип ангиогенных Т-клеток CD3(+)CD31(+)CXCR4(+), способных к активному синтезу VEGF, IL-8 и матриксных металлопротеиназ [27];

- В-лимфоциты участвуют в ангиогенезе. Экспериментально доказано, что введение стимулятора В-клеток фрактазола мышам в зону ишемии, вызванной перевязкой и последующей перерезкой бедренной артерии, стимулирует образование в ней капилляров [28];

- Т-лимфоциты регулируют пролиферацию фибробластов, в том числе посредством выделяемых лимфокинов. Имеются сообщения, что Т-лимфоциты ингибируют секрецию коллагена фибробластами кожи благодаря мембраносвязанному TNF α . Другие цитокины, особенно IFN γ из активированных Т-лимфоцитов, тормозят деление гладкомышечных клеток и синтез коллагена;

- лимфоциты регулируют рост стволовых клеток: добавление клеток тимуса к сингенному костному мозгу повышает его способность образовывать колонии на селезенках облученных реципиентов, а трансплантация тимоцитов облученным мышам ускоряет восстановление кроветворения.

ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ И РЕГЕНЕРАЦИЯ

После гепатэктомии уже через 4 ч (в деструктивно-реактивную фазу регенерации) у крыс в печени возрастает количество тучных клеток, через 17 ч после операции (в пролиферативную фазу) количество тучных клеток несколько снижается, но остается выше, чем у интактных

животных. При этом морфологически они отличаются от мастоцитов печени у интактных животных, что подтверждает факт их миграции извне. Функциональная активность тучных клеток остается высокой. При кровопотере количество тучных клеток в костном мозге не меняется, но снижается степень их дегрануляции [29].

Показано, что после механического повреждения семенников у крыс снижение индекса дегрануляции тучных клеток при действии кетотифена (стабилизатора мембран тучных клеток) сопровождается повышением репаративной регенерации тестикул [30]. Необходимо отметить, что большинство цитокинов тучных клеток не только стимулирует ангиогенез, но и вызывает пролиферацию и созревание фибробластов и образование соединительной ткани [31].

При оценке влияния тучных клеток на регенерацию кроветворной ткани установлено, что оно может быть опосредовано как через гистамин, так и практически через весь спектр продуцируемых ими кислых гликозаминогликанов (ГАГ): гепарин, хондроитинсульфаты А и В, глюкуроновую кислоту. При этом в качестве одной из точек приложения их действия выступают фибробласты. Взаимодействие между тучными клетками и фибробластами носит, очевидно, двухсторонний характер. Предполагается, что и фибробласты продуцируют ростовые вещества для тучных клеток [32].

ЭНДОТЕЛИОЦИТЫ, АНГИОГЕНЕЗ И РЕГЕНЕРАЦИЯ

Ангиогенез в поврежденной ткани – еще один ключевой механизм восстановления нарушенных функций, который регулируется множеством про- и антиангиогенных факторов [33]. Быстрая ревазуляризация поврежденной ткани или регенерирующего органа служит предпосылкой восстановления долгосрочных функций ткани [30]. Ревазуляризация инициируется и поддерживается на местном уровне взаимодействием эндотелиальных клеток, а также системным привлечением комплекса (набора) регенеративных клеток [34].

Мелкие дефекты, захватывающие несколько эндотелиоцитов, могут закрываться в течение 48 ч за счет распластывания клеток. При повреждениях большего размера «наполнение» пласта эндотелиоцитов на край раны обусловлено в первую очередь усилением их пролиферации. Одновременно возрастает содержание двуядерных клеток и полиморфизм эндотелиального пласта.

Эндотелиоциты делятся не только у краев раны, но и (в меньшей степени) – в отдалении от нее. Сроки и выраженность процессов репарации неодинаковы после повреждений, различающихся по механизму, объему и времени суток нанесения, условий гемодинамики и типа сосуда. Так, темпы реэндотелизации существенно выше вдоль сосуда, чем в поперечном направлении, скорость «наползания» пласта в венах больше (до 1 мм/сут), чем в артериях (0,5 мм/сут) [35].

Выраженность нормального и патологического ангиогенеза коррелирует с численностью и относительной плотностью тучных клеток. Некоторые факторы, стимулирующие ангиогенез, одновременно индуцируют миграцию тучных клеток в участки ангиогенеза, а локальное накопление этих клеток облегчает ангиогенез [36].

В образовании сосудов главная роль принадлежит факторам роста эндотелиальных клеток. Эти белковые вещества включают в себя факторы для активации, хемотаксиса и индукции митогенеза эндотелиоцитов, среди которых ключевым является VEGF, источником которого служат, в том числе, и тучные клетки [37]. Экспрессия и регуляция этого фактора в тучных клетках осуществляется простагландином E_2 . Данные клетки могут регулировать ангиогенез даже без процесса дегрануляции [38, 39].

На роль эндотелиоцитов в регенерации поврежденной ткани указывают эксперименты с резекцией печени. Оказалось, что синусоидальные эндотелиальные клетки продуцируют HGF, при этом клетки-предшественницы в этом отношении более активны, чем зрелые эндотелиоциты. При повреждении печени в орган мигрируют костномозговые предшественники синусоидальных эндотелиальных клеток, которые стимулируют репаративные процессы значительно больше, чем резидентные клетки [40].

N.F. Liu, Q.L. Не в своих исследованиях оценивали действие основного фактора роста фибробластов bFGF и рекомбинантных форм человеческого эпидермального фактора роста, TGF α , TNF α и IL-1 α на рост культур лимфатических эндотелиоцитов новорожденных телят. Фактор роста фибробластов, трансформирующий и эпидермальный факторы роста дозозависимо стимулировали пролиферацию эндотелиоцитов лимфатических сосудов. Синергизма в действии этих цитокинов выявлено не было. TNF α и IL-1 α подавляли размножение эндотелия. Кроме того, фактор роста фибробластов усиливал миграцию эндотелиоцитов лимфатических сосудов [41].

Пролиферативный ответ эндотелиоцитов свя-

зывают и с гепарином. Этот белок, синтезируемый тучными клетками, обладает митогенной активностью для эндотелиальных клеток и блокируется антагонистами гепарина (протамином или гепариназой) [42, 43]. Кроме того, находящийся в тучных клетках гистамин индуцирует продукцию VEGF и таким образом стимулирует ангиогенез [44]. Тучные клетки секретируют сами и вызывают освобождение из других клеток фактора роста фибробластов bFGF, обладающего ангиогенными свойствами [45, 46].

Помимо тучных клеток, ангиогенные факторы синтезируются стимулированными лимфоцитами, моноцитами, макрофагами и фибробластами. VEGF синтезируют многие тканевые клетки, в том числе гепатоциты, фибробласты, эпителиальные и сами эндотелиальные клетки.

В экспериментах с перевязкой и перерезкой бедренной артерии у крыс отмечено, что стимуляция макрофагов тамеритом и В-звена иммунитета фрактозолом повышает образование капилляров в зоне ишемии [28]. Таким образом, макрофагальное и В-клеточное звенья иммунной системы в значительной степени влияют на восстановление микроциркуляторного русла после ишемии.

Особое место занимает проблема участия костномозговых клеток-предшественниц в ангиогенезе в условиях патологии. К. Hamano et al. (2002) на модели экспериментального инфаркта миокарда показали, что в случае инъекции 2×10^7 клеток костного мозга в инфарктную и пограничную зону в них выявляется значительно больше микрососудов, чем в случае инъекции фосфатного буфера [47]. Этот эффект подтвержден и при инъекции клеток костного мозга в ишемизированную заднюю конечность [48].

Для инициации процесса ангиогенеза необходима дестабилизация – ослабление межклеточных контактов между эндотелиальными клетками, разрушение базальной мембраны, а также локальный протеолиз матриксных протеинов для того, чтобы эндотелиальные клетки или их предшественники из циркулирующей крови могли мигрировать и формировать новые сосуды.

В качестве ключевого регулятора ремоделирования в стенке сосудов после механического повреждения чаще всего рассматривается урокиназа [49]. Урокиназа является обязательным участником реакции сосуда на повреждение. В исследованиях на трансгенных животных [36, 50] и артериях приматов [51] установлено, что урокиназа является ключевым фактором развития неоинтимы. Было выявлено, что отсутствие гена урокиназы, также как и отсутствие генов обоих

активаторов плазминогена одновременно, приводит к подавлению роста неоинтимы. При этом у таких мышей гладкомышечные клетки неоинтимы лишены способности мигрировать, что связывают с участием урокиназы в расщеплении внеклеточного матрикса. Урокиназа синтезируется эндотелиальными и гладкомышечными клетками сосудов, эпителиальными клетками, фибробластами, моноцитами (или) макрофагами, а также клетками злокачественных опухолей различного происхождения [52].

Митогенная активность урокиназы наблюдалась на многих типах клеток, в том числе на человеческих эпидермальных клетках, нормальных и злокачественных клетках почки и клетках меланомы. Пролиферация, как показано на раковых клетках человека, зависит от взаимодействия комплекса uPA-uPAR, образованного урокиназой urokinase-type plasminogen activator (uPA) и ее рецептором uPAR с интегринами, в частности фибронектином, что ведет к активации белков p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) [53].

Урокиназа и образовавшийся под ее действием плазмин инициируют разрушение протеинов базальной мембраны, таких как фибронектин и ламинин. Они также могут активировать и (или) высвободить латентные матриксные металлопротеиназы, а также ангиогенные факторы роста, в частности VEGF, bFGF, HGF, TGF и platelet-derived growth factor (PDGF), которые в свою очередь способствуют миграции эндотелиальных клеток, их инвазии и пролиферации [54]. Блокада урокиназного рецептора uPAR/CD87 подавляет индуцируемые фактором роста фибробластов bFGF и эндотелиальным фактором роста сосудов VEGF миграцию эндотелиальных клеток и образование капилляроподобных трубочек в фибриновом матриксе [55].

Кроме того, фактор роста тромбоцитов PDGF – это мощный белок-митоген и хемотаксический агент для миофибробластов, клеток эпителия и эндотелиальных клеток, который стимулирует рекрутирование и пролиферацию клеток-предшественниц [56].

ТРОМБОЦИТЫ И РЕГЕНЕРАЦИЯ

Тромбоциты известны, главным образом, своей ролью в гемостазе, но они играют также ключевую роль как промежуточное звено в процессе заживления поврежденной ткани за счет способности выделять из своих α -гранул факторы роста [57]. Весьма интересно, что в тромбоцитах и мегакариocyтах обнаружен ангиопоэтин-1 (кото-

рый обеспечивает стабилизацию пролиферирующих эндотелиальных клеток и сосудов) в васкуляризованных тканях (в тканях с выраженной сосудистой сетью), в то время как он отсутствует в данных клетках бессосудистых зон. После активации тромбоцитов, например тромбином, из них высвобождается ангиопоэтин-1 [58].

Помимо стимуляторов ангиогенеза, тромбоциты выделяют ряд его ингибиторов, таких как эндостатин, тромбоцитарный фактор (TF) 4 или тромбоспондин (TSP) 1. Эндостатин специфически ингибирует пролиферацию эндотелиальных клеток, подавляет ангиогенез и рост опухоли [59]. TF-4 был первым гемостатическим белком, для которого показан ингибирующий ангиогенез эффект *in vivo* [60]. По крайней мере, частично антиангиогенная активность TF-4 обусловлена ингибированием его димеризации в результате взаимодействия с FGF-рецептором и интернализации образующегося комплекса. TSP также является ингибитором ангиогенеза; он дестабилизирует локальные контакты эндотелиальных клеток и тормозит пролиферацию последних [61]. Кроме того, тромбоспондины мегакариocyтов и тромбоцитов выступают в качестве основных антиангиогенных «переключателей» и определяют степень реваскуляризации в естественных условиях [62].

Немаловажную роль тромбоциты играют в апоптозе. Апоптоз – строго запрограммированная смерть клетки, призванная ограничить дальнейшее повреждение тканей и обычно ассоциируется с иммунологической толерантностью.

Накапливается все больше доказательств того, что регулирование баланса между апоптозом и клеточной выживаемостью, который определяет судьбу травмированных тканей, обеспечивается тромбоцитами. Индукция апоптоза обеспечивается разнообразными клеточными сигналами, которые могут быть либо внеклеточными (внешними), либо внутриклеточными (внутренними). В одном из внешних путей апоптоза задействован рецептор смерти, который является представителем рецепторов фактора некроза опухоли (TNF) [63]. TNF α – основной цитокин, регулирующий апоптоз [64]. Хотя наличие самого TNF α в тромбоцитах представляет предмет дискуссии, они экспрессируют множество цитокинов и родственных TNF α -лигандов, таких как CD95 (Fas-L), CD154 (CD40L), Apo2-L (TRAIL), Apo3-L (TWEAK) и LIGHT, которые способны регулировать апоптоз посредством паракринной сигнализации.

Основополагающие идеи о значении тромбоцитиндуцированного апоптоза можно почерпнуть

в области патофизиологии сепсиса [65–67]. Инкубация эндотелиальных клеток и SMCs с тромбоцитарными микрочастицами от септических больных приводит к выраженной индукции апоптоза в клетках, в результате выработки активных форм кислорода, что предполагает центральный механизм патогенеза сосудистой дисфункции при сепсисе [66, 67]. Как бы то ни было, но доказано, что тромбоцитарные микрочастицы способны фосфорилировать и активировать RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, protein kinase B alpha (Akt), серин-треониновую киназу, которая инактивирует проапоптоз смерти, ассоциированный с В-клеточной лимфомой 2 – RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, protein kinase B alpha (BAD) [68], и оказывает антиапоптотическую активность в TNP-1 клетках, линии клеток моноцитарного лейкоза человека, зависящей от β -селектина [69]. Интересно, что различные типы микрочастиц индуцируют различные ответы моноцитов в плане внутриклеточных кальциевых потоков и секреции C5a-фрагмента компонента, а также TNF α . Другая группа исследователей показала, что тромбоциты от септических мышей индуцирует апоптоз в мышечных CD4(+) спленоцитах благодаря независимому от микрочастиц механизму [65]. В данном исследовании апоптоз был опосредован сериновой протеазой – гранзимом В, активированным в мегакариоцитах септических мышей. Позже та же группа показала, что гранзим В гранул тромбоцитов опосредует апоптоз в селезенке и легких при непосредственных межклеточных контактах в условиях торможения ингибиторами гликопротеина IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) [70].

С другой стороны, тромбоциты способны осуществлять (транслировать) антиапоптотические механизмы, сдвигая равновесие в сторону выживаемости клеток и восстановления тканей. В нейрональных стволовых клетках тромбоцитарные микрочастицы индуцируют фосфорилирование Akt, сопряженное с нейрональной клеточной пролиферацией, выживаемостью и дифференцировкой [71]. Опосредованное микрочастицами тромбоцитов фосфорилирование Akt наблюдается также в эндотелиальных клетках. Показана повышенная регенерация эндотелиоцитов после инъекции обработанных микрочастицами ранних поколений эндотелиоцитов (эндотелиальных предшественников) в сонную артерию мыши при повреждении [72]. Кроме того, активированные тромбоциты выделяют медиаторы с антиапоптотическим действием, такие как HGF, SDF-1, серотонин, аденозиндифосфат и сфинго-

зин-1-фосфат, несущие сигналы к выживанию эндотелиоцитам и MSCs в местах повреждения сосудов. Высокомобильный протеин high-mobility group protein B1 (HMGB1) – ядерный белок, пассивно выходящий из некротических клеток в процессе их повреждения или активно секретируемый иммунными клетками, идентифицированный как сигнал опасности. Он активизирует иммунный ответ [73] и регулирует клеточную смерть и выживание, как было показано для опухолевых клеток, в зависимости от HMGB1-редокс статуса или образования комплекса с p53-белком. Тромбоциты содержат эндогенный HMGB1, который экспортируется на поверхности клетки после активации [74], что делает его еще одним кандидатом на роль тромбоцитарного звена регуляции клеточной смерти и выживания.

Клетки-мишени, их региональное распределение и выраженность поверхностной экспрессии соответствующих «смерть/выживание»-рецепторов определяют конечный результат про- и антиапоптотической функции тромбоцитов. Обсуждается роль тромбоцитов в процессах реиннервации при повреждении. Установлено, что в зону микротравмы выделяется большое количество тромбоцитов – источников серотонина и других биологически активных веществ, способствующих сосудистому спазму и химической сенсibilизации свободных нервных окончаний [75].

У нормальных животных нейроны коры сливаются с олигодендроцитами и образуют клетки с двумя ядрами – гетерокарионы. В гетерокарионе «нейрон-олигодендроцит» ядро олигодендроцита подвергается нейрон-специфическому репрограммированию. Оно становится похожим на ядро нейрона по структуре (величине, форме, строению хроматина). В таком ядре и на его поверхности начинают экспрессироваться специфические маркеры нейрона: NeuN и MAP2, и возрастает, подобно ядру нейрона, скорость транскрипции. С завершением репрограммирования в нейроне появляется второе нейрональное ядро. Постоянное образование у интактных животных двухядерных нейронов свидетельствует о том, что этот процесс выражает физиологическую регенерацию мозга [76].

При экспериментальном геморрагическом инсульте в коре мозга, окружающей очаг повреждения, увеличивается содержание двухядерных нейронов (гетерокарионов и дикарионов). У животных с максимальным увеличением содержания двухядерных нейронов в коре наблюдается максимальная скорость восстановления нарушенной инсультом двигательной активности. Эти факты

указывают на то, что образование двухядерных нейронов есть механизм репаративной регенерации нейронов коры. Присутствие тромбоцитов в очаге ускоряет восстановление функции, усиливает ангиогенез [76].

Таким образом, центральной задачей регенерации поврежденной ткани является максимальное восстановление количества и структуры ее функциональных элементов. В этом процессе важнейшую роль играют практически все клетки иммунной системы, любое нарушение баланса между которыми приводит к нарушению репаративных процессов. С этих позиций можно рассматривать иммунную систему в качестве системы, обеспечивающей тканевой гомеостаз как в физиологических условиях, так и при патологии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:

Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа профинансирована комплексной программой фундаментальных исследований УрО РАН № 15-3-4-24.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Казакова И.А. Механизмы влияния макрофагов на репаративную регенерацию: автореферат дис. ... канд. биол. наук: 03.03.01. Екатеринбург, 2014: 26.
2. Kazakova I.A. Mehanizmy vlijanija makrofagov na reparativnuju regeneraciju [Mechanisms of macrophages influence on the reparative regeneration]: avtoreferat dis. ... kand. biol. nauk: 03.03.01. Ekaterinburg, 2014: 26 (in Russian).
3. Захаров Ю.М.; Рассохин, А.Г. Эритробластический островок. М.: Медицина, 2002: 280.
4. Zaharov Ju.M., Rassohin A.G. Jeritroblasticheskij ostrovok [Erythroblastic islet]. M.: Medicina Publ., 2002: 280 (in Russian).
5. Bessis M. L'ilot erythroblastique unite fonctionelle de la moelle osseuse // *Rev. Hematol.* 1958; 13 (1): 8–11.
6. Godwin J.W., Pinto A.R., and N. A. Rosenthal N.A. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration // *PNAS.* 2013; 110 (23): 9415–9420. DOI: 10.1073/pnas.1300290110.
7. Kohno S., Ueji T., Abe T., Nakao R., Hirasaka K., Oarada M., Harada-Sukeno A., Ohno A., Higashibata A., Mukai R., Terao J., Okumura Y., Nikawa T. Rantes secreted from macrophages disturbs skeletal muscle regeneration after cardiotoxin injection in Cbl-b-deficient mice // *Muscle Nerve.* 2011; Feb., 43 (2): 223–229. DOI: 10.1002/mus.21829.
8. Aurora A.B., Porrello E.R., Tan W., Mahmoud A.I., Hill J.A., Bassel-Duby R., Sadek H.A., Olson E.N. Macrophages are required for neonatal heart regeneration // *J. Clin. Invest.* 2014; 124 (3): 1382–1392. DOI: 10.1172/JCI72181.
9. Киселева Е.П., Крылов А.В., Стариков Э.А., Кузнецова С.А. Фактор роста сосудистого эндотелия и иммунная система // *Успехи современной биологии.* 2009; 129 (4): 1–12.
10. Kiseleva E.P., Krylov A.V., Starikov Je.A., Kuznecova S.A. Faktor rosta sosudistogo jendotelija i immunnaja sistema [Vascular endothelial growth factor and immune system] // *Uspehi sovremennoj biologii.* 2009; 129 (4): 1–12 (in Russian).
11. Dabbous M.K., North S.M., Haney L., Tipton D.A., Nicolson G.L. Effects of mast cell-macrophage interactions on the production of collagenolytic enzymes by metastatic tumor cells and tumor-derived and stromal fibroblasts // *Clin. Exp. Metastasis.* 1995; 13 (1): 33–41. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00144016>.
12. Мусина Л.А. Функциональная морфология макрофагов при регенерации тканей, индуцированной аллогенными биоматериалами: автореф. ... д-ра биол. наук. Саранск, 2007: 49.
13. Musina L.A. Funkcional'naja morfologija makrofagov pri regeneracii tkanej, inducirovannoj allogennymi biomaterialami [Functional morphology of macrophages at tissue regeneration induced by allogenic biomaterials]: avtoref. ... dokt. biol. nauk. Saransk, 2007: 49 (in Russian).
14. Юшков Б.Г., Климин В.Г., Кузьмин А.И. Сосуды костного мозга и регуляция кроветворения. Екатеринбург: УрО РАН, 2004: 150.
15. Jushkov B.G., Klimin V.G., Kuz'min A.I. Sosudy kostnogo mozga i reguljacija krovotvorenija [Blood vessels in the bone marrow and regulation of hematopoiesis]. Ekaterinburg: UrO RAN Publ., 2004: 150 (in Russian).
16. Юшков Б.Г., Тюменцева Н.В., Медведева С.Ю., Ослина Д.С. Экспериментальное исследование возможного использования в костной пластике соединительнотканного имплантата / Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: материалы III Всероссийского симпозиума с международным участием. Москва: ЦИТО, 25–26 апреля 2007. М., 2007: 49–50.
17. Jushkov B.G., Tjumenceva N.V., Medvedeva S.Ju., Oslina D.S. Jeksperimental'noe issledovanie vozmozhnogo ispol'zovanija v kostnoj plastike soedinitel'notkannogo implantata [Experimental investigation the possible use of connective tissue implant in the bone grafting] / Aktual'nye voprosy tkanevoj i kletочноj transplantologii: materialy III Vserossijskij simpozium s mezhdunarodnym uchastiem.. Moskva, СИТО, 25–26 aprelja 2007. М., 2007: 49–50 (in Russian).
18. Iushkov B., Tyumentseva N., Medvedeva S., Sarapultsev A. The new technique for receiving autoprotheses for the bladder wall defects replacement // Poster Presentations at the 4th European Congress of Immunology-ECI 2015. Vena, Austria, 2015: 572–573. P.D.25.21.

13. Yushkov B., Tyumentseva N., Khodakov V., Medvedeva S., Krokhin D., Plaksin K., Rantsev M., Sarapultsev P., Sarapultsev A. The technique for receiving for angioplasty // *Gazzetta Medica Italiana Archivio per le Scienze Mediche*. 2015; 174 (1–2): 23–31.
14. Taylor D.A. From stem cells and cadaveric matrix to engineered organs // *Current Opinion in Biotechnology*. 2009; 20: 598–605.
15. Vogel S., Trapp T., Bürger V., Peters C., Lakbir D., Dillio D., Sorg R.V. Hepatocyte growth factor-mediated attraction of mesenchymal stem cells for apoptotic neuronal and cardiomyocytic cells // *Cell Mol. Life Sci*. 2010; 67 (2): 295–303. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0183-3>
16. Abbott J.D., Huang Y., Liu D., Hickey R., Krause D.S., Giordano F.J. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury // *Circulation*. 2004; 110 (21): 3300–3305. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000147780.30124.CF>.
17. Huang Y.L., Qiu R.F., Mai W.Y., Kuang J., Cai X.Y., Dong Y.G., Hu Y.Z., Song Y.B., Cai A.P., Jiang Z.G. Effects of insulin-like growth factor-1 on the properties of mesenchymal stem cells in vitro // *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 2012; 13 (1): 20–28.
18. Li Y., Yu X., Lin S., Li X., Zhang S., Song Y.H. Insulin-like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 356 (3): 780–784. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.049>.
19. Ястребов А.П., Юшков Б.Г., Большаков В.Н. Регуляция гемопоэза при воздействии на организм экстремальных факторов. Свердловск: УрО АН СССР, 1988: 152. Jastrebov A.P., Jushkov B.G., Bol'shakov V.N. Reguljacija gemopojeza pri vozdeystvii na organizm jekstremal'nyh faktorov [Hematopoiesis regulation at extreme factors effects on the body]. Sverdlovsk: UrO AN SSSR Publ., 1988: 152 (in Russian).
20. Храмова Ю.С. Роль иммунной системы в регуляции регенерации тканей с разной восстановительной способностью: дис. ... канд. биол. наук. Екатеринбург, 2004: 184. Hramcova Ju.S. Rol' immunnoj sistemy v reguljácii regeneracii tkanej s raznoj vosstanovitel'noj sposobnost'ju [The role of immune system in the regulation of tissue regeneration with different reducing ability]: dis. ... kand. biol. nauk. Ekaterinburg, 2004: 184 (in Russian).
21. Fantin A., Vieira J.M., Gestri G., Denti L., Schwarz Q., Prykhozij S., Peri F., Wilson S.W., Ruhrberg C. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction // *Blood*. 2010; 116 (5): 829–840. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-257832>.
22. Harmey J.H., Dimitriadis E., Kay E., Redmond H.P., Bouchier-Hayes D. Regulation of macrophage production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by hypoxia and transforming growth factor beta-1 // *Ann. Surg Oncol*. 1998; 5 (3): 271–278. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02303785>.
23. Бабаева А.Г. Регенерация: факты и перспективы. М.: Медицина, 2009: 334. Babaeva A.G. Regeneracija: fakty i perspektivy [Regeneration: facts and perspectives]. M.: Medicina, 2009: 334 (in Russian).
24. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А. Роль лимфоцитов в оперативном изменении развития тканей. М.: Изд-во РАМН, 2009: 107. Babaeva A.G., Gevorkjan N.M., Zotikov E.A. Rol' limfocitov v operativnom izmenenii razvitija tkanej [The role of lymphocytes in the operational changes of tissue development]. M.: Izd-vo RAMN Publ., 2009: 107 (in Russian).
25. Burzyn D., Benoist C., Mathis D. Regulatory T cells in nonlymphoid tissues // *Nat. Immunol*. 2013; 14 (10): 1007–1013. DOI: 10.1038/ni.2683.
26. Reinke S., Geissler S., Taylor W.R., Schmidt-Bleek K., Juelke K., Schwachmeyer V., Dahne M., Hartwig T., Akyüz L., Meisel C., Unterwalder N., Singh N.B., Reinke P., Haas N.P., Volk H.D., Duda G.N. Terminally differentiated CD8⁺ T cells negatively affect bone regeneration in humans // *Sci. Transl. Med*. 2013; 5 (177): 177ra36. DOI: 10.1126/scitranslmed.3004754.
27. Molvarec A., Ito M., Shima T., Yoneda S., Toldi G., Stenczer B., Vósbórhelyi B., Rigby J. Jr, Saito S. Decreased proportion of peripheral blood vascular endothelial growth factor-expressing T and natural killer cells in preeclampsia // *Am. J. Obstet. Gynecol*. 2010; 203 (6): 567. e1. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2010.07.019>.
28. Юшков Б.Г., Тюменцева Н., Ходаков В. Сосуды костного мозга и гемопоэз. Lap Lambert Academic Publishing, 2013: 256. Jushkov B.G., Tjumenceva N., Hodakov V. Sosudy kostnogo mozga i gemopojez [Bone marrow vessels and haemopoiesis]. Lap Lambert Academic Publishing, 2013: 256 (in Russian).
29. Храмова Ю.С., Арташян О.С., Юшков Б.Г. Морфогенетическая функция иммунокомпетентных клеток при репаративной регенерации тканей с разной восстановительной способностью // *Таврический медико-биологический вестник*. 2012; 15 (3), ч. 1 (59): 372–375. Hramcova Ju.S., Artashjan O.S., Jushkov B.G. Morfogeneticheskaja funkcija immunokompetentnyh kletok pri reparativnoj regeneracii tkanej s raznoj vosstanovitel'noj sposobnost'ju [The morphogenetic function of immunocompetent cells during reparative regeneration of tissues with different reducing ability] // *Tavricheskij mediko-biologicheskij vestnik*. 2012; 15 (3), ch. 1 (59): 372–375 (in Russian).
30. Храмова Ю.С. Влияние инактивации тучных клеток на репаративные процессы в семенниках // *Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке»*. 2014; 16 (4): 28–30.

- Hramcova Ju.S. Vlijanie inaktivacii tuchnyh kletok na reparativnye processy v semennikah [The inactivation effect of the fat cells on reparative processes in the testes] // *Zhurnal nauchnyh statej «Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke»*. 2014; 16 (4): 28–30 (in Russian).
31. Rüger B., Dunbar P.R., Hasan Q., Sawada H., Kittelberger R., Greenhill N., Neale T.J. Human mast cells produce type VIII collagen *in vivo* // *Int. J. Exp. Pathol.* 1994; 75 (6): 397–404.
 32. Wasserman S.I. The regulation of inflammatory mediator production by mast cell products // *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 135 (6), pt. 2: 46–48.
 33. Stellos K., Kopf S., Paul A., Marquardt J.U., Gawaz M., Huard J., Langer H.F. Platelets in regeneration // *Semin. Thromb. Hemost.* 2010; 36 (2): 175–184. DOI: 10.1055/s-0030-1251502.
 34. Carmeliet P., Jain R. Angiogenesis in health and disease // *Nat. Med.* 2003; 9 (6): 653–660. DOI: 10.1038/nm0603-653.
 35. Rafii S., Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration // *Nat. Med.* 2003; 9 (6): 702–712. DOI: 10.1038/nm0603-702.
 36. Gruber B.L., Marchese M.J., Kew R. Angiogenic factors stimulate mast-cell migration // *Blood.* 1995; 86 (7): 2488–2493.
 37. Norrby K. Mast cells and angiogenesis // *APMIS.* 2002; 110 (5): 355–371. DOI: 10.1034/j.1600-0463.2002.100501.x.
 38. Abdel-Majid R.M., Marshall J.S. Prostaglandin E2 induces degranulation-independent production of vascular endothelial growth factor by human mast cells // *J. Immunol.* 2004; 172(2): 1227–1236. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.1227>.
 39. Nakayama T., Mutsuga N., Yao L., Tosato G. Prostaglandin E2 promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells // *J. Leukoc. Biol.* 2006; 79 (1): 95–104.
 40. Wang L., Wang X., Xie G., Wang L., Hill C.K., DeLeve L.D. Liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells promote liver regeneration in rats // *J. Clin. Invest.* 2012; 122 (4): 1567–1573. DOI:10.1172/JCI58789.
 41. Liu N.F., He Q.L. The regulatory effects of cytokines on lymphatic angiogenesis // *Lymphology.* 1997; 30 (1): 3–12.
 42. Jakobsson A., Sürbo J., Norrby K. Protamine and mast-cell-mediated angiogenesis in the rat // *J. Exp. Pathol (Oxford)*. 1990; 71 (2): 209–217.
 43. Müller S.M., Terszowski G., Blum C., Haller C., Anquez V., Kuschert S., Carmeliet P., Augustin H.G., Rodewald H.R. Gene targeting of VEGF-A in thymus epithelium disrupts thymus blood vessel architecture // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102 (30): 10587–10592. DOI: 10.1073/pnas.0502752102.
 44. Ghosh A.K. Regulation by prostaglandin E2 and histamine of angiogenesis in inflammatory granulation tissue // *Yakugaku Zasshi.* 2003; 123 (5): 295–303. DOI: <http://doi.org/10.1248/yakushi.123.295>.
 45. Lappalainen H., Laine P., Penttikäinen M.O., Sajantila A., Kovanen P.T. Mast cells in neovascularized human coronary plaques store and secrete basic fibroblast growth factor, a potent angiogenic mediator // *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* 2004; 24 (10): 1880–1885. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000140820.51174.8d>.
 46. Walgenbach K.J., Gorospe J.R., Gratas C., Brunagel G., Hoffman E.P., Shestak K.C. A potential role for mast cells in the of bFGF from normal myocytes during angiogenesis *in vivo* // *J. Invest. Surg.* 2002; 15 (3): 153–162. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/08941930290085903>.
 47. Hamano K., Li T.S., Kobayashi T., Hirata K., Yano M., Kohno M., Matsuzaki M. Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation // *Ann. Thorac. Surg.* 2002; 73 (4): 1210–1215.
 48. Тюменцева Н.В. Физиологические подходы к восстановлению локальной гемодинамики: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Екатеринбург, 2006: 23.
 - Tjumenceva N.V. Fiziologicheskie podhody k vosstanovleniju lokal'noj gemodinamiki [Physiological approaches to the local hemodynamic restoration]: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Ekaterinburg, 2006: 23 (in Russian).
 49. Ткачук В.А., Плеханова О.С., Белоглазова И.Б., Парфенова Е.В. Роль мультидоменной структуры урокиназы в регуляции роста и ремоделирования сосудов // *Укр. біохім. журн.* 2013; 85 (6): 18–45.
 - Tkachuk V.A., Plehanova O.S., Beloglazova I.B., Parfenova E.V. Rol' mul'tidomennoj struktury urokinazy v reguljacii rosta i remodelirovanija sosudov [The role of urokinase multi-domain structure in the growth and blood vessels remodeling regulation] // *Ukr. biobim. zburn.* 2013; 85 (6): 18–45 (in Russian).
 50. Carmeliet P., Moons L., Herbert J.M., Crawley J., Lupu F., Lijnen R., Collen D. Urokinase but not tissue plasminogen activator mediates arterial neointima formation in mice // *Circ. Res.* 1997; 81 (5): 829–839. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.RES.81.5.829>.
 51. Kenagy R.D., Vergel S., Mattsson E., Bendeck M., Reidy M.A., Clowes A.W. The role of plasminogen, plasminogen activators, and matrix metalloproteinases in primate arterial smooth muscle cell migration // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996; 16 (11): 1373–1382. DOI: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.16.11.1373>.
 52. Парфёнова Е.В., Плеханова О.С., Ткачук В.А. Активаторы плазминогена в ремоделировании сосудов и ангиогенезе // *Биохимия.* 2002; 67 (1): 119–134.
 - Parfjonova E.V., Plehanova O.S., Tkachuk V.A. Aktivatory plazminogena v remodelirovanii sosudov i angiogeneze [Plasminogen activators in vascular remodeling and angiogenesis] // *Biobimija.* 2002; 67 (1): 119–134 (in Russian).
 53. Aguirre-Ghiso J.A., Liu D., Mignatti A., Kovalski K., Ossowski L. Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy *in vivo* // *Mol. Biol. Cell.* 2001; 12 (4): 863–879.

54. Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы // Кардиологический вестник. 2007; XIV (2): 5–15.
- Parfenova E.V., Tkachuk V.A. Terapevticheskij angiogenez: dostizhenija, problemy, perspektivy [Therapeutic angiogenesis: achievements, problems, and prospects] // *Kardiologicheskij vestnik*. 2007; XIV (2): 5–15 (in Russian).
55. Kroon M.E., Koolwijk P., van Goor H., Weidle U.H., Collen A., van der Pluijm G., van Hinsbergh V.W. Role and localization of urokinase receptor in the formation of new microvascular structures in fibrin matrices // *Am. J. Pathol.* 1999; 154 (6): 1731–1742. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65429-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65429-6).
56. Andrae J., Gallini R., Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine // *Genes. Dev.* 2008; 22 (10): 1276–1312. DOI: [10.1101/gad.1653708](https://doi.org/10.1101/gad.1653708).
57. Lopez-Vidriero E., Goulding K.A., Simon D.A., Sanchez M., Johnson D.H. The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment // *Arthroscopy*. 2010; 26 (2): 269–278. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arthro.2009.11.015>.
58. Li J.J., Huang Y.Q., Basch R., Karpatkin S. Thrombin induces the release of angiopoietin-1 from platelets // *Thromb. Haemost.* 2001; 85 (2): 204–206.
59. O'Reilly M.S., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane W.S., Flynn E., Birkhead J.R., Olsen B.R., Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth // *Cell*. 1997; 88 (2): 277–2285. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81848-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81848-6).
60. Maione T.E., Gray G.S., Petro J., Hunt A.J., Donner A.L., Bauer S.I., Carson H.F., Sharpe R.J. Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides // *Science*. 1990; 247 (4938): 77–79. DOI: [10.1126/science.1688470](https://doi.org/10.1126/science.1688470).
61. Iruela-Arispe M.L., Bornstein P., Sage H. Thrombospondin exerts an antiangiogenic effect on cord formation by endothelial cells *in vitro* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88 (11): 5026–5033.
62. Kopp H.G., Hooper A.T., Broekman M.J., Avecilla S.T., Petit I., Luo M., Milde T., Ramos C.A., Zhang F., Kopp T., Bornstein P., Jin D.K., Marcus A.J., Rafii S. Thrombospondins deployed by thrombopoietic cells determine angiogenic switch and extent of revascularization // *J. Clin. Invest.* 2006; 116 (12): 3277–3291. DOI: [10.1172/JCI29314](https://doi.org/10.1172/JCI29314).
63. Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation // *Science*. 1998; 281 (5381): 1305–1308. DOI: [10.1126/science.281.5381.1305](https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1305)
64. Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling // *Cell Death Differ.* 2003; 10 (1): 45–65. DOI: [10.1038/sj.cdd.4401189](https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401189)
65. Freishtat R.J., Natale J., Benton A.S., Cohen J., Sharron M., Wiles A.A., Ngor W.M., Mojgani B., Bradbury M., Deggan A., Sachdeva R., Debiase L.M., Ghimbovschi S., Chow M., Bunag C., Kristosturyan E., Hoffman E.P. Sepsis alters the megakaryocyte-platelet transcriptional axis resulting in granzyme B-mediated lymphotoxicity // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009; 179 (6): 467–473. DOI: <https://doi.org/10.1164/rccm.200807-1085OC>.
66. Gambim M.H., do Carmo Ade O, Marti L., Verhssimo-Filho S., Lopes L.R., Janiszewski M. Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction // *Crit. Care*. 2007; 11 (5): R107. DOI: <https://doi.org/10.1186/cc6133>.
67. Janiszewski M., Do Carmo A.O., Pedro M.A., Silva E., Knobel E., Laurindo F.R. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway // *Crit. Care Med.* 2004; 32 (3): 818–825. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000114829.17746.19>.
68. Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., Greenberg M.E. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery // *Cell*. 1997; 91 (2): 231–241. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80405-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80405-5).
69. Vasina E.M., Cauwenberghs S., Staudt M., Feijge M.A., Weber C., Koenen R.R., Heemskerk J.W. Aging- and activation-induced platelet microparticles suppress apoptosis in monocytic cells and differentially signal to proinflammatory mediator release // *Am. J. Blood. Res.* 2013; 3 (2): 107–123.
70. Sharron M., Hoptay C.E., Wiles A.A., Garvin L.M., Geha M., Benton A.S., Nagaraju K., Freishtat R.J. Platelets induce apoptosis during sepsis in a contact-dependent manner that is inhibited by GPIIb/IIIa blockade // *PLoS One*. 2012; 7 (7): e41549. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041549>.
71. Hayon Y., Dashevsky O., Shai E., Varon D., Leker R.R. Platelet microparticles promote neural stem cell proliferation, survival and differentiation // *J. Mol. Neurosci.* 2012; 47 (3): 659–665. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9711-y>.
72. Mause S.F., Ritzel E., Liehn E.A., Hristov M., Bidzhekov K., Müller-Newen G., Soehnlein O., Weber C. Platelet microparticles enhance the vasoregenerative potential of angiogenic early outgrowth cells after vascular injury // *Circulation*. 2010; 122 (5): 495–506. DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.909473>.
73. Andersson U., Tracey K.J. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection // *Annu. Rev. Immunol.* 2011; 29: 139–162. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101323>.
74. Rouhiainen A., Imai S., Rauvala H., Parkkinen J. Occurrence of amphoterin (HMG1) as an endogenous protein of human platelets that is exported to the cell surface upon platelet activation // *Thromb. Haemost.* 2000; 84 (6): 1087–1094.
75. Свет-Молдавский Г.Я., Шхвацабая И.К., Зинзар С.Н. Изучение пассивного переноса лимфоидными клетками компенсаторной гипертрофии миокарда // Докл. АН СССР. 1974; 218 (1): 246–248.

Svet-Moldavskij G.Ja., Shhvacabaja I.K., Zinzar S.N. Izuchenie passivnogo perenosa limfoidnymi kletkami kompensatornoj gipertrofii miokarda [The study of passive transfer by the lymphoid cells of the compensatory myocardial hypertrophy] // Dokl. AN SSSR. 1974; 218 (1): 246–248. (in Russian).

76. Комиссарова С.Н. Регенерация нейронов коры головного мозга при экспериментальном геморрагическом инсульте: влияние тромбоцитов и моделированных

эффектов микрогравитации: автореф. ... дис. канд. биол. наук. М., 2015: 25.

Komissarova S.N. Regeneracija neyronov kory golovnogo mozga pri jeksperimental'nom gemorragicheskom insul'te: vlijanie trombocitov i modelirovannyh jeffektov mikrogravitacii [Regeneration of the cerebral cortex neurons in experimental hemorrhagic stroke: influence of platelets and simulated effects of microgravity]: avtoref. ... dis. kand. biol. nauk. M., 2015: 25 (in Russian).

Поступила в редакцию 05.07.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Юшков Борис Германович, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, зам. директора по научной работе, зав. лабораторией иммунофизиологии и иммунофармакологии, Институт иммунологии и физиологии УрО РАН; зав. центральной экспериментальной лабораторией биотехнологий, Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург.

(✉) Юшков Борис Германович, e-mail: b.yushkov@iip.uran.ru.

УДК 577.27

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-94–105

For citation: Yushkov B.G. Immune system and regulation of regeneration. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 94–105.

Immune system and regulation of regeneration

Yushkov B.G.

*Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences (RAS)
106, Pervomaiskaiy Str., Ekaterinburg, 620049, Russian Federation*

*Institute of Medical Cell Technologies
22a, Karla Marksa Str., Ekaterinburg, 620026, Russian Federation*

SUMMARY

This study proposes a theory of immune regulation of regeneration of damaged tissues. An assessment of the role of macrophages, lymphocytes, mast cells, platelets, and endothelial cells in the reconstruction of the structure of the functional element of the defective organ. Discusses the mechanisms of interaction of immune cells during regeneration. Presents the main factors determining the differentiation of stem cells. Apoptosis is considered as one of the components of the recovery process.

Key words: regeneration, immune cells.

Received July 05.2017
Accepted November 08.2017

Yushkov Boris G., DM, Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Laboratory Immunophysiology and Immunopharmacology, Deputy Director of the Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, RAS; Head of the Central Experimental Laboratory Biotechnology, Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russian Federation.

(✉) Yushkov Boris G., e-mail: b.yushkov@iip.uran.ru.

УДК 577.175.722:612.396.2:612.82:616.894-053.8-092.9

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-106–115

Для цитирования: Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Черных А.И., Салмина А.Б. Влияние инсулинорезистентности на нарушение метаболизма глюкозы в миндалине головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера.

Бюллетень сибирской медицины. 2017; 16 (4): 106–115.

Влияние инсулинорезистентности на нарушение метаболизма глюкозы в миндалине головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера

Горина Я.В.¹, Комлева Ю.К.¹, Лопатина О.Л.¹, Черных А.И.², Салмина А.Б.¹

¹ Красноярский государственный медицинский университет (КГМУ) имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Россия, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

² Красноярская межрайонная клиническая больница № 20 им. И.С. Берзона Россия, 660123, г. Красноярск, ул. Инструментальная, 12А

РЕЗЮМЕ

Цель. В головном мозге метаболизм глюкозы четко регулируется, поэтому его нарушение является важной особенностью нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера. Транспорт глюкозы в мембрану клетки реализуется за счет активности инсулин-регулируемой аминопептидазы (IRAP), которая влияет на память и обучение, и рассматривается как один из ключевых маркеров инсулинорезистентности при болезни Альцгеймера. Однако вопрос о механизме действия IRAP остается открытым. Цель исследования – изучение влияния экспрессии IRAP на клетках нейрональной и глиальной природы, а также совместно с инсулинзависимым глюкозным транспортером (GLUT4) в миндалине головного мозга на эмоциональную память у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера.

Материал и методы. Исследование проводили на животных с использованием двух экспериментальных моделей болезни Альцгеймера – инъекционной и генетической. Опытная группа – мыши линии CD1, самцы в возрасте 4 мес, которым билатерально вводили бета-амилоид 1-42 в зону гиппокампа CA1 (*cornu ammonis*) по 1 мкл. Контрольная группа – мыши линии CD1, самцы в возрасте 4 мес, которым билатерально вводили растворитель для бета-амилоида – фосфатно-солевой буфер в зону CA1 по 1 мкл.

Генетическая модель болезни Альцгеймера – мыши линии B6SLJ – Tg(APP^{SweFlon}, PSEN1^{*M146L}*L286V)6799Vas, самцы в возрасте 4 мес. Контрольная группа – мыши линии C57BL/6xSJL, самцы в возрасте 4 мес. Оценку эмоциональной памяти проводили с использованием нейроповеденческого тестирования Fear conditioning. Экспрессию молекул-маркеров инсулинорезистентности в миндалине изучали методом иммуногистохимии с последующей конфокальной микроскопией.

Результаты. У животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера выявлено нарушение ассоциативного обучения и эмоциональной памяти. Выявлено снижение ($p \leq 0,05$) экспрессии IRAP на клетках нейрональной и глиальной природы, а также (совместно с GLUT4) в миндалине головного мозга у животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера.

Заключение. Уменьшение числа IRAP-иммунопозитивных нейрональных и астроглиальных клеток, а также экспрессии IRAP/GLUT4 в клетках миндалины у животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера указывает на развитие инсулинорезистентности в миндалине головного мозга, находящейся во взаимосвязи с гиппокампом при осуществлении когнитивных функций и запоминания, сопряженных с эмоционально окрашенными событиями.

Ключевые слова: IRAP, GLUT4, эмоциональная память, болезнь Альцгеймера.

✉ Горина Яна Валерьевна, e-mail: yana_20@bk.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) характеризуется постепенно прогрессирующими деструктивными изменениями в поведении, психическим расстройством и необратимой потерей памяти [1]. Кроме того, наблюдается дисбаланс между провоспалительными и репаративными функциями нейроиммунных клеток микроглии и астроцитов, который влияет на активацию инфламмосом (в частности NLRP3), высвобождение провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода, что в свою очередь вызывает повреждение нейронов, синаптическую дисфункцию, в конечном итоге приводя к потере синапсов и гибели нейронов [2].

Известно, что метаболизм глюкозы в головном мозге четко регулируется, поэтому его нарушение является важной особенностью нейродегенеративных заболеваний. Стоит отметить, что гипометаболизм глюкозы наблюдается как у здоровых пожилых людей [3], так и в результате прогрессирования нейродегенеративных расстройств, проявляющихся в снижении когнитивных функций, в частности при БА [4]. При этом развитие гипометаболизма глюкозы предшествует наступлению дефицита памяти, что может служить ранним маркером для прогнозирования прогрессирования заболевания [5].

Стоит отметить, что в последние несколько десятилетий внимание ученых привлекает один из ключевых маркеров инсулинорезистентности при БА – инсулин-регулируемая аминопептидаза (IRAP), однако вопрос о механизме ее действия остается открытым [6, 7]. IRAP локализуется в специализированных везикулах, содержащих чувствительный к инсулину транспортер глюкозы (GLUT4), в нейронах гиппокампа, а также в других областях мозга, таких как гипоталамус, грушевидная извилина, энторинальная кора, гипофиз, обонятельная луковица, неокортекс и миндалина [8], при этом последняя ответственна за реализацию эмоциональной памяти, которая нарушается при БА [9, 10].

Как IRAP, так и GLUT4 транспортируются из везикул к поверхности клетки в ответ на определенные стимулы, в том числе инсулин [11, 12]. Вместе с тем транспорт GLUT4 в мембрану клетки реализуется за счет активности IRAP [13]. GLUT4 вносит существенный вклад в поглощение глюкозы клетками, что необходимо для памяти и реализации когнитивных функций [14]. Аналогичным образом ангиотензин IV влияет на обучение и память, ингибируя активность IRAP

[15]. Так, было показано, что синтезированные 13-членные макроциклические конкурентные ингибиторы IRAP, разработанные путем имитации N-конца окситоцина и вазопрессина, увеличивали синаптическую пластичность при исследовании гиппокампа у крыс [16].

Кроме того установлено, что IRAP присутствует в окситоцин- и вазопрессинергических нейронах гиппокампа, коры головного мозга, таламуса, миндалины и гипоталамуса у пациентов с шизофренией. При этом численная плотность нейронов, экспрессирующих IRAP, в паравентрикулярном и супрахиазматическом ядрах гипоталамуса у больных с данной патологией значительно снижается, что может быть связано с уменьшением числа нейрофизин-содержащих нейронов [17].

Также выявлено, что у животных, дефицитных по IRAP, не наблюдалось проявлений антидепрессивного эффекта после введения окситоцина [18]. В связи с этим актуальным является детальное изучение новых потенциальных молекул-мишеней (IRAP) для фармакологической коррекции хронических нейродегенеративных заболеваний, в частности БА.

Исходя из изложенного, целью настоящей работы явилось изучение влияния экспрессии IRAP на клетках нейрональной и глиальной природы и (совместно с GLUT4) в миндалине головного мозга на эмоциональную память у животных с экспериментальной БА.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Мыши линии CD1, самцы в возрасте 4 мес. Опытная группа (CD1-БА) – введение бета-амилоида 1-42 (Sigma Aldrich, USA) в зону гиппокампа CA1 билатерально по 1 мкл по стереотаксическим координатам согласно атласу [19]: ML ± 1,3 мм, AP – 2,0 мм, DV – 1,9 мм ($n = 10$). Контрольная группа (ложно-оперированные животные – CD1-ЛО) – введение растворителя для бета-амилоида – фосфатно-солевого буфера (Sigma Aldrich, USA) ($n = 10$).

Животных содержали в клетках при регулярном световом цикле 12 ч день / 12 ч ночь и свободным доступом к воде и корму при постоянной температуре (21 ± 1) °C. Исследования на животных проводили в соответствии с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС).

Моделирование болезни Альцгеймера осуществляли интрагиппокампальным введением бета-амилоида по стереотаксическим координатам мозга в зону CA1 по 1 мкл. Бета-амилоид 1-42

растворяли в фосфатно-солевом буфере до концентрации 50 мМ с последующей агрегацией в термостате при 37 °С в течение 7 дней [20]. Оценку признаков и верификацию модели БА осуществляли согласно методике, представленной нами ранее [21].

Генетическая модель БА – мыши линии B6SLJ – Tg(APPs^{wFlLon}, PSEN1*^{M146L}*^{L286V})6799^{Vas}, самцы в возрасте 4 мес ($n = 10$). Контрольная группа – мыши линии C57BL/6xSJL, самцы в возрасте 4 мес ($n = 10$). Данные линии мышей получены из The Jackson Laboratory (USA).

Тест Fear conditioning (FC) использовали для исследования консолидации памяти страха и способности животных к ассоциативному обучению [22]. Тестирование осуществляли согласно ранее представленной методике [23]. В каждой сессии оценивали время замирания. Для оценки процесса запоминания нами были введены следующие коэффициенты запоминания (КЗ): в условиях контекста (КЗ_к) и в присутствии одного из стимулов (ассоциативное запоминание, КЗ_а), которые рассчитывались по формулам:

$KZ_k = \text{время замирания во 2-й день} / \text{время замирания в 1-й день}$,

$KZ_a = \text{время замирания в 3-й день} / \text{время замирания в 1-й день}$.

Показатель $KZ \geq 1,0$ свидетельствовал об отсутствии нарушений ассоциативного обучения и эмоциональной памяти у животных.

На 8-й день через 60 мин после тестирования FC осуществляли транскардиальную перфузию 4-м% параформальдегидом (PFA) с последующим забором головного мозга. Мозг фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном формалине, после чего погружали в 20%-й раствор сахарозы. С помощью микротомы Thermo Scientific Microm HM 650 изготавливали срезы толщиной 50 мкм. Изучали экспрессию маркеров методом непрямой иммуногистохимии для свободно плавающих срезов [24].

После промывки в PBS срезы блокировали 3-м козьим сывороточным альбумином (GSA) в PBS и 1%-м Triton X-100 в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим инкубированием в течение ночи с первичными антителами IRAP (Santa cruz, sc-8481, goat monoclonal) 1:1000, GLUT4 (Abcam, ab654, rabbit monoclonal) 1:1000, NeuN (Abcam, ab90, guinea pig polyclonal) 1:1000, GFAP (Santa cruz, sc-58766, mouse monoclonal) 1:1000 с 3%-м BSA в PBS и 0,2%-м Triton X-100 при 4 °С. После инкубации с первичными антителами срезы промывали и инкубировали со вторичными антителами Alexa Conjugated antibody в

разведении 1:1000 в течение 2 ч при комнатной температуре.

Изображения были получены с помощью конфокального микроскопа Olympus FV 10i. В срезах головного мозга подсчитывали количество экспрессирующих IRAP и GLUT4 клеток нейрональной и астроглиальной природы и на различных уровнях в миндалине. Оценивали пять полей зрения.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы Statplus Professional, сборка 5.9.8.5/Core v.5.9.33 методами непараметрической статистики. Сравнение средних осуществляли с помощью t -критерия Стьюдента. Различия принимали значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования особенностей совместной экспрессии маркеров IRAP и GLUT4 в норме и при экспериментальной БА в миндалине головного мозга нами было определено количество нейронов, в которых IRAP колокализован с GLUT4.

Так, у животных с генетической моделью БА (линия Tg 6799) выявлено статистически значимое ($p = 0,029$) сокращение количества клеток IRAP+/GLUT4+ в миндалине ($13,20 \pm 2,35$) по сравнению с животными контрольной группы (линия C57BL/6) ($29,75 \pm 3,18$) (рис. 1, *a* и *b*). Кроме того, при моделировании нейродегенерации (интрагиппокампальное введение бета-амилоида) отмечалось статистически значимое ($p = 0,031$) снижение количества клеток IRAP+/GLUT4+ в миндалине ($9,34 \pm 1,03$) по сравнению с ложно-оперированными животными ($23,09 \pm 2,01$) (рис. 1, *c* и *d*).

При исследовании особенностей экспрессии IRAP на клетках нейрональной и глиальной природы в миндалине головного мозга в норме и при экспериментальной БА было определено количество нейронов и астроцитов, экспрессирующих IRAP. Так, в GFAP-иммунопозитивных астроцитах миндалины головного мозга зафиксированы значимые различия в экспрессии IRAP у животных с генетической моделью БА ($8,38 \pm 1,05$) и контрольной группы ($13,60 \pm 2,16$) ($p = 0,043$) (рис. 2, *a* и *b*). Кроме того, моделирование нейродегенерации вызывало статистически значимое сокращение количества клеток IRAP+/GFAP+ в миндалине ($5,17 \pm 0,98$) по сравнению с ложно-оперированными животными ($20,09 \pm 3,01$) ($p < 0,001$) (рис. 2, *c* и *d*).

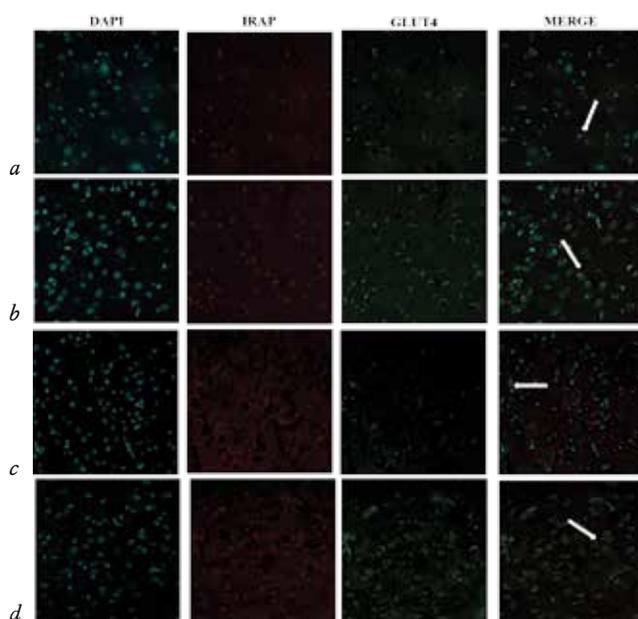


Рис. 1. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание. Экспрессия клеток IRAP+ (красный), клеток GLUT4+ (зеленый), DAPI-ядра (голубой); стрелки в Merge показывают колоколизацию IRAP с GLUT4 в миндалине головного мозга в экспериментальных группах: *a* – животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799), *b* – контрольная группа (линия C57BL/6), *c* – животные с интрагиппокампулярным введением бета-амилоида, *d* – ложно-оперированные животные. Увеличение $\times 10$

Fig. 1. Dual immunofluorescence staining. IRAP + cell expression (red), GLUT4 + cells (green), DAPI nucleus (blue), arrows in Merge show the colocalization of IRAP with GLUT4 in the brain amygdala in experimental groups: *a* – animals with a genetic model of Alzheimer's disease (line Tg 6799), *b* – control group (line C57BL/6), *c* – animals with intrahippocampal administration of beta-amyloid, *d* – false-operated animals. Magnification $\times 10$

Изучая уровень экспрессии IRAP после моделирования БА, нами выявлено статистически значимое снижение экспрессии IRAP в зрелых гранулярных нейронах в миндалине головного мозга ($9,63 \pm 1,15$) по сравнению с ложно-оперированными животными ($21,75 \pm 3,25$) ($p = 0,019$) (рис. 3, *c* и *d*). Вместе с тем у животных с генетической моделью БА также отмечалось статистически значимое снижение экспрессии IRAP в зрелых гранулярных нейронах в миндалине ($15,05 \pm 3,05$) по сравнению с контрольной группой ($28,25 \pm 4,10$) ($p < 0,001$) (рис. 3, *a* и *b*).

Анализ результатов теста Fear conditioning показал, что на протяжении всего периода тестирования у животных с генетической моделью БА наблюдался пролонгированный ответ на неприятные стимулы (звук, ток) и смену обстановки, о чем свидетельствовало статистически значимо более длительное время замирания по сравнению с жи-

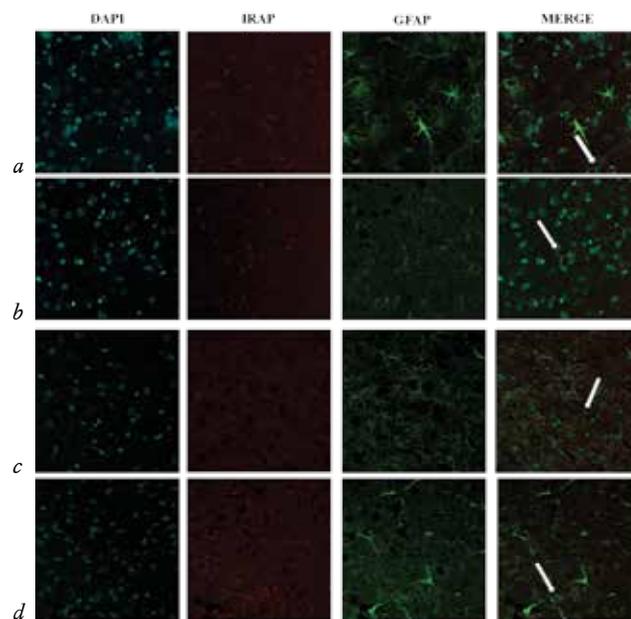


Рис. 2. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание. Экспрессия клеток IRAP+ (красный), клеток GFAP+ (зеленый), DAPI-ядра (голубой); стрелки в Merge показывают колоколизацию IRAP с GFAP в миндалине головного мозга в экспериментальных группах: *a* – животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799), *b* – контрольная группа (линия C57BL/6), *c* – животные с интрагиппокампулярным введением бета-амилоида, *d* – ложно-оперированные животные. Увеличение $\times 10$

Fig. 2. Dual immunofluorescence staining. The expression of IRAP + cells (red), GFAP + cells (green), DAPI-nucleus (blue), arrows in Merge show the colocalization of IRAP with GFAP in brain amygdala in experimental groups: *a* – animals with genetic model of Alzheimer's disease (line Tg 6799), *b* – control group (line C57BL / 6), *c* – animals with intrahippocampal administration of beta-amyloid, *d* – false-operated animals. Magnification $\times 10$

вотными контрольной группы (рис. 4, *a*). При этом на 2-й день тестирования (отсутствие звукового и электрического стимула) у животных с генетической моделью БА время замирания ($251,67 \pm 8,95$) с статистически значимо ($p < 0,001$) снижалось по сравнению с 1-м днем тестирования ($359,90 \pm 20,16$) с, тогда как у животных контрольной группы время замирания за указанный период статистически значимо не изменялось ($p = 0,225$) (рис. 4, *a*), а показатель КЗ_к у животных контрольной и опытной групп составил $1,01 \pm 0,10$ и $0,72 \pm 0,04$ соответственно ($p = 0,045$). Кроме того, время замирания на 3-й день тестирования ($244,78 \pm 5,21$) с у животных с генетической моделью БА в ответ на смену обстановки и подачу звукового сигнала статистически значимо не изменялось ($p = 0,557$) по сравнению с таковым на 2-й день ($251,67 \pm 8,95$). У животных контрольной группы наблюдалась тенденция ($p =$

0,091) к повышению времени замирания ($199,50 \pm 17,89$ против $161,76 \pm 14,46$ на 2-й день) и возвращение его к исходному уровню в 1-й день тестирования ($195,52 \pm 17,88$) с (рис. 4, а). При этом показатель KZ_a в опытной и контрольной группах составил $0,70 \pm 0,05$ и $1,23 \pm 0,18$ соответственно ($p = 0,035$) (рис. 4, а).

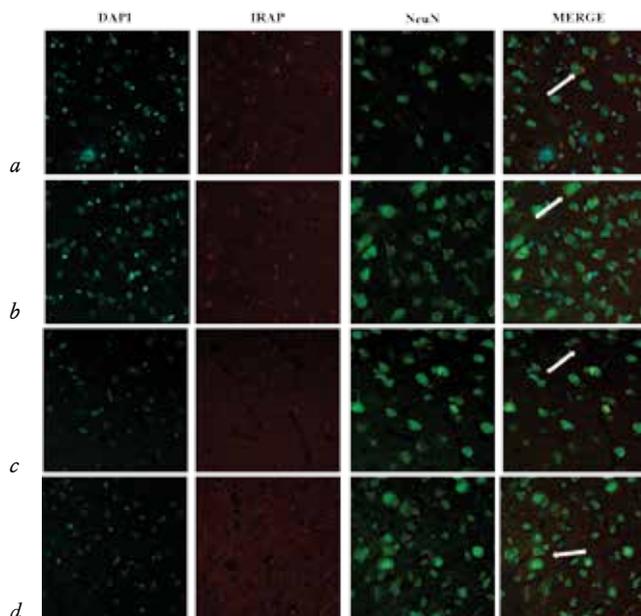


Рис. 3. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание. Экспрессия клеток IRAP+ (красный), клеток NeuN+ (зеленый), DAPI-ядра (голубой); стрелки в Merge показывают колокализацию IRAP с NeuN в миндалине головного мозга в экспериментальных группах: а – животные с генетической моделью болезни Альцгеймера (линия Tg 6799), б – контрольная группа (линия C57BL/6), с – животные с интрагиппокампулярным введением бета-амилоида, д – ложно-оперированные животные. Увеличение $\times 10$

Fig. 3. Dual immunofluorescence staining. IRAP + cell expression (red), NeuN + cells (green), DAPI nucleus (blue), arrows in Merge show the colocalization of IRAP with NeuN in the brain amygdala in experimental groups: а – animals with a genetic model of Alzheimer’s disease (line Tg 6799), б – control group (line C57BL / 6), с – animals with intrahippocampal administration of beta-amyloid, д – false-operated animals. Magnification $\times 10$

В совокупности это свидетельствовало о нарушении контекстуальной и долговременной ассоциативной памяти у животных с генетической моделью БА. Поскольку время замирания у ложно-оперированных животных и мышей контрольной группы статистически значимо не отличалось, было целесообразно привести сравнительные данные только по двум группам – у животных с интрагиппокампулярным введением бета-амилоида и ложно-оперированных животных.

Оказалось, что на 2-й день тестирования у животных после моделирования нейродегенера-

ции время замирания ($52,92 \pm 7,35$) статистически значимо ($p = 0,038$) снижалось по сравнению с таковым на 1-й день тестирования ($89,70 \pm 15,91$), тогда как у ложно-оперированных животных время замирания статистически значимо не изменялось ($p = 0,690$) (рис. 4, б). При этом показатель KZ_k у ложно-оперированных животных и мышей опытной группы составил $1,55 \pm 0,31$ и $0,85 \pm 0,15$ соответственно ($p = 0,024$). При этом стоит отметить, что на 3-й день тестирования время замирания ($113,43 \pm 7,25$) с у животных с интрагиппокампулярным введением бета-амилоида

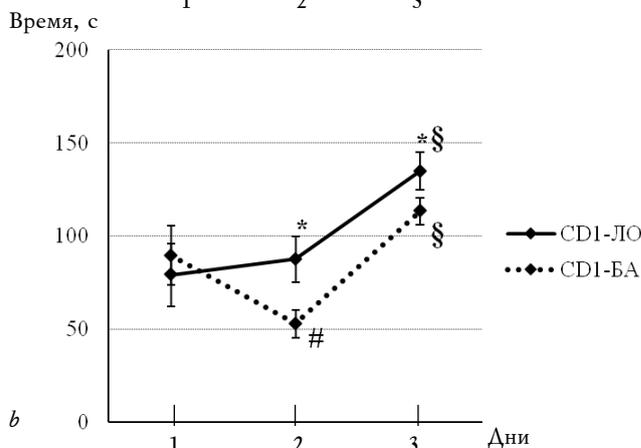
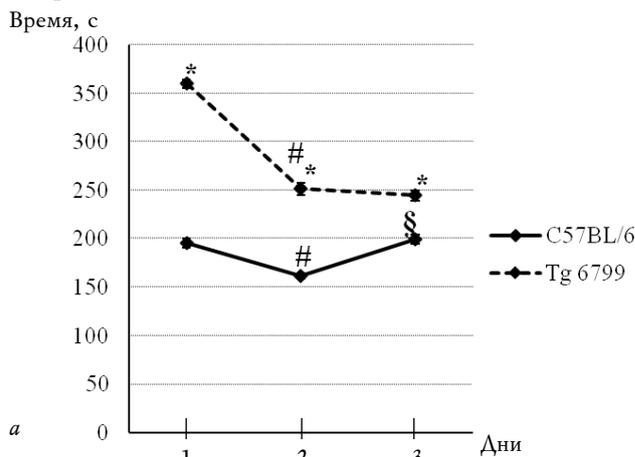


Рис. 4. Результаты нейро-поведенческого тестирования Fear conditioning животных с экспериментальной моделью болезни Альцгеймера: а – время замирания у животных с генетической моделью болезни Альцгеймера, б – время замирания у животных с интрагиппокампулярным введением бета-амилоида

* сравнение опытной и контрольной группы ($p \leq 0,05$); # – сравнение в группе на 1- и 2-й день тестирования ($p \leq 0,05$); § – сравнение в группе на 2- и 3-й день тестирования ($p \leq 0,05$)

Fig. 4. Results of neurobehavioral testing “Fear conditioning” of animals with the experimental model of Alzheimer’s disease: а – time of freezing behaviour in animals with a genetic model of Alzheimer’s disease, б – time of freezing behaviour in animals with intrahippocampal administration of beta-amyloid

*comparison between the experimental and control group ($p \leq 0,05$); # – comparison on the 1st and 2nd day of testing ($p \leq 0,05$); § – comparison on the 2nd and 3rd day of testing ($p \leq 0,05$)

в ответ на смену обстановки и подачу звукового сигнала статистически значимо ($p < 0,001$) увеличилось по сравнению с таковым на 2-й день и соответствовало ($52,92 \pm 7,35$) с (рис. 4, *b*). Аналогичная ситуация наблюдалась и в группе ложно-оперированных животных (рис. 4, *b*). При этом показатель KZ_a у ложно-оперированных животных и мышей опытной группы составил $1,92 \pm 0,26$ и $1,95 \pm 0,30$ соответственно ($p = 0,937$), что указывало на нарушение контекстуальной памяти без видимых деструктивных изменений долговременной ассоциативной памяти у животных после моделирования нейродегенерации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что некоторые популяции нейронов в головном мозге экспрессируют GLUT4, в частности в гиппокампе и миндалинах, где эти транспортеры глюкозы, вероятно, вовлечены в осуществление когнитивных функций [25]. Экспрессия GLUT4 в нейронах головного мозга, с одной стороны, характеризует эффективность инсулин-опосредованной регуляции транспорта глюкозы [26], с другой стороны, является объектом контроля со стороны IRAP.

В представленном исследовании выявлено, что нейротоксическое действие интрагиппокампально введенного бета-амилоида вызывает снижение уровня IRAP на клетках нейрональной и глиальной природы, а также уменьшение количества клеток IRAP+/GLUT4+ (нейронов) в миндалине головного мозга. Аналогичная ситуация наблюдалась и у животных с генетической моделью БА.

Группой зарубежных ученых было показано, что у мышей, дефицитных по IRAP, выявлены слабо выраженные фенотипические признаки, а также значительно снижен уровень GLUT4 в жировой и мышечной ткани (до 80%), что в свою очередь приводит к снижению поглощения клетками глюкозы [27]. Это может служить объяснением того, что снижение уровня IRAP вызывает уменьшение экспрессии GLUT4 [28].

Установлено, что у животных с генетической моделью БА на начальной стадии развития заболевания наблюдалось нарушение контекстуальной и долговременной ассоциативной памяти, тогда как после моделирования нейродегенерации выявлялось нарушение контекстуальной памяти без видимых деструктивных изменений долговременной ассоциативной памяти.

H.R. Yeatman и соавт. было показано, что у IRAP-нокаутных мышей в 3-месячном возрасте

наблюдался значительный дефицит пространственной памяти, а также распознавания объекта на фоне отсутствия нарушений оперативной памяти, что указывает на значительную роль IRAP в постнатальном развитии мозга и нормальном функционировании гиппокампа во взрослом возрасте [29].

Как известно, ангиотензин IV (AngIV) – пептид ренин-ангиотензиновой системы, принимает участие в регуляции нескольких функций мозга – обучение, память, эмоциональный ответ и обработка сенсорной информации [30]. Группа зарубежных ученых синтезировала серию молекул ангиотензина IV на основе соединений, которые являются метаболически стабильными, проникают через гематоэнцефалический барьер и предназначены для взаимодействия с IRAP, что в свою очередь дает возможность предотвратить негативные последствия развития нейродегенеративных заболеваний, в частности БА [31]. Показано, что у мышей, получавших холестерол-содержащую диету, обнаруживалась дисрегуляция ренин-ангиотензиновой системы в головном мозге [32] и снижался уровень цитоскелет-ассоциированного белка (Arc) – ключевого белка, участвующего в процессах консолидации памяти [33]. Данный патологический процесс регистрировали также в головном мозге при БА [32].

Таким образом, полученные нами данные об изменении поведенческого (эмоционального) статуса животных с экспериментальной моделью БА в совокупности с новыми данными о снижении экспрессии IRAP и GLUT4 в клетках миндалины подтверждает гипотезу о роли IRAP/GLUT4-опосредованных механизмов в нарушении сложных форм поведения при экспериментальной БА. Наиболее простым вариантом такого механизма может являться торможение транспорта глюкозы и развитие локального гипометаболизма глюкозы в ткани миндалины. Не менее интересным предполагаемым механизмом может быть также нарушение рецепции ангиотензина IV – лиганда IRAP – в ткани миндалины, что требует дополнительного экспериментального подтверждения.

В целом полученные нами результаты открывают потенциальную роль IRAP-контролируемого транспорта глюкозы в клетках миндалины головного мозга в развитии эмоциональных расстройств при хронической нейродегенерации Альцгеймеровского типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Снижение экспрессии IRAP на нейронах и астроцитах, а также IRAP/GLUT4 в клетках

миндалины у животных с экспериментальной моделью БА свидетельствует о развитии инсулинорезистентности в миндалине головного мозга, находящейся в тесной взаимосвязи с гиппокампом при реализации когнитивных функций и запоминания, сопряженных с эмоциональной окраской событий, что дает ценную информацию для разработки новых стратегий в терапии нейродегенеративных заболеваний, как было предложено ранее [34].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о вкладе авторов. Горина Я.В. – интерпретация данных иммуногистохимического исследования. Комлева Ю.К. – разработка концепции и дизайна эксперимента. Лопатина О.Л. – интерпретация данных нейроповеденческого тестирования. Черных А.И. – анализ данных нейроповеденческого тестирования и иммуногистохимического исследования. Салмина А.Б. – проверка критически важного интеллектуального содержания и окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-10241.2016.7).

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследования на животных проводились с соблюдением принципов гуманности, которые изложены в Директиве Европейского сообщества (2010/63/ЕС). Исследование одобрено на заседании биоэтической комиссии по работе с животными при локальном этическом комитете ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (выписка из протокола № 20 от 7 октября 2015 г.).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hane F.T., Robinson M., Lee B.Y., Bai O., Leonenko Z., Albert M.S. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 3: Diagnosis and Treatment // *J. Alzheimers Dis.* 2017; 57 (3): 645–665. DOI: 10.3233/jad-160907.
- Schain M., Kreisl W.C. Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders—a Review // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2017; 17 (3): 25. DOI: 10.1007/s11910-017-0733-2.
- Nugent S., Castellano C.A., Bocki C., Dionne I., Fulop T., Cunnane S.C. Relationship of metabolic and endocrine parameters to brain glucose metabolism in older adults: do cognitively-normal older adults have a particular metabolic phenotype? // *Biogerontology.* 2016; 17 (1): 241–255. DOI: 10.1007/s10522-015-9595-7.
- Riepe M.W., Walther B., Vonend C., Beer A.J. Drug-induced cerebral glucose metabolism resembling Alzheimer's Disease: a case study // *BMC Psychiatry.* 2015; 15: 157. DOI: 10.1186/s12888-015-0531-9.
- Calsolaro V., Edison P. Alterations in Glucose Metabolism in Alzheimer's Disease // *Recent. Pat. Endocr. Metab. Immun. Drug. Discov.* 2016; 10 (1): 31–39.
- Yeatman H., Albiston A., Chai S. Insulin-regulated aminopeptidase in astrocytes: Role in Alzheimer's disease? // *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association.* 2011; 7 (4): 668.
- Keller S.R., Scott H.M., Mastick C.C., Aebersold R., Lienhard G.E. Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut4 vesicles // *J. Biol. Chem.* 1995; 270 (40): 23612–23618.
- Bernstein H.G., Müller S., Dobrowolny H., Wolke C., Lendeckel U., Bukowska A., Keilhoff G., Becker A., Trübner K., Steiner J., Bogerts B. Insulin-regulated aminopeptidase immunoreactivity is abundantly present in human hypothalamus and posterior pituitary gland, with reduced expression in paraventricular and suprachiasmatic neurons in chronic schizophrenia // *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2016. DOI: 10.1007/s00406-016-0757-7. [Epub ahead of print].
- Li X., Wang H., Tian Y., Zhou S., Li X., Wang K., Yu Y. Impaired White Matter Connections of the Limbic System Networks Associated with Impaired Emotional Memory in Alzheimer's Disease // *Front Aging Neurosci.* 2016; 8: 250. DOI: 10.3389/fnagi.2016.00250.
- McDonald A.J., Mott D.D. Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory // *J. Neurosci. Res.* 2017; 95 (3): 797–820. DOI: 10.1002/jnr.23709.
- Chen Y., Lippincott-Schwartz J. Selective visualization of GLUT4 storage vesicles and associated Rab proteins using IRAP-pHluorin // *Methods Mol. Biol.* 2015; 1298: 173–179. DOI: 10.1007/978-1-4939-2569-8_14.
- Fernando R.N., Albiston A.L., Chai S.Y. The insulin-regulated aminopeptidase IRAP is colocalised with GLUT4 in the mouse hippocampus – potential role in modulation of glucose uptake in neurones? // *Eur. J. Neurosci.* 2008; 28: 588–598. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2008.06347.x.
- Yeh T.Y., Sbodio J.I., Tsun Z.Y., Luo B., Chi N.W. Insulin-stimulated exocytosis of GLUT4 is enhanced by IRAP and its partner tankyrase // *Biochem. J.* 2007; 402 (2): 279–290. DOI: 10.1042/bj20060793.
- Shah K., Desilva S., Abbruscato T. The role of glucose transporters in brain disease: diabetes and Alzheimer's Disease // *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13 (10): 12629–12655. DOI: 10.3390/ijms131012629.

15. Albiston A.L., Diwakarla S., Fernando R.N., Mountford S.J., Yeatman H.R., Morgan B., Pham V., Holien J.K., Parker M.W., Thompson P.E., Chai S.Y. Identification and development of specific inhibitors for insulin-regulated aminopeptidase as a new class of cognitive enhancers // *Br. J. Pharmacol.* 2011; 164 (1): 37–47. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01402.x.
16. Diwakarla S., Nylander E., Grönbladh A., Vanga S.R., Khan Y.S., Gutiérrez-de-Terán H., Ng L., Pham V., Sävmarker J., Lundbäck T., Jenmalm-Jensen A., Andersson H., Engen K., Rosenström U., Larhed M., Ekvist J., Chai S.Y., Hallberg M. Binding to and Inhibition of Insulin-Regulated Aminopeptidase by Macrocyclic Disulfides Enhances Spine Density // *Mol. Pharmacol.* 2016; 89 (4): 413–424. DOI: 10.1124/mol.115.102533.
17. Bernstein H.G., Müller S., Dobrowolny H., Wolke C., Lendeckel U., Bukowska A., Keilhoff G., Becker A., Trübner K., Steiner J., Bogerts B. Insulin-regulated aminopeptidase immunoreactivity is abundantly present in human hypothalamus and posterior pituitary gland, with reduced expression in paraventricular and suprachiasmatic neurons in chronic schizophrenia // *Eur. Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2016. DOI: 10.1007/s00406-016-0757-7. [Epub ahead of print].
18. Loyens E., De Bundel D., Demaegdt H., Chai S.Y., Vanderheyden P., Michotte Y., Gard P., Smolders I. Antidepressant-like effects of oxytocin in mice are dependent on the presence of insulin-regulated aminopeptidase // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2013; 16 (5): 1153–11563. DOI: 10.1017/s1461145712001149.
19. Paxinos G., Franklin K.B.J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates: Compact Second Edition.* San Diego, CA: Academic Press, 2012: 360.
20. Epelbaum S., Youssef I., Lacor P.N., Chaurand P., Duplus E., Brugg B., Duyckaerts C., Delatour B. Acute amnesic encephalopathy in amyloid- β oligomer-injected mice is due to their widespread diffusion *in vivo* // *Neurobiol Aging.* 2015; 36 (6): 2043–2052. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.03.005.
21. Комлева Ю.А., Малиновская Н.А., Горина Я.В., Лопатина О.Л., Волкова В.В., Салмина А.Б. Экспрессия молекул CD38 и CD157 в олифакторных луковицах головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера // *Сибирское медицинское обозрение.* 2015; 95 (5): 45–49.
22. Komleva Ju.K., Malinovskaia N.A., Gorina Ja.V., Lopatina O.L., Volkova V.V., Salmina A.B. Ekspressiya molekuly CD38 i CD157 v ol'faktornykh lukovnicah golovnogo mozga pri ehksperimental'noj bolezni Al'cgejmerya [Expression of CD38 and CD157 molecules in the olfactory bulb of the brain in experimental Alzheimer's disease] // *Sibirskoe medicinskoe obozrenie – Siberian Medical Review.* 2014; 5: 45–49 (in Russian).
23. Lugo J.N., Smith G.D., Holley A.J. Trace fear conditioning in mice // *J. Vis. Exp.* 2014; Mar 20 (85). DOI: 10.3791/51180.
24. Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Волкова В.В., Черных А.И., Шабалова А.А., Семенчуков А.А., Оловянникова Р.Я., Салмина А.Б. Батарея тестов для поведенческого фенотипирования стареющих животных в эксперименте // *Успехи геронтологии.* 2017; 130 (1): 49–56.
25. Gorina Ja.V., Komleva Ju.K., Lopatina O.L., Volkova V.V., Chernyh A.I., Shabalova A.A., Semenchukov A.A., Olovjannikova R.Ja., Salmina A.B. Batateja testov dlja povedencheskogo fenotipirovanija starejushhijh zhivotnyh v jeksperimente [The battery of tests for behavioral phenotyping of aging animals in the experiment] // *Uspehi gerontologii – Successes of Gerontology.* 2017; 1: 49–56 (in Russian).
26. Encinas J.M., Enikolopov G. Identifying and Quantitating Neural Stem and Progenitor Cells in the Adult Brain // *Methods Cell Biol.* 2008; 85 (1): 243–272. DOI: 10.1016/s0091-679x(08)85011-x.
27. Jurcovicova J. Glucose transport in brain – effect of inflammation // *Endocr Regul.* 2014; 48 (1): 35–48.
28. Vannucci S.J., Koehler-Stec E.M., Li K., Reynolds T.H., Clark R., Simpson I.A. GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes // *Brain Res.* 1998; 797 (1): 1–11.
29. Keller S.R., Davis A.C., Clairmont K.B. Mice deficient in the insulin-regulated membrane aminopeptidase show substantial decreases in glucose transporter GLUT4 levels but maintain normal glucose homeostasis // *J. Biol. Chem.* 2002; 277 (20): 17677–17686. DOI: 10.1074/jbc.M202037200.
30. Jordens I., Molle D., Xiong W., Keller S.R., McGraw T.E. Insulin-regulated aminopeptidase is a key regulator of GLUT4 trafficking by controlling the sorting of GLUT4 from endosomes to specialized insulin-regulated vesicles // *Mol. Biol. Cell.* 2010; 21 (12): 2034–2044. DOI: 10.1091/mbc.E10-02-0158.
31. Yeatman H.R., Albiston A.L., Burns P., Chai S.Y. Forebrain neurone-specific deletion of insulin-regulated aminopeptidase causes age related deficits in memory // *Neurobiol Learn Mem.* 2016; 136: 174–182. DOI: 10.1016/j.nlm.2016.09.017.
32. Xu B., Li H. Brain mechanisms of sympathetic activation in heart failure: Roles of the renin-angiotensin system, nitric oxide and pro-inflammatory cytokines (Review) // *Mol. Med. Rep.* 2015; 12(6): 7823–7829. DOI: 10.3892/mmr.2015.4434.
33. Wright J.W., Kawas L.H., Harding J.W. The development of small molecule angiotensin IV analogs to treat Alzheimer's and Parkinson's diseases // *Prog Neurobiol.* 2015; 125: 26–46. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2014.11.004.
34. Mateos L., Ismail M.A., Gil-Bea F.J., Leoni V., Winblad B., Björkhem I., Cedazo-Munguez A. Upregulation of brain renin angiotensin system by 27-hydroxycholesterol in Alzheimer's disease // *J. Alzheimers Dis.* 2011; 24 (4): 669–679. DOI: 10.3233/jad-2011-101512.
35. Mateos L., Akterin S., Gil-Bea F.J., Spulber S., Rahman A., Björkhem I., Schultzberg M., Flores-Morales A., Ce-

dazo-Mnnguez A. Activity-regulated cytoskeleton-associated protein in rodent brain is downregulated by high fat diet in vivo and by 27-hydroxycholesterol in vitro // *Brain Pathol.* 2009; 19 (1): 69–80. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2008.00174.x.

36. Chai S.Y., Yeatman H.R., Parker M.W., Ascher D.B., Thompson P.E., Mulvey H.T., Albiston A.L. Development of cognitive enhancers based on inhibition of insulin-regulated aminopeptidase // *BMC Neurosci.* 2008; 9 Suppl 2: S14. DOI: 10.1186/1471-2202-9-S2-S14.

Поступила в редакцию 05.05.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Горина Яна Валерьевна, канд. фарм. наук, доцент, кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Комлева Юлия Константиновна, канд. мед. наук, доцент, кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Лопатина Ольга Леонидовна, канд. биол. наук, доцент, кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Черных Анатолий Игоревич, врач-хирург, Красноярская межрайонная клиническая больница № 20 имени И.С. Берзона, г. Красноярск.

Салмина Алла Борисовна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

(✉) Горина Яна Валерьевна, e-mail: yana_20@bk.ru.

УДК 577.175.722:612.396.2:612.82:616.894-053.8-092.9

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-106–115

For citation: Gorina Ya.V., Komleva Yu.K., Lopatina O.L., Chernykh A.I., Salmina A.B. The effect of insulin resistance on amygdale glucose metabolism alterations in experimental Alzheimer's disease. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2017; 16 (4): 106–115.

The effect of insulin resistance on amygdale glucose metabolism alterations in experimental Alzheimer's disease

Gorina Ya.V.¹, Komleva Yu.K.¹, Lopatina O.L.¹, Chernykh A.I.², Salmina A.B.¹

¹ Krasnoyarsk State Medical University (KSMU) named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

² Krasnoyarsk Interdistrict Clinical Hospital № 20 named after I.S. Berzon 12A, Instrumental Str., Krasnoyarsk, 660123, Russian Federation

ABSTRACT

Purpose. Glucose metabolism is tightly regulated in the brain. Aberrant glucose metabolism is an important feature of neurodegenerative diseases, as in Alzheimer's disease. The transport of glucose to the cell membrane is realized through the activity of insulin-regulated aminopeptidase (IRAP) which controls transfer of glucose transporter to the plasma membrane. IRAP is considered as one of the key markers of insulin resistance in Alzheimer's disease. However, the question of the mechanism of the action of the IRAP remains open. The aim of the study was to study the effect of IRAP expression on cells of the neuronal and glial lineage, glucose transporter (GLUT4) expression in the brain amygdala on emotional memory in animals with experimental Alzheimer's disease.

Materials and methods. The study was performed with two experimental models of Alzheimer's disease in mice. The experimental group was mice of the CD1 line, males aged 4 months (Alzheimer's disease model with the intra-hippocampal administration of beta-amyloid 1-42 (1 µl) bilaterally in the CA1 area). The control

group was mice of the CD1 line, males aged 4 months (sham-operated animals with the intrahippocampal administration of Phosphate buffered saline (1 μ l) bilaterally in the CA1). The genetic model of Alzheimer's disease is the B6SLJ-Tg line mice (APP^{SwF1L}, PSEN1^{*M146L*L286V}) 6799Vas, males aged 4 months. The control group consisted of C57BL/6xSJL mice, males aged 4 months. Evaluation of emotional memory was carried out using "Fear conditioning" protocol. Expression of molecule-markers of insulin-resistance in the amygdala was studied by immunohistochemistry followed by confocal microscopy.

Results. Aberrant associative learning and emotional memory was revealed in animals with an experimental model of Alzheimer's disease. A decrease ($p \leq 0,05$) of IRAP expression on cells of neuronal and glial nature, associated with GLUT4 down-regulation was detected in amygdala of brain in animals with experimental Alzheimer's disease.

Conclusion. Decreased number of IRAP-immunopositive neuronal and astroglial cells, as well as IRAP+/GLUT4+ in cells of amygdala in animals with an experimental model of Alzheimer's disease, indicates the development of insulin resistance in amygdala of brain, which was in correlation with the hippocampus in performing cognitive functions and memorizing associated with emotionally colored events.

Key words: IRAP, GLUT4, emotional memory, Alzheimer's disease.

Received May 05.2017
Accepted November 08.2017

Gorina Yana V., PhD, Associate Professor, Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Komleva Yuliya K., PhD, Associate Professor, Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Lopatina Ol'ga L., PhD, Associate Professor, Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Chernykh Anatolii I., Surgeon, Krasnoyarsk Clinical Hospital No 20 named after I.S. Berzona, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Salmina Alla B., DM, Professor, Head of the Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Head of the Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

(✉) **Gorina Yana V.**, e-mail: yana_20@bk.ru.

УДК 616-018.2-007.17:577.2

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-116–125

Для цитирования: Дворниченко М.В., Сизикова А.Е., Саприна Т.В., Пашкова Е.Н., Щербинко М.С., Хлусов И.А., Новицкий В.В. Клеточно-молекулярный скрининг дисплазии соединительной ткани у подростков-спортсменов (пилотное исследование). *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 116–125.

Клеточно-молекулярный скрининг дисплазии соединительной ткани у подростков-спортсменов (пилотное исследование)

Дворниченко М.В.¹, Сизикова А.Е.¹, Саприна Т.В.¹, Пашкова Е.Н.²,
Щербинко М.С.¹, Хлусов И.А.^{1,3}, Новицкий В.В.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Врачебно-физкультурный диспансер
Россия, 634029, г. Томск, ул. Лебедева, 5в

³ Балтийский федеральный университет имени И. Канта
Россия, 236016, г. Калининград, ул. А. Невского, 14

РЕЗЮМЕ

Цель работы – оценить в крови клеточные и молекулярные показатели ремоделирования костной ткани как потенциальные маркеры недифференцированных форм дисплазии соединительной ткани.

Материал и методы. Проведено исследование структурно-функционального статуса клеточных элементов в культуре *in vitro* мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у подростков-спортсменов и фенотипических проявлений недифференцированной дисплазии соединительной ткани (НДСТ). С помощью экспресс-анализа обследовано 25 учащихся спортивных школ в возрасте 10–14 лет (основные спортивные дисциплины: фигурное катание, гимнастика, легкая атлетика). Средний возраст обследованных составил $(12,0 \pm 1,7)$ лет. Клиническое обследование подростков позволило ранжировать признаки НДСТ в анкетной шкале 4–11,5 баллов.

Основные результаты. Сопоставление результатов анкетного обследования и оценки дистантных маркеров ремоделирования костной ткани позволило выявить распределение подростков-спортсменов на две группы: с минимальными признаками НДСТ (сумма менее 7 баллов – 10 человек), с выраженным фенотипом НДСТ (сумма баллов ≥ 7 –15 человек). Установлено статистически значимое снижение концентрации CrossLaps (на 80%) и ионизированного кальция (на 5%) в крови подростков-спортсменов с выраженными диспластическими проявлениями. При краткосрочном 72-часовом культивировании мононуклеарных лейкоцитов в присутствии 3D-матрикса, имитирующего свойства минерального вещества регенерирующей костной ткани, обнаружены морфофункциональные особенности клеточной реакции у подростков-спортсменов с клиническими проявлениями НДСТ, а также гетерогенность клеточной популяции, связанная с появлением в крови клеток с остеобластоподобным фенотипом. Результаты проведенного исследования предполагают использование клеточных и молекулярных показателей ремоделирования костной ткани при скрининге механизмов и динамики развития диспластических нарушений у подростков-спортсменов.

Ключевые слова: недифференцированная дисплазия соединительной ткани, подростки-спортсмены, остеокальцин, остеобластоподобные клетки, периферическая кровь, мононуклеарные лейкоциты.

✉ Дворниченко Марина Владимировна, e-mail: dochic@yandex.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема клинически недифференцированных форм дисплазии соединительной ткани (НДСТ) в педиатрии обусловлена широкой распространенностью ее проявлений в популяции, варьирующей, по данным разных авторов, от 26 до 80% [1–5]. Внимание исследователей и клиницистов привлекает факт возрастного нарастания симптомов НДСТ с критическим периодом в возрасте 10–14 лет [2, 3]. Формирование диспластического фенотипа обусловлено генетически детерминированным изменением свойств соединительной ткани, связанным с нарушением состава и структурной организации внеклеточного матрикса, включая волокнистые структуры, гликозаминогликаны и гликопротеиды [1, 6–10].

В настоящее время не существует единого мнения о классификации, терминологии и диагностических критериях НДСТ. Согласно международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10), диспластически подобные состояния соединительной ткани выделены в рубрику Q65–Q79 «Врожденные аномалии и деформации костно-мышечной системы» класса «врожденные аномалии [пороки развития], деформации и хромосомные нарушения» (Q00–Q99). Существующие методы диагностики направлены, прежде всего, на выявление определенных симптомов и синдромов НДСТ, в основе которых лежат оценка фенотипических проявлений по балльной системе или результаты инструментальных методов исследования [4, 11]. Так, существует двухэтапный скрининг-алгоритм, разработанный в 2014 г. комитетом экспертов педиатрической группы «Дисплазия соединительной ткани» при Российском научном обществе терапевтов с балльной системой оценки внешних и висцеральных признаков, характерных для НДСТ [4]. Преваляирование нарушений опорно-двигательного аппарата в фенотипических проявлениях НДСТ [3, 5, 12] требует оценки необходимости использования в диагностике дистантных показателей [13], активно применяющихся при патологии ремоделирования (самообновления) костной ткани (концентрация остеокальцина, CrossLaps, кальция и фосфора; активность общих фракций кислой фосфатазы (ОКФ) и щелочной фосфатазы (ОЩФ), а также их изоформ в периферической крови).

В предыдущей работе показано, что интерпретация дистантных маркеров ремоделирования костной ткани у детей и подростков во многом обусловлена клинической ситуацией и возрастом обследуемых [13]. Для подростков 10–14 лет ин-

тенсивные физические нагрузки в период активно растущего и формирующегося скелета могут провоцировать прогрессирование и (или) клиническую манифестацию НДСТ.

Цель исследования – оценить в крови клеточные и молекулярные показатели ремоделирования костной ткани как потенциальные маркеры недифференцированных форм дисплазии соединительной ткани.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследованы 25 детей и подростков в возрасте 10–14 лет, учащиеся спортивных школ (основные спортивные дисциплины: фигурное катание, гимнастика, легкая атлетика). Выбор в качестве объекта исследования подростков-спортсменов обусловлен спецификой данных видов спорта, в которых фенотипические проявления НДСТ являются одним из факторов выбора спортивной карьеры. Среди обследованных девочки составили 84%, мальчики – 16%, средний возраст ($12,0 \pm 1,7$) лет.

Обследование подростков проводилось на базе Областного государственного автономного учреждения здравоохранения «Врачебно-физкультурный диспансер» в 2015–2016 гг. Все пациенты были проинформированы об особенностях проводимых диагностических манипуляций согласно этическим требованиям [14].

Основные критерии включения: наличие информированного согласия, обучение в спортивной школе в течение трех и более лет, отсутствие дифференцированных форм дисплазии соединительной ткани. Критерии исключения из программы исследования: период обострения хронических воспалительных заболеваний; наличие дифференцированной формы дисплазии соединительной ткани; аутоиммунные, наследственные и психические заболевания, злокачественные новообразования, алкогольная и наркотическая зависимости; отсутствие информированного согласия.

Оценка фенотипических проявлений НДСТ проводилась по балльной системе в соответствии с алгоритмом, разработанным комитетом экспертов педиатрической группы «дисплазия соединительной ткани» при Российском научном обществе терапевтов от 2014 г. [4] в авторской модификации. Например, признак долихостеномии выявлялся при измерении соотношений длин кисти или стопы к росту, размаха рук к росту и верхнего сегмента к нижнему. Так, оценивалось каждое соотношение в 1 балл при условии, если

оно выходило за рамки нормальных значений. В заключительный алгоритм было взято 18 признаков НДСТ (костно-суставные: гипермобильность суставов, долихостеномилия, арахнодактилия, деформация грудной клетки и эктодермальные: растяжимость кожи, видимая венозная сеть и др.). Максимальная сумма возможных баллов по разработанной системе составила 23 балла. По итогам скрининга наивысшая сумма баллов у обследованных подростков-спортсменов не превышала 11,5.

Периферическую кровь получали из локтевой вены, собирали в пробирки типа vacuette с гепарином (BD Diagnostics, США). Для выделения фракции мононуклеарных лейкоцитов кровь в стерильных условиях наслаивали на градиент плотности (фиколл, $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$, ООО «Биолот», Россия), центрифугировали в течение 10 мин при 500 g с последующим двукратным отмыванием клеточного материала фосфатно-солевым буфером.

Взвесь мононуклеаров помещали (при плотности $1,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/лунку) в 1 мл культуральной среды, культивировали в 12-луночных планшетах (Orange Scientific, Бельгия) в течение 72 ч при температуре 37°C и 100%-й влажности. Полная культуральная среда готовилась по стандартным протоколам в модификации [15]. В качестве 3D-матрикса, имитирующего свойства минерального вещества регенерирующей костной ткани, в лунки помещали экспериментальные образцы размером $12 \times 12 \times 1 \text{ мм}^3$ из коммерчески чистого титана, несущие двустороннее покрытие из фосфатов кальция, полученное методом микродугового оксидирования в электролите. Процесс получения и свойства покрытия описаны ранее [16]. Контролем служил рост клеток на пластике.

В плазме крови и супернатантах клеточных культур методом ИФА с реактивами IDS (Великобритания) оценивали маркеры костного ремоделирования: концентрацию остеокальцина и С-концевых фрагментов молекул коллагена I типа (CrossLaps). Активность ОКФ и ОЩФ, концентрации общего кальция и неорганического фосфора определяли стандартным колориметрическим методом [17] реактивами Thermo Fisher Scientific (США). Все манипуляции проводились согласно изложенному алгоритму в инструкции производителя. Супернатанты (кондиционные жидкости) получали путем забора надосадочной части клеточных культур, их центрифугирования в течение 10 мин при 500 g.

Для иммуноцитохимических исследований планшеты сушили на воздухе в течение 24 ч.

Фиксацию и пермеабиллизацию клеток проводили в холодном этаноле (-20°C) в течение 1 мин, затем промывали в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4). Дальнейшие этапы проводились при комнатной температуре (25°C) в соответствии с рекомендациями производителей антител (Epitomics®, clone Rb4507, рабочий титр 1 : 50; США). Использовались поликлональные IgG кролика к остеокальцину человека. Обнаружение DAB-позитивной реакции осуществляли с помощью поливалентной визуализирующей системы Novocastra NOVOLINK™ на основе Novolink Compact Polymer™. Негативным контролем окрашивания служила тест-система без антител.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программы Statistica for Windows 6.0. Проверка выборки на нормальность проводилась с помощью критерия Колмогорова – Смирнова. В связи с тем, что данные не подчинялись нормальному закону, для описания статистических различий использовался критерий Манна – Уитни (U-тест). Данные выражали как медиану (Me), 25%-й (Q_1) и 75%-й (Q_3) квартили. Оценка взаимосвязи показателей проводилась посредством рангового коэффициента корреляции (r) по Спирмену. Корреляционная связь оценивалась как сильная ($r > 0,75$), умеренная ($0,25 < r < 0,75$) и слабая ($r < 0,25$). Уровень статистической значимости принимался при $p < 0,05$ [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с неоднозначной интерпретацией клинических признаков НДСТ, высокой частотой манифестации дисплазии в виде нарушений опорно-двигательного аппарата в настоящем исследовании была проанализирована связь результатов клинического осмотра и дистантных маркеров ремоделирования костной ткани в крови. На рис. 1 представлен характер изменений общепринятых показателей формирования и резорбции костной ткани (остеокальцин, рис. 1, а; CrossLaps, рис. 1, б) в зависимости от суммы баллов клинической оценки признаков НДСТ у подростков-спортсменов.

Согласно полученным данным, реперной точкой (точкой экстремума) в диагностической шкале НДСТ у подростков-спортсменов является граница 7 баллов, при которой уровень остеокальцина и CrossLaps в плазме крови достигал минимальных значений у обследованных. Это позволило сформировать рабочую гипотезу о возможности ранжирования подростков-спортсменов на две группы: без выраженных (сумма менее 7 баллов;

10 человек) проявлений и с явными (сумма баллов ≥ 7 ; 15 человек) признаками НДСТ.

В табл. 1 представлена сравнительная оценка дистантных маркеров метаболизма костной ткани у подростков-спортсменов в зависимости от степени выраженности признаков дисплазии соединительной ткани. Обнаружено статистически зна-

чимое снижение в крови концентрации CrossLaps (на 80%) и ионизированного кальция (на 5%) у спортсменов с диспластическими проявлениями (≥ 7 баллов) по сравнению с обследованными без признаков дисплазии (менее 7 баллов). Результаты корреляционного анализа выявили сопряженность в каждой группе спортсменов (табл. 1).

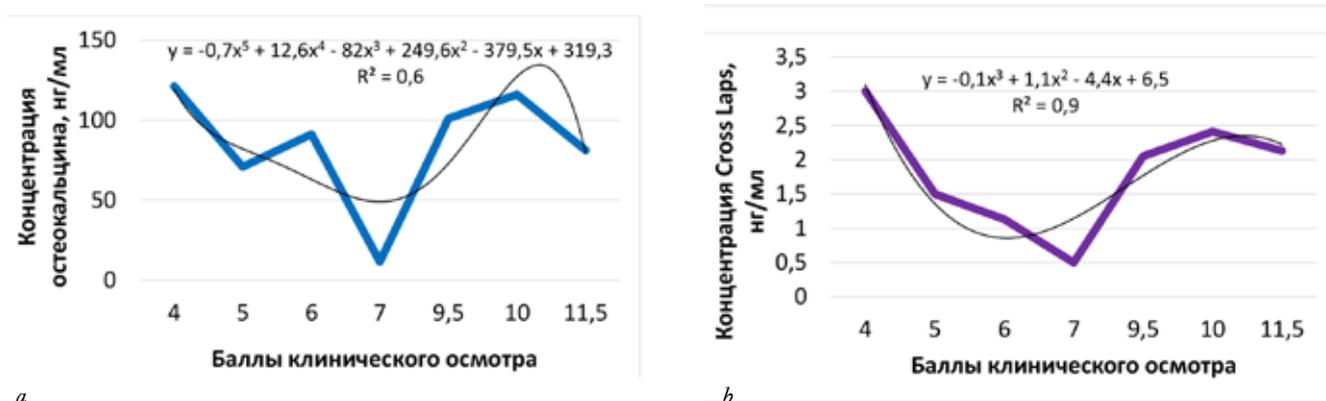


Рис. 1. Распределение и аппроксимация показателей ремоделирования костной ткани в плазме крови у подростков-спортсменов 10–14 лет в зависимости от анкетной оценки проявлений дисплазии соединительной ткани: *a* – остеокальцин; *b* – CrossLaps
Fig. 1. Distribution and approximation of bone tissue remodeling indices in the blood among adolescent athletes aged 10–14 years, depending on the questionnaire evaluation of phenotypic manifestations of connective tissue dysplasia: *a* – osteocalcin; *b* – CrossLaps

Т а б л и ц а 1

Сравнительная характеристика дистантных маркеров ремоделирования костной ткани в крови и внутригрупповые корреляции у подростков-спортсменов в зависимости от степени выраженности признаков недифференцированной дисплазии соединительной ткани, <i>Me (Q_i; Q_j)</i>		
Показатель	Спортсмены без выраженных признаков НДСТ, <i>n</i> = 10 (сумма баллов <7)	Спортсмены с признаками НДСТ, <i>n</i> = 15 (сумма баллов ≥ 7)
Остеокальцин, нг/мл	111,7 (94,4; 114,0)	94,6 (66,6; 108)
CrossLaps, нг/мл	2,3 (1,9; 2,6)	1,3* (1,0; 2,01)
Общая фракция щелочной фосфатазы, МЕ	279 (250,5; 357,5)	265 (157; 279)
Общая фракция кислой фосфатазы, МЕ	19,7 (15,1; 23,05)	21,7 (17,5; 25,4)
Кальций общий, мМ	2,49 (2,40; 2,51)	2,39 (2,31; 2,48)
Кальций ионизированный, мМ	1,19 (1,18; 1,28)	1,13* (1,08; 1,17)
Фосфор, мМ	1,51 (1,41; 1,74)	1,4 (1,32; 1,48)
Внутригрупповые корреляционные связи по Спирмену	Остеокальцин – кальций общий ($r = 0,90$; $p < 0,05$)	CrossLaps – остеокальцин ($r = 0,89$; $p < 0,01$)
	ОЩФ – кальций ионизированный ($r = 0,90$; $p < 0,05$)	

Примечание. *n* – число обследованных пациентов.

*статистически значимые ($p < 0,05$) различия с соответствующими данными в группе спортсменов без выраженного диспластического фенотипа согласно U-критерию Манна – Уитни.

При минимальных проявлениях НДСТ (4–6 баллов) регистрировались сильные ассоциации метаболических показателей формирования костной ткани (остеокальцин, ОЩФ) с уровнем кальция (общего или ионизированного) в крови, что свидетельствует о высокой интенсивности синтетических процессов в паттерне ремоделирования костной ткани при высоком содержании CrossLaps,

свидетельствующем о катаболизме зрелого коллагена. Для подростков-спортсменов с выраженными диспластическими признаками (сумма баллов клинической оценки ≥ 7) низкий уровень CrossLaps был сопряжен с относительным снижением концентрации остеокальцина. Полученные данные, возможно, связаны с уменьшением активности костного ремоделирования и утратой фазового

характера процессов формирования или резорбции костной ткани, что характерно для диспластических изменений [3, 6]. Кроме этого, снижение уровня ионизированного кальция в крови у спортсменов с выраженным диспластическим фенотипом свидетельствует о дисбалансе процессов минерализации костной ткани [19].

Согласно проведенным ранее исследованиям [20, 21], наличие локальной взаимосвязанной системы регуляции структурно-функционального статуса клеток костной ткани и системы крови (особенно в процессе их дифференцировки) может стать основой для разработки методологических подходов к оценке процессов ремоделирования кости в норме и при патологии с использованием культуры *in vitro* мононуклеарных лейкоцитов периферической крови.

В связи с этим была проведена оценка структурно-функционального состояния мононукле-

арных лейкоцитов крови в культуре клеток *in vitro* при постановке сравнительного эксперимента в 2D-системе (пластиковая поверхность культуральной посуды) и 3D-системе (в присутствии 3D-матрикса, имитирующего свойства минерального вещества регенерирующей костной ткани).

В табл. 2 и 3 представлены сравнительные данные краткосрочного культивирования мононуклеаров крови в 2D- и 3D-системах в зависимости от степени клинических проявлений диспластического фенотипа. Для подростков-спортсменов с минимальными проявлениями диспластического фенотипа (сумма баллов <7), в кондиционной жидкости обнаружено статистически значимое снижение содержания общего (на 5,7 %) и ионизированного кальция (на 12%), увеличение активности ОЩФ (на 3%), обусловленное 3D-культивированием клеток (см. табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Молекулярные показатели в супернатантах краткосрочной культуры мононуклеаров у подростков-спортсменов без выраженных клинических проявлений дисплазии соединительной ткани (сумма баллов клинической оценки 4–6), $Me (Q_1; Q_3)$		
Показатель	2D-культура клеток, $n = 10, N = 30$	3D-культура клеток, $n = 10, N = 10$
Остеокальцин, нг/мл	11,08 (10,8; 11,8)	10,96 (8,7; 11,08)
Общая фракция щелочной фосфатазы, МЕ	103 (89; 104)	106* (92; 109)
Общая фракция кислой фосфатазы, МЕ	0,2 (0,2; 0,3)	0,3 (0,3; 0,3)
Кальций общий, мМ	1,52 (1,52; 1,53)	1,44* (1,34; 1,48)
Кальций ионизированный, мМ	1,25 (1,23; 1,30)	1,1* (1,08; 1,11)
Калий, мМ	5,8 (5,6; 5,8)	5,7 (5,7; 5,8)
Фосфор, мМ	1,41 (1,38; 1,42)	1,42 (1,35; 1,46)

П р и м е ч а н и е. n – число обследованных пациентов; N – количество исследованных проб.

* $p < 0,05$ в сравнении с 2D-культурой клеток согласно U-критерию Манна – Уитни.

Т а б л и ц а 3

Молекулярные показатели в супернатантах краткосрочной культуры мононуклеаров у подростков-спортсменов с выраженными клиническими диспластическими изменениями (сумма баллов клинической оценки ≥ 7), $Me (Q_1; Q_3)$		
Показатель	2D-культура клеток, $n = 15, N_{\text{проб}} = 45$	3D-культура клеток, $n = 15, N_{\text{проб}} = 15$
Остеокальцин, нг/мл	9,2 (7,5; 9,5)	8,3 (8,1; 11,7)
Общая фракция щелочной фосфатазы, МЕ	91 (84; 96)	90 (88; 95)
Общая фракция кислая фосфатазы, МЕ	0,3 (0,2; 0,3)	0,4* (0,3; 0,5)
Кальций общий, мМ	1,52 (1,49; 1,53)	1,43* (1,36; 1,45)
Кальций ионизированный, мМ	1,34 (1,3; 1,35)	1,07* (1,04; 1,09)
Калий, мМ	5,5 (5,5; 5,7)	5,7* (5,6; 5,7)
Фосфор, мМ	1,41 (1,37; 1,42)	1,39 (1,36; 1,46)

П р и м е ч а н и е. n – число обследованных пациентов; N – количество исследованных проб.

* $p < 0,05$ в сравнении с 2D-культурой клеток согласно U-критерию Манна – Уитни.

Для обследованных подростков-спортсменов с выраженным диспластическим фенотипом (сумма баллов ≥ 7) были установлены во многом аналогичные изменения (см. табл. 3) со стороны показателей минерального обмена. Зафиксировано уменьшение концентрации общего и ионизиро-

ванного кальция на 5,9 и на 20,2% от соответствующих уровней в 2D-культуре (см. табл. 3). С другой стороны, отмечено повышение активности ОКФ (на 33%), но не ОЩФ, а также содержания калия (на 3,6%) в сравнении с показателями культуры на пластике.

Снижение фракций кальция можно ассоциировать с формированием малорастворимых фосфатов кальция, выпадающих в осадок на модельных дисках и самих клетках, выступающих в качестве центров кристаллизации. Подобные метаболические процессы характерны для *in vitro* культур стромальных стволовых клеток, созревающих в остеобласты [22]. Активность ОКФ и ОЩФ обусловлена наличием в культуре не только лимфоцитов, моноцитов и нейтрофильных гранулоцитов (до 10% от состава клеточной популяции мононуклеарной фракции крови), но и клеток с вектором остеобластной и (или) остеокластной дифференцировки [23].

Выход калия из клеток в межклеточную жидкость в зависимости от выраженности процесса можно рассматривать как маркер активации клеток (потенциал действия) и (или) цитолиза (повреждения плазматических мембран). Как следствие представленных выкладок, в клинической динамике НДСТ у подростков-спортсменов меняется характер клеточно-молекулярной реакции на 3D-матрикс, имитирующий минеральное вещество костной ткани: к остеобластоподобным функциональным проявлениям при сумме баллов клинической оценки ≥ 7 добавляются признаки остеокластоподобной активности.

С помощью специфических моноклональных антител был проведен иммуноцитохимический анализ мононуклеарной фракции лейкоцитов, прилипающих к пластику, на специфический маркер остеобластов (остеокальцин, ОК). До этапа культивирования *in vitro* ОК-позитивные клетки не обнаруживались. После краткосрочного (3 сут) культивирования мононуклеаров периферической крови как в 2D-, так и 3D-системе были зарегистрированы единичные клетки, позитивно окрашивающиеся на остеокальцин (рис. 2).



Рис. 2. Остеокальцин-позитивные клетки в 2D- и 3D-культурах мононуклеарных лейкоцитов крови. Иммуноцитохимическая окраска, увеличение 100

Fig. 2. Osteocalcin-positive cells in 2D- and 3D-cultures of mononuclear blood leukocytes. Immunocytochemical staining, increase 100

Полученные данные согласуются с мнением [24, 25] о существовании в периферической крови 0,5–1% циркулирующих клеток, имеющих фи-

бробластоподобную морфологию (ранее называемых «фиброциты») с иммунофенотипом CD44+, CD106+, CD29+, CD34-, CD45-, CD14-, способных адгезировать к поверхности лабораторного пластика, дифференцироваться в фибробластическом, остеобластическом, хондробластическом направлениях [26–28].

Таким образом, у подростков-спортсменов с НДСТ выявляются *in vitro* клетки крови, положительно окрашивающиеся на остеокальцин. При этом в случае слабо выраженных клинических проявлений НДСТ (в диапазоне 4–6 баллов), добавление 3D-матрикса к культуре мононуклеарных лейкоцитов способствует проявлению метаболических признаков остеобластоподобных клеток (рост активности щелочной фосфатазы, снижение концентрации кальция в межклеточной жидкости). Мононуклеары крови подростков-спортсменов с выраженной НДСТ (сумма баллов клинической оценки ≥ 7) реагируют на 3D-раздражитель усилением как остеобластоподобной (уменьшение уровня кальция в межклеточной жидкости), так и остеокластоподобной функции (рост активности кислой фосфатазы).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования установили возможность использования клеточных и молекулярных показателей ремоделирования костной ткани в системе скрининга механизмов и динамики развития диспластических нарушений у подростков-спортсменов. Полученные данные позволяют интерпретировать 3D-систему культивирования мононуклеарных лейкоцитов как экспериментальную *in vitro* модель системы «кровь – кость» в условиях физиологического (патологического) паттернов ремоделирования костной ткани у подростков-спортсменов. Выявление чувствительности и специфичности установленных маркеров в качестве потенциальных диагностических и прогностических критериев НДСТ требуют расширения выборки исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о вкладе авторов. Дворниченко М.В. – разработка концепции и дизайна исследования, интерпретация данных Сизикова А.Е. – разработка дизайна исследования, подготовка текста статьи Саприна Т.В. – анализ и интерпретация данных,

проверка критически важного интеллектуального содержания Пашкова Е.Н. – анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания Щербинко М.С. – разработка дизайна исследования, подготовка текста статьи Хлусов И.А. – обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания Новицкий В.В. – обоснование рукописи, окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по программе «УМНИК» (договор №10490ГУ2/2015).

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета (заключение № 1646 от 25.10.2010).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Баклунов В.В. Системная дисплазия соединительной ткани – один из важных факторов формирования рецидивирующего бронхита у детей // *Современная педиатрия*. 2006; 4: 193–195.
2. Baklunov V.V. Sistemnaya displaziya soedinitel'noy tkani – odin iz vazhnykh faktorov formirovaniya retsidiviruyushchego bronkhita u detey // *Sovremennaya pediatriya*. 2006; 4: 193–195 (in Russian).
3. Дедова В.О., Доценко Н.Я., Боев С.С., Шехунова И.А., Герасименко Л.В. Распространенность дисплазии соединительной ткани (обзор литературы) // *Медицина и образование в Сибири*. 2011; (2): 6–17.
4. Dedova V.O., Dotsenko N.Ya., Boev S.S., Shekhunova I.A., Gerasimenko L.V. Rasprostranennost' displazii soedinitel'noy tkani (obzor literatury) [Prevalence of connective tissue dysplasia (Review)] // *Meditsina i obrazovanie v Sibiri*. 2011; (2): 6–17 (in Russian).
5. Клеменов А.В., Суслов А.С. Наследственные нарушения соединительной ткани: современный подход к классификации и диагностике (обзор) // *Соврем. техн. мед.* 2014; 6 (2): 127–132.
6. Klemenov A.V., Suslov A.S. Nasledstvennyye narusheniya soedinitel'noy tkani: sovremennyy podkhod k klassifikatsii i diagnostike (obzor) [Hereditary Connective Tissue Disorders: a Modern Approach to Classification and Diagnosis (Review)] // *Sovrem. tekhnol. med.* 2014; 6 (2): 127–132 (in Russian).
7. Кадурина Т.И., Гнусаев С.Ф., Аббакумова Л.Н., Алимова И.А., Антонова Н.С., Апенченко Ю. С., ... Кудинова Е.Г. Наследственные и многофакторные нарушения соединительной ткани у детей алгоритмы диагностики. Тактика ведения проект российских рекомендаций разработан комитетом экспертов педиатрической группы «Дисплазия соединительной ткани» при российском обществе терапевтов // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2015; 10 (1 (37)).
8. Kadurina T.I., Gnusaev S.F., Abbakumova L.N., Alimova I.L., Antonova N.S., Apenchenko Yu.S., ... Kudinova E.G. Nasledstvennyye i mnogofaktornyye narusheniya soedinitel'noy tkani u detey algoritmy diagnostiki. Taktika vedeniya proekt rossiyskikh rekomendatsiy razrabotan komitetom ekspertov pediatricheskoy gruppy «Displaziya soedinitel'noy tkani» pri rossiyskom nauchnom obshchestve terapevtov [Hereditary And Multivariate Connective Tissue Disorders in Children Algorithm of Diagnosis. Management Tactics Draft Russian Recommendations Developed by The Expert Committee Of Pediatric Group «Connective Tissue Dysplasia» at The Russian Scientific Society of Physicians] // *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza*. 2015; 10 (1 (37)) (in Russian).
9. Яковлев В.М., Нечаева Г.И. Системные дисплазии соединительной ткани: актуальность проблемы в клинике внутренних болезней // *Сибирский медицинский журнал*. 2011; 26 (3–2): 9–12.
10. Yakovlev V.M., Nechaeva G.I. Sistemnyye displazii soedinitel'noy tkani: aktual'nost' problemy v klinike vnutrennikh bolezney [Systemic Dysplasia Of Connective Tissue: The Clinical Significance Of The Problem For Internal Diseases] // *SMZb*. 2011, 26 (3–2): 9–12 (in Russian).
11. Птицына И.А. Возможные механизмы возникновения дисплазии соединительной ткани // *Научные итоги года: достижения, проекты, гипотезы*. 2015; (5): 64–69.
12. Ptitsyna I.A. Vozmozhnyye mekhanizmy vzniknoveniya displazii soedinitel'noy tkani // *Nauchnyye itogi goda: dostizheniya, proekty, gipotezy*. 2015; (5): 64–69 (in Russian).
13. Indumati V., Patil V.S. Biochemical markers of bone remodelling in osteoporosis // *J. Clinical Diagnostic Res*. 2010; (3): 2089–2097.
14. Malemud C.J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview // *Front Biosci*. 2006; 11 (1): 1696–1701. DOI: 10.2741 / 1915.
15. Allen-Brady K., Norton P., Farnham J., Teerlink C., Cannon-Albright L. Significant linkage evidence for a predisposition gene for pelvic floor disorders on chromosome 9q21 // *The American Journal of Human Genetics*. 2009; 84 (5): 678–682. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.04.002.
16. Zweers M., Dean W., van Kuppevelt T., Bristow J., Schalkwijk J. Elastic fiber abnormalities in hypermobility type Ehlers-Danlos syndrome patients with tenascin-X mutations // *Clinical Genetics*. 2005; 67 (4): 330–334. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2005.00401.x.
17. Анастасьева В.Г., Белан Ю.Б., Бржеский В.В., Викторова И.А., Верещагина Г.Н., Высокогорский В.Е.,

- ... Громова О.А. Наследственные нарушения соединительной ткани. Российские рекомендации // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2009; (3): 24.
- Anastas'eva V.G., Belan Yu.B., Brzheskiy V.V., Viktorova I.A., Vereshchagina G.N., Vysokogorskiy V.E., ... Gromova O.A. Nasledstvennye narusheniya soedinitel'noy tkani. Rossiyskie rekomendatsii // *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2009; (3): 24 (in Russian).
12. Демидов Р.О., Лапшина С.А., Якупова С.П., Мухина Р.Г. Дисплазия соединительной ткани: современные подходы к клинике, диагностике и лечению // *ПМ*. 2015; 4–2: 37–40.
- Demidov R.O., Lapshina S.A., Yakupova S.P., Mukhina R.G. Displaziya soedinitel'noy tkani: sovremennye podkhody k klinike, diagnostike i lecheniyu [Connective tissue dysplasia: current approaches to the clinic, diagnosis and treatment] // *PM*. 2015; 4–2: 37–40 (in Russian).
13. Дворниченко М.В., Сизикова А.Е., Дмитриева Л.А., Хмель А.А., Саприна Т.В., Хлусов И.А. Характеристика маркеров нормального и патологического ремоделирования костной ткани в крови детей и подростков // *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (3): 24–32. DOI: 10.20538/1682-0363-2016-3-24-32.
- Dvornichenko M.V., Sizikova A.E., Dmitrieva L.A., Khmel' A.A., Saprina T.V., Khlusov I.A. Kharakteristika markerov normal'nogo i patologicheskogo remodelirovaniya kostnoy tkani v krovi detey i podrostkov [Age-related features of peripheral blood markers in children and young adults with normal and pathological remodeling of bone tissue] // *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2016; 15 (3): 24–32 (in Russian). DOI: 10.20538/1682-0363-2016-3-24-32
14. World Medical Association (WMA). Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects // *Jahrbuch für Wissenschaft und Ethik*. 2009;14 (1). DOI: 10.1515/9783110208856.233.
15. Khlusov I.A., Ryazantseva N.V., Vengerovskii A.I., Nechaev K.A., Yakushina V.D., Dvornichenko M.V., Sharkeev Yu.P., Legostayeva E.V., Novitskii V.V. Modulating effect of matrices with calcium phosphate coating on cytotoxicity of strontium ranelate and ibandronic Acid in vitro // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014; 157 (2): 215–219. DOI: 10.1007/s10517-014-2528-7.
16. Sharkeev Y., Legostaeva E., Eroshenko Y., Khlusov I., Kashin O. The structure and physical and mechanical properties of a novel biocomposite material, nanostructured Titanium–Calcium-Phosphate Coating // *Composite Interfaces*. 2009; 16 (4–6): 535–546. DOI: 10.1163/156855409x447174.
17. Тиц Н. Клиническое руководство по лабораторным тестам. М.: Лабинформ, 2006: 960.
- Tits N. Klinicheskoe rukovodstvo po laboratornym testam // М.: Labinform Publ., 2006: 960 (in Russian).
18. Mukaka M.M. A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research // *Malawi Medical Journal*. 2012; 24: 69–71.
19. Мохан Р., Глессон М., Гринхafft П.Л. Биохимия мышечной деятельности и физической тренировки: пер. с англ. Киев: Олимпийская литература, 2001: 296.
- Mokhan R., Glesson M., Grinkhaff P.L. Biokhimiya myshechnoy deyatelnosti i fizicheskoy trenirovki: per. s angl. Kiev: Olimpiyskaya literatura Publ., 2001: 296 (in Russian).
20. Хлусов И.А., Нечаев К.А., Шевцова Н.М., Хлусова М.Ю., Дворниченко М.В., Зайцев К.В., Колокольцова Т.Д., Больбасов Е.Н., Шаркеев Ю.П., Легостаева Е.В., Сабурин И.Н. К вопросу о фибробластоподобных клетках в периферической крови человека // *Гены и клетки*. 2010; 5 (4): 72–78.
- Khlusov I.A., Nechaev K.A., Shevtsova N.M., Khlusova M.Yu., Dvornichenko M.V., Zaytsev K.V., Kolokol'tsova T.D., Bol'basov E.N., Sharkeev Yu.P., Legostaeva E.V., Saburina I. N. K voprosu o fibroblastopodobnykh kletkakh v perifericheskoy krovi cheloveka [As to a problem of fibroblast-like cells in human peripheral blood] // *Geny i kletki*. 2010; 5 (4): 72–78 (in Russian).
21. Хлусов И.А., Саприна Т.В., Нечаев К.А., Дворниченко М.В., Шевцова Н. М., Зайцев К.В., Попков А.В. Морфофункциональные особенности культуры мононуклеарных клеток крови у больных несовершенным остеогенезом: клинико-диагностическое наблюдение // *Бюллетень сибирской медицины*. 2010; 9 (6): 71–79.
- Khlusov I.A., Saprina T.V., Nechaev K.A., Dvornichenko M.V., Shevtsova N.M., Zaytsev K.V., Popkov A.V. Morfofunktsional'nye osobennosti kul'tury mononuklearnykh kletok krovi u bol'nykh nesovershennym osteogenezom: kliniko-diagnosticheskoe nablyudenie [Morphofunctional features of blood mononuclear cells culture in patients with osteogenesis imperfecta: clinicodiagnostic observation] // *Byul. sib. meditsiny*. 2010; 9 (6): 71–79 (in Russian).
22. Khlusov I., Khlusova M., Zaitsev K. et al. Pilot in vitro study of the parameters of artificial niche for osteogenic differentiation of human stromal stem cell pool // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011; 150 (4): 535–542. DOI: 10.1007/s10517-011-1184-4.
23. Хлусов И.А., Шевцова Н.М., Хлусова М.Ю., Зайцев К.В., Шаркеев Ю.П., Пичугин В.Ф., Легостаева Е.В. Концепция «ниша-рельеф» для стволовых клеток как основа биомиметического подхода к инженерии костной и кроветворной тканей // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2011; 6 (2): 55–64.
- Khlusov I.A., Shevtsova N.M., Khlusova M.Yu., Zaytsev K.V., Sharkeev Yu.P., Pichugin V.F., Legostaeva E.V. Kontseptsiya "nisha-rel'ef" dlya stvolovykh kletok kak osnova biomimeticheskogo podkhoda k inzhenerii kostnoy i krovotvornoy tkaney ["Niche – relief" conception for stem cells as a basis of biomimetic approach to bone and hemopoietic tissues engineering] // *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2011; 6 (2): 55–64 (in Russian).
24. Бозо И.Я., Деев Р.В., Пинаев Г.П. Фибробласт-специализированная клетка или функциональное

- состояние клеток мезенхимного происхождения // *Цитология*. 2010; 52 (2): 99–109.
25. Bozo I.Ya., Deev R.V., Pinaev G.P. Fibroblast–spetsializirovannaya kletka ili funktsional'noe sostoyanie kletok mezenkhimnogo proiskhozhdeniya [Is «fibroblast» a specialized cell or a functional condition of mesenchymal cells derivatives?] // *Tsitologiya*. 2010, 52 (2): 99–109 (in Russian).
26. Quan T., Cowper S., Wu S., Bockenstedt L., Bucala R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004; 36 (4): 598–606. DOI: 10.1016/j.biocel.2003.10.005.
27. Herzog E., Bucala R. Fibrocytes in health and disease // *Experimental Hematology*. 2010; 38 (7): 548–556. DOI: 10.1016/j.exphem.2010.03.004.
28. Kuznetsov S., Mankani M., Leet A., Ziran N., Gronthos S., Robey P. Circulating Connective Tissue Precursors: Extreme Rarity in Humans and Chondrogenic Potential in Guinea Pigs // *Stem Cells*. 2007; 25 (7): 1830–1839. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0140.
29. Metz C. Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing // *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2003; 60 (7): 1342–1350. DOI: 10.1007/s00018-003-2328-0.

Поступила в редакцию 18.05.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Дворниченко Марина Владимировна, канд. мед. наук, доцент, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск.

Сизикова Анастасия Евгеньевна, интерн, клиническая лаборатория диагностики, СибГМУ, г. Томск.

Саприна Татьяна Владимировна, д-р мед. наук, профессор кафедры эндокринологии и диабетологии, СибГМУ, г. Томск.

Пашкова Елена Николаевна, канд. мед. наук, гл. врач ОГАУЗ «Врачебно-физкультурный диспансер», г. Томск.

Щербинко Матвей Сергеевич, студент педиатрического факультета, СибГМУ, г. Томск.

Хлусов Игорь Альбертович, д-р мед. наук, профессор, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск; профессор-исследователь, Балтийский федеральный университет имени И. Канта, г. Калининград.

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, зав. кафедрой патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

✉ Дворниченко Марина Владимировна, e-mail: dochic@yandex.ru.

УДК 616-018.2-007.17:577.2

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-116–125

For citation: Dvornichenko M.V., Sizikova A.E., Saprina T.V., Pashkova E.N., Shcherbinko M.S., Khlusov I.A., Novitsky V.V. Cellular and molecular screening of connective tissue dysplasia in adolescent athletes (pilot study). *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 116–125.

Cellular and molecular screening of connective tissue dysplasia in adolescent athletes (pilot study)

Dvornichenko M.V.¹, Sizikova A.E.¹, Saprina T.V.¹, Pashkova E.N.², Shcherbinko M.S.¹, Khlusov I. A.^{1,3}, Novitsky V.V.¹

¹ Siberian State Medical University (SSMU)
2, Moskow Trakt, Tomsk, 634055, Russian Federation

² Medical Exercises Dispensar
5V, Lebedeva Str., Tomsk, 634029, Russian Federation

³ Immanuel Kant Baltic Federal University
14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236041, Russian Federation

ABSTRACT

The purpose of the study is to evaluate the cellular and molecular parameters of bone remodeling in the blood as potential markers of undifferentiated forms of connective tissue dysplasia

Materials and methods. The structural and functional status of cellular elements of in vitro culturing of mononuclear leukocytes of peripheral blood in adolescent athletes connected with phenotypic manifestations of undifferentiated connective tissue dysplasia (UCTD) were investigated. 25 pupils of sport schools from 10–14 years old (main disciplines: figure skating, gymnastics, athletics) were examined with the help of express analysis. The average age of the examined adolescents was $(12,0 \pm 1,7)$ years. Clinical examination of adolescents allowed ranking the UCTD signs on a scale of 4–11,5 points.

Results. A comparison of questionnaire survey results and an evaluation of bone remodeling distant markers allowed the revelation of 2 groups in the distribution of adolescent athletes: those with minimal signs of UCTD (scores lesser than 7 points – 10 pupils), and those with expressed UCTD phenotype (scores are equal or more than 7 points – 15 pupils). Significant statistical decrease in the content of collagen type I degradation products (CrossLaps) (by 80%) and ionized calcium (by 5%) has been determined in the peripheral blood of adolescent athletes with expressed UCTD phenotype. In conditions of short-term 72-h cultivation of mononuclear leukocytes in the presence of a 3D matrix imitating the properties of the mineral substance of the regenerating bone tissue, morphofunctional features of cellular reaction in adolescent athletes with clinical manifestations of UCTD, as well the heterogeneity of the cell population associated with the appearance of cells with an osteoblast-like phenotype in the blood have been revealed. The results of investigation propose the use of distant cellular and molecular parameters of bone remodeling to screen the mechanisms and dynamics of dysplastic disorders in adolescent athletes.

Key words: undifferentiated connective tissue dysplasia, adolescent athletes, osteocalcin, osteoblast-like cells, peripheral blood, mononuclear leukocytes.

Received May 18.2017
Accepted November 08.2017

Dvornichenko Marina V., PhD, Associate Professor, Department of Morphology and General Pathology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Sizikova Anastasiia E., Intern, Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Saprina Tatyana V., DM, Professor, Department of Endocrinology and Diabetology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Pashkova Elena N., PhD, Head of the Physician Medical Exercises Dispensary, Tomsk, Russian Federation.

Shcherbinko Matvey S., Student, Pediatric Faculty, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Khlusov Igor A., DM, Professor, Department of Morphology and General Pathology, SSMU, Tomsk, Russian Federation; Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

Novitsky Vyacheslav V., DM, Professor, Academician of RAS, Head of the Department Pathophysiology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Dvornichenko Marina V.**, e-mail: dochic@yandex.ru.

УДК 616.12-005.4-089.811

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-126–133

Для цитирования: Дмитриев Ю.В., Минасян С.М., Байрашева В.К., Демченко Е.А., Галагудза М.М. Прямое сравнение кардиопротективных свойств ингибиторов некроптоза на модели глобальной ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 126–133.

Прямое сравнение кардиопротективных свойств ингибиторов некроптоза на модели глобальной ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы

Дмитриев Ю.В., Минасян С.М., Байрашева В.К., Демченко Е.А., Галагудза М.М.

Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова
Россия, 197341, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – провести сравнительную оценку кардиопротективных эффектов различных ингибиторов некроптоза на модели глобальной ишемии-реперфузии изолированного перфузируемого сердца крысы.

Материал и методы. Исследование выполнено на 38 крысах стока Wistar массой 250–300 г. Исследовались кардиопротективные эффекты следующих ингибиторов некроптоза: некростатина-1 (Nec-1), некростатина-5 (Nec-5), некростатина-1s (Nec-1s), некросульфонида (NSA). Все исследуемые соединения вводились внутривентриально за 1 ч до начала эксперимента. В отдельных группах животным вводили растворитель для ингибиторов некроптоза диметилсульфоксид (ДМСО) и 0,9%-й раствор хлорида натрия (контроль). Через 1 ч после внутривентриальной инъекции у крыс извлекалось сердце, производилось канюлирование аорты и подключение сердца к модифицированному аппарату Лангендорфа. Путем прекращения ретроградной перфузии сердца оксигенированным раствором Кребса моделировалась нормотермическая 35-минутная глобальная ишемия, по окончании которой восстанавливалась ретроградная перфузия в течение 2 ч. До моделирования ишемии в полость левого желудочка вводился заполненный жидкостью баллон для регистрации внутрижелудочкового давления. Скорость коронарного потока определялась исходно и в период реперфузии по объему оттекающего от сердца перфузата. Объем некроза миокарда выражали в процентах от общего объема сердца после гистохимической окраски срезов сердец трифенилтетразолием хлоридом.

Результаты. Группы контроля и ДМСО не различались по объему некроза миокарда и функциональным параметрам работы сердца. По результатам проведенных экспериментов можно утверждать, что все ингибиторы некроптоза обладают инфаркт-лимитирующим эффектом, при этом статистически значимых различий показателей у животных, которым вводились различные ингибиторы некроптоза, не выявлено. Объем некроза миокарда в группе ДМСО составил $(50,5 \pm 7,82)\%$, в то время как в группе Nec-1 – $(29,9 \pm 3,42)\%$, в группе Nec-5 – $(27,7 \pm 3,42)\%$, в группе Nec-1s – $(30,6 \pm 3,82)\%$, в группе NSA – $(34,7 \pm 5,82)\%$ ($p < 0,01$ в сравнении с ДМСО для каждой из групп ингибиторов некроптоза). Выявлена способность двух ингибиторов некроптоза, а именно Nec-1s и NSA, улучшать функциональное состояние миокарда, что проявлялось в более высоком уровне пульсового давления ($p < 0,01$ по сравнению с контролем и ДМСО), скорости коронарного потока ($p < 0,05$ по сравнению с контролем и ДМСО), а

✉ Дмитриев Юрий Валерьевич, e-mail: yury.v.dmitriev@gmail.com.

также в более низком уровне диастолического внутрижелудочкового давления ($p < 0,01$ по сравнению с контролем и ДМСО) в ходе реперфузии.

Заключение. Результаты проведенного исследования демонстрируют наличие у всех изученных ингибиторов некроптоза инфаркт-лимитирующего эффекта одинаковой степени выраженности. Однако Nec-1s и NSA выделяет способность улучшать функциональное состояние миокарда в периоде реперфузии, что с учетом их низкой токсичности и более низкой EC50 позволяет рассматривать их в качестве перспективных соединений кардиопротективного действия для последующих доклинических и клинических исследований.

Ключевые слова: ишемия-реперфузия миокарда, кардиопротекция, некроптоз, некростатины.

ВВЕДЕНИЕ

По данным Американской ассоциации сердца, в Соединенных Штатах Америки более 15,5 млн человек в возрасте старше 20 лет имеют диагноз ишемической болезни сердца [1]. При этом ближайший и отдаленный прогноз у пациентов с наиболее грозной формой ишемической болезни сердца, а именно с инфарктом миокарда, прямо зависит от объема миокарда, сохранившего жизнеспособность после острой ишемии-реперфузии. Именно поэтому поиск фармакологических агентов, обладающих кардиопротективными свойствами, остается глобальным трендом в современной медицинской науке.

Одним из наиболее активно исследуемых методов кардиопротекции является воздействие на программируемую клеточную гибель (ПКГ). К настоящему времени наиболее изучены такие виды ПКГ, как апоптоз и аутофагия. Результаты модуляции данных видов клеточной гибели противоречивы. Так, например, в работе Т. Нолли и соавт. (1999) на сердце кролика после регионарной ишемии-реперфузии (ИРП) была показана способность панкаспазного ингибитора YVAD-cmk уменьшать апоптоз и некроз кардиомиоцитов [2]. Однако, согласно данным других авторов, селективное подавление этих видов клеточной гибели не приводит к улучшению морфофункционального состояния миокарда и, более того, активация данных видов клеточной гибели обладает протекторным значением при ИРП миокарда [3–5]. Более того, «проксимальная» блокада апоптоза и аутофагии может способствовать возникновению феномена «переключения», когда на фоне подавления апоптоза и аутофагии в геометрической прогрессии возрастает количество клеток, гибнущих путем некроза [6, 7].

Одним из наиболее активно исследуемых видов ПКГ является открытый в 2005 г. некроптоз, характеризующийся морфологическими призна-

ками некроза, но имеющий молекулярные мишени для таргетного ингибирования. В настоящее время значение некроптоза как фактора, способствующего ухудшению морфофункционального состояния органов и тканей, доказано при различных патологических процессах, в частности при ишемии головного мозга и ишемии-реперфузии миокарда [8, 10, 11].

Выявлено также значение активности некроптоза как фактора, определяющего функциональное состояние сердечного аллографта и выраженность реакции отторжения сердечного трансплантата после трансплантации донорского сердца [14]. К настоящему времени известно несколько ингибиторов некроптоза, которые показали способность подавлять некроптоз в опытах *in vitro* и *in vivo*. Однако прямого сравнения различных ингибиторов некроптоза на предмет их органопротективной активности до сих пор не проводилось.

Цель настоящего исследования – сравнительная оценка кардиопротективной активности таких ингибиторов некроптоза, как некростатин-1 (Nec-1), некростатин-5 (Nec-5), некростатин-1s (Nec-1s) и некросульфонамид (NSA), в условиях глобальной ишемии-реперфузии изолированного сердца.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 38 самцах крыс стока Wistar массой 250–300 г, наркотизированных хлоралгидратом в дозе 450 мг/кг. Животные были случайным образом разделены на шесть групп: 1) контроль (Кон, $n = 5$); 2) диметилсульфоксид (ДМСО, $n = 5$); 3) некростатин-1 (Nec-1, $n = 7$); 4) некростатин-5 (Nec-5, $n = 7$); 5) некростатин-1s (Nec-1s, $n = 5$); 6) некросульфонамид (NSA, $n = 8$). Всем животным за 1 ч до начала перфузии изолированного сердца внутривенно вводили 0,9%-й раствор хлорида натрия в

объеме 0,1 мл (контроль), ДМСО (группа ДМСО) либо ингибиторы некроптоза, растворенные в ДМСО (группы Nec-1, Nec-5, Nec-1s и NSA). Ингибиторы некроптоза вводились в дозе 1,65 мг/кг. После изъятия сердца из грудной полости его подключали к модифицированному аппарату Лангендорфа.

По окончании 10-минутного стабилизационного периода вызывали 35-минутную глобальную ишемию путем прекращения ретроградной перфузии сердца оксигенированным раствором Кребса – Хенселейта. По окончании периода ишемии возобновляли перфузию в течение 120 мин при температуре раствора 37 °С. Для оценки параметров внутрисердечной гемодинамики производилась непрерывная регистрация внутрижелудочкового давления (ВЖД) и измерение скорости коронарного потока (СКП). В стабилизационном периоде и во время реперфузии регистрировали конечно-диастолическое и пульсовое внутрижелудочковое давление (ДВЖД и ПВЖД соответственно). Регистрация ВЖД проводилась с помощью программно-аппаратного комплекса PhysExp (ООО «Кардиопротект», г. Санкт-Петербург). По окончании периода реперфузии сердца разрезали на пять равных по толщине поперечных срезов и в течение 15 мин окрашивали путем инкубации в 1%-м растворе трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) при 37 °С. Затем получали цифровые фотографии срезов. Объем некроза миокарда рассчитывали планиметрически по площади ТТХ-негативных зон при помощи программы Adobe Photoshop CS. Оценивали процентное отношение суммы площадей ТТХ-негативных зон к сумме общей площади сердца. Результаты представляли в виде «среднее ± среднеквадратическое отклонение». Значимость различий в объеме некроза миокарда оценивали с помощью *U*-критерия Манна – Уитни с использованием программы Statistica 10.0. Различия между группами по функциональным параметрам оценивали с помощью теста ANOVA с использованием критерия Тьюки в программе SPSS 24 (IBM Inc.). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контроле объем некроза миокарда составил ($57,2 \pm 6,6$)%, что достоверно не отличалось от объема некроза миокарда в группе ДМСО ($(50,5 \pm 7,8)\%$, $p > 0,05$). В группах Nec-1 и Nec-5 объем некроза миокарда составил ($29,9 \pm 3,4$)% и ($27,7 \pm 3,4$)% соответственно, что оказалось значи-

мо меньше, чем в группе ДМСО ($(50,5 \pm 7,8)\%$, $p < 0,01$). В группах Nec-1s и NSA объем некроза миокарда составил ($30,6 \pm 3,8$)% и ($34,7 \pm 5,8$)%, что было значительно меньше, чем в группе ДМСО ($p < 0,01$).

Значения объема некроза миокарда в экспериментальных группах представлены на рис. 1.

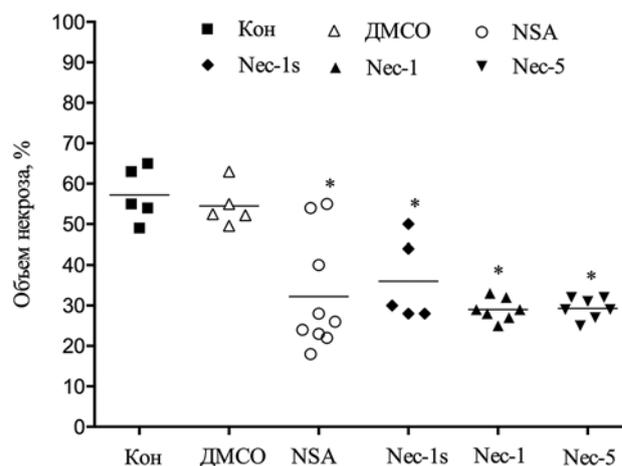


Рис. 1. Объем некроза миокарда в экспериментальных группах. * $p < 0,01$ по сравнению с Кон и ДМСО

Fig. 1. The size of myocardial necrosis in experimental groups. * $p < 0,01$ as compared with the control and dimethylsulphoxide (DMSO)

нами не обнаружено достоверных различий показателей в сравниваемых группах в динамике нарастания среднего ВЖД во время ишемии. Параметры внутрисердечной гемодинамики во время реперфузии миокарда в экспериментальных группах представлены на рис. 2–4. Интересные данные были получены при оценке влияния ингибиторов некроптоза на функциональное состояние миокарда в период ишемии-реперфузии. Так, несмотря на наличие инфаркт-лимитирующего эффекта Nec-1 и Nec-5, данные ингибиторы некроптоза оказались не способными оказать существенное влияние на внутрисердечную гемодинамику при ишемии-реперфузии миокарда. Так, показатели ПВЖД, ДВЖД и СКП не отличались между группами ингибиторов некроптоза и группами Кон и ДМСО ($p > 0,05$).

Противоположные данные были получены в группах Nec-1s и NSA, где при анализе динамики ПВЖД, ДВЖД и СКП в трех временных точках реперфузии выявлены значительно более высокие значения ПВЖД и СКП по сравнению с группами Кон и ДМСО ($p < 0,01$), и достоверно более низкие значения ДВЖД по сравнению с группами Кон и ДМСО ($p < 0,01$).

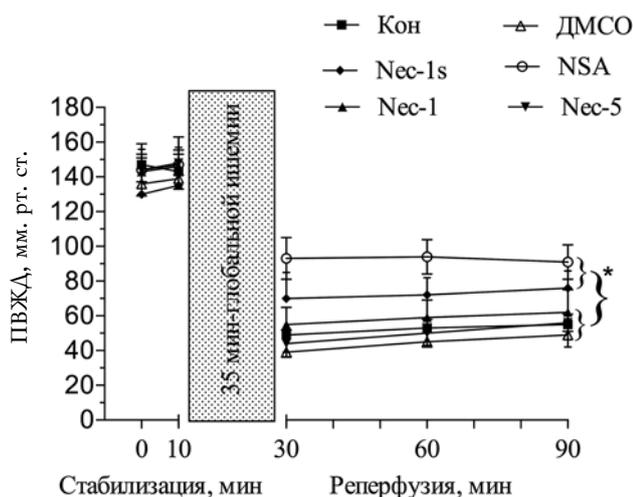


Рис. 2. Диастолическое внутрижелудочковое давление в стабилизационном периоде и во время реперфузии.

* $p < 0,01$ по сравнению с Кон и ДМСО

Fig. 2. Diastolic intraventricular pressure during the stabilization period and reperfusion.

* $p < 0,01$ as compared with the control and dimethylsulphoxide (DMSO)

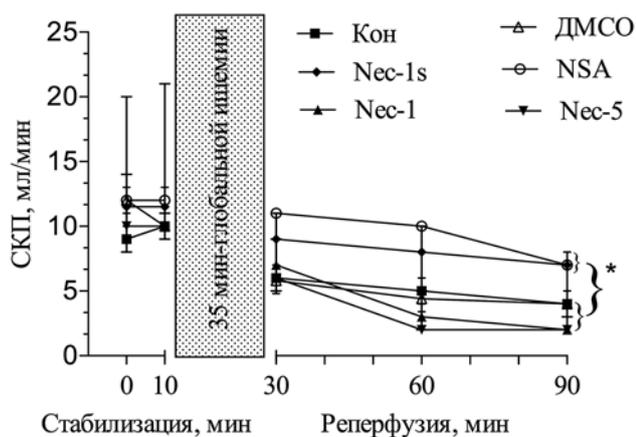


Рис. 4. Скорость коронарного потока в стабилизационном периоде и во время реперфузии.

* $p < 0,01$ по сравнению с Кон и ДМСО

Fig. 4. Coronary flow velocity during the stabilization period and reperfusion.

* $p < 0,01$ as compared with the control and dimethylsulphoxide (DMSO)

ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях острой ишемии миокарда жизненно необходимо раннее восстановление кровотока, которое ограничивает объем необратимого повреждения миокарда. Вместе с тем даже восстановление кровотока по инфаркт-ассоциированной артерии не всегда позволяет добиться значительного ограничения повреждения миокарда, поскольку само по себе может вызвать необратимое повреждение ткани, получившее на-

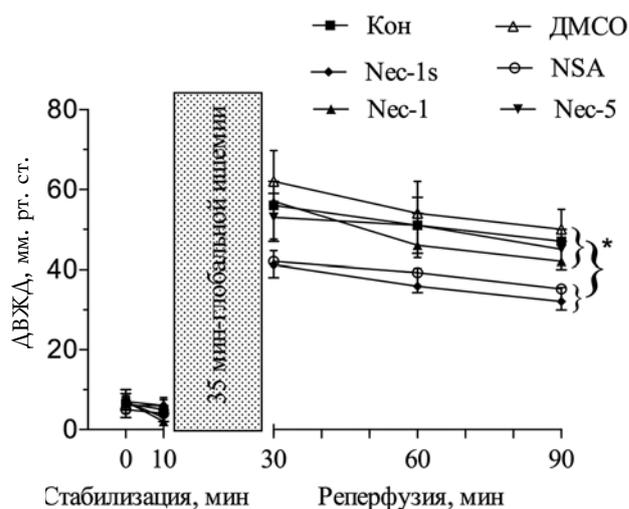


Рис. 3. Пульсовое внутрижелудочковое давление в стабилизационном периоде и во время реперфузии.

* $p < 0,01$ по сравнению с Кон и ДМСО

Fig. 3. Pulse intraventricular pressure in the stabilization period and reperfusion.

* $p < 0,01$ as compared with the control and dimethylsulphoxide (DMSO)

звание реперфузионного. В настоящее время активно изучается проблема предотвращения ишемического-реперфузионного повреждения (ИРП) миокарда с помощью модуляторов программируемой клеточной гибели.

Среди всех типов ПКГ наиболее изученным является апоптоз. Однако изолированное подавление апоптоза не сопровождается уменьшением ИРП миокарда. Известно, что при попытке изолированного подавления апоптоза или аутофагии в условиях ишемии-реперфузии миокарда происходит «переключение» апоптоза или аутофагии на наиболее неблагоприятный вид клеточной гибели – некроз [3].

Начало исследования некроптоза положено в 2005 г., когда сотрудниками Гарвардской медицинской школы на культуре клеток Jurkat при действии индуктора апоптоза – фактора некроза опухоли альфа и панкаспазного ингибитора апоптоза ZVAD.fmk – был выявлен процесс клеточной гибели, морфологически не отличимый от некроза, характеризующийся активацией аутофагии, но в отличие от некроза, имеющий молекулярные мишени для ингибирования. Авторы данного исследования назвали этот вид клеточной гибели некроптозом и в результате скрининга нескольких тысяч химических соединений выявили несколько из них, способных ее предотвращать. Эти химические соединения получили название некростатинов. Тогда же на модели фокальной ишемии головного мозга у мышей была проде-

монстрирована способность Nec-1 оказывать инфаркт-лимитирующий эффект [8]. Был выявлен один из механизмов действия некростатинов — специфическое ингибирование киназы RIP1 [9].

В последующие годы рядом авторов, в том числе и нашей группой, исследовалось влияние ингибиторов некроптоза при ишемии-реперфузии миокарда и на модели постинфарктной сердечной недостаточности. Так, С. Smith и соавт. (2007) на модели изолированного сердца по Лангендорфу были опубликованы первые результаты применения Nec-1 в качестве кардиопротектора, которые продемонстрировали способность Nec-1 уменьшать объем некроза миокарда [10]. В дальнейшем М. Oerlemans и соавт. (2012) на модели регионарной ишемии-реперфузии миокарда у мышей *in vivo* показали уменьшение объема некроза миокарда и подавление активности киназ RIP1 и RIP3 при действии Nec-1 [11].

В 2013 г. нашей группой были выявлены инфаркт-лимитирующие свойства Nec-5, а также наличие положительного инотропного эффекта у Nec-1 [12]. Кроме того, нами на модели постинфарктной хронической сердечной недостаточности у крыс была выявлена способность Nec-7 уменьшать объем рубцовой ткани через 21 день после перманентной коронарной окклюзии у крыс, а также предотвращать патологическое постинфарктное ремоделирование миокарда и улучшать его функциональное состояние. Последнее подтверждалось более низким уровнем предшественника мозгового натрийуретического пептида в плазме крови крыс в группе Nec-7 [13].

В последние годы появился ряд публикаций, касающихся значения некроптоза в развитии реакции отторжения сердечного трансплантата. Так, А. Pavlovsky и соавт. (2014) на нокаутных по медиаторам некроптоза RIP1 и RIP3 мышцах продемонстрировали лучшую выживаемость сердечного трансплантата и меньшую лимфоцитарную инфильтрацию ткани миокарда по сравнению с контрольной группой [14]. Нами на модели длительной холодовой консервации донорского сердца крысы обнаружено усиление кардиопротективных эффектов консервирующего раствора «Кустодиол» при добавлении в него Nec-1 [15].

По нашему представлению, «идеальный» ингибитор некроптоза, который может иметь перспективы использования в практике, должен удовлетворять, по крайней мере, двум критериям, а именно: высокая эффективность и низкая токсичность. Именно этим критериям соответствуют два ингибитора некроптоза: Nec-1s и NSA. Первый из них обладает меньшей, чем у

Nec-1, ЕС 50 и низкой токсичностью, а второй осуществляет «дистальную» блокаду некроптоза на уровне спирального белка mixed lineage kinase domain-like (MLKL), которая фосфорилируется с участием киназы RIP3, является компонентом некрсомного комплекса и запускает финальную стадию некроптоза [16, 17]. Активация MLKL приводит к встраиванию некрсомного комплекса в клеточную мембрану, повышению ее проницаемости и к гибели клетки [18]. Эффективность подавления некроптоза на уровне MLKL для предотвращения повреждения клеток уже показана в исследовании J. Wu и соавт. (2013) на модели экспериментального панкреатита, вызванного введением церулетида, а также в работе Y. Qu и соавт. (2016) [19, 20]. Исследовательской группой L. Sun и соавт. (2012) на клеточной линии HeLa была выявлена эффективность NSA в подавлении некроптоза посредством блокады MLKL [21].

В настоящем исследовании показано, что такие ингибиторы некроптоза, как некростатин-1, некростатин-5, некростатин-1s и некросульфонамид оказывают инфаркт-лимитирующий эффект в условиях глобальной ишемии-реперфузии миокарда. Степень выраженности инфаркт-лимитирующего действия указанных ингибиторов некроптоза одинакова. Помимо уменьшения объема ишемического некроза, некростатин-1s и некросульфонамид способствуют улучшению функции левого желудочка в постишемическом периоде.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 17-04-02061 «МикроРНК-223-5p и -3p – зависимые механизмы некроптоза в миокарде сердечного аллогraftа при трансплантации донорского сердца».

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Все эксперименты одобрены комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России (протокол № 2016/012 от 14.09.2016).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Writing Group Members, Mozaffarian D., Benjamin E., Go A., Arnett D., Blaha M., Cushman M., Das S., de Ferranti S., Després J., Fullerton H., Howard V., Huffman M., Isasi C., Jiménez M., Judd S., Kissela B., Lichtman J., Lisabeth L., Liu S., Mackey R., Magid D., McGuire D., Mohler E., Moy C., Muntner P., Mussolino M., Nasir K., Neumar R., Nichol G., Palaniappan L., Pandey D., Reeves M., Rodriguez C., Rosamond W., Sorlie P., Stein J., Towfighi A., Turan T., Virani S., Woo D., Yeh R., Turner M. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2016 Update: A Report From the American Heart Association // *Circulation*. 2016; 133: 447–454. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000366
2. Holly T., Drincic A., Byun Y., Nakamura S., Harris K., Klocke F., Cryns V. Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion *in vivo* // *J. Mol. Cell Cardiol*. 1999; 31 (9): 1709–1715. DOI: 10.1006/jmcc.1999.1006.
3. Zhang Y., Kohler K., Xu J., Lu D., Braun T., Schlitt A., Buerke M., Müller-Werdan U., Werdan K., Ebelt H. Inhibition of p53 after acute myocardial infarction: Reduction of apoptosis is counteracted by disturbed scar formation and cardiac rupture // *J. Mol. Cell Cardiol*. 2011; 50 (3): 471–478. DOI: 10.1016/j.jmcc.2010.11.006
4. Buss S., Muenz S., Riffel J., Malekar P., Hagenmueller M., Weiss C., Bea F., Bekeredian R., Schinke-Braun M., Izumo S., Katus H., Hardt S. Beneficial effects of mammalian target of rapamycin inhibition on left ventricular remodeling after myocardial infarction // *J. Am. Coll Cardiol*. 2009; 54 (25): 2435–2446. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.08.031.
5. Wei C., Li H., Han L., Zhang L., Yang X. Activation of autophagy in ischemic postconditioning contributes to cardioprotective effects against ischemia/reperfusion injury in rat hearts // *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 2013; 61 (5): 416–422. DOI: 10.1097/FJC.0b013e318287d501.
6. Nikolettou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1833: 3448–3459. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.001.
7. Nicotera P., Melino G. Regulation of the apoptosis–necrosis switch // *Oncogene*. 2004; 23: 2757–2765. DOI: 10.1038/sj.onc.1207559.
8. Degtarev A., Huang Z., Boyce M., Li Y., Jagtap P., Mizushima N., Cuny G.D., Mitchison T.J., Moskowitz M.A., Yuan J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential in ischemic brain injury // *Nat. Chem. Biol*. 2005; 1 (2): 116–119. DOI: 10.1038/nchembio711.
9. Degtarev A., Hitomi J., Germscheid M., Ch'en I., Korkina O., Teng X., Abbott D., Cuny G., Yuan C., Wagner G., Hedrick S., Gerber S., Lugovskoy A., Yuan J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins // *Nat. Chem. Biol*. 2008; 4 (5): 313–321. DOI: 10.1038/nchembio.83.
10. Smith C., Davidson S., Lim S., Simpkin J., Hothersall J., Yellon D. Necrostatin: A Potentially Novel Cardioprotective Agent? // *Cardiovasc Drugs Ther*. 2007; 21: 227–233. DOI: 10.1007/s10557-007-6035-1.
11. Oerlemans M., Liu J., Arslan F., den Ouden K., van Middelaar B., Doevendans P., Sluijter J. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia–reperfusion *in vivo* // *Basic Res. Cardiol*. 2012; 107: 270. DOI: 10.1007/s00395-012-0270-8.
12. Dmitriev Y., Minasian S., Demchenko E., Galagudza M. Necrostatin-5 limits infarct size in isolated rat heart // *European Heart Journal*. 2013; 34(suppl_1): P55538. DOI: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh310.P5538>.
13. Dmitriev Y., Minasian S., Dracheva A., Karpov A., Chefu S., Demchenko E., Galagudza M. Necrostatin 7 Limits Myocardial Infarct Size and Reduces Cardiac Remodeling After Permanent Coronary Occlusion in Rats // *Circulation*. 2014; 130: A17348.
14. Pavlovsky A., Lian D., Huang X., Yin Z., Haig A., Jevnikar A., Zhang Z. RIPK3-Mediated Necroptosis Regulates Cardiac Allograft Rejection // *American Journal of Transplantation*. 2014; 14: 1778–1790. DOI: 10.1111/ajt.12779.
15. Dmitriev Y., Minasyan S., Vasina L., Demchenko E., Galagudza M. Effects of Inhibitors of Necroptosis and Autophagy on Morphofunctional Characteristics of the Myocardium during Static Cold Storage of Donor Rat Heart // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015; 159 (6): 792–795. DOI: 10.1007/s10517-015-3078-3.
16. Zhao J., Jitkaewa S., Caia Z., Choksi S., Li Q., Luo J., Liu Z. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis // *PNAS*. 2012; 109 (14): 5322–5327. DOI: 10.1073/pnas.1200012109.
17. Linkermann A., Green A. Necroptosis // *N. Engl. J. Med*. 2014; 370: 455–465. DOI: 10.1056/NEJMra1310050.
18. Shin Y., Kim J., Yang Y. Switch for the necroptotic permeation pore // *Structure*. 2014; 22 (10): 1374–1376. DOI: 10.1016/j.str.2014.09.002.
19. Wu J., Huang Z., Ren J., Zhang Z., He P., Li Y., Ma J., Chen W., Zhang Y., Zhou X., Yang Z., Wu S.Q., Chen L., Han J. Mlkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mlkl in necroptosis // *Cell Res*. 2013; 23: 994–1006. DOI: 10.1038/cr.2013.91.
20. Qu Y., Shi J., Tang Y., Zhao F., Li S., Meng J., Tang J., Lin X., Peng X., Mu D. MLKL inhibition attenuates hypoxia-ischemia induced neuronal damage in developing brain // *Experimental Neurology Volume*. 2016; 279: 223–231. DOI: 10.1016/j.expneur.
21. Sun L., Wang H., Wang Z., He S., Chen S., Liao D., Wang L., Yan J., Liu W., Lei X., Wang X. Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein Mediates Necrosis Signaling Downstream of RIP3 Kinase // *Cell*. 2012; 148: 213–227. DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.031.

Поступила в редакцию 05.07.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Дмитриев Юрий Валерьевич, мл. науч. сотрудник, Институт экспериментальной медицины, Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

Минасян Саркис Минасович, ст. науч. сотрудник, Институт экспериментальной медицины, Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

Байрашева Валентина Кузьминична, науч. сотрудник, Институт экспериментальной медицины, Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

Демченко Елена Алексеевна, зав. научно-исследовательской лабораторией реабилитации, Институт сердца и сосудов, Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

Галагудза Михаил Михайлович, директор Института экспериментальной медицины, Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

(✉) Дмитриев Юрий Валерьевич, e-mail: yury.v.dmitriev@gmail.com.

УДК 616.12-005.4-089.811

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-126–133

For citation: Dmitriev Yu.V., Minasian S.M., Bayrasheva V.K., Demchenko E.A., Galagudza M.M. Direct comparison of cardioprotective effects of necroptosis inhibitors against global ischemia-reperfusion in the isolated rat heart. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 126–133.

Direct comparison of cardioprotective effects of necroptosis inhibitors against global ischemia-reperfusion in the isolated rat heart

Dmitriev Yu.V., Minasian S.M., Bayrasheva V.K., Demchenko E.A., Galagudza M.M.

Federal Almazov North-West Medical Research Centre
2, Str. Accuratova, St.-Petersburg, 197341, Russian Federation

ABSTRACT

The study was aimed at comparative assessment of cardioprotective properties of various necroptosis inhibitors in the isolated perfused rat heart subjected to global ischemia-reperfusion.

Materials and Methods. The study was performed on 38 male Wistar rats weighting 250–300 g. The following necroptosis inhibitors were tested: necrostatin-1 (Nec-1), necrostatin-5 (Nec-5), necrostatin-1s (Nec-1s), and necrosulfonamide (NSA). All tested substances were administered intraperitoneally (i.p.) 1 hour prior to heart perfusion. Control animals were treated either with the vehicle (dimethyl sulfoxide, DMSO) or with 0,9% sodium chloride solution (Controls). The dose of necroptosis inhibitors was calculated on the basis of effective concentration (EC50) data. One hour after i.p. injection, the animals were anesthetized, the hearts were rapidly excised, the aorta was cannulated and retrogradely perfused according to Langendorff. After stabilization, the perfusion was stopped for 35 minutes, which was followed by 2 hours of reperfusion. Prior to stabilization, fluid-filled polyethylene balloon was placed into the left ventricle for left ventricular pressure registration. Coronary flow was measured at baseline and during reperfusion by means of perfusate collection. The volume of necrotic myocardium was expressed as a percentage of triphenyltetrazolium chloride-negative tissue relative to the entire heart volume.

Results. The volume of myocardial necrosis and functional heart parameters were not different between Controls and DMSO group. All tested necroptosis inhibitors demonstrated infarct-limiting effect. However, there were no differences between the groups. The volume of necrotic myocardium was $(50,5 \pm 7,82)\%$, $(29,9 \pm 3,42)\%$, $(27,7 \pm 3,42)\%$, $(30,6 \pm 3,82)\%$, and $(34,7 \pm 5,82)\%$ in DMSO, Nec-1, Nec-5, Nec-1s, and NSA groups, respectively ($p < 0,01$ vs. DMSO group).

Nec-1s and NSA were shown to improve functional recovery of the heart after ischemia. In particular, left ventricular developed pressure and coronary flow rate were higher in Nec-1s and NSA groups ($p < 0,01$).

compared with Controls and DMSO), while end-diastolic pressure was lower in Nec-1s and NSA groups vs. Controls and DMSO ($p < 0,01$).

Conclusions. It has been shown that Nec-1, Nec-5, Nec-1s, and NSA administration prior to global ischemia-reperfusion results in comparable infarct size limitation. In addition to infarct size limitation, Nec-1s and NSA are able to improve postischemic left ventricular function. This fact, along with low toxicity and optimal EC50, makes Nec-1s and NSA perspective candidates for preclinical and clinical development as cardioprotective agents.

Key words: heart, ischemia-reperfusion injury, cardioprotection, necroptosis, necrostatins.

Received July 05.2017
Accepted November 08.2017

Dmitriev Yury V., Junior Researcher, Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St.-Petersburg, Russian Federation.

Minasian Sarkis M., Senior Researcher, Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St.-Petersburg, Russian Federation.

Bayrasheva Valentina K., Researcher, Institute of Endocrinology, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St.-Petersburg, Russian Federation.

Demchenko Elena A., Head of the Rehabilitation Laboratory, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St.-Petersburg, Russian Federation.

Galagudza Mikhail M., Director of the Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St.-Petersburg, Russian Federation.

(✉) **Dmitriev Yury V.**, e-mail: yury.v.dmitriev@gmail.com.

УДК 616.379-008.646:577.121.7

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-134-143

Для цитирования: Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Литвяков Н.В., Перекуча Н.А., Носарева О.Л., Фёдорова Т.С., Новицкий В.В. Окислительный стресс в патогенезе сахарного диабета 1 типа: роль ксантиноксидазы адипоцитов. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 134–143.

Окислительный стресс в патогенезе сахарного диабета 1 типа: роль ксантиноксидазы адипоцитов

Иванов В.В.¹, Шахристова Е.В.¹, Степовая Е.А.¹, Литвяков Н.В.²,
Перекуча Н.А.¹, Носарева О.Л.¹, Фёдорова Т.С.¹, Новицкий В.В.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский
медицинский центр (ТНИМЦ) Российской академии наук (РАН)
Россия, 634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Согласно современным представлениям о механизмах возникновения сахарного диабета 1 и 2 типов и развития их осложнений, важную роль играет окислительный стресс. Источниками активных форм кислорода при сахарном диабете являются реакции гликозилирования белков, дыхательная цепь митохондрий, мембраносвязанная НАДФН-оксидаза и другие ферменты. Важным ферментативным источником супероксид-анион радикала и H_2O_2 является ксантиноксидоредуктаза, которая в физиологических условиях находится преимущественно в ксантиндегидрогеназной форме и может обратимо или необратимо переходить в ксантиноксидазу, в результате окислительной модификации с образованием дисульфидных связей в молекуле белка. У грызунов ксантиноксидоредуктаза в жировой ткани экспрессируется с более высокой скоростью по сравнению с другими тканями.

Цель исследования – установить роль ксантиноксидазы в развитии окислительного стресса в адипоцитах крыс при экспериментальном сахарном диабете 1 типа.

Материал и методы. Материалом для исследования служили самцы крыс Wistar, у которых моделировали экспериментальный сахарный диабет с применением двух разных диабетогенов аллоксана и стрептозотоцина. Иммунорадиометрическим методом в сыворотке крови контрольных крыс и животных с экспериментальным диабетом определяли содержание инсулина, ферментативными методами – уровень глюкозы и мочевой кислоты, методом FOX-2 – содержание первичных продуктов перекисного окисления липидов (гидроперекисей липидов), флуоресцентным методом – ксантиноксидазную активность в изолированных адипоцитах эпидидимальной жировой ткани и экспрессию мРНК ксантиндегидрогеназы.

Результаты. У крыс с экспериментальным диабетом развивался индуцированный гипергликемией окислительный стресс. Повышение содержания гидроперекисей липидов в адипоцитах наблюдалось при увеличении активности ксантиноксидазы. Повышение активности ферментов в условиях окислительного стресса в адипоцитах крыс с экспериментальным сахарным диабетом сопровождалось повышением вклада ксантиноксидазной активности в общую ксантиндегидрогеназную, что отражалось в увеличении отношения активности ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы. Окислительный стресс в адипоцитах при экспериментальном сахарном диабете 1 типа вызывает окислительную посттрансляционную модификацию фермента и переход ксантиндегидрогеназной формы в ксантиноксидазную, что приводит

✉ Носарева Ольга Леонидовна, e-mail: olnosareva@yandex.ru.

к дальнейшему увеличению продукции активных форм кислорода. Ингибитор ксантиноксидазы снижает содержание гидроперекисей липидов в адипоцитах крыс. Таким образом, ксантиноксидаза может быть потенциальной мишенью для защиты от развития окислительного стресса в жировой ткани крыс при сахарном диабете 1 типа.

Выводы. Окислительный стресс в жировой ткани крыс при аллоксановом и стрептозотоциновом диабете обусловлен в определенной мере повышением экспрессии мРНК гена ксантиндегидрогеназы и постраницсионной окислительной модификацией ксантиндегидрогеназной активности в ксантиноксидазную. Ингибитор ксантиноксидазы аллопуринол снижает индуцированный аллоксаном повышенный уровень гидроперекисей липидов в сыворотке крови в изолированных адипоцитах крыс, что свидетельствует о важной роли ксантиноксидазы в развитии окислительного стресса в адипоцитах при экспериментальном сахарном диабете 1 типа.

Ключевые слова: экспериментальный сахарный диабет, аллоксан, стрептозотцин, ксантиноксидаза, адипоциты, гидроперекиси липидов, окислительный стресс.

ВВЕДЕНИЕ

Активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в патогенезе сахарного диабета (СД) на стадии его возникновения (деструкция В-клеток островков Лангерганса поджелудочной железы) и в период развития осложнений [1–3]. Источниками АФК при СД являются реакции гликозилирования белков, дыхательная цепь митохондрий, мембраносвязанная НАДФН-оксидаза и другие ферменты [4]. Важным ферментативным источником супероксид-анион (O_2^-) радикала и H_2O_2 в клетках является ксантиноксидоредуктаза, которая в физиологических условиях находится преимущественно в ксантиндегидрогеназной форме и может обратимо или необратимо переходить в ксантиноксидазу, в результате образования дисульфидных связей цистеиновых остатков Cys535 и Cys992 [5]. Ксантиноксидазная реакция способствует образованию высокорекреационного ОН-радикала, который возникает в результате дальнейшего восстановления H_2O_2 и является мощным индуктором перекисного окисления липидов (ПОЛ) [2]. Основная физиологическая функция фермента – участие в катаболизме пуринов, при этом ксантиндегидрогеназная форма в качестве акцептора электронов использует главным образом НАД⁺, оксидазная же – молекулярный кислород. В то же время ксантиноксидоредуктаза – единственный метаболический источник мочевой кислоты, важного антиоксиданта внеклеточных жидкостей, и повышение ее активности в условиях окислительного стресса может играть двойственную роль [6]. У грызунов ксантиноксидоредуктаза в адипоцитах экспрессируется с более высокой скоростью по сравнению с другими тканями и ее ксантиноксидазная активность может

вносить существенный вклад в развитие окислительного стресса в жировой ткани при ожирении [7]. Ранее нами было показано, что в адипоцитах эпидидимальной жировой ткани крыс с аллоксановым диабетом увеличено содержание продуктов липидной перекисидации и окислительной модификации белков и снижен редокс-потенциал системы глутатиона [1, 8].

Цель исследования – установить роль ксантиноксидазы в развитии окислительного стресса в адипоцитах крыс при экспериментальном сахарном диабете 1 типа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на 32 аутобредных самцах крыс Wistar массой (310 ± 50) г, полученных из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиЗМ им. Е.Д. Гольдберга (г. Томск). Животных содержали в стандартных условиях вивария на обычном рационе кормления, при свободном доступе к воде и пище. Исследования проводились с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

Методом случайной выборки животные были распределены на три группы: восемь крыс составили группу контроля, у восьми крыс диабет вызывали инъекцией стрептозотоцина (65 мг/кг, внутривнутрибрюшинно) и у 16 крыс диабет индуцировали четырехкратной инъекцией аллоксана (90 мг/кг, внутривнутрибрюшинно). Для выявления роли ксантиноксидазы в развитии окислительного стресса при экспериментальном СД 1 типа исследовали влияние ингибитора ксантиноксидазы аллопуринола на содержание гидроперекисей липидов, активность ксантиноксидазы и экспрессию

мРНК ксантиндегидрогеназы в адипоцитах изолированных из эпидидимальной жировой ткани. Аллопуринол вводили дважды внутрибрюшинно восьми крысам с аллоксановым диабетом на 12-й день после последней инъекции диabetогена по предложенной схеме [9]. Препарат вводили за 6 и 30 ч до декапитации.

Через 2 нед после введения диabetогенов у животных из хвостовой вены забирали 10 мкл цельной крови, в которой с помощью системы контроля определяли уровень кетонов в крови (Великобритания). Затем крыс усыпляли CO_2 -асфиксией, получали сыворотку крови и эпидидимальную жировую ткань, из которой выделяли адипоциты с использованием коллагеназы (Sigma Aldrich, США) по методу M. Rodbell [10]. Жизнеспособность выделенных клеток оценивали с трипановым синим (Serva, США), при этом доля живых клеток составляла не менее 95%.

В сыворотке крови контрольных крыс и животных с экспериментальным диабетом определяли содержание инсулина иммунорадиометрическим методом при помощи наборов Insulin (e) IRMA KIT (Immunotech, Чехия), глюкозы и мочевой кислоты с помощью ферментативных наборов фирмы Chronolab (Испания). В сыворотке крови и изолированных адипоцитах измеряли содержание первичных продуктов ПОЛ – гидроперекисей липидов, которые определяли методом FOX-2 [11] и ксантиндегидрогеназную и ксантиноксидазную активность [12]. Для этого адипоциты гомогенизировали в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 0,1 мМ ЭДТА и 10 мМ дитиотриетол, чтобы предотвратить окисление сульфгидрильных групп фермента при выделении. Гомогенат центрифугировали при 4 °С (20000 g, 20 мин), и в надосадке определяли ксантиноксидазную активность с использованием субстрата птерина (Sigma Aldrich, США) по интенсивности флуоресценции продукта реакции – изоксантоптерина [12]. Ксантиндегидрогеназную активность измеряли при добавлении 40 мкМ метиленового синего. Интенсивность флуоресценции измеряли на планшетном спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent, США). Активность фермента выражали в нМ/мин/мг белка. Концентрацию белка в гомогенатах определяли по методу Бредфорда [13].

В изолированных адипоцитах проводили анализ экспрессии гена ксантиндегидрогеназы (Xdh) методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в режиме реального времени на амплификаторе LightCycler®480 (Roche, Швейцария) по технологии TaqMan. Методом фенол-хлороформной экс-

тракции из жировых клеток выделяли мРНК с использованием реагента TRIzol® (Invitrogen, США). По матрице мРНК получали комплементарную ДНК (кДНК) в реакции обратной транскрипции с помощью набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва). Для ПЦР использовали набор Sibenzyme (Россия). Режим амплификации включал: предварительную денатурацию – один цикл 95 °С 5 мин, денатурацию – один цикл 94 °С 15 с, отжиг при 60 °С – 10 с и элонгацию при 70 °С – 30 с. Общее количество циклов – 45. Праймеры и зонды (FAM-BHQ1) подбирали с использованием программы VectorNTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>). Для гена Xdh: прямой праймер 5'-САСТААСАССГТССССААС-3', обратный праймер 5'-GGTTCCAGCCTTTTCAGTATG-3' и зонд FAM-5'-СТСТGCCAGTGCTGACСТСААТG-3'-BHQ1. Экспрессию гена выражали в условных единицах по отношению к экспрессии гена-рефери Actb (beta-actin); последовательность прямого праймера 5'-GAAAAGATGACCCAGATCATGT-3', обратного праймера 5'-GGGACAACACAGCCTGGAT-3' и зонда FAM-5'-AGACСТТСААССССAGCCAT-3'-BHQ1. Относительная экспрессия гена Xdh была оценена с помощью метода $\Delta\Delta\text{Ct}$ [14].

При оценке полученных данных использовали методы статистического описания и проверки статистических гипотез с использованием программы SPSS 11.0 for Windows. Проверка на соответствие выборки нормальному закону распределения проводилась критерием Шапиро – Уилка. В связи с отсутствием согласия данных с нормальным распределением на уровне значимости $p < 0,05$ вычисляли средневыборочные характеристики: медиану Me , первый и третий квартили ($Q1-Q3$). Достоверность различий выборок оценивали с помощью непараметрических критериев Манна – Уитни и Краскела – Уоллиса для малых групп. Различия считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$. Межгрупповой анализ проводили с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в мире широко применяются экспериментальные модели сахарного диабета, индуцированного аллоксаном или стрептозотоцином [15]. Следует отметить, что обе модели имеют как преимущества, так и недостатки, поскольку диabetогены оказывают токсическое действие не только на В-клетки поджелудочной железы, но и другие органы и ткани.

В механизме диабетогенного действия аллоксана более выражено прооксидантное действие, поскольку он окисляется в диалуровую кислоту с последующей генерацией супероксидного анион-радикала и гидроксильного радикала, который вызывает повреждение ДНК В-клеток и их гибель [15]. Стрептозотоцин, являясь алкилирующим агентом, также повреждает ДНК В-клеток, но в отличие от аллоксанового диабета при моделировании СД 1 типа стрептозотоцином наряду с гипергликемией, гипоинсулинемией и некрозом наблюдается инфильтрация панкреатических островков лимфоцитами [16]. Поэтому для установления роли ксантиноксидазы адипоцитов в патогенезе сахарного диабета 1 типа использованы обе модели экспериментального сахарного диабета.

В результате экспериментов установлено, что через 2 нед после инъекций аллоксана и

стрептозотоцина уровень глюкозы в крови крыс составлял 21,2 (16,9–22,6) мМ/л и 30,3 (25,9–32,7) мМ/л соответственно (в контроле – 5,2 (5,0–5,7) мМ/л), что свидетельствует о развитии стойкой гипергликемии, характеризующей СД (табл. 1). Гипергликемия у опытных животных обусловлена выраженной гипоинсулинемией вследствие гибели В-клеток под действием диабетогенов. Содержание инсулина в плазме крови крыс снижалось в 2,9 ($p < 0,001$) и 3,4 раза ($p < 0,001$) соответственно при введении аллоксана и стрептозотоцина (см. табл. 1). При этом в крови экспериментальных животных увеличивалось содержание кетоновых тел, что является характерной особенностью сахарного диабета 1 типа. Таким образом, через 2 нед после введения диабетогенов у экспериментальных животных наблюдались основные симптомы СД 1 типа: гипоинсулинемия, гипергликемия и кетонемия.

Т а б л и ц а 1

Показатель	Группа животных		
	1. Контроль, <i>n</i> = 8	2. Аллоксан, <i>n</i> = 8	3. Стрептозотоцин, <i>n</i> = 8
Глюкоза, мМ/л	5,2 (5,0–5,7)	21,2 (16,9–22,6) $p_{2-1} < 0,001$	30,3 (25,9–32,7) $p_{3-1} < 0,001$
Инсулин, мкЕд/мл	26,2 (24,0–27,8)	9,2 (8,3–10,1) $p_{2-1} < 0,001$	7,6 (6,7–8,8) $p_{3-1} < 0,001$
Кетоновые тела, мМ/л	0,65 (0,6–0,8)	1,5 (1,3–1,8) $p_{2-1} = 0,002$	1,7 (1,5–2,1) $p_{3-1} = 0,002$
Гидроперекиси липидов, мкМ	5,9 (5,0–7,1)	18,1 (14,5–20,3) $p_{2-1} < 0,001$	21,6 (19,2–23,1) $p_{3-1} < 0,001$
Мочевая кислота, мМ/л	74,6 (55,3–88,4)	94,6 (89,9–98,9) $p_{2-1} = 0,046$	110,4 (95,4–139,1) $p_{3-1} = 0,002$
Ксантиноксидаза, нМ/мин/мл	1,54 (1,45–1,62)	2,50 (2,31–2,81) $p_{2-1} < 0,001$	3,64 (3,46–3,96) $p_{3-1} < 0,001$
Ксантиндегидрогеназа, нМ/мин/мл	2,45 (2,13–2,87)	3,62 (3,29–3,94) $p_{2-1} < 0,001$	4,82 (4,13–5,05) $p_{3-1} < 0,001$
Ксантиноксидаза/ксантиндегидрогеназа	0,63	0,69	0,75

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2: *n* – количество животных в группе; *p* – уровень значимости различий, рассчитанный относительно контрольных величин.

У крыс с экспериментальным диабетом развивался индуцированный гипергликемией окислительный стресс, о чем свидетельствует увеличение содержания в сыворотке крови гидроперекисей липидов, определенных методом FOX-2 – при аллоксановом диабете в 3,1 раза ($p < 0,001$) и при стрептозотоциновом в 3,7 раза ($p < 0,001$) (см. табл. 1). Повышенное содержание маркёров окислительного стресса в крови больных СД 1 и 2 типов, а также животных при экспериментальных моделях СД было отмечено ранее и отража-

ет развитие свободнорадикального окисления в условиях гипергликемии [3]. Показан существенный вклад жировой ткани в продукцию АФК при экспериментальном СД 2 типа, при котором существенно увеличены размеры жировой ткани [7]. Мы впервые демонстрируем повышение уровня гидроперекисей липидов в 1,6 ($p < 0,001$) и 1,7 ($p < 0,001$) раза в адипоцитах у крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа, индуцированным аллоксаном и стрептозотоцином, соответственно (табл. 2).

Влияние аллоксана и стрептозотоцина на содержание гидроперекисей липидов, ксантиноксидазную и ксантиндегидрогеназную активность и величину экспрессии мРНК гена ксантиндегидрогеназы (*Xdb*) в адипоцитах крыс, $Me (Q_1-Q_3)$

Показатель	Группа животных		
	1. Контроль, <i>n</i> = 8	2. Аллоксан, <i>n</i> = 8	3. Стрептозотоцин, <i>n</i> = 8
Гидроперекиси липидов, нМ/мг белка	5,7 (5,4–6,2)	8,9 (8,6–9,2) $p_{2-1} < 0,001$	9,9 (9,8–10,2) $p_{3-1} < 0,001$
Ксантиноксидаза, нМ/мин/мг белка	0,095 (0,074–0,101)	0,163 (0,140–0,192) $p_{2-1} = 0,002$	0,192 (0,167–0,193) $p_{3-1} = 0,002$
Ксантиндегидрогеназа, нМ/мин/мг белка	0,141 (0,103–0,171)	0,186 (0,171–0,198) $p_{2-1} = 0,012$	0,210 (0,190–0,217) $p_{3-1} = 0,01$
Ксантиноксидаза/ ксантиндегидрогеназа	0,67	0,88	0,91
Величина экспрессии мРНК гена <i>Xdb</i> , усл.ед.	0,07 (0,05–0,08)	0,16 (0,14–0,19) $p_{2-1} < 0,001$	0,19 (0,16–0,23) $p_{3-1} < 0,001$

Развитие окислительного стресса в адипоцитах крыс как при аллоксановом, так и стрептозотоциновом диабете свидетельствует о том, что это обусловлено гипoinsулинемией и гипергликемией, а не токсическим действием диабетогенов.

В сыворотке крови крыс с аллоксановым и стрептозотоциновым диабетом наблюдалось повышение ксантиноксидазной активности в 1,6 ($p < 0,001$) и 2,4 ($p < 0,001$) раза и ксантиндегидрогеназной активности в 1,5 ($p < 0,001$) и 2 ($p < 0,001$) раза соответственно (см. табл. 1). Увеличение активности ферментов сопровождалось повышением вклада ксантиноксидазной активности в общую ксантиндегидрогеназную, о чем свидетельствует увеличение отношения активности ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы с 0,63 в контроле до 0,69 и 0,75 при аллоксановом и стрептозотоциновом диабете (см. табл. 1). Известно, что основным источником ксантиноксидазы в сыворотке крови является печень, из которой фермент распределяется по всему кровеносному руслу и прикрепляется к эндотелию гепарансульфатом [9]. По данным литературы, при экспериментальном СД 1 типа у крыс ксантиноксидазная активность повышена в печени [9]. При этом жировая ткань обладает высокой ксантиноксидазной активностью, и зрелые адипоциты продуцируют и секретируют мочевую кислоту [7]. У крыс с аллоксановым и стрептозотоциновым СД в изолированных адипоцитах ксантиндегидрогеназная активность возрастала в 1,3 ($p = 0,012$) и 1,5 ($p = 0,01$) раза, а ксантиноксидазная в 1,7 ($p = 0,002$) и 2 ($p = 0,002$) раза соответственно (см. табл. 2).

Увеличение активности ферментов в условиях окислительного стресса в адипоцитах крыс с экспериментальным СД сопровождалось повышением вклада ксантиноксидазной активности в

общую ксантиндегидрогеназную, что отражалось в увеличении отношения активности ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы с 0,67 в контроле до 0,88 и 0,91 при аллоксановом и стрептозотоциновом диабете (см. табл. 2).

Ксантиноксидаза является сложным ферментом, активность которого регулируется на транскрипционном и посттрансляционном уровнях, а продукты реакции обладают прооксидантным (супероксид-анион кислорода и пероксид водорода) и антиоксидантным (мочевая кислота) действием [5].

Установлено, что повышение ксантиндегидрогеназной активности в адипоцитах при аллоксановом и стрептозотоциновом диабете обусловлено увеличением экспрессии мРНК гена ксантиндегидрогеназы в 2,3 ($p < 0,001$) и 2,7 раза ($p < 0,001$) соответственно по сравнению со значениями в группе контроля (см. табл. 2).

На транскрипционном уровне экспрессия ксантиндегидрогеназы регулируется многими факторами и в том числе увеличивается при гипоксии и под влиянием провоспалительных цитокинов, повышенная секреция последних лежит в основе патогенеза СД 1 типа [3]. Недавно было показано, что при индуцированном стрептозотоцином и аллоксаном экспериментальном диабете с симптомами СД 1 типа у крыс в жировой ткани увеличивается продукция провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α [17; 18], которые могут оказывать локальное и системное воздействие на метаболические процессы, в том числе индуцировать экспрессию мРНК ксантиндегидрогеназы. Таким образом, увеличение ксантиндегидрогеназной активности в адипоцитах эпидидимальной жировой ткани обусловлено увеличением величины экспрессии мРНК фермента.

Известно, что в нормальных условиях фермент находится преимущественно в ксантиндегидроге-

назой форме и может в результате окисления SH-групп цистеиновых остатков Cys535 и Cys992 с образованием дисульфидных связей обратимо или необратимо модифицироваться в ксантиноксидазу [19]. Таким образом, окислительный стресс вызывает окислительную посттрансляционную модификацию фермента и переход ксантиндегидрогеназной формы в ксантиноксидазную, что приводит к дальнейшему увеличению продукции АФК. Это подтверждается полученными современными данными о способности антиоксидантов токоферола и селена снижать индуцируемую окислительным стрессом повышенную активность ксантиноксидазы в печени и почках крыс со стрептозотоциновым диабетом [19].

Основная функция ксантиноксидазы состоит в образовании конечного продукта катаболизма пуринов мочевой кислоты, уровень которой в сыворотке крови определяется активностью ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы главным образом в печени. Содержание мочевой кислоты в сыворотке крови у крыс с аллоксановым и стрептозотоциновым диабетом увеличивалось в 1,3 раза ($p = 0,046$) и 1,5 раза ($p = 0,002$) соответственно по сравнению со значениями в контрольной группе (см. табл. 1). Повышение активности ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы в адипоцитах крыс, обнаруженное в наших экспериментах, свидетельствует о вкладе жировой ткани в гиперурикемию при экспериментальном СД 1 типа.

Поскольку мочевая кислота оказывает существенный вклад в антиоксидантный потенциал сыворотки крови [2], повышение ее уровня у животных с экспериментальным СД 1 типа можно рассматривать как адаптивную реакцию на оксидативный стресс, индуцированный гипергликемией. В то же время мочевая кислота в адипоцитах активирует НАДФН-оксидазу, участвующую в редокс-зависимой внутриклеточной передаче сигналов, и образующийся при чрезмерной активации этого фермента супероксид-анион кислорода индуцирует в клетках окислительный стресс [6].

Для выявления роли ксантиноксидазы в развитии окислительного стресса в адипоцитах при экспериментальном СД, после индукции диабета аллоксаном крысам вводили аллопуринол. Ингибитор ксантиноксидазы снижал содержание гидроперекисей липидов в сыворотке крови и адипоцитах крыс с экспериментальным СД, индуцированным аллоксаном (рис. 1). Введение аллопуринола крысам с аллоксановым диабетом не оказывало влияния на повышенную величину экспрессии ксантиндегидрогеназы (рис. 2). Это

свидетельствует о том, что действие препарата обусловлено ингибированием активности ксантиноксидазы, а не снижением транскрипции мРНК фермента. Таким образом, ксантиноксидаза может быть потенциальной мишенью для защиты от развития окислительного стресса в жировой ткани крыс при СД 1 типа.

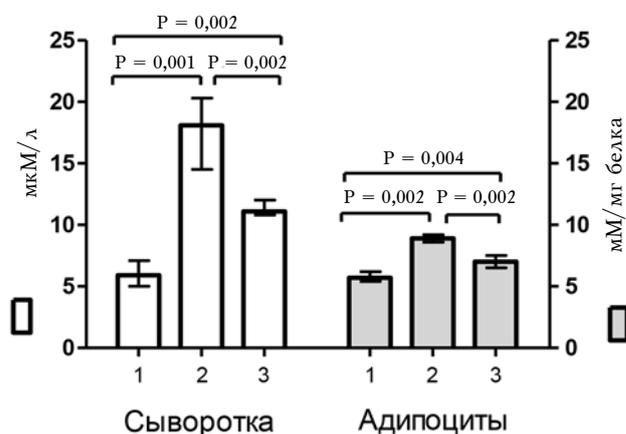


Рис. 1. Влияние аллоксана и аллопуринола на содержание гидроперекисей липидов (ГПЛ) в сыворотке крови и адипоцитах крыс: 1 – контроль ($n = 8$); 2 – аллоксановый диабет ($n = 8$); 3 – аллоксановый диабет + аллопуринол ($n = 8$); n – количество животных в группе

Fig. 1. Alloxan and allopurinol effect on the amount of lipid hydroperoxides (GPL) in blood serum and adipocytes of rats: 1 – control ($n = 8$); 2 – alloxan diabetes ($n = 8$); 3 – alloxan diabetes + allopurinol ($n = 8$); n – the number of animals in the group

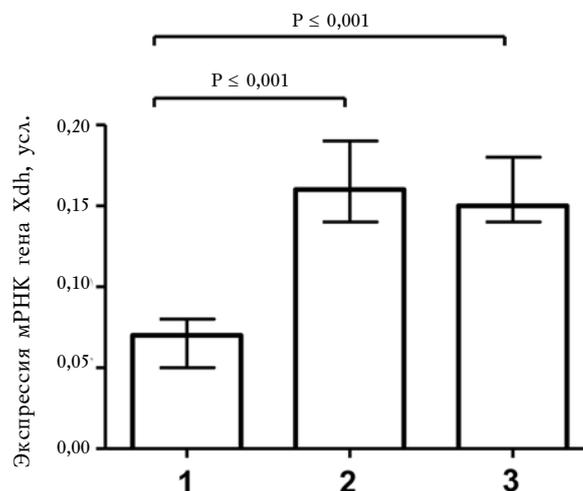


Рис. 2. Влияние аллоксана и аллопуринола на величину экспрессии мРНК гена ксантиндегидрогеназы (*Xdh*) в адипоцитах крыс: 1 – контроль ($n = 8$); 2 – аллоксановый диабет ($n = 8$); 3 – аллоксановый диабет + аллопуринол ($n = 8$); n – количество животных в группе

Fig. 2. Alloxan and allopurinol effect on the mRNA expression of the xanthine dehydrogenase gene (*Xdh*) in adipocytes of rats: 1 – control ($n = 8$); 2 – alloxan diabetes ($n = 8$); 3 – alloxan diabetes + allopurinol ($n = 8$); n – the number of animals in the group

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие окислительного стресса в адипоцитах эпидидимальной жировой ткани крыс с экспериментальным диабетом, индуцированным аллоксаном и стрептозотоцином, связано с увеличением продукции АФК вследствие повышения экспрессии мРНК гена ксантиндегидрогеназы и ксантиноксидазной активности в жировых клетках. Ингибитор ксантиноксидазы аллопуринол снижает содержание гидроперекисей липидов в адипоцитах, что свидетельствует о важной роли ксантиноксидазы в развитии окислительного стресса в жировой ткани при экспериментальном СД. Эти данные показывают, что ксантиноксидаза является одним из источников АФК индуцированных гипергликемией в адипоцитах эпидидимальной жировой ткани и ингибирование ксантиноксидазы уменьшает окислительный стресс. Поскольку окислительный стресс играет важную роль в патогенезе воспаления и каскада событий, ведущих к развитию диабетических осложнений, ксантиноксидаза может быть потенциальной терапевтической мишенью для уменьшения нарушений, связанных с окислительным стрессом, и прогрессирования этих явлений при СД 1 типа.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о вкладе авторов. Иванов В.В. – разработка концепции и дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания, проведение практической части исследования, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Шахристова Е.В. – проведение практической части исследования, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Степовая Е.А. – анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи, окончательное утверждение для публикации рукописи. Литвяков Н.В. – разработка дизайна, анализ и интерпретация данных. Перекуча Н.А. – проведение практической части исследования. Носарева О.Л. – анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Фёдорова Т.С. – анализ и интерпретация данных. Новицкий В.В. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (соглашение № 14.W02.16.7906-НШ).

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Протокол исследования одобрен этическим комитетом СибГМУ (№ 4718 от 18.04.2016 г.)

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Носарева О.Л., Федорова Т.С., Новицкий В.В. Молекулярные механизмы модуляции липолиза в жировой ткани и развитие инсулинорезистентности при сахарном диабете // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 4: 111–119.
- Ivanov V.V., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Nosareva O.L., Fedorova T.S., Novitsky V.V. Molekulyarnyye mekhanizmy modulyatsii lipoliza v zhirovoy tkani i razvitiye insulinorezistentnosti pri sakharnom diabete [Molecular mechanisms of modulation of lipolysis in adipose tissue and development of insulinresistance in diabetes] // *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya – Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 2014; 4: 111–119 (in Russian).
- Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008: 284.
- Men'shhikova E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z. Bondar' I.A., Trufakin V.A. Okislitel'nyy stress: patologicheskiye sostoyaniya i zabolevaniya [Oxidative stress: Pathological conditions and diseases]. Novosibirsk: ARTA Publ., 2008: 284 (in Russian).
- Rains J.L., Jain S.K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes // *Free Radic. Biol. Med.* 2011; 50(5): 567–575. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006.
- Giacco F., Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications // *Circ. Res.* 2010; 107(9): 1058–1070. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223545.
- Battelli M.G., Bolognesi A., Polito L. Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: new emerging roles for a multi-tasking enzyme // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1842 (9): 1502–1517. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.05.022.
- Sautin Y.Y., Johnson R.J. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox // *Nucleosides. Nucleotides. Nucleic Acids.* 2008; 27(6): 608–619. DOI: 10.1080/15257770802138558.
- Tsushima Y., Nishizawa H., Tochino Y., Nakatsuji H., Sekimoto R., Nagao H., Shirakura T., Kato K., Imaizumi K., Takahashi H., Tamura M., Maeda N., Funahashi T., Shimomura I. Uric acid secretion from adipose tissue and its increase in obesity // *Biol. Chem.* 2013; 288(38): 27138–27149. DOI: 10.1074/jbc.M113.485094.

8. Ivanov V.V., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Nosareva O.L., Fedorova T.S., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V. Effect of insulin, the glutathione system, and superoxide anion radical in modulation of lipolysis in adipocytes of rats with experimental diabetes // *Biochemistry (Mosc)*. 2015; 80 (1): 87–96. DOI: 10.1134/S0006297915010101.
9. Romagnoli M., Gomez-Cabrera M.C., Perrelli M.G., Biasi F., Pallardy F.V., Sastre J., Poli G., Vica J. Xanthine oxidase-induced oxidative stress causes activation of NF- κ B and inflammation in the liver of type I diabetic rats // *Free Radic. Biol. Med.* 2010; 49 (2): 171–177. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.024.
10. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells // *Biol. Chem.* 1964; 266 (24): 15817–15823.
11. Hermes-Lima M., Willmore W.G., Storey K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation // *Free Radic. Biol. Med.* 1995; 19 (3): 271–280.
12. Beckman J.S., Parks D.A., Pearson J.D., Marshall P.A., Freeman B.A. A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues // *Free Radic. Biol. Med.* 1989; 6: 607–615.
13. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. 1976; 7 (1): 248–254.
14. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method // *Methods*. 2001; 25 (4): 402–408.
15. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes // *Diabetologia*. 2008; 51 (2): 216–226.
16. Wu J., Yan L.J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity // *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 2015; 8: 181–188. DOI: 10.2147/DMSO.S82272.
17. Molanouri Shamsi M., Mahdavi M., Quinn L.S., Gharakhanlou R., Isanegad A. Effect of resistance exercise training on expression of Hsp70 and inflammatory cytokines in skeletal muscle and adipose tissue of STZ-induced diabetic rats // *Cell Stress Chaperones*. 2016; 21(5): 783–791. DOI: 10.1007/s12192-016-0703-7.
18. Panveloski-Costa A.C., Silva Teixeira S., Ribeiro I.M., Serrano-Nascimento C., das Neves R.X., Favaro R.R., Seelaender M., Antunes V.R., Nunes M.T. Thyroid hormone reduces inflammatory cytokines improving glycaemia control in alloxan-induced diabetic wistar rats // *Acta Physiol. (Oxf)*. 2016; 217 (2): 130–140. DOI: 10.1111/apha.12647.
19. Ghaffari T., Nouri M., Saei A.A., Rashidi M.R. Aldehyde and xanthine oxidase activities in tissues of streptozotocin-induced diabetic rats: effects of vitamin E and selenium supplementation // *Biol. Trace Elem. Res.* 2012; 147 (1-3): 217–225. DOI: 10.1007/s12011-011-9291-7.

Поступила в редакцию 24.06.2017
Утверждена к печати 08.11.2017

Иванов Владимир Владимирович, канд. биол. наук, доцент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

Шахристовая Евгения Викторовна, канд. мед. наук, доцент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

Степовая Елена Алексеевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

Литвяков Николай Васильевич, д-р биол. наук, зав. лабораторией онковирусологии, НИИ онкологии, Томский НИМЦ РАН, г. Томск.

Перекуча Наталья Андреевна, интерн, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

Носарева Ольга Леонидовна, канд. мед. наук, доцент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

Фёдорова Татьяна Сергеевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, зав. кафедрой патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

(✉) **Носарева Ольга Леонидовна**, e-mail: olnosareva@yandex.ru.

УДК 616.379-008.646:577.121.7

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-134-143

For citation: Ivanov V.V., Shakhristova E.V., Stepovaya E.A., Litvjakov N.V., Perekucha N.A., Nosareva O.L., Fedorova T.S., Novitsky V.V. Oxidative stress in the pathogenesis of type 1 diabetes: the role of adipocyte xanthine oxidase. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 134–143.

Oxidative stress in the pathogenesis of type 1 diabetes: the role of adipocyte xanthine oxidase

Ivanov V.V.¹, Shakhristova E.V.¹, Stepovaya E.A.¹, Litvjakov N.V.², Perekucha N.A.¹, Nosareva O.L.¹, Fedorova T.S.¹, Novitsky V.V.¹

¹ *Siberian State Medical University (SSMU)*
2, Moskow Tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

² *Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (TNRMC), Russian Academy of Science (RAS)*
5, Kooperativny Str., Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Rationale. According to modern understanding, oxidative stress plays an essential role in the underlying mechanisms for the emergence of type 1 and type 2 diabetes and development of complications in these conditions. The sources of reactive oxygen species in diabetes are protein glycosylation, mitochondrial respiratory chain, membrane-bound NADPH oxidase, and other enzymes. An important enzymatic source of the superoxide anion radical and H₂O₂ is xanthine oxidoreductase. Under physiological conditions, it exists mainly in the xanthine dehydrogenase form and may be reversibly or irreversibly converted to xanthine oxidase, following oxidative modification with formation of disulfide bonds in the protein molecule. In rodents, xanthine oxidoreductase in adipose tissue is expressed at a higher rate, as opposed to in other tissues.

The aim of the study was to establish the role of xanthine oxidase in development of oxidative stress in rat adipocytes in experimental type 1 diabetes.

Materials and methods. The study was conducted in male Wistar rats with experimental diabetes induced by two different diabetogenic agents – alloxan and streptozotocin. Serum concentration of insulin in the control and experimental rats was determined by the immunoradiometric assay. The levels of glucose and uric acid were measured by the enzymatic methods. The concentration of lipid hydroperoxides, primary products of lipid peroxidation, was detected by the FOX-2 method. The activity of xanthine oxidase in isolated adipocytes of epididymal adipose tissue and the expression of xanthine dehydrogenase mRNA were determined by fluorometry.

Results. The rats from the experimental group developed hyperglycemia-induced oxidative stress. The rise in the lipid hydroperoxide concentration in adipocytes was observed against the backdrop of the increased xanthine oxidase activity. The boost in the enzymatic activity under oxidative stress in adipocytes of the experimental rats was accompanied by the increase in the proportion of the xanthine oxidase activity in the total xanthine dehydrogenase plus oxidase activity. It resulted in the elevated xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase activity ratio. Oxidative stress in rat adipocytes with experimental type 1 diabetes caused oxidative post-translational modification of the enzyme and its conversion from the xanthine dehydrogenase form to the xanthine oxidase one. It resulted in the subsequent increase in reactive oxygen species production. The inhibitor of xanthine oxidase reduced the level of lipid hydroperoxides in rat adipocytes. Thus, xanthine oxidase may be a potential target to protect from oxidative stress in rat adipose tissue in type 1 diabetes.

Conclusions. Oxidative stress in adipose tissue of the rats with alloxan- and streptozotocin-induced diabetes is determined, to a certain extent, by the increased expression of xanthine dehydrogenase mRNA as well as by post-translational oxidative modification of the enzyme activity from dehydrogenase to oxidase. Allopurinol, the inhibitor of xanthine oxidase, decreases the alloxan-induced elevated level of lipid hydroperoxides in rat

serum and isolated adipocytes. It indicates a crucial role of xanthine oxidase in development of oxidative stress in adipocytes in experimental type 1 diabetes.

Key words: experimental diabetes, alloxan, streptozotocin, xanthine oxidase, adipocytes, lipid hydroperoxides, oxidative stress.

Received June 24.2017
Accepted November 08.2017

Ivanov Vladimir V., PhD, Associate Professor, Department Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Shakhrystova Evgeniya V., PhD, Associate Professor, Department Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Stepovaya Elena A., DM, Professor, Department Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Lityjakov Nicolai V., DBSc, Head of the Laboratory of Oncovirology, Cancer Research Institute, TNRMС of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation.

Perekucha Nataliya A., Intern, Department Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Nosareva Olga L., PhD, Associate Professor, Department Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Fedorova Tatayna S., DM, Professor, Department Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Novitsky Vyacheslav V., DM, Professor, Academician of RAS, Head of the Department Pathophysiology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Nosareva Olga L.**, e-mail: olnosareva@yandex.ru.

УДК 578.245.4:616-097-099

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-144–154

Для цитирования: Киншт Д.Н., Мадонов П.Г., Шерстобоев Е.Ю., Данилец М.Г., Трофимова Е.С., Лигачева А.А., Дыгай А.М. Иммунотоксические эффекты интерферона α -2b, модифицированного иммобилизацией с помощью технологии электронно-лучевого синтеза. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 144–154.

Иммунотоксические эффекты интерферона α -2b, модифицированного иммобилизацией с помощью технологии электронно-лучевого синтеза

Киншт Д.Н.¹, Мадонов П.Г.¹, Шерстобоев Е.Ю.², Данилец М.Г.²,
Трофимова Е.С.², Лигачева А.А.², Дыгай А.М.²

¹ Новосибирский государственный медицинский университет (НГМУ)
Россия, 630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

² Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины (НИИФирМ)
имени Е.А. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр (ТНИМЦ)
Российской академии наук (РАН)
Россия, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – изучить иммунотоксическое действие лекарственного препарата на основе интерферона α -2b, иммобилизованного на полиэтиленгликоле с помощью технологии электронно-лучевого синтеза.

Материал и методы. Исследование проведено на 250 самцах мышей-гибридов линии F₁(СВАЧС7В1/6) с использованием следующих методик: предварительная оценка иммунотоксичности при однократном введении в широком диапазоне доз, изучение влияния препарата на массу и клеточность центральных и периферических органов иммунитета, оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов, исследование влияния препарата на фагоцитарную активность нейтрофилов, оценка уровня гемагглютининов в сыворотке крови к эритроцитам барана, оценка влияния препарата на реакцию гиперчувствительности замедленного типа, индуцированную тринитробензолсульфоновой кислотой. Лекарственный препарат на основе иммобилизованного интерферона α -2b применяли внутрибрюшинно однократно в дозах $1,8 \times 10^6$ МЕ/кг, 9×10^6 МЕ/кг, $4,5 \times 10^7$ МЕ/кг, $22,5 \times 10^7$ МЕ/кг и курсом внутривенно в дозах $1,8 \times 10^6$ МЕ/кг и $1,8 \times 10^7$ МЕ/кг.

Результаты. Показано, что курсовое применение лекарственного препарата на основе иммобилизованного интерферона α -2b в дозах $1,8 \times 10^6$ МЕ/кг и $1,8 \times 10^7$ МЕ/кг не оказывает иммунотоксического действия. Однократное введение лекарственного препарата в различных дозах и курсовое применение дозы $1,8 \times 10^6$ МЕ/кг приводит к стимуляции гуморальных иммунных реакций. Использование курсом исследуемого препарата в дозах $1,8 \times 10^6$ МЕ/кг и $1,8 \times 10^7$ МЕ/кг повышает фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов и нейтрофилов периферической крови мышей.

Заключение. Применение лекарственного препарата на основе иммобилизованного интерферона α -2b в дозах, значительно превышающих терапевтические, не оказывает негативного воздействия на функционирование иммунной системы экспериментальных животных.

Ключевые слова: интерферон альфа-2b, пегилирование, иммунотоксичность, гуморальный и клеточный иммунный ответ, фагоцитоз, мыши-гибриды линии F1(СВАЧС7В1/6).

✉ Шерстобоев Евгений Юрьевич, e-mail: sherstoboev_eu@pharmso.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Для решения задачи этиотропной терапии энтеровирусной инфекции была разработана пероральная форма интерферона α -2b (ИФН α -2b), модифицированного иммобилизацией на полиэтиленгликоле с помощью технологии электронно-лучевого синтеза [1]. Известно, что воздействие ионизирующего излучения может изменять структуру белков вплоть до их разрушения, а иммобилизация белковых молекул на инертных носителях изменяет фармакологические свойства исходных [2]. Поэтому имеется актуальность изучения фармакологических свойств интерферонов, модифицированных иммобилизацией с помощью технологии электронно-лучевого синтеза.

Целью данного исследования в рамках общей программы доклинического изучения безопасности явилось исследование иммунотоксичности лекарственного препарата (ЛП) на основе иммобилизованного ИФН α -2b. Изучение иммунотоксического действия является обязательной частью изучения токсичности новых лекарственных препаратов и химических соединений [3].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Изучение иммунотоксического действия ЛП на основе интерферона (ИФН) α -2b, иммобилизованного на полиэтиленгликоле, проводилось согласно «Методическим рекомендациям по оценке иммунотоксического действия лекарственных средств» [3]. Пероральную форму ЛП иммобилизованного ИФН α -2b получали с помощью облучения пучком электронов в дозе 1,5 мрад, предварительно замороженной при -70 °С смеси рекомбинантного ИФН α -2b с 5%-м раствором полиэтиленгликоля-1500 [4].

В экспериментах использовано 250 самцов мышей-гибридов линии F_1 (СВАЧС57В1/6) в возрасте 6–8 нед массой тела 19–23 г, которые были получены из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН. Содержание животных, участвующих в экспериментах, осуществлялось в стандартных условиях вивария при температуре 18–24 °С, влажности – $(50 \pm 20)\%$, объеме воздухообмена (вытяжка / приток) – 8 : 10, световом режиме (день / ночь) – 12 ч / 12 ч. Мыши имели постоянный доступ к воде и пище.

Имунотоксическое действие лекарственного препарата исследовано при помощи следующих методик: предварительной оценки иммунотоксичности при однократном введении в широком диапазоне доз, влиянии препарата на массу и кле-

точность центральных и периферических органов иммунитета, оценки фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов, влиянии препарата на фагоцитарную активность нейтрофилов, оценки уровня гемагглютининов в сыворотке крови к эритроцитам барана, оценки влияния препарата на реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), индуцированную тринитробензолсульфоновой кислотой.

Для исследования иммунотоксичности препарат на основе иммобилизованного ИФН α -2b вводился внутрижелудочно курсом в течение 7 сут в десятикратной терапевтической дозе (10 ТД) $1,8 \times 10^6$ МЕ/кг и дозе, на порядок ее превышающей, $1,8 \times 10^7$ МЕ/кг (100 ТД), а также однократно внутрибрюшинно в дозах $1,8 \times 10^6$ МЕ/кг (10 ТД), 9×10^6 МЕ/кг (50 ТД), $4,5 \times 10^7$ МЕ/кг (250 ТД) и $22,5 \times 10^7$ МЕ/кг (1250 ТД). Терапевтическая доза лекарственного препарата была определена как $1,8 \times 10^5$ МЕ/кг для мышей, исходя из терапевтической дозы ИФН α -2b для человека. Введение препарата осуществлялось внутрижелудочно после извлечения содержимого капсулы и растворения его в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Контрольные животные получали ФСБ в дозе 10 мл/кг перорально или внутрибрюшинно.

При изучении влияния препарата на массу и клеточность центральных и периферических органов иммунитета, оценке фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов и нейтрофилов периферической крови в качестве фона были использованы интактные животные соответствующего пола и возраста. При исследовании влияния препарата на гуморальный иммунный ответ при однократном и курсовом введении на интенсивность реакции ГЗТ в качестве фона был использован мышьяк, получившие антиген, но без курсового введения растворителя. Применяемые методики подробно изложены в руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств [3].

Полученные в ходе исследования данные обрабатывались методом вариационной статистики с использованием программы Statistica 6.0. Для каждой выборки вычислялось среднее арифметическое (M), ошибка среднего арифметического (m). Проверка распределения на соответствие нормальному проводилась с помощью критерия Шапиро – Уилка. Сравнение выборочных средних осуществлялось по t -критерию Стьюдента в случае нормального распределения или по критерию Краскела – Уоллиса для k -несвязанных выборок ($k > 2$) в случае распределения, отличающегося от нормального.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Предварительная оценка иммунотоксичности при однократном введении

После однократного внутривенного введения лекарственного препарата самцам мышей-гибридов линии F_1 (СВАЧС57В1/6) в дозах $1,8 \times 10^6$ МЕ/кг (10 ТД), 9×10^6 МЕ/кг (50 ТД), $4,5 \times 10^7$ МЕ/кг (250 ТД) и $22,5 \times 10^7$ МЕ/кг (1250 ТД) наблюдалось достоверное повышение числа спленоцитов по сравнению с показателем контрольной группы (табл. 1). При этом отмечалось статистически значимое увеличение абсолютного числа антителообразующих клеток в группах

животных с однократным применением лекарственного препарата во всех исследованных дозах относительно контрольных значений. Однако процентное содержание антителопродуцентов было достоверно повышено лишь в группе мышей, получивших исследуемый препарат в дозе 9×10^6 МЕ/кг, а в группе животных с введением лекарственного препарата в дозе $4,5 \times 10^7$ МЕ/кг отмечалось статистически значимое снижение относительного числа антителообразующих клеток по сравнению с показателем контрольной группы.

Т а б л и ц а 1

Оценка влияния лекарственного препарата на основе иммобилизованного интерферона α -2b на гуморальный иммунный ответ мышей-гибридов линии F_1 (СВА \times С57В1/6) при однократном введении, $M \pm m$					
Показатель	Контроль ($n = 10$)	Доза, МЕ/кг			
		$1,8 \times 10^6$ ($n = 10$)	9×10^6 ($n = 10$)	$4,5 \times 10^7$ ($n = 10$)	$22,5 \times 10^7$ ($n = 10$)
Общее количество спленоцитов, 10^6 /орган	$171,60 \pm 5,81$	$193,80 \pm 8,10\#$	$237,10 \pm 9,98\#$	$284,60 \pm 7,66\#$	$317,90 \pm 13,64\#$
Антителообразующие клетки, %	$14,38 \pm 0,42$	$14,88 \pm 0,63$	$16,58 \pm 0,36\#$	$13,04 \pm 0,36\#$	$15,34 \pm 0,58$
Антителообразующие клетки, 10^6 /орган	$24,59 \pm 0,92$	$28,69 \pm 1,49\#$	$39,42 \pm 1,63\#$	$37,28 \pm 1,87\#$	$48,67 \pm 2,64\#$

П р и м е ч а н и е. # – различия между соответствующими опытными и контрольными группами достоверны ($p < 0,05$); n – количество животных в группе.

Таким образом, однократное применение ЛП на основе иммобилизованного ИФН α -2b у мышей-гибридов линии F_1 (СВА \times С57В1/6) в различных дозах приводило к стимуляции гуморального иммунного ответа.

Определение массы и клеточности органов иммунной системы

Курсовое введение лекарственного препарата мышам-самцам гибридам F_1 (СВА \times С57В1/6) в дозе

$1,8 \times 10^6$ МЕ/кг (10 ТД) приводило к достоверному повышению относительного числа спленоцитов и абсолютному и относительному увеличению количества тимоцитов по сравнению с показателями контрольной группы (табл. 2). При применении лекарственного препарата в минимальной дозе (10 ТД) наблюдалось статистически значимое повышение абсолютного числа тимоцитов относительно фоновых значений.

Т а б л и ц а 2

Оценка влияния курсового введения лекарственного препарата на основе иммобилизованного интерферона α -2b на массу и клеточность центральных и периферических органов иммунитета мышей-гибридов линии F_1 (СВА \times С57В1/6), $M \pm m$				
Показатель	Фон ($n = 10$)	Контроль ($n = 10$)	Доза, МЕ/кг	
			$1,8 \times 10^6$ ($n = 10$)	$1,8 \times 10^7$ ($n = 10$)
Масса селезенки, мг	$70,30 \pm 2,60$	$67,40 \pm 3,18$	$68,10 \pm 4,10$	$69,70 \pm 3,25$
Масса тимуса, мг	$47,00 \pm 2,04$	$51,50 \pm 3,90$	$52,10 \pm 3,54$	$50,30 \pm 2,90$
Масса лимфоузла, мг	$1,13 \pm 0,09$	$1,40 \pm 0,13$	$1,67 \pm 0,18^*$	$1,57 \pm 0,14^*$
Общее количество кариоцитов, 10^6 /бедро	$17,95 \pm 1,08$	$16,15 \pm 1,01$	$17,60 \pm 1,00$	$16,70 \pm 0,90$
Общее количество спленоцитов абсолютное, 10^6 /на орган	$129,30 \pm 8,29$	$123,00 \pm 4,49$	$132,80 \pm 7,06$	$132,60 \pm 5,38$
Общее количество спленоцитов относительное	$1,83 \pm 0,07$	$1,84 \pm 0,03$	$1,96 \pm 0,02\#$	$1,91 \pm 0,03$
Общее количество тимоцитов абсолютное, 10^6 /орган	$183,00 \pm 8,44$	$181,00 \pm 8,19$	$216,20 \pm 11,21^*\#$	$186,90 \pm 5,74$
Общее количество тимоцитов относительное	$3,90 \pm 0,07$	$3,61 \pm 0,18$	$4,21 \pm 0,14\#$	$3,80 \pm 0,18$
Общее количество лимфоцитов в лимфоузле абсолютное, 10^6 /орган	$1,51 \pm 0,10$	$1,63 \pm 0,14$	$1,95 \pm 0,20$	$2,33 \pm 0,27^*\#$

Показатель	Фон (<i>n</i> = 10)	Контроль (<i>n</i> = 10)	Доза, МЕ/кг	
			$1,8 \times 10^6$ (<i>n</i> = 10)	$1,8 \times 10^7$ (<i>n</i> = 10)
Общее количество лимфоцитов в лимфоузле относительное	1,38 ± 0,11	1,17 ± 0,03	1,17 ± 0,03	1,46 ± 0,08#

П р и м е ч а н и е. Здесь и далее в табл. 3–6: # – различия между соответствующими опытными и контрольными группами достоверны ($p < 0,05$), *n* – количество животных в группе.

*различия между опытными группами и фоном, между контрольной группой и фоном достоверны ($p < 0,05$).

При использовании лекарственного препарата мышам-самцам курсом в дозе $1,8 \times 10^7$ МЕ/кг (100 ТД) отмечалось достоверное повышение абсолютного и относительного содержания клеток лимфоузла по сравнению со значениями контрольной группы, при этом масса и общая клеточность лимфоузла была статистически значимо повышена и относительно фонового значения.

Таким образом, курсовое введение лекарственного препарата в дозе $1,8 \times 10^6$ МЕ/кг (10 ТД) мышам-самцам гибридам F_1 (СВА×С57В1/6) не оказывало существенного влияния на массу и клеточность центральных и периферических органов иммунитета, за исключением относительного повышения числа спленоцитов и абсолютно-

го и относительного количества тимоцитов. При использовании лекарственного препарата в дозе $1,8 \times 10^7$ МЕ/кг (100 ТД) наблюдалось повышение абсолютного и относительного числа клеток лимфоузла.

Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов

Курсовое введение лекарственного препарата в дозе $1,8 \times 10^6$ МЕ/кг (10 ТД) самцам мышей-гибридов линии F_1 (СВА × С57В1/6) приводило к достоверному повышению числа фагоцитов в перитонеальной полости, их суммарной и индивидуальной фагоцитарной активности по сравнению с контрольной группой, а также и фоном по такому показателю, как фагоцитарный индекс (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Оценка влияния курсового введения лекарственного препарата на основе иммобилизованного интерферона α -2b на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов мышей-гибридов линии F_1 (СВА×С57В1/6), $M \pm m$

Показатель	Фон (<i>n</i> = 10)	Контроль (<i>n</i> = 10)	Доза, МЕ/кг	
			$1,8 \times 10^6$ (<i>n</i> = 10)	доза $1,8 \times 10^7$ (<i>n</i> = 10)
Количество ядродержащих клеток в перитонеальном экссудате, $\times 10^6$	1,35 ± 0,13	1,19 ± 0,08	1,49 ± 0,14	1,31 ± 0,11
Фагоцитирующие клетки, %	38,18 ± 0,80	38,27 ± 1,93	41,70 ± 2,20	42,74 ± 2,23
Количество фагоцитирующих клеток, $\times 10^6$	0,52 ± 0,06	0,46 ± 0,04	0,64 ± 0,07#	0,57 ± 0,08
Количество туши, поглощенное клетками перитонеального экссудата, ед. абсорбции	0,438 ± 0,051	0,370 ± 0,034	0,569 ± 0,070#	0,493 ± 0,066
Фагоцитарный индекс (количество туши, поглощенное одним фагоцитом), ед. абсорбции, $\times 10^6$	0,838 ± 0,018	0,803 ± 0,013	0,887 ± 0,011*#	0,859 ± 0,015#

В группе мышей, получивших лекарственный препарат курсом в дозе $1,8 \times 10^7$ МЕ/кг (100 ТД), отмечалось достоверное повышение фагоцитарного индекса по сравнению со значением в контрольной группе. Таким образом, курсовое введение лекарственного препарата в дозе $1,8 \times 10^6$ МЕ/кг самцам мышей-гибридов линии F_1 (СВА×С57В1/6) стимулировало фагоцитарную активность клеток перитонеального экссудата. При использовании лекарственного препарата в дозе $1,8 \times 10^7$ МЕ/кг наблюдалось лишь повышение фагоцитарного индекса.

Оценка фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови

Применение лекарственного препарата курсом как в дозе $1,8 \times 10^6$ МЕ/кг (10 ТД), так и в дозе на порядок ее выше $1,8 \times 10^7$ МЕ/кг (100 ТД) приводило к достоверному повышению относительного количества фагоцитирующих нейтрофилов (фагоцитарный индекс) как по сравнению со значениями контрольной, так и фоновой группы (табл. 4). При этом среднее число частиц, поглощенное одной клеткой (фагоцитарное число) в группах животных, получивших лекарственный препарат

в обеих исследованных дозах, статистически значимо не изменялось по сравнению с показателями контрольной группы и фона. Таким образом, курсовое введение лекарственного препарата в

дозах $1,8 \times 10^6$ МЕ/кг и $1,8 \times 10^7$ МЕ/кг самцам мышей-гибридов линии F₁(СВА × С57Bl/6) повышало относительное число активных фагоцитов среди нейтрофилов периферической крови.

Т а б л и ц а 4

Оценка влияния курсового введения лекарственного препарата на основе иммобилизованного интерферона α -2b на фагоцитарную активность нейтрофилов мышей-гибридов линии F ₁ (СВА×С57Bl/6), $M \pm m$				
Показатель	Фон (n = 10)	Контроль (n = 10)	Доза, МЕ/кг	
			$1,8 \times 10^6$ (n = 10)	$1,8 \times 10^7$ (n = 10)
Фагоцитарный индекс, %	25,20 ± 1,62	25,60 ± 1,25	34,90 ± 2,32*#	33,80 ± 2,21*#
Фагоцитарное число	2,18 ± 0,19	2,03 ± 0,13	2,46 ± 0,16	2,32 ± 0,14

Оценка уровня гемагглютининов в сыворотке крови к эритроцитам барана

Курсовое введение лекарственного препарата в дозе $1,8 \times 10^6$ МЕ/кг достоверно повышало титр гемагглютининов в периферической крови экспериментальных животных по сравнению с контрольной группой (табл. 5).

Применение лекарственного препарата в дозе $1,8 \times 10^7$ МЕ/кг не оказывало существенного влияния на уровень гемагглютининов в сыворотке

крови иммунизированных ЭБ мышей.

Оценка влияния препарата на гиперчувствительность замедленного типа

Курсовое введение лекарственного препарата в дозах $1,8 \times 10^6$ МЕ/кг (10 ТД) и $1,8 \times 10^7$ МЕ/кг (100 ТД) самцам мышей-гибридов линии F₁(СВА×С57Bl/6) не приводило к статистически значимым различиям в выраженности реакции ГЗТ по сравнению с соответствующими показателями контрольной и фоновой группы (табл. 6).

Т а б л и ц а 5

Оценка влияния курсового введения лекарственного препарата на основе иммобилизованного интерферона α -2b на уровень гемагглютининов ($\log_2 T$) к эритроцитам барана в крови мышей-гибридов линии F ₁ (СВА×С57Bl/6) на 7-е сут после иммунизации, $M \pm m$				
Показатель	Фон (n = 10)	Контроль (n = 10)	Доза, МЕ/кг	
			$1,8 \times 10^6$ (n = 10)	$1,8 \times 10^7$ (n = 10)
Уровень гемагглютининов ($\log_2 T$)	8,90 ± 0,31	8,50 ± 0,40	10,10 ± 0,53#	9,30 ± 0,47

Т а б л и ц а 6

Оценка влияния курсового введения лекарственного препарата на основе иммобилизованного интерферона α -2b на интенсивность реакции ГЗТ мышей-гибридов линии F ₁ (СВА×С57Bl/6), индуцированную введением тринитробензолсульфоновой кислоты, $M \pm m$				
Показатель	Фон (n = 10)	Контроль (n = 10)	Доза МЕ/кг	
			$1,8 \times 10^6$ (n = 10)	$1,8 \times 10^7$ (n = 10)
Интенсивность реакции ГЗТ	14,28 ± 1,20	13,63 ± 1,14	16,91 ± 1,30	16,14 ± 1,39

ОБСУЖДЕНИЕ

Широкое применение в медицине препараты на основе ИФН α -2b нашли в лечении вирусных заболеваний, большого круга онкологических болезней, а также для профилактики гриппа и ОРЗ [5–7]. Но, к сожалению, белковая природа ИФН α -2b накладывает ряд существенных ограничений

в клиническом применении. Эти препараты легко разрушаются ферментами желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и протеазами крови, что снижает их биодоступность и вынуждает клиницистов увеличивать дозу и частоту введения препарата [8–10]. Парентеральное назначение высоких доз ИФН влечет за собой развитие побочных реакций [11–14]. У больных, принимающих большие

дозы рекомбинантных ИФН, также наблюдается образования антител, нейтрализующих препарат, что сопровождается развитием резистентности к интерферонотерапии [10, 15].

Совершенствование препаратов на основе ИФН предполагает получение более безопасного и эффективного лекарственного средства с улучшенными физико-химическими и биологическими свойствами. Современная технология иммобилизации активного белка с полиэтиленгликолем с помощью электронно-лучевого синтеза модифицирует фармакокинетические характеристики соединения, позволяя создавать лекарственные препараты с высокой терапевтической активностью и низкой токсичностью [16–18]. Результатом такой модификации является возрастание биодоступности ИФН, снижение колебаний уровня активного вещества в крови, более длительное сохранение эффективной концентрации в органах-мишенях, что и увеличивает эффективность интерферонотерапии [8, 10, 19–22]. Уникальность препарата ИФН α -2b, иммобилизованного на полиэтиленгликоле с помощью электронно-лучевого синтеза, заключается в защите белковой молекулы от действия протеолитических ферментов ЖКТ, благодаря чему появляется возможность перорального применения лекарственного препарата на основе иммобилизованного ИФН α -2b. Немаловажен и тот факт, что около 60–70% клеток иммунной системы находится именно в желудочно-кишечном тракте, а учитывая склонность иммуноцитов к рециркуляции, эта цифра существенно возрастает, поэтому пероральный прием препарата будет оказывать более выраженный иммуномодулирующий эффект и почти не сопровождаться системными побочными эффектами [23–25]. Одна из задач доклинического изучения любого нового лекарственного препарата – в эксперименте на животных доказать или исключить возможность развития иммунотоксического действия, вызванного введением препарата. Поэтому было изучено влияние лекарственного средства на основе иммобилизованного ИФН α -2b на основные звенья иммунного ответа в эксперименте при однократном и курсовом применении.

На сегодняшний день препараты ИФН- α все чаще рассматриваются, прежде всего, как иммуномодуляторы, влияющие на процессы дифференцировки и функциональной активности эффекторных клеток иммунной системы [12, 26, 27]. Ведь роль ИФН в естественном выздоровлении человека связана не только с торможением репродукции вирусов, бактериальных агентов и опухолевых клеток, но и с формированием адек-

ватного воспалительного процесса и иммунного ответа. Являясь частью общей цитокиновой сети организма, ИФН принимают участие во всех реакциях иммунитета и в первую очередь отвечают за включение механизмов врожденного иммунитета [28, 29]. Известно, что ИФН- α активно воздействуют на НК-клетки, Т-лимфоциты, моноциты, макрофаги и нейтрофилы, способствуя активации механизмов захвата и переваривания чужеродных агентов, а также через усиление экспрессии мембранных антигенов I и II классов комплекса МНС на поверхности иммунокомпетентных клеток облегчают процесс узнавания антигена [5, 28, 30–33]. Проведенное нами исследование показало, что ЛП на основе иммобилизованного ИФН α -2b оказывает стимулирующее влияние на функциональную активность перитонеальных макрофагов и нейтрофилов (см. табл. 3, 4).

Помимо активации неспецифических ресурсов иммунной системы, ИФН- α регулируют процессы созревания иммунокомпетентных клеток, межклеточных взаимодействий и участвуют в формировании специфического иммунного ответа [34–36]. Из данных литературы известно, что иммуномодулирующее действие рекомбинантного препарата ИФН α -2b реализуется преимущественно через воздействие на клеточное звено иммунной системы [37–39]. Продукция инфицированными клетками ИФН- α при участии других цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-12) определяет дифференцировку Тх0 лимфоцитов в Тх1 и развитие клеточного иммунного ответа, что в сочетании с активацией основных антигенпрезентирующих клеток способствует формированию антиген-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов CD8⁺, направленных против инфицированных клеток [26, 40, 41]. С другой стороны, ИФН α -2b препятствует развитию воспаления и реакции ГЗТ [5]. Основная роль в развитии ГЗТ принадлежит Т-лимфоцитам.

Специфическое узнавание антигена активирует сенсibilизированные Т-лимфоциты, которые, в свою очередь, запускают синтез большого количества лимфокинов – медиаторов ГЗТ. Активированные Т-лимфоциты вместе с синтезируемыми цитокинами вовлекают в ответную реакцию на чужеродный антиген клетки других типов, таких как моноциты (макрофаги), нейтрофилы. Миграция и пролиферация иммунных клеток характеризуется воспалением с ярко выраженными признаками [42]. В представленном исследовании курсовое введение ЛП на основе иммобилизованного ИФН α -2b не способствовало развитию воспаления по типу ГЗТ (см. табл. 6).

Существуют данные о способности ИФН- α в физиологических концентрациях активировать эффекторные механизмы гуморального иммунитета, повышая тем самым эффективность иммунного ответа. Иммуномодулирующее влияние ИФН I типа на гуморальный иммунный ответ показано для разных типов антигенов [5, 43]. Нами было обнаружено, что однократное введение ЛП на основе иммобилизованного ИФН α -2b в различных дозах, начиная от десятикратной терапевтической дозы и заканчивая дозой, в 125 раз ее превышающей, увеличивало показатели гуморального иммунного ответа на 4-е сут после иммунизации эритроцитами барана (см. табл. 1).

В зависимости от условий протекания иммунного воспаления ИФН I типа способны влиять на функциональную активность В-лимфоцитов, усиливая или тормозя процесс антителообразования, а также переключая синтез иммуноглобулинов. По имеющимся данным, ИФН стимулируют в В-клетках в зависимости от их локализации продукцию специфических иммуноглобулинов G, M, A и снижают синтез иммуноглобулина E [28, 36]. Функциональная активность антителопродукторов в селезенке мышей, принимавших 7-дневным курсом ЛП на основе иммобилизованного ИФН α -2b в десятикратной терапевтической дозе ($1,8 \times 10^6$ МЕ/кг) повышалась, судя по титрам специфических гемагглютининов в сыворотке крови (см. табл. 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Курсовое применение лекарственного препарата на основе иммобилизованного интерферона α -2b в десятикратной и стократной терапевтических дозах не оказывает иммунотоксического действия в эксперименте. Однократное введение лекарственного препарата в различных дозах и курсовое применение десятикратной терапевтической дозы приводит к стимуляции гуморальных иммунных реакций. Использование лекарственного препарата на основе иммобилизованного ИФН α -2b курсом в десятикратной и стократной терапевтических дозах повышает фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов и нейтрофилов периферической крови экспериментальных животных, не влияя при этом на протекание клеточного иммунного ответа.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных

с публикацией настоящей статьи, и сообщают о вкладе авторов. Киншт Д.Н. – разработка методики электронно-лучевого синтеза препарата, анализ данных. Мадонов П.Г. – разработка методики электронно-лучевого синтеза препарата, анализ и интерпретация данных. Шерстобоев Е.Ю. – разработка дизайна исследования, написание текста статьи. Данилец М.Г. – проведение экспериментов, интерпретация данных. Трофимова Е.С. – проведение экспериментов, интерпретация данных. Лигачева А.А. – проведение экспериментов, статистическая обработка результатов. Дыгай А.М. – общее руководство исследованием, окончательное утверждение рукописи для публикации.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» «Доклинические исследования лекарственного средства на основе иммобилизованного интерферона для лечения энтеровирусной инфекции» (государственный контракт от 14 мая 2012 г. № 16.N08.12.1017).

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено решением комитета по этике НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга ТНИМЦ РАН (протокол № 15012014 от 15.01.2014 г.).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Артамонов А.В., Бекарев А.А., Балданов Н.В., Киншт Д.Н., Мадонов П.Г., Мирошников П.Н., Дыгай А.М., Данилец М.Г., Лигачева А.А., Масная Н.В., Трофимова Е.С., Шерстобоев Е.Ю., Шитикова О.Г. Противоэнтеровирусное и иммуностимулирующее средство. Патент РФ № 2554761, 2015.
Artamonov A.V., Bekarev A.A., Baldanov N.V., Kinsht D.N., Madonov P.G., Miroshnikov P.N., Dygay A.M., Danilets M.G., Ligacheva A.A., Masnaya N.V., Trofimova E.S., Sherstoboev E.Yu., Shitikova O.G. Protivoenterovirusnoe i immunostimuliruyushchee sredstvo [Anti-enteroviral and immunostimulating agent]. Russian Federation Patent 2554761, 2015 (in Russian).
2. Wang Y.S., Youngster S., Grace M., Bausch J., Borden R., Wyss D.F. Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications // *Adv. Drug Deliv.* 2002; 54 (4): 547–570. DOI: 10.1016/S0169-409X(02)00027-3.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2013: 944.

- Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya. Ed. A.N. Mironov. [Guidelines for preclinical drug research. Part one / pod red. A.N. Mironova] M.: Grif i K Publ., 2013: 944 (in Russian).
4. Бекарев А.А., Артамонов А.В., Верещагин Е.И. Способ иммобилизации биологически активного вещества (БАВ) на носитель (варианты) и конъюгат БАВ-носитель, полученный данными способами. Патент РФ № 2409669, 2011.
 - Bekarev A.A., Artamonov A.V., Vereshchagin E.I. Sposob immobilizatsii biologicheskii aktivnogo veshchestva (BAV) na nositel' (varianty) i konyugat BAV-nositel', poluchennuyu dannymi sposobami [Method for immobilising biologically active substance (BAS) on carrier (versions) and BAS-carrier conjugate produced by such methods], Russian Federation Patent 2409669, 2011 (in Russian).
 5. Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М.: ГЭОТАР-МЕД, 2005: 368.
 - Ershov F.I., Kiselev O.I. Interferony i ikh induktory (ot molekul do lekarstv) [Interferons and their inducers (from molecules to drugs)], M.: GEOTAR-MED Publ., 2005: 368 (in Russian).
 6. Goodbourn S., Didcock L., Randall R.E. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures // *J. Gen. Virol.* 2000; 81: 2341–2364. DOI: 10.1099/0022-1317-81-10-2341.
 7. Caraglia M., Marra M., Pelaia G., Maselli R., Caputi M., Marsico S.A. Alpha-interferon and its effects on signal transduction pathways // *Cell Physiol.* 2005; 202 (2): 223–235.
 8. Ahad M.A., Alim M.A., Saifuddin Ekram A.R.M. Interferon to PEG-Interferon: a review // *TAJ: Journal of Teachers Association.* 2004; 7 (2): 113–116. DOI: 10.3329/taj.v17i2.3460.
 9. Lai L., Hui Ch. K., Leung N., Lau G. K. Pegylated interferon alpha-2a (40 kDa) in the treatment of chronic hepatitis B // *Int. J. Nanomedicine.* 2006; 1 (3): 255–262.
 10. Thomas T., Foster G. Nanomedicines in the treatment of chronic hepatitis C-focus on pegylated interferon alpha-2a // *Int. J. Nanomedicine.* 2007; 2 (1): 19–24. DOI: 10.2147/nano.2007.2.1.19.
 11. Борзанова М.В., Алпенидзе Д.Н., Горельшева Н.Е. Обзор эффективности препаратов интерферона альфа-2b при интраназальном применении // *Русский медицинский журнал.* 2012; 20 (24): 1208–1210.
 - Borzanova M.V., Alpenidze D.N., Gorelysheva N.E. Obzor effektivnosti preparatov interferona al'fa-2b pri intranasal'nom primenenii [Review of the effectiveness of interferon alfa-2b preparations for intranasal application] // *Russkiy meditsinskiy zhurnal – Russian Medical Journal.* 2012; 20 (24): 1208–1210 (in Russian).
 12. Лусс Л.В., Малиновская В.В., Выжлова Е.Н. 12. Интерфероны в комплексной терапии и профилактике гриппа и респираторных инфекций // *Эффективная фармакотерапия.* 2014; 5: 14–19.
 - Luss L.V., Malinovskaya V.V., Vyzhlova E.N. Interferony v kompleksnoy terapii i profilaktike gripa i respiratornykh infektsiy [Interferons in complex therapy and prevention of influenza and respiratory infections] // *Effektivnaya farmakoterapiya – Effective Pharmacotherapy.* 2014; 5: 14–19 (in Russian).
 13. Patten S.B. What is the best approach to treating interferon-induced depression in people with multiple sclerosis? // *J. Psychiatry. Neurosc.* 2001; 26 (1): 66.
 14. Papafragkakis H., Rao M.S., Moehlen M., Dhillon S., Martin P. Depression and pegylated interferon-based hepatitis C treatment // *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research.* 2012; 4 (1): 25–35. DOI: 10.2147/IJICMR.S28901.
 15. Симбирцев А.С. Достижения и перспективы использования рекомбинантных цитокинов в клинической практике // *Медицинский академический журнал.* 2013; 13 (1): 7–22.
 - Simbirtsev A.S. Dostizheniya i perspektivy ispol'zovaniya rekombinantnykh tsito-kinov v klinicheskoy praktike [Achievements and prospects of usage of recombinant cytokines in clinical practice] // *Meditsinskiy akademicheskii zhurnal – Medical Academic Journal.* 2013; 13 (1): 7–22 (in Russian).
 16. Дыгай А.М., Артамонов А.В., Бекарев А.А., Жданов В.В., Зюзьков Г.Н., Мадонов П.Г., Удут В.В. Нанотехнологии в фармакологии. М.: Издательство РАМН, 2011: 136 с.
 - Dygay A.M., Artamonov A.V., Bekarev A.A., Zhdanov V.V., Zyuz'kov G.N., Madonov P.G., Udut V.V. Nanotekhnologii v farmakologii [Nanotechnology in Pharmacology]. M.: Publishing house RAMS, 2011: 136 (in Russian).
 17. Ершов К.И., Серяпина А.А., Спиридонов В.В., Парыгина Е.М., Редозубов Э.В. Исследование эффективности перорального нанокompозитного препарата инсулина // *Сибирский медицинский вестник.* 2013; 4: 30.
 - Ershov K.I., Seryapina A.A., Spiridonov V.V., Parygina E.M., Redozubov E.V. Issledovanie effektivnosti peroral'nogo nanokompозitnogo preparata insulin [The study of the effectiveness of the peroral nanocomposite preparation of insulin] // *Sibirskiy meditsinskiy vestnik – Siberian Medical Bulletin.* 2013; 4: 30 (in Russian).
 18. Мадонов П.Г., Ершов К.И., Дубровин А.В., Заполоцкий Е.Н., Мирошников П.Н., Шилова М.А., Киншт Д.Н. Электронно-лучевая модификация препаратов белковой природы для улучшения их фармакологических свойств // *Сибирский медицинский вестник.* 2013; 4: 83.
 - Madonov P.G., Ershov K.I., Dubrovin A.V., Zapolotskiy E.N., Miroshnikov P.N., Shilova M.A., Kinsht D.N. Elektronno-luchevaya modifikatsiya preparatov belkovoy prirody dlya uluchsheniya ikh farmakologicheskikh svoystv [Electron-beam modification of protein preparations aimed at improving their pharmacological properties] // *Sibirskiy meditsinskiy vestnik – Siberian Medical Bulletin.* 2013; 4: 83 (in Russian).

19. Никитин И.Г., Байкова И.Е., Гогова Л.М. Пегилированные лекарственные препараты: современное состояние, проблемы и перспективы // *Лечебное дело*. 2005; 4: 18–24.
- Nikitin I.G., Baykova I.E., Gogova L.M. Pegilirovannye lekarstvennyye preparaty: sovremennoe sostoyanie, problemy i perspektivy [Pegylated medicines: current state, problems and prospects] // *Lechebnoe delo – Therapeutics*. 2005; 4: 18–24 (in Russian).
20. Карабельский А.В., Падкина М.В. Рекомбинантные интерфероны-альфа пролонгированного действия // *Вестник СПбГУ*. 2007; 3 (4): 45–53.
- Karabel'skiy A.V., Padkina M.V. Rekombinantnyye interferony-al'fa prolongirovannogo deystviya [Recombinant interferons-alpha with prolonged action] // *Vestnik SPbGU – SPbSU Bulletin*. 2007; 3 (4): 45–53 (in Russian).
21. Grace M.J., Cutler D. Pegylating IFNs at his-34 improves the in vitro antiviral activity through the JAK/STAT pathway // *Antivir. Chem. Chemother*. 2004; 15 (6): 287–297. DOI: 10.1177/095632020401500601.
22. Ferreira P.R.A., Tenore S.B. Response predictors to treatment with pegylated interferon in chronic hepatitis B // *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2010; 14 (5): 519–525. DOI: 10.1590/S1413-86702010000500017.
23. Хайтов Р.М., Пинегин Б.В. Особенности организации и функционирования иммунной системы желудочно-кишечного тракта и заболевания, связанные с нарушениями ее функционирования // *Анналы хирургической гепатологии*. 1998; 3 (1): 112–116.
- Khaitov R.M., Pinegin B.V. Osobennosti organizatsii i funktsionirovaniya immunnoy sistemy zheludочно-kishechnogo trakta i zabolevaniya, svyazannye s narusheniyami ee funktsionirovaniya [Features of organization and functioning of a gastrointestinal tract immune system and diseases associated with disruption of its functioning] // *Analy khirurgicheskoy gepatologii – Annals of Surgical Hepatology*. 1998; 3 (1): 112–116 (in Russian).
24. Eberl G. Inducible lymphoid tissues in the adult gut: recapitulation of a fetal developmental pathway? // *Nat. Rev. Immunol*. 2005; 5(5): 413–420. DOI: 10.1038/nri1600.
25. Dzialo J., Niedzwiedzka-Rystwel P., Mekal A., Depula W. Charakterystyka tkanki limfatycznej błon śluzowych przewodu pokarmowego i układu oddechowego [Characteristics of mucosal lymphatic tissue associated with gastrointestinal tract and respiratory system] // *Alergia Astma Immunologia. – Allergy Asthma Immunology*. 2010; 15 (4): 197–202.
26. González-Navajas J.M., Lee J., David M., Raz E. Immunomodulatory functions of type I interferons // *Nat. Rev. Immunol*. 2012; 12 (2): 125–135. DOI: 10.1038/nri3133.
27. Boasso A. Type I Interferon at the Interface of Antiviral Immunity and Immune Regulation: The Curious Case of HIV-1 // *Scientifica*. 2013; 2013. DOI: 10.1155/2013/580968.
28. Brassard D.L., Grace M.J., Bordens R.W. Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein // *Journal of Leukocyte Biology*. 2002; 71 (4): 565–581.
29. Randall R.E., Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures // *J. Gen. Virol*. 2008; 89 (1): 1–47. DOI: 10.1099/vir.0.83391-0.
30. Кузнецов В.П. Интерфероны в каскаде цитокинов: исторический и современный аспекты // *Антибиотики и химиотерапия*. 1998; 43 (5): 28–39.
- Kuznetsov V.P. Interferony v kaskade tsitokinov: istoricheskii i sovremennyy aspekt [Interferons in a cytokines cascade: historical and modern aspects] // *Antibiotiki i khimioterapiya – Antibiotics and Chemotherapy*. 1998; 43 (5): 28–39 (in Russian).
31. Малиновская В.В. Новый отечественный комплексный препарат Виферон, принцип его создания и применения в педиатрической и акушерской инфекционной практике / Ребенок и лекарство. Справочное пособие для лечащих врачей. Т. 2. Фармакотерапия в педиатрии. М.: Оверлей, 2000: 56–77.
- Malinovskaya V.V. Novyy otechestvennyy kompleksnyy preparat Viferon, printsip ego sozdaniya i primeneniya v pediatricheskoy i akusherskoy infektsionnoy praktike / Rebenok i lekarstvo. Spravochnoe posobie dlya lechashchikh vrachey. T. 2. Farmakoterapiya v pediatrii. [The new domestic complex preparation Viferon, the principle of its creation and application in pediatric and obstetrical infection practice / A child and a medicine. Handbook for physicians. V. 2. Pharmacotherapy in pediatrics]. M.: Overlay Publ., 2000: 56–77 (in Russian).
32. Романцов М.Г. Интерфероны и их индукторы. В кн.: Горячева Л.Г., Романцов М.Г., Ботвиньева В.В. Циклоферон. Эффективное средство для педиатрии. СПб., 2002: 9–15.
- Romantsov M.G. Interferony i ikh induktory [Interferons and their inductors]. V kn.: Goryacheva L.G., Romantsov M.G., Botvin'eva V.V. Tsikloferon. Effektivnoe sredstvo dlya pediatrii. [In: Cycloferon. An effective remedy for pediatrics]. SPb., 2002: 9–15 (in Russian).
33. Takaoka A., Yanai H. Interferon signalling network in innate defence // *Cellular Microbiology*. 2006; 8 (6): 907–922. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2006.00716.x.
34. Серебряная Н.Б., Кетлинский С.А. Использование препаратов интерферона альфа в медицине: настоящее и будущее // *Медицинский академический журнал*. 2002; 2 (4): 101–102.
- Serebryanaya N.B., Ketlinskiy S.A. Ispol'zovanie preparatov interferona al'fa v meditsine: nastoyashchee i budushchee [Use of interferon alpha preparations in medicine: the present and the future] // *Meditsinskiy akademicheskii zhurnal – Medical Academic Journal*. 2002; 2 (4): 101–102.
35. Наровлянский А.Н., Ершов Ф.И., Гинцбург А.А. Интерфероны: перспективные направления исследований // *Иммунология*. 2013; 3: 168–172.

- Narovlyanskiy A.N., Ershov F.I., Gintsburg A.L. Interferony: perspektivnyye napravleniya issledovaniy [Interferons: perspective research directions] // *Immunologiya – Immunology*. 2013; 3: 168–172 (in Russian).
36. Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R., Silverman R.H., Schreiber R.D. How cells respond to interferons // *Annu. Rev. Biochem.* 1998; 67: 227–264. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.227.
37. Абатуров А.Э., Юлиш Е.И. Роль интерферонов в защите респираторного тракта. Ч. 1. Каскад возбуждения системы интерферонов // *Здоровье ребенка*. 2007; 5: 136–144.
- Abaturov A.E., Yulish E.I. Rol' interferonov v zashchite respiratornogo trakta. Chast' 1. Kaskad vzbuzhdeniya sistema interferonov [The role of interferons in the protection of the respiratory tract. Part 1. Excitation cascade of the interferons system] // *Zdorov'e rebenka – Child Health*. 2007; 5: 136–144 (in Russian).
38. Бекетова Г.В. Интерфероны в лечении острых респираторных инфекций у детей // *Ліки України*. 2011; 3: 106–109.
- Beketova G.V. Interferony v lechenii ostrykh respiratornykh infektsiy u detey [Interferons in the treatment of acute respiratory infections in children] // *Liki Ukraini – Liki of Ukraine*. 2011; 3: 106–109 (in Russian).
39. Панкратов О.В. Иммуномодуляторы в лечении герпетической инфекции, вызванной вирусом простого герпеса // *Медицинские новости*. 2011; 4: 18–24.
- Pankratov O.V. Immunomodulatory v lechenii herpeticheskoy infektsii, vyzvannoy virusom prostogo herpesa [Immunomodulators in the treatment of herpetic infection caused by the herpes simplex virus] // *Medsinskie novosti – Medical News*. 2011; 4: 18–24 (in Russian).
40. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н., Мезенцева М.В. Ранние цитокиновые реакции при вирусных инфекциях // *Цитокины и воспаление*. 2004; 3 (1): 3–6.
- Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N., Mezentsseva M.V. Rannie tsitokinovye reaktsii pri virusnykh infektsiyakh [Early cytokine reactions at viral infections] // *Tsitokiny i vospalenie – Cytokines and Inflammation*. 2004; 3 (1): 3–6 (in Russian).
41. Wagner T.L., Ahonen C.L., Couture A.M., Gibson S.J., Miller R.L., Smith R.M., Reiter M.J., Vasilakos J.P., To-mai M.A. Modulation of TH1 and TH2 Cytokine Production with the Immune Response Modifiers, R-848 and imiquimod // *Cell Immunol.* 1999; 191(1): 10–19. DOI: 10.1006/cimm.1998.1406.
42. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология: норма и патология: учебник для студентов медицинских вузов и университетов. М: Медицина, 2010: 752.
- Khaitov R.M., Ignat'eva G.A., Sidorovich I.G. Immunologiya: norma i patologiya. Ucheb-nik dlya studentov meditsinskikh vuzov i universitetov [Immunology: norm and pathology. Textbook for students of medical universities and universities]. M: Medicine Publ., 2010: 752 (in Russian).
43. Литвицкий П.Ф., Синельникова Т.Г. Врожденный иммунитет: механизмы реализации и патологические синдромы // *Вопросы современной педиатрии*. 2009; 8 (1): 59–61.
- Litvitskiy P.F., Sinel'nikova T.G. Vrozhdennyy immunitet: mekhanizmy realizatsii i patologicheskie sindromy [Innate immunity: mechanisms of realization and pathological syndromes] // *Voprosy sovremennoy pediatrii – Problems of Modern Pediatrics*. 2009; 8 (1): 59–61 (in Russian).

Поступила в редакцию 06.09.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Киншт Дмитрий Николаевич, канд. мед. наук, доцент, кафедра фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины, НГМУ, г. Новосибирск.

Мадонов Павел Геннадьевич, д-р мед. наук, зав. кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины, г. Новосибирск.

Шерстобоев Евгений Юрьевич, д-р мед. наук, профессор, зав. отделом иммунофармакологии НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Данилец Марина Григорьевна, д-р мед. наук, зав. отделом экспериментальных биологических моделей, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Трофимова Евгения Сергеевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория иммунофармакологии, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Лигачева Анастасия Александровна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, лаборатория иммунофармакологии, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Дыгай Александр Михайлович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, научный руководитель НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

(✉) Шерстобоев Евгений Юрьевич, e-mail: sherstoboev_eu@pharmso.ru.

УДК 578.245.4:616-097-099

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-144-154

For citation: Kinsht D.N., Madonov P.G., Sherstoboev E.Yu., Danilets M. G., Trofimova E. S., Ligacheva A.A., Dygai A.M. Immunotoxic effects of interferon alpha-2b, modified by immobilization by means of electron-beam synthesis technology. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 144–154.

Immunotoxic effects of interferon alpha-2b, modified by immobilization by means of electron-beam synthesis technology

Kinsht D.N.¹, Madonov P.G.¹, Sherstoboev E.Yu.², Danilets M. G.², Trofimova E. S.², Ligacheva A.A.², Dygai A.M.²

¹ *Novosibirsk State Medical University (NSMU)*
52, Krasny Av., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

² *Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (RIPRM) named after E.D. Goldberg, Tomsk National Research Medical Center (NRMC) of the Russian Academy of Sciences (RAS)*
3, Lenin Av., Tomsk, 634028, Russian Federation

ABSTRACT

The paper presents the results of investigation of immunotoxic action of interferon α -2b, immobilized in polyethylene glycol by means of electron-beam synthesis technology.

Materials and methods. In this study we used following methods: a preliminary assessment of immunotoxicity after single administration in wide range of doses, a study of the effect of the drug on the weight and cellularity of central and peripheral immune organs, an assessment of the phagocytic activity of peritoneal macrophages, a study of the effect of the drug on the phagocytic activity of neutrophils, an estimation of the level of serum hemagglutinins to sheep erythrocytes, an evaluation of the effect of the drug on the delayed-type hypersensitivity reaction induced by trinitrobenzenesulfonic acid.

Results. We have shown that the course application of the drug based on immobilized interferon α -2b in tenfold and hundredfold therapeutic doses has no immunotoxic action. At the same time, single administration of the drug at various doses and the therapeutic course application in tenfold dose leads to the stimulation of humoral immune responses. The course application of this drug in tenfold and hundredfold therapeutic dose enhances the phagocytic activity of peritoneal macrophages and peripheral blood neutrophils of experimental animals.

Key words: interferon alpha-2b, pegylation, immunotoxicity, humoral and cellular immune response, phagocytosis, mice F1 (CBA/C57Bl/6).

Received September 06.2017

Accepted November 08.2017

Kinsht Dmitriy N., PhD, Associate Professor, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidential Medicine, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation.

Madonov Pavel G., DM, Head of the Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidential Medicine, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation.

Sherstoboev Evgeniy Yu., DM, Professor, Head of the Department of Immunopharmacology, RIPRM named after E.D. Goldberg, TNIMC of RAS, Tomsk, Russian Federation.

Danilets Marina G., DBSc, Head of the Department of Experimental Biological Models, RIPRM named after E.D. Goldberg, TNIMC of RAS, Tomsk, Russian Federation.

Trofimova Evgeniya S., PhD, Senior Researcher, Department of Immunopharmacology, RIPRM named after E.D. Goldberg, TNIMC of RAS, Tomsk, Russian Federation.

Ligacheva Anastasiya A., PhD, Researcher, Department of Immunopharmacology, RIPRM named after E.D. Goldberg, TNIMC of RAS, Tomsk, Russian Federation.

Dygai Aleksandr M., DM, Professor, Academician of the RAS, Scientific Supervisor of RIPRM named after E.D. Goldberg, TNIMC of RAS, Tomsk, Russian Federation.

(✉) Sherstoboev Evgeniy Yu., e-mail: sherstoboev_eu@pharmso.ru.

УДК 616.5-002.525.2-039.11-092.6/.9

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-155-164

Для цитирования: Колесникова О.П., Гойман Е.В., Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Козлов В.А. Ранние маркеры фенотипической гетерогенности системной красной волчанки в экспериментальной модели. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 155–164.

Ранние маркеры фенотипической гетерогенности системной красной волчанки в экспериментальной модели

Колесникова О.П., Гойман Е.В., Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Козлов В.А.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФиКИ) 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

РЕЗЮМЕ

Цель работы – выявление на основе индуцируемой воспалительной реакции у интактных мышей предрасположенности к дальнейшему развитию разных клинических вариантов системной красной волчанки.

Материал и методы. Низкодозовый системный воспалительный ответ моделировали введением липополисахарида (ЛПС) интактным самкам мышей-гибридов (C57BL/6хDBA/2)F1 (B6D2F1) внутрибрюшинно в дозе 10 нг/мышь или 1 мкг/мышь. Динамику ответа на ЛПС оценивали через 2, 4, 8, 11, 24 ч, а также на 4- и 8-й нед от момента индукции модели по числу форменных элементов крови (лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов), а также соотношению нейтрофилы / лимфоциты (индекс N/L), уровню внеклеточной ДНК (внДНК). Через 1 сут после введения ЛПС у мышей индуцировали модель системной красной волчанки (СКВ): самкам мышей B6D2F1 вводили по 120×10^6 клеток селезенки мышей родительской линии DBA/2. Через 3 мес от момента индукции модели у мышей двукратно измеряли уровень белка в моче: при протеинурии 3 мг/мл и более мышей относили к группе СКВ^{нефрит+}, при наличии белка в моче менее 3 мг/мл – к группе СКВ^{нефрит-}.

Результаты. Установлено, что введение ЛПС не влияет на соотношение групп СКВ^{нефрит+}/СКВ^{нефрит-}. Ретроспективный анализ количества лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов не позволяет прогнозировать развитие нефрита. При введении ЛПС в дозе 10 нг/мышь наблюдалось достоверное увеличение частоты и абсолютного прироста индекса N/L на 8-й нед относительно 4-й нед после индукции модели в группе СКВ^{нефрит+} по сравнению с группой СКВ^{нефрит-}. При введении ЛПС в дозе 1 мкг/мышь мыши СКВ^{нефрит+} и СКВ^{нефрит-} обнаруживают разную динамику воспалительного ответа по приросту индекса N/L в каждой последующей точке относительно предыдущей. Изменение уровня внДНК в группе СКВ^{нефрит+} и СКВ^{нефрит-} аналогично динамике индекса N/L. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности использования параметров воспалительного процесса, в частности индекса N/L и уровня внДНК, для прогноза предрасположенности животного к развитию разных вариантов СКВ.

Ключевые слова: липополисахарид, индекс N/L, внДНК, модель системной красной волчанки, фенотипическая гетерогенность.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы активно развиваются исследования, связанные с изучением фенотипической разнородности аутоиммунных, аллергических,

онкологических заболеваний. Примером фенотипической гетерогенности системной красной волчанки (СКВ) у людей является наличие (более чем у половины больных) или отсутствие люпусного нефрита. Волчаночный нефрит является одним из серьезных проявлений и одним из самых

✉ Гойман Елена Владимировна, e-mail: lgoiman@mail.ru.

сильных предикторов неблагоприятного исхода СКВ.

Наиболее важным клинически релевантным проявлением болезни в модели СКВ на основе хронической реакции «трансплантат против хозяина в полуаллогенной системе» при переносе клеток одного из родителей реципиенту (parent-into- F1) $P \rightarrow F1$ [1], разработанной в лаборатории экспериментальной иммунотерапии НИИФиКИ, является фенотипическая разнородность – развитие разных клинических вариантов системной красной волчанки: СКВ^{нефрит+} и СКВ^{нефрит-}. После индукции модели через 3 мес в популяции генетически однородных гибридов F1 у всех мышей имелись признаки СКВ: спленомегалия, гипергаммаглобулинемия, продукция аутоантител к ДНК. При этом у части мышей с более выраженными симптомами СКВ развивается нефрит (СКВ^{нефрит+}), а у мышей с менее выраженными симптомами СКВ нефрит отсутствует – СКВ^{нефрит-} [2]. Показано, что наличие разных клинических вариантов СКВ^{нефрит-} и СКВ^{нефрит+} связано с преимущественной активацией соответственно Т-клеток-хелперов Th1 или Th2. А соотношение активности Th1- и Th2-субпопуляций, контролирующее выбор варианта, по которому пойдет развитие иммунного процесса в каждом конкретном случае, определяется не только генотипом, но и обусловленными эпигенетическими механизмами изменениями в иммунной системе, сформировавшимися на предыдущих этапах онтогенеза [3].

Сегодня понятно, что сложное взаимодействие между врожденным и адаптивным иммунным реагированием существует не только при антиинфекционной защите, но также при развитии аутоиммунного ответа [4]. Возможно, что соотношение групп мышей СКВ^{нефрит-} и СКВ^{нефрит+}, равное примерно 50/50 при стандартных условиях опыта (без каких-либо воздействий после индукции модели), обусловлено у части мышей эпигенетическими изменениями в системе врожденного иммунитета, определяющими более сильный воспалительный ответ, что в дальнейшем приведет к формированию группы СКВ^{нефрит+}. Для изучения эпигенетических механизмов в развитии воспаления в настоящее время апробируются разнообразные экспериментальные модели. К числу таких моделей относится модель экспериментальной низкодозовой эндотоксемии, когда здоровым людям-добровольцам внутривенно вводится липополисахарид (ЛПС).

Ответ на введение ЛПС у части здоровых лиц выявляет отклонения, характерные для больных

хроническими воспалительными заболеваниями (атеросклероз, диабет, неврологические воспаления, метаболический синдром). Реакция на внутривенное введение ЛПС, который активирует врожденный иммунитет и вызывает специфические метаболические последствия, расценивается как интегральный показатель сложных физиологических, молекулярных и генетических взаимодействий, определяющих воспаление у каждого конкретного индивидуума [5].

Цель работы – выявление на основе индуцируемой воспалительной реакции у интактных мышей предрасположенности к дальнейшему развитию разных клинических вариантов системной красной волчанки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В опыт были включены здоровые половозрелые 6–8-недельные мыши, содержащиеся в виварии в условиях, соответствующих требованиям эксперимента. Мыши получали гранулированный комбикорм, сбалансированный по потребностям в белках, жирах, углеводах, витаминах, минеральных веществах и микроэлементах в рациональных дозах (ГОСТ Р 50258-92). Все эксперименты проводили в стандартных условиях содержания животных, соблюдения температурного режима, освещенности. В работе использовали самок мышей-гибридов первого поколения (C57BL/6хDBA/2)F1 и самок мышей линий DBA/2, полученных из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных НИИФиКИ (г. Новосибирск).

Интактным самкам мышей-гибридов (C57BL/6хDBA/2)F1 (B6D2F1) внутрибрюшинно однократно вводили липополисахарид (ЛПС) *E. coli* штамма 111: B4 (Sigma, США) в дозе 10 нг/мышь или 1 мкг/мышь в физиологическом растворе. Динамику ответа на ЛПС оценивали через 2, 4, 8, 11, 24 ч, а также на 4- и 8-й нед от момента индукции модели по числу форменных элементов крови (лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов), а также соотношению нейтрофилы / лимфоциты (индекс N/L), уровню свободной ДНК. Индекс N/L – это результат деления абсолютного количества нейтрофилов на абсолютное количество лимфоцитов. Для выделения ДНК забор крови производили из хвостовой вены животных в пробирки, содержащие $3 \times$ PBS, 30 мМ ЭДТА (PBS – 10 мМ фосфатный буфер; pH 7,4; 0,15 М NaCl). Плазму отделяли от фракции кле-ток центрифугированием в течение 20 мин при 400 g. Для определения количества ДНК,

связанной с клеточной поверхностью, осадок клеток инкубировали 5 мин с 0,25%-м раствором трипсина, реакцию останавливали добавлением ингибитора трипсина из соевых бобов (143 мкг ингибитора на 1 мг фермента). Клетки осаждали центрифугированием при 400 g в течение 20 мин, отбирали супернатант (трипсиновая фракция). Выделение ДНК из полученных фракций проводили на колонках компании «БиоСилика» (Россия) согласно инструкции по применению «Набора для выделения ДНК из плазмы крови». Определение свободной циркулирующей ДНК (из плазмы крови) проводили с помощью флуоресцентного красителя PicoGreen. Концентрация ДНК пересчитывалась по калибровочной кривой, построенной для известных концентраций стандартной двухцепочечной λ ДНК. Через 1 сут после введения ЛПС у мышей-гибридов индуцировали модель СКВ: самкам B6D2F1 вводили клетки селезенки мышей родительской линии DBA/2 [6]. Каждая мышь-реципиент получала по $60-70 \times 10^6$ клеток путем внутривенной инъекции в хвостовую вену в объеме 0,5 мл среды двукратно с интервалом в 5–6 сут. Количество белка в моче определяли колориметрически с красителем Кумасси бриллиантовый синий, результаты выражали в мг/мл.

Через 3 мес от момента индукции модели у мышей двукратно измеряли уровень белка в моче: при протеинурии 3 мг/мл и более мышей относили к группе СКВ^{нефрит+}, при наличии белка в моче менее 3 мг/мл – к группе СКВ^{нефрит-} [7].

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики с использованием теста Манна – Уитни, критерия Пирсона χ^2 и пакета прикладных статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft, США) на персональном компьютере. Предварительный анализ вариационных рядов выявил асимметричность распределения признаков. Данные представлены в виде медианы *Me*. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РУЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После введения интактным реципиентам ЛПС в дозе 10 нг/мышь за 1 сут до индукции модели, через 12 нед у 20 мышей из 38 развился нефрит, у 18 мышей нефрита не было, то есть соотношение мышей СКВ^{нефрит+}/СКВ^{нефрит-} составило 53/47. При введении ЛПС в дозе 1 мкг/мышь из 19 мышей у 10 мышей развился нефрит, у 9 мышей – нет, соотношение составило 53/47. Таким

образом, введение ЛПС в дозе 10 нг/мышь и 1 мкг/мышь за 1 сут до индукции процесса не изменяет частоты вариантов СКВ^{нефрит+}/СКВ^{нефрит-}, которое при стандартных условиях опыта (двукратный перенос клеток селезенки) в среднем также примерно равно 50/50. Однако ранее установлено, что при введении в первые 2 нед после индукции модели соединений, изменяющих баланс Th1/Th2, наблюдается возможность модуляции процесса. Вещества, активирующие Th1-клетки (плазмида pUC19, дегидроэпиандростерон-сульфат), снижают частоту развития аутоиммунного гломерулонефрита; вещества, стимулирующие Th2-клетки (мурамилдипептид, бисфенол А, пентоксифиллин), увеличивают частоту этого клинического варианта в экспериментальной группе [8].

Известно, что введение ЛПС индуцирует иммунный ответ к ДНК: введение только ЛПС (без экзогенной ДНК) приводит к образованию анти-ДНК антител, что вызывает у интактных мышей заболевание, подобное волчанке. А у мышей NZB/W со спонтанной СКВ оно приводит к более ранней и ускоренной форме волчаночного нефрита, что связано с усилением поликлональной активации В клеток, увеличением титра анти-ДНК антител. Более того, начинающийся мезангиальный нефрит у мышей NZB/W под действием ЛПС трансформируется в диффузный пролиферативный нефрит [9].

Отсутствие влияния введенного интактным мышам ЛПС на соотношение СКВ^{нефрит+}/СКВ^{нефрит-}, то есть на исход развития СКВ, может быть связано с использованием в данном эксперименте малых доз ЛПС и однократным его применением, в то время как авторы процитированных выше работ использовали многократное введение гораздо более высоких доз ЛПС. В целом, несмотря на то что в большинстве исследований показано усиление Th1-ответа под действием ЛПС, его влияние на дифференцировку в Th2, Th17 и Treg зависит от дозы, пути иммунизации и видов адьюванта. Так, у мышей антиген-специфический Th2-ответ формируется в присутствии низких доз ЛПС (0,1 мкг), а Th1-ответ – при высоких дозах (100 мкг) ЛПС [10].

Как видно из данных, представленных на рис. 1, введение ЛПС в низкой дозе 10 нг/мышь не сопровождается изменениями числа лейкоцитов в динамике, через 2 ч наблюдается подъем количества нейтрофилов, который достигает максимума к 4-му ч, оставаясь достоверно высоким к 6-му ч. В период времени 2–4 ч у животных наблюдается выраженная лимфопения, к 24-му ч от

момента введения эндотоксина в крови нормализуется содержание нейтрофилов и лимфоцитов, что аналогично данным, полученными у людей [11]. В то же время введение ЛПС в дозе 1 мкг/мышь вызывает более выраженные гематологические изменения по сравнению с дозой 10 нг/мышь (см. рис. 1). Снижение числа лейкоцитов в периферической крови, которое наблюдается через 2 ч после инъекции эндотоксина, является одним из ранних изменений, связанных с секвестрацией лейкоцитов в тканях [12]. Последующее увеличение лейкоцитов в основном связано с увеличением их производства (мобилизации) из костного мозга. Кроме циркуляции в кровотоке нейтрофилы могут формировать маргинальные пулы в селезенке, легких, краевой пул в сосудах. Эти маргинальные нейтрофилы играют гомеостатические функции и обладают способностью мобилизоваться назад в циркуляцию. Однако время их пребывания в этих периферических участках остается неизвестным. Как увеличение, так и нормализация численности лейкоцитов (нейтрофилов) опосредуется колониестимулирующим фактором (Г-КСФ), цитокины ФНО α и ИЛ-1 β также играют ключевую роль в облегчении миграции лейкоцитов за счет увеличения экспрессии молекул адгезии на эндотелиальных клетках [13].

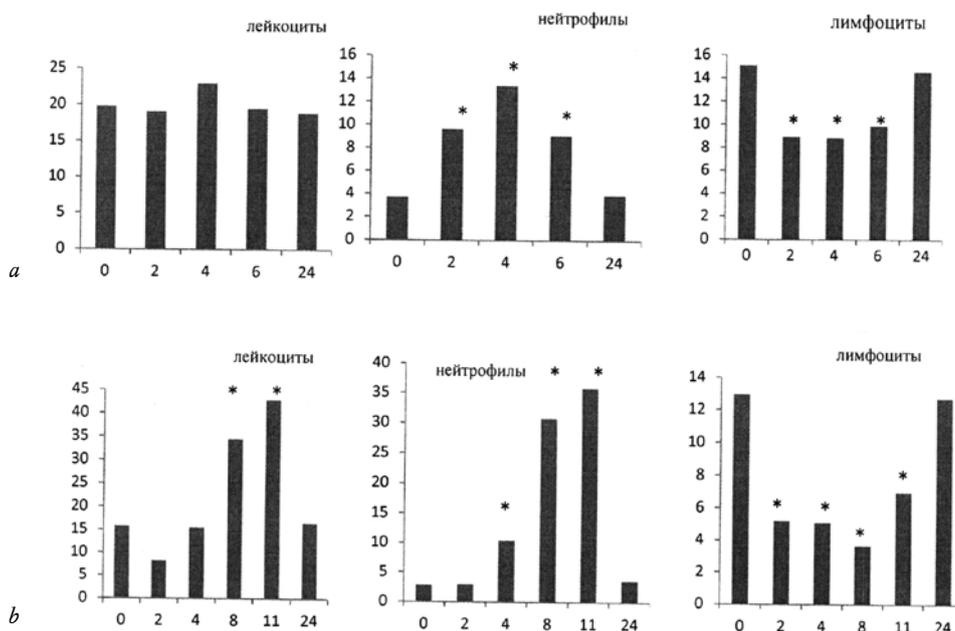


Рис. 1. Динамика изменения форменных элементов периферической крови мышей после введения разных доз ЛПС: *a* – доза ЛПС 10 нг/мышь; *b* – доза ЛПС 1 мкг/мышь. По оси абсцисс – время после введения ЛПС, ч. По оси ординат – количество клеток $\times 10^6/\text{мл}$. * $p < 0,05$ по сравнению с 0-м ч

Fig. 1. Evaluation of changes in the formed elements of mouse peripheral blood after the administration of different LPS doses: *a* – LPS dose 10 ng/mouse; *b* – LPS dose 1 mg/mouse; X-direction – time passed after LPS administration, hours; Y-direction – number of cells $\times 10^6/\text{ml}$; $p < 0,05$, as compared with 0 hour

Введение ЛПС в дозе 1 мкг/мышь и 10 нг/мышь сопровождается разной динамикой развития нейтрофилеза и лимфопении. Однако видно, что гематологические параметры в группе мышей с введением ЛПС в дозе 1 мкг/мышь через 24 ч также возвращаются к своим исходным значениям (см. рис. 1). Приведенные данные наглядно свидетельствуют о том, что введение ЛПС в дозах 10 нг/мышь и 1 мкг/мышь не приводит к необратимым изменениям картины крови. Таким образом, они являются, наряду с данными об отсутствии изменения баланса СКВ^{нефрит+}/СКВ^{нефрит-} в опыт-

ной группе мышей после введения ЛПС, дополнительным доказательством того, что введение ЛПС интактным животным не влияет на исход заболевания при дальнейшем введении животных в экспериментальную модель индуцированной СКВ.

Несмотря на то что при ответе на ЛПС в дозе 10 нг/мышь и 1 мкг/мышь в период 2–4 ч в крови мышей выявляются достаточно большие индивидуальные колебания параметров численности нейтрофилов (нейтрофилез) и лимфоцитов (лимфопения), ретроспективный анализ не вы-

явил возможности использовать их в качестве маркеров, позволяющих прогнозировать развитие СКВ в опытной группе мышей в направлении СКВ^{нефрит-} или СКВ^{нефрит+}. Кроме того, в стандартных условиях опыта – индукция модели без предварительного введения ЛПС – у мышей с выраженной лимфопенией и большими индивидуальными колебаниями лимфоцитов, которые выявляются в 1–3-ю нед после индукции модели, не удалось прогнозировать развитие СКВ^{нефрит-} или СКВ^{нефрит+} [14]. Изучение взаимодействия врожденного и адаптивного иммунитета в формировании хронического слабовыраженного воспаления, являющегося ключевой особенностью ряда патологических состояний (атеросклероза, диабета, онкологии, аутоиммунных заболеваний), обуславливает необходимость поиска новых экспериментальных моделей, повышения эффективности использования традиционных маркеров воспаления. К числу таких маркеров относится достаточно простой параметр – индекс N/L как биологический маркер системного воспаления

и предиктор, положительно коррелирующий с исходом заболеваний, обусловленных наличием хронического системного воспаления низкого уровня. Сегодня он является предиктором неблагоприятного прогноза рака и сердечно-сосудистых заболеваний среди населения в целом [15]. Хотя основной механизм изменения количества лейкоцитов может быть неодинаковым при различных патологических состояниях, характеризующихся наличием слабовыраженного воспаления, общий паттерн комбинированной нейтрофилии и лимфопении может обнаруживаться при этих стрессовых состояниях [16, 17].

Ретроспективный анализ средних значений индекса N/L в течение 1 сут после введения ЛПС в дозе 10 нг/мышь выявляет лишь тенденцию более раннего и более выраженного ответа на эндотоксин у животных, у которых впоследствии развился нефрит, но не выявил возможности использовать его в качестве маркера, позволяющего прогнозировать развитие СКВ в опытной группе мышей в направлении СКВ^{нефрит-} или СКВ^{нефрит+} (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Изменения индекса N/L у мышей после введения ЛПС в дозе 10 нг/мышь, Me					
Группа	Время, ч				
	0	2	4	6	24
СКВ ^{нефрит-} , n = 14	0,24 (0,2–0,5)	0,97 (0,3–2,1)	1,5 (0,4–3,9)	0,9 (0,5–1,7)	0,29 (0,11–0,6)
СКВ ^{нефрит+} , n = 14	0,3 (0,13–0,6)	1,5 (0,4–2,7)	1,9 (0,84–3,2)	0,9 (0,3–1,6)	0,23 (0,2–0,4)

Ретроспективный анализ средних значений лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов в группе СКВ^{нефрит-} и СКВ^{нефрит+} на более поздних сроках наблюдения – 4- и 8-й нед не выявляет каких-либо существенных различий. При этом средние значения и индивидуальные колебания индекса N/L также выявляют тенденцию его увеличения в группе СКВ^{нефрит+} по сравнению с группой СКВ^{нефрит-} на 8-й нед по сравнению с 4-й нед от момента индукции модели (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Средние значения индекса N/L у мышей после индукции СКВ, Me		
Группа	Время, нед	
	4	8
СКВ ^{нефрит-} , n = 13	0,29 (0,14–0,43)	0,27 (0,1–0,46)
СКВ ^{нефрит+} , n = 14	0,30 (0,12–0,52)	0,35 (0,07–0,79)

Для нормирования колебаний индекса N/L у каждого отдельного животного было подсчитано изменение (прирост/убыль) индекса N/L к 8-й нед относительно 4-й нед и установлено, что прирост индекса N/L в группах СКВ^{нефрит-} и СКВ^{нефрит+} достоверно отличался. У мышей СКВ^{нефрит+} выявлялся существенный прирост индекса N/L, и он составлял в среднем 25,1%, у мышей СКВ^{нефрит-} – в пределах ошибки измерения (1,5%).

Эти изменения в группах касаются и частотных характеристик: прирост индекса N/L выявляется у 10 из 14 мышей СКВ^{нефрит+}, и только у четырех из 13 мышей СКВ^{нефрит-} (уровень статистической значимости различий индекса прироста с наличием протеинурии по критерию Пирсона χ^2 соответствует $p < 0,05$).

Важно, что прирост индекса N/L выявляет подгруппу мышей СКВ^{нефрит+} до выявления протеинурии, которая начинает определяться у мышей этой группы на 10–12 нед от момента индукции модели. Аналогичные данные получены

в стандартной модели СКВ без введения ЛПС у 15 интактных животных. Через 12 нед мыши были разделены на группы: восемь мышей составили группу СКВ^{нефрит+}, семь мышей – СКВ^{нефрит-}. Ретроспективный анализ средних значений индекса N/L на 4- и 5-й нед не выявил каких-либо существенных различий в группах. Прирост индекса на 5-й нед относительно 4-й нед у мышей СКВ^{нефрит+} составил в среднем 70%, тогда как в группе СКВ^{нефрит-} – в пределах ошибки измерения (1,4%).

По литературным данным известно, что значение индекса N/L является хорошим прогностическим маркером: у пациентов с СКВ индекс N/L достоверно выше по сравнению со здоровыми людьми. Средние значения индекса у больных СКВ с люпусным нефритом достоверно выше, чем у больных без нефрита, что позволяет отнести его к перспективным маркерам, отражающим поражение почек у пациентов с СКВ, который имеет преимущества по сравнению с определением креатинина и измерением суточной протеинурии: он более дешев, быстро и легко измеряется [18].

Таким образом, в экспериментальной модели СКВ выявлялся достоверный прирост значений индекса N/L на 8-й нед относительно 4-й. Мы полагаем, что достоверный прирост этого показателя связан с началом развития нефрита в группе мышей СКВ^{нефрит+}, что согласуется с данными у человека [19]. Возможность обнаружить группу мышей СКВ^{нефрит+} на сроке 8 нед по приросту индекса N/L представляется важным, так как в этот срок у мышей не выявлялась протеинурия,

на основании которой мыши были включены в фенотипически разнородные группы СКВ^{нефрит+} и СКВ^{нефрит-}. Стоит отметить, что группа СКВ^{нефрит-} – это группа мышей, у которых отмечаются минимальные морфологические изменения в почках, не приводящие к значимой протеинурии, что близко клиническим наблюдениям. Морфологические изменения в почках определяются практически у всех больных СКВ, тогда как клинические признаки поражения почек выявляются у 50–80% больных [20]. Сравнение представленных данных с изменением индекса N/L при СКВ чел. У людей в периферической крови выявляются преимущественно полиморфноядерные клетки, тогда как у мышей примерно 79% всех ядродержащих клеток – мононуклеарные. При оценке трансляционных возможностей экспериментальных моделей расстройств иммунитета у животных и человека эти различия морфологической картины крови в литературе не обсуждаются. Многие исследования на мышах в настоящее время выполняются с нейтрофилами, выделенными из костного мозга, хотя, как известно, нейтрофилы костного мозга неоднородны и функционально незрелы.

Ретроспективный анализ ответа интактных мышей на ЛПС в дозе 1 мкг/мышь показал, что мыши в последующем разделившиеся на группу СКВ^{нефрит-} и СКВ^{нефрит+} проявляют разную кинетику воспалительного ответа, определяемую по индексу N/L: у мышей СКВ^{нефрит+} ответ развивается быстрее по сравнению с мышами СКВ^{нефрит-} (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Индекс N/L у мышей после введения ЛПС в дозе 1 мкг/мышь, Me						
Группа	Время, ч					
	0	2	4	8	11	24
СКВ ^{нефрит-} , n = 4	0,2 (0,07–0,3)	0,54 (0,35–1,13)	1,9 (1,1–3,3)	9,1 (6,7–11,5)	6,6 (4,9–8,1)	0,24 (0,04–0,52)
СКВ ^{нефрит+} , n = 6	0,2 (0,19–0,3)	0,57 (0,25–0,96)	2,5 (1,3–4,9)	8,9 (4,9–13,3)	5,6 (2,3–13,2)	0,4 (0,3–0,5)

Как видно из данных табл. 3, максимальные различия по средним значениям индекса N/L у мышей СКВ^{нефрит-} и СКВ^{нефрит+} выявляются через 4 ч после введения ЛПС в дозе 1 мкг/мышь. Поскольку более существенный прирост индекса

наблюдается у мышей из группы СКВ^{нефрит+} в период 2–4 ч, а у мышей из группы СКВ^{нефрит-} в период 4–8 ч, был рассчитан прирост индекса N/L на каждый последующий час относительно предыдущего часа (табл. 4).

Т а б л и ц а 4

Прирост индекса N/L в крови мышей после введения ЛПС в дозе 1 мкг/мышь					
Группа	Время, ч				
	0	4	8	11	24
СКВ ^{нефрит-} , n = 9	0,2	3,0	4,8	0,2	0,9
СКВ ^{нефрит+} , n = 10	0,2	5,8	3,2	0,6	0,9

Таким образом, ретроспективный анализ изменения индекса N/L у мышей при введении ЛПС в дозе 1 мкг/мышь до индукции модели показал, что мыши, впоследствии включенные в группы СКВ^{нефрит+} и СКВ^{нефрит-}, проявляют разную динамику воспалительного ответа, определяемую по приросту индекса N/L в каждой определяемой точке – 0 ч, 4, 8, 11, 24 ч относительно предыдущей. У мышей СКВ^{нефрит+} ответ развивается сильнее и быстрее по сравнению с мышами СКВ^{нефрит-}. У мышей СКВ^{нефрит+} максимум ответа наблюдается через 4 ч, у мышей СКВ^{нефрит-} – 8 ч.

Одной из отличительных черт СКВ является наличие антител к двухцепочечной ДНК. Появление в организме внеклеточных нуклеиновых кислот напрямую связано с протекающими в организме процессами воспаления, приводящими к гибели клеток и нарушениям клиренса погибающих клеток. Таким образом, определение уровня внеклеточной ДНК (внДНК) представляется подходящим маркером для определения динамики протекания и степени заболевания. Был определен уровень внДНК в плазме интактных животных до и после введения ЛПС в дозе 1 мкг/мышь. Ретроспективный анализ показал, что мыши, в последующем включенные в группы СКВ^{нефрит-} и СКВ^{нефрит+}, имели разную динамику изменения уровня внДНК. В среднем в группе мышей с СКВ^{нефрит+} уровень внДНК повышался, а затем снижался раньше, чем у мышей с СКВ^{нефрит-} (рис. 2). При сравнении данных табл. 4 и рис. 2 видно, что изменения

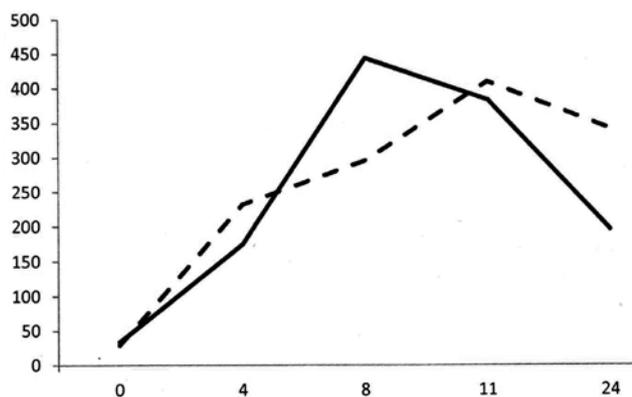


Рис. 2. Ретроспективный анализ средних значений уровня внеклеточной ДНК в плазме интактных животных после введения ЛПС 1 мкг/мышь. Пунктирная линия – СКВ^{нефрит-}; сплошная линия – СКВ^{нефрит+}. По оси абсцисс – время после введения ЛПС, час; по оси ординат – концентрация внДНК, нг/мл

Fig. 2. Retrospective analysis of mean values of extracellular DNA level of in plasma of intact animals after LPS administration 1 mg/mouse: dashed line – systemic lupus erythematosus^{nephritis}; continuous line – systemic lupus erythematosus^{nephritis+}; X-direction – time passed after LPS administration, hours; Y-direction – amount of extracellular DNA, ng/ml

индекса N/L и уровня внДНК каждой из подгрупп имеют сходную динамику. Так, в группе СКВ^{нефрит+} через 4 ч выявляется максимум ответа по индексу N/L, а со сдвигом на 4 ч определяется максимум уровня внДНК. В группе СКВ^{нефрит-} максимум ответа по индексу N/L выявляется через 8 ч, а со сдвигом на 4 ч определяется максимум уровня внДНК. Феномен повышенной концентрации внДНК в крови определяется как отличительный признак не только при патологических состояниях, протекающих с острым воспалением (инсульт, сепсис, травма, инфаркт миокарда), но и при хронических воспалительных процессах, включая онкологические, аутоиммунные заболевания, напряженные физические нагрузки, и обусловлен воспалением или aberrантной (усиленной) гибелью клеток. Несмотря на то что патофизиологический смысл этого феномена остается малопонятным, уровень внДНК рассматривается не только в качестве биомаркера клеточной гибели, содержащего общую оценку процессов гибели клеток, но и биомаркера прогноза этих процессов и возможную терапевтическую мишень [21]. Сегодня внДНК известна не только как биомаркер, но описаны ее потенциальные функциональные эффекты – способность избирательно стимулировать продукцию провоспалительного цитокина ИЛ-6 моноцитами человека [22]. На основе представленных данных достаточно затруднительно судить об источнике внДНК. Можно предполагать, что появление внДНК связано с образованием нейтрофильных внеклеточных ловушек (НЕТоза). Известно, что ЛПС используется в условиях *in vitro* как индуктор НЕТоза. По данным [23], у больных СКВ наличие активного люпусного нефрита коррелирует с повышенным уровнем свДНК в плазме, обусловленным нарушением регуляции НЕТоза у этих больных.

Новые исследования показали, что TLRs являются ключевыми регуляторами как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа, и посттрансляционные модификации могут приводить к изменению их функциональной активности [24]. Изменение передачи сигналов TLRs модулирует функцию дендритных клеток (ДК), связывающих врожденный и адаптивный иммунный ответ. Выключение в ДК миелоидного фактора дифференцировки 88 – ключевого адаптора в передаче TLRs-сигнала – приводит к преимущественной ингибции дифференцировки Th1 и соответственно изменению баланса Th1/Th2 продукции цитокинов в сторону Th2-клеток (т.е. увеличению секреции цитокинов Th2 типа IL-4 и IL-5) и соответственно торможению аллоиммунного ответа [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлена взаимосвязь гетерогенности ответа интактных конвенциональных мышей-гибридов B6D2F1 на введение ЛПС до индукции СКВ с последующим развитием разных клинических вариантов СКВ (с нефритом и без нефрита). Модель поляризации Th1/Th2 иммунного ответа в полуаллогенной системе DBA/2 → B6D2F1, приводящая к формированию разных клинических исходов СКВ^{нефрит-} и СКВ^{нефрит+}, представляет собой чувствительную к воздействиям систему. Она не только служит для оценки воздействий на баланс субпопуляций Th1/Th2 *in vivo*, определяющих соответствующий адаптивный иммунный ответ, но также для изучения эпигенетических изменений в системе врожденного иммунитета, детерминирующих в дальнейшем формирование адаптивного иммунного реагирования. Разная динамика ЛПС-индуцированного воспалительного ответа, оцениваемая у интактных мышей с помощью индекса N/L и внДНК и соотношенная с формированием разных клинических вариантов СКВ, свидетельствует о перспективности использования данного подхода для оценки эпигенетических изменений в системе врожденного иммунитета и прогноза возможного исхода заболевания.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии финансовой поддержки при проведении исследований.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено этическим комитетом НИИФиКИ (протокол № 92 от 10.11.2015 г.)

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Xu Y., Zeumer L., Reeves W., More L. Induced murine models of systemic lupus erythematosus // *Methods Mol. Biol.* 2014; 1134: 103–130.
- Kudaeva O.T., Kolesnikova O.P., Goiman E.V., Tkachev V.O., Volsky N.N., Perminova O.M., Gavrilova E.D., Kozlov V.A. The Experimental Model of the Autoimmune Glomerulonephritis Induced by the Chronic Graft versus Host Reaction. In: Prabhakar S. (Ed.). An Update on

Glomerulopathies – Etiology and Pathogenesis. InTech, 2011: 49–86. ISBN 978-953-307-388-0.

- Kolesnikova O.P., Kudaeva O.T., Volsky N.N., Goiman E.V., Gavrilova E.D., Perminova O.M., Demchenko E.N., Kozlov V.A. Экспериментальная модель аутоиммунного процесса: роль эпигенетической изменчивости в популяции мышей-гибридов // *Вестник РАМН.* 2015; 70 (2): 152–158.

Kolesnikova O.P., Kudaeva O.T., Volsky N.N., Goiman E.V., Gavrilova E.D., Perminova O.M., Demchenko E.N., Kozlov V.A. Eksperimental'naya model' autoimmunnogo protsessa: rol' epigeneticheskoy izmenchivosti v populyatsii myshey-gibridov. [Experimental model of autoimmune process: the role of epigenetic variability in the population of hybrid mice] // *Vestnik RAMN – Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2015; 70 (2): 152–158 (in Russian).

- Salem D., Subang R., Laplante P., Levine J.S., Rauch J. The dual role of innate immunity in antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus // *Lupus.* 2014; 23 (12):1327–1331.

- Patel P.N., Shah R.Y., Ferguson J.F., Reilly M.P. Human Experimental Endotoxemia in Modeling the Pathophysiology, Genomics and Therapeutics of Innate Immunity in Complex Cardiometabolic Diseases // *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 2015; 35 (3): 525–534.

- Kimura M., Gleichmann E. Depressed antibody responses to exogenous antigens in mice with lupus-like graft-versus-host disease // *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1987; 43 (1): 97–109.

- Kolesnikova O.P., Kudaeva O.T., Loginov V.A., Robinson M.V., Kolesnikova S.M., Kozlov V.A. Показатели эритро- и иммунопоеза в развитии аутоиммунных заболеваний, индуцированных хронической реакцией трансплантат против хозяина // *Вестн. АМН СССР.* 1991; 12: 13–16.

Kolesnikova O.P., Kudaeva O.T., Loginov V.A., Robinson M.V., Kolesnikova S.M., Kozlov V.A. Pokazateli eritro-i immunopoeza v razvitii autoimmunnykh zabolevaniy, indutsirovannykh khronicheskoy reaktsiyey transplantat protiv khozyaina [The parameters of erythro- and immunopoiesis in the development of autoimmune diseases induced by the chronic graft versus host reaction] // *Vestnik AMN SSSR.* 1991; 12: 13–16 (in Russian).

- Vlasov V.V., Rykova E.Yu., Safronova I.V., Laktionov P.V., Kudaeva O.T., Kozlov V.A. Модуляция течения хронической реакции трансплантат против хозяина // *Доклады академии наук.* 2002; 32 (6): 844–846.

Vlasov V.V., Rykova E.Yu., Safronova I.V., Laktionov P.V., Kudaeva O.T., Kozlov V.A. Modulyatsiya techeniya khronicheskoy reaktsii transplantat protiv khozyaina [Modulation of the course of the chronic graft-versus-host reaction] // *Doklady akademii nauk.* 2002; 32 (6): 844–846 (in Russian).

- Cavallo T., Granholm N. Accelerated (proliferative) lupus nephritis // *American Journal of Pathology.* 1990; 137 (6): 1549–1551.

10. Eisenbarth S., Piggott D., Huleatt J., Visintin I., Herrick C., Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen // *J. Exp. Med.* 2002; 196: 1645–1651.
11. Kiers D., Koch R., Hamers L., Gerretsen J., Thijs E., van Ede L., Riksen N., Kox M., Pickkers P. Characterization of a model of systemic inflammation in humans in vivo elicited by continuous infusion of endotoxin // *Scientific Reports.* 2017; 7: 40149. DOI: 10.1038/srep40149.
12. Pajkrt D., Manten A., van der Poll T., Tiel-van Buul M.M., Jansen J., Wouter ten Cate J., van Deventer S. Modulation of cytokine release and neutrophil function by granulocyte colony-stimulating factor during endotoxemia in humans // *Blood.* 1997; 90: 1415–24.
13. Marsik C., Mayr F., Cardona F., Schaller G., Wagner O., Jilma B. Endotoxin down-modulates P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) on neutrophils in humans // *J. Clin. Immunol.* 2004; 24: 62–65.
14. Гойман Е.В., Кудяева О.Т., Ильина Н.А., Борисов В.И., Кожевников В.С., Колесникова О.П., Козлов В.А. Процессы гомеостатической пролиферации в патогенезе аутоиммунного гломерулонефрита, индуцированного хронической реакцией «трансплантат против хозяина» // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2010; 149 (1): 60–63.
- Goiman E.V., Kudaeva O.T., Ilna N.A., Borisov V.I., Kozhevnikov V.S., Kolesnikova O.P., Kozlov V.A. Processes of homeostatic proliferation in the pathogenesis of autoimmune glomerulonephritis, induced by the chronic “graft versus host” reaction // *Bulleten' eksperimental'noj biologii i mediciny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2010; 149 (1): 60–63 (in Russian).
15. Li H., Lu X., Xiong R., Wang S. High Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predicts Cardiovascular Mortality in Chronic Hemodialysis Patients // *Mediators Inflamm.* 2017. DOI: 10.1155/2017/9327136.
16. Seong M.K. Prognostic inflammation score in surgical patients with colorectal cancer // *Korean. Med. Sci.* 2015; 30: 1793–1799.
17. Huang W., Huang J., Liu Q., Lin F., He Z., Zeng Z., He L. Neutrophil-lymphocyte ratio is a reliable predictive marker for early-stage diabetic nephropathy // *Clin. Endocrinol.* 2014; 82: 229–33.
18. Chen Y., Yang X., Chen L., Yang Y. Neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) were associated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus // *International Immunopharmacology.* 2016; 36: 94–99.
19. Li L., Xia Y., Chen C., Cheng P., Peng C. Neutrophil-lymphocyte ratio in systemic lupus erythematosus disease: a retrospective study // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8 (7): 11026–11031.
20. Waldman M., Madaio M.: Pathogenic autoantibodies in lupus nephritis // *Lupus.* 2005; 14: 19–24.
21. Lam N.Y.L., Rainer T.H., Chan L.Y.S., Joynt G.J., Lo Y.M.D. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients // *Clin. Chem.* 2003; (49): 1286–1291.
22. Atamaniuk J., Kopecky C., Skoupy S., Sdemann M.D., Weichhart T. Apoptotic cell-free DNA promotes inflammation in haemodialysis patients // *Nephrol. Dial. Transplant.* 2012; 27 (3): 902–905. DOI: 10.1093/ndt/gfr695.
23. Zhang S., Lu X., Shu X., Tian X. et al. Elevated plasma cfDNA may be associated with active lupus nephritis and partially attributed to abnormal regulation of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with systemic lupus erythematosus // *Intern. Med.* 2014; 53: 2763–71.
24. Leifer C.A., Medvedev A.E. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling // *J. Leukoc Biol.* 2016; 100 (5): 927–941.
25. Bao W., Qin X., Guan N., Wang S., Zhu J., Sun X., Zhou H., Zhu Z., Zhu C. MyD88-silenced dendritic cells induce T-cell hyporesponsiveness and promote Th2 polarization in vivo // *Cytotherapy.* 2015; 17: 1240–1250.

Поступила в редакцию 28.04.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Колесникова Ольга Петровна, д-р мед. наук, зав. лабораторией экспериментальной иммунотерапии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Гойман Елена Владимировна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория экспериментальной иммунотерапии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Гаврилова Елена Давидовна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, лаборатория экспериментальной иммунотерапии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Демченко Елена Николаевна, канд. хим. наук, науч. сотрудник, лаборатория экспериментальной иммунотерапии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Козлов Владимир Александрович, академик РАН, научный руководитель НИИФиКИ, г. Новосибирск.

(✉) Гойман Елена Владимировна, e-mail: l.goiman@mail.ru.

УДК 616.5-002.525.2-039.11-092.6/.9

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-155-164

For citation: Kolesnikova O.P., Goiman E.V., Gavrilova E.D., Demchenko E.N., Kozlov V.A. Early markers of phenotypic heterogeneity in the induced model of systemic lupus erythematosus. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 155–164.

Early markers of phenotypic heterogeneity in the induced model of systemic lupus erythematosus

Kolesnikova O.P., Goiman E.V., Gavrilova E.D., Demchenko E.N., Kozlov V.A.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14, Str. Yadrintsevskaya, 630099, Novosibirsk, Russian Federation

ABSTRACT

The study aimed at evaluating the predisposition for development of different variants of SLE based on an inflammatory response in intact mice.

Materials and methods. Low-dose systemic inflammatory response was modeled by the administration of lipopolysaccharide (LPS) of *E. coli* (strain 111: B4) by intact B6D2F1 recipients in the dose of 10 ng/mouse or 1 µg / mouse. We evaluated the number of leukocytes, neutrophils, and lymphocytes in the blood, the index of neutrophils / lymphocytes (ratio N/L), and the level of free DNA (cf DNA cell free) in dynamics. The first day after LPS injection we induced SLE model: the female B6D2F1 mice were injected 60–70 x 10⁶ spleen cells of the DBA / 2 parent mice twice with interval five days. Three months after the induction of the model, the level of protein in the urine was measured twice: the mice with proteinuria 3 mg/ml and more were assigned to the group SLE^{nephritis+}, and mice with less than 3 mg/ml of protein in the urine were assigned to the group SLE^{nephritis-}.

Results. It was established that administration of LPS does not change the frequency of nephritis in mice. The retrospective analysis of the number of leukocytes, neutrophils, and lymphocytes does not allow the prediction of the development of nephritis. We observed a significant increase in the frequency and the absolute value of the N/L index at week 8 relative to 4 weeks four weeks before the appearance of proteinuria in the group of mice SLE^{nephritis+} in contrast to mice SLE^{nephritis-} when LPS was administered at a dose of 10 ng/mouse. Mice SLE^{nephritis+} and SLE^{nephritis-} show different kinetics of the inflammatory response by an increase in the N/L index every subsequent hour relative to the previous one when LPS was administered at a dose of 1 µg/mouse. The dynamics of the cfDNA level is similar to the kinetics of an index N/L in the group SLE^{nephritis+} and the SLE^{nephritis-}. The data obtained indicate the possibility of using of the index N/L and cfDNA level as a parameter of inflammatory response in mice and prediction of the susceptibility the development of nephritis.

Key words: LPS, index N/L, cfDNA, SLE model, phenotyping heterogeneity.

Received April 28.2017

Accepted November 08.2017

Kolesnikova Olga P., DM, Head of the Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

Goiman Elena V., PhD, Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

Gavrilova Elena D., PhD, Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

Demchenko Elena N., PhD, Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

Kozlov Vladimir A., Academician of the Russian Academy of Sciences, Scientific Supervisor of the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) Goiman Elena V., e-mail: l.goiman@mail.ru.

УДК 616.33-006.6:577.112

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-165-172

Для цитирования: Колобовникова Ю.В., Дмитриева А.И., Янкович К.И., Васильева О.А., Пурлик И.Л., Новицкий В.В., Уразова О.И. Галектин-1-опосредованная экспрессия белков-регуляторов клеточного цикла и ростовых факторов при раке желудка. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 165–172.

Галектин-1-опосредованная экспрессия белков-регуляторов клеточного цикла и ростовых факторов при раке желудка

Колобовникова Ю.В.¹, Дмитриева А.И.^{1,2}, Янкович К.И.^{1,2}, Васильева О.А.¹, Пурлик И.Л.^{1,2}, Новицкий В.В.¹, Уразова О.И.¹, Хардикова С.А.

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер» (ТООД)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 115

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – проанализировать экспрессию белков-регуляторов клеточного цикла (p53 и p21) и рецепторов к эндотелиальному и эпидермальному факторам роста (VEGFR и EGFR) в зависимости от экспрессии галектина-1 в опухолевых клетках при раке желудка.

Материал и методы. Обследованы 52 пациента с диагнозом рака желудка. Материалом исследования служили образцы тканей злокачественных новообразований желудка, полученные при оперативном вмешательстве. Методом иммуногистохимии в опухолевой ткани оценивали экспрессию галектина-1, белков p53 и p21, рецепторов VEGF и EGF. Полученные результаты анализировались статистическими методами.

Результаты. Показано, что у больных раком желудка, сопровождающимся гиперэкспрессией галектина-1, достоверно чаще регистрируется высокая экспрессия мутантного белка p53 и EGFR в опухолевой ткани. У всех пациентов с раком желудка независимо от уровня экспрессии галектина-1 опухолевыми клетками зарегистрирована низкая экспрессия VEGFR. Установлена ассоциация экспрессии галектина-1 опухолевыми клетками с экспрессией в них белка p53 и рецептора EGF.

Заключение. Взаимосвязь гиперэкспрессии галектина-1 с высоким уровнем экспрессии мутантного белка p53 (не проявляющим антионкогенных свойств) и рецептора к эпидермальному фактору роста EGFR опухолевыми клетками желудка, является негативным прогностическим критерием опухолевого процесса при раке желудка.

Ключевые слова: галектины, клеточный цикл, ангиогенез, рак желудка.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема ранней диагностики и своевременного лечения рака желудка актуализирует необходимость детального изучения молекулярных механизмов трансформации опухолевых клеток

и факторов прогрессии опухоли. Взаимодействие клеток опухоли с элементами микроокружения опосредовано функционированием многих регуляторных молекул, в том числе галектинов. Гликан-связывающие протеины экспрессируются многими клетками и участвуют в регуляции

✉ Колобовникова Юлия Владимировна, e-mail: kolobovnikova.julia@mail.ru.

процессов пролиферации, апоптоза, неоваскуляризации и др. [1]. Одним из механизмов действия галектинов на клетки является их взаимодействие с белками-регуляторами клеточного цикла. Негативным регулятором клеточного цикла является белок p53, который выступает в роли транскрипционного фактора для генов P21 и P27 [2]. По данным литературы, галектин-1-опосредованное накопление ингибиторов клеточного цикла p21 и p27 вызывает остановку пролиферации клеток [3].

Вместе с тем галектин-1 способен регулировать неоангиогенез в опухолях. По сведениям J. Folkman (2006), опухоли с интенсивно развитой в них сетью неопластических сосудов характеризуются быстрым ростом и склонны к гематогенному метастазированию [4, 5]. Ключевым фактором ангиогенеза является фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), реализующий свои функции через рецептор VEGFR [6]. Примечательно, что VEGFR экспрессируется не только эндотелиальными клетками, но и клетками опухолей [7], что обуславливает способность VEGF непосредственно влиять на гомеостаз опухолевых клеток. Еще один фактор, способный активировать пролиферацию онкотрансформированных клеток, – эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor, EGF). Взаимодействие данного фактора с рецептором EGFR может инициировать синтез ДНК в клетках и образование онкогенных белков [8]. Дисбаланс галектин-зависимой экспрессии белков-регуляторов клеточного цикла и факторов роста может быть ключевым молекулярным изменением в патогенезе злокачественных новообразований различной локализации.

Цель настоящего исследования – определить взаимосвязь экспрессии галектина-1 опухолевыми клетками при раке желудка с экспрессией в них белков-регуляторов клеточного цикла (p53, p21) и рецепторов к эндотелиальному и эпидермальному факторам роста (VEGFR и EGFR).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В программу исследования включены 52 пациента с раком желудка, находившиеся на лечении и состоящие на диспансерном учете в ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер» (ОГАУЗ «ТООД»). Пациенты были разделены на две группы в зависимости от экспрессии галектина-1 опухолевыми клетками. Группу больных раком желудка с высокой экспрессией галектина-1 в опухолевой ткани составили 27 человек (средний возраст $(67,3 \pm 4,5)$ лет), а с низкой экспрес-

сией галектина-1 в опухолевой ткани – 25 человек (средний возраст $(61,9 \pm 5,8)$ лет). Критерии исключения пациентов из исследования: наличие хронических воспалительных процессов, психических, аутоиммунных и (или) наследственных заболеваний, аллергии и паразитарных инвазий, а также опухолей других локализаций.

Материалом для исследования служили архивные образцы тканей злокачественных новообразований желудка, полученные при оперативном вмешательстве до начала проведения цитостатической и лучевой терапии. Образцы опухолевой ткани заключались в парафин. Исследование экспрессии галектина-1, белков p53 и p21, а также VEGFR и EGFR в опухолевой ткани проводили методом иммуногистохимии на парафиновых срезах с последующим докрасиванием гематоксилином с применением автоматического иммуногистостейнера Bond-maX (Leica Biosystems, Германия). В исследовании использовали антитела фирмы GeneTex к галектину-1 (поликлональные, рабочее разведение 1 : 500, кроличьи), моноклональные антитела к p53 (клон DO-7, RTU, мышинные) и p21 (клон 4D10, рабочее разведение 1 : 40, мышинные), а также антитела к VEGFR (клон KLT9, рабочее разведение 1 : 100, мышинные) и EGFR (клон EGFR.25, RTU, мышинные) фирмы Leica Biosystems (Германия). Оценку экспрессии исследуемых белков в опухолевой ткани осуществляли полуколичественным способом в участках максимальной экспрессии белка («горячих точках»), что более воспроизводимо, чем в случайных полях зрения.

При оценке результатов экспрессии галектина-1 в опухолевых клетках учитывали цитоплазматическую и ядерную реакции окрашивания. Экспрессию галектина-1 считали низкой при отсутствии окрашивания, выявлении окрашивания любой интенсивности (менее 25% опухолевых клеток) или слабого окрашивания (до 50% опухолевых клеток). Обнаружение интенсивной положительной реакции более 25% клеток и положительного окрашивания любой интенсивности более чем 50% опухолевых клеток расценивали как высокую экспрессию галектина-1 [9].

При исследовании экспрессии белка p53 оценивали долю клеток с позитивно окрашенными ядрами. Экспрессию белка p53 считали высокой, если количество окрашенных клеток превышало 75% (сильное окрашивание) или варьировало в диапазоне 26–75% (умеренное окрашивание). В случае, когда количество окрашенных клеток было менее 25%, либо ядерная реакция в ткани отсутствовала, уровень экспрессии мутантного

белка p53 расценивали как низкий [2]. Анализ экспрессии белка p21 осуществляли также по количеству опухолевых клеток с положительно окрашенными ядрами. Низкой считали экспрессию белка p21, если количество окрашенных клеток было менее 10%, либо ядерная реакция в ткани отсутствовала. Позитивное умеренное (10–50%) и сильное (более 50%) окрашивание расценивали как высокую экспрессию фактора [10].

При анализе экспрессии VEGFR в опухолевых клетках учитывали мембранную и цитоплазматическую реакции окрашивания. Отсутствие окрашивания или выявление слабого по интенсивности окрашивания менее чем в 25% опухолевых клеток оценивали как низкую экспрессию VEGFR, при обнаружении сильного окрашивания менее 25% клеток и позитивной реакции любой интенсивности в более чем 25% опухолевых клетках – как высокую экспрессию рецептора [11]. Экспрессию EGFR оценивали только на мембране опухолевых клеток и считали низкой при выявлении продукта реакции менее чем на 10% клеток опухоли или незначительном количестве маркера на части мембраны более чем 10% опухолевых клеток. Умеренное количество продукта реакции на более чем 10% клеток опухоли, а также наличие ярко выраженного окрашивания по всей мембране более чем 10% опухолевых клеток интерпретировали как высокий уровень экспрессии EGFR [12].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программы SPSS. Для расчета достоверности различий между исследуемыми группами проводили анализ таблиц сопряженности с использованием критерия χ^2 Пирсона. В том случае, если хотя бы в одной ячейке ожидаемая частота принимала значение от 5 до 9, критерий χ^2 рассчитывался с поправкой Йетса. Различия сравниваемых величин считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для определения силы связи между переменными вычисляли коэффициент ϕ [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам иммуногистохимического исследования установлено, что у пациентов с раком желудка с высокой экспрессией галектина-1 достоверно чаще регистрируется высокий уровень экспрессии мутантного белка p53 опухолевыми клетками (табл. 1). Одновременно с этим выявлена связь средней силы между экспрессией галектина-1 и белком p53 в опухолевой ткани ($\phi = 0,321$). Гиперэкспрессия белка p53 при раке

желудка обусловлена накоплением его мутантной формы, не проявляющей антионкогенных свойств. При исследовании экспрессии опухолевыми клетками белка p21 нами был зарегистрирован высокий ее уровень у пациентов с раком желудка в сочетании с низкой экспрессией галектина-1, однако различия между исследуемыми группами не достигали статистически значимого уровня (см. табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Экспрессия белков-регуляторов клеточного цикла p53 и p21 в опухолевой ткани у пациентов с раком желудка				
Группа пациентов	Экспрессия белка p53		Экспрессия белка p21	
	Низкая	Высокая	Низкая	Высокая
С отсутствием или низкой экспрессией галектина-1, абс. (%)	19 (76,0)	6 (24,0)	5 (20,0)	20 (80,0)
С высокой экспрессией галектина-1, абс. (%)	12 (44,4)	15 (55,6)	11 (40,7)	16 (59,3)
	$\chi^2 = 5,369$; $p < 0,05$; $\phi = 0,321$		$\chi^{2*} = 1,738$; $p > 0,05$	

* с поправкой Йетса.

В результате проведенного анализа ассоциаций экспрессии галектина-1 с экспрессией рецепторов эндотелиального и эпидермального факторов роста опухолевыми клетками при раке желудка статистически значимая взаимосвязь выявлена только в отношении экспрессии галектина-1 и рецептора к EGF. Установлено, что в опухолях желудка с высокой экспрессией галектина-1 достоверно чаще регистрировалась высокая экспрессия EGFR (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Экспрессия рецепторов факторов роста EGFR и VEGFR в опухолевой ткани у пациентов с раком желудка				
Группа пациентов	Экспрессия EGFR		Экспрессия VEGFR	
	Низкая	Высокая	Низкая	Высокая
С отсутствием или низкой экспрессией галектина-1, абс. (%)	16 (64,0)	9 (36,0)	21 (84,0)	4 (16,0)
С высокой экспрессией галектина-1, абс. (%)	8 (29,6)	19 (70,4)	20 (74,1)	7 (25,9)
	$\chi^2 = 6,170$; $p < 0,05$; $\phi = 0,344$		$\chi^{2*} = 0,287$; $p > 0,05$	

* с поправкой Йетса.

Выявлена связь средней силы между экспрессией галектина-1 и EGFR ($\phi = 0,321$). Взаимосвязи между экспрессией галектина-1 и VEGFR в опухолевой ткани у больных раком желудка не зарегистрировано (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Многие опухолевые заболевания характеризуются дисбалансом экспрессии галектинов, что ассоциируется с высокой степенью злокачественности новообразований [3, 9]. Высокая экспрессия галектина-1 в опухолевой ткани обнаруживается при раке толстой кишки, мочевого пузыря и щитовидной железы, что коррелирует с появлением очагов метастазирования и негативным прогнозом заболевания [3]. Гиперэкспрессия галектина-1 в клетках меланомы и клетках Риды – Березовского – Штернберга сопровождается снижением основных параметров противоопухолевого иммунитета [14–16]. Последнее связывают со способностью галектина-1 селективно ингибировать Т-хелпер (Th)-зависимые (сопряженные с Th1 и Th17) реакции иммунного ответа, а также активировать функциональную активность регуляторных Т-лимфоцитов с иммуносупрессорной активностью (Treg) [15–17].

В то же время галектин-1 способен действовать на клетки через факторы сигнальной трансдукции и белки-регуляторы клеточного цикла [1, 4]. Главный регулятор клеточного цикла белок p53, выступающий в роли транскрипционного фактора гена P21, вызывает остановку клеточного цикла в G1- и G2-фазах и запускает программу апоптоза [2]. По данным R. Fischer et al. (2005), в клетках галектин-1 угнетает Ras-МЕК-ERK-сигнальный путь с последующей индукцией экспрессии генов P21 и P27, усиливая при этом стабильность белка p21 [3]. В опухолевых клетках часто наблюдается снижение экспрессии белков p53 и p21, вследствие чего их функции не реализуются. Кроме этого, в клетках опухолей могут происходить мутации гена P53, обуславливающие изменение его структуры и накопление мутантной формы белка [10].

В результате проведенного нами исследования у пациентов с раком желудка, сочетающимся с высокой экспрессией галектина-1, достоверно чаще регистрировалась высокая экспрессия мутантного белка p53. При исследовании другого белка-регулятора клеточного цикла выявлена иная тенденция – высокий уровень экспрессии белка p21 в опухолевой ткани регистрировался при раке желудка с низкой экспрессией галектина-1.

Установленная взаимосвязь экспрессии галектина-1 с белком p53 в опухолевой ткани желудка является скорее неблагоприятным показателем, поскольку мутантный тип p53 не способен проявлять антионкогенные свойства, а его высокая экспрессия часто ассоциируется с негативными морфологическими и клиническими показателями болезни [2].

Неблагоприятным условием развития опухоли является также формирование в ткани новообразования разветвленной сети кровеносных сосудов. Неопластические сосуды не только обеспечивают адекватное поступление в опухолевые клетки необходимых для их роста веществ, но и повышают вероятность гематогенного метастазирования [5]. К факторам ангиогенеза относится VEGF, который секретируется как клетками опухоли, так и элементами внутри- и околоопухолевого микроокружения [6]. По данным зарубежных авторов, галектин-1 может изменять экспрессию рецептора к VEGF на клетках [19]. Гладкомышечные клетки сосудов и эндотелиоциты экспрессируют галектин-1, участвующий в модуляции компонентов внеклеточного матрикса [4]. Рецептор к VEGF присутствует не только на клетках сосудистого эндотелия, но и обнаруживается на мембране клеток опухолей [7]. Предполагается, что VEGF, секретируемый опухолевыми клетками, может выступать в роли фактора паракринной и аутокринной стимуляции для эндотелиоцитов и самих опухолевых клеток [6].

По результатам, полученным в данном исследовании, у большинства пациентов с раком желудка регистрировалась низкая экспрессия VEGFR. По-видимому, экспрессия опухолевыми клетками рецептора сосудисто-эндотелиального фактора при раке желудка в меньшей степени зависит от экспрессии галектина-1, несмотря на потенциальную возможность данного белка участвовать в регуляции опухолевого неоангиогенеза.

К группе ростовых факторов, опосредующих механизмы неоваскуляризации и пролиферации опухолей, относится EGF [19]. Рецептор к данному фактору обладает тирозинкиназной активностью и опосредует многие внутриклеточные процессы. Нарушение функционирования системы EGF – EGFR приводит к тому, что EGFR приобретает свойства онкобелка, инициирующего неконтролируемый рост опухолевых клеток [13]. В настоящее время EGF рассматривают в качестве потенциального молекулярного маркера онкогенеза [19].

По результатам проведенного иммуногистохимического исследования установлена высокая

экспрессия EGFR в опухолевой ткани при раке желудка с гиперэкспрессией галектина-1. По сведениям P. Lajoie et al. (2009), галектин-1 способен повышать чувствительность экстрацеллюлярного участка EGFR к соответствующему лиганду [20]. Высокая экспрессия EGFR характерна для многих карцином, в том числе карциномы желудка. Повышенная экспрессия EGFR у таких пациентов коррелирует с низким уровнем дифференцированности клеток и ранним метастазированием [19].

Таким образом, у больных раком желудка высокая экспрессия галектина-1 в опухолевых клетках сочетается с гиперэкспрессией мутантного белка p53 и рецептора к фактору, активирующему рост эпителиальных клеток желудка. Выявленные нами изменения имеют скорее отрицательное значение в контексте развития и прогрессии опухоли при раке желудка. Дальнейшее исследование галектин-зависимых механизмов канцерогенеза позволит существенно дополнить современные представления о роли гликан-связывающих протеинов в патогенезе опухолевого процесса ввиду перспективности их использования в качестве новых диагностических маркеров.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о вкладе авторов. Янкович К.И., Пурлик И.А., Васильева О.А. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных. Колобовникова Ю.В., Дмитриева А.И. – обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания. Новицкий В.В., Уразова О.И. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых и ведущих научных школ Российской Федерации: соглашение № 14.W01.17.842-МД «Роль галектинов в патогенезе рака желудка и толстой кишки с опухолеассоциированной эозинофилией» (руководитель – д-р мед. наук Ю.В. Колобовникова); соглашение № 14.W02.16.7906-НШ «Роль галектинов в патогенезе опухолевых заболеваний крови и других

локализаций» (руководитель – академик РАН В.В. Новицкий).

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (рег. № 5309 от 22.05.2017).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Camby I., Le Mercier M., Lefranc F., Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions // *Glycobiology*. 2006; 16(11): 137R–157R. DOI: 10.1093/glycob/cwl025.
2. Колесник А.П. Прогностическое значение экспрессии p53 у больных с ранними стадиями немелкоклеточного рака легкого // *Онкология*. 2013; 15 (1): 20–23.
3. Kolesnik A.P. Prognosticheskoe znachenie jekspressii r53 u bol'nyh s rannimi stadijami nemelkokletochnoho raka legkogo [Prognostic value of p53 expression in patients with early non-small cell lung cancer] // *Onkologija – Oncology*. 2013; 15 (1): 20–23 (in Russian).
3. Fischer C., Sanchez-Ruderisch H., Welzel M., Wiedenmann B., Sakai T., Andre S., Gabius H.-J., Khachigian L., Detjen K.M., Rosewicz S. Galectin-1 Interacts with the $\alpha 5 \beta 1$ Fibronectin Receptor to Restrict Carcinoma Cell Growth via Induction of p21 and p27 // *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280 (44): 37266–37277. DOI:10.1074/jbc.m411580200.
4. Thijssen V.L., Griffioen A.W. Galectin-1 and -9 in angiogenesis: A sweet couple // *Glycobiology*. 2014; 24 (10): 915–920. DOI: 10.1093/glycob/cwu048.
5. Folkman J. Angiogenesis // *Annual Review of Medicine*. 2006; 57: 1–18. DOI:10.1146/annurev.med.57.121304.131306.
6. Pallares J., Rojo F., Iriarte J., Morote J., Armadans L.I., de Torres I. Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues // *Histol. Histopathol*. 2006; 21(8): 857–865. DOI: 10.14670/HH-21.857.
7. Rodriguez-Antona C., Pallares J., Montero-Conde C., Inglada-Perez L., Castelblanco E., Landa I., Leskela S., Leandro-Garcia L.J., Lopez-Jimenez E., Leton R., Cascon A., Lerma E., Martin M.C., Carralero M.C., Mauricio D., Cigudosa J.C., Matias-Guiu X., Robledo M. Overexpression and activation of EGFR and VEGFR2 in medullary thyroid carcinomas is related to metastasis // *Endocrine Related Cancer*. 2010; 17(1): 7–16. DOI: 10.1677/erc-08-0304.
8. Lieto E., Ferraraccio F., Orditura M., Castellano P., Mura A.L., Pinto M., Zamboli A., De Vita F., Galizia G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome in gastric cancer patients // *Annals of Surgical Oncology*. 2008; 15(1): 69–79. DOI: 10.1245/s10434-007-9596-0.
9. He X.J., Tao H.Q., Hu Z.M., Ma Y.Y., Xu J., Wang H.J., Xia Y.J., Li L., Fei B.Y., Li Y.Q., Chen J.Z. Expression of

- galectin-1 in carcinoma-associated fibroblasts promotes gastric cancer cell invasion through upregulation of integrin $\beta 1$ // *Cancer Science*. 2014; 105 (11): 1402–1410. DOI: 10.1111/cas.12539.
10. Prall F., Ostwald C., Nizze H., Barten M. Expression profiling of colorectal carcinomas using tissue microarrays: cell cycle regulatory proteins p21, p27, and p53 as immunohistochemical prognostic markers in univariate and multivariate analysis // *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2004; 12(2): 111–121. DOI: 10.1097/00129039-200406000-00003.
11. Niyaz M., Anwer J., Liu H., Zhang L., Shayhedin I., Awut I. Characterization of the expression and clinical features of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in esophageal carcinoma // *Oncology Letters*. 2015; 10 (6): 3696–3704. DOI: 10.3892/ol.2015.3747.
12. Туманский В.А., Евсеев А.В. Сравнительная оценка экспрессии ростовых рецепторов семейства ErbB, Ki-67 и E-кадгерина клетками протоковой аденокарциномы поджелудочной железы // *Патология*. 2014; 3 (32): 55–59.
- Tumanskij V.A., Evseev A.V. Sravnitel'naja ocenka jekspressii rostovyh receptorov semejstva ErbB, Ki-67 i E-kadgerina kletkami protokovoj adenokarcinomy podzheludochnoj zhelezy [Comparative evaluation of expression of growth receptors of the family ErbB, Ki-67 and E-cadherin by cells of ductal pancreatic adenocarcinoma] // *Patologija – Patology*. 2014; 3(32): 55–59 (in Russian).
13. Гржибовский А.М. Анализ номинальных данных (независимые наблюдения) // *Экология человека*. 2008; 6: 58–68.
- Grzhibovskij A.M. Analiz nominal'nyh dannyh (nezavisimye nabljudenija) [Analysis of nominal data (independent observations)] // *Jekologija cheloveka – Human Ecology*. 2008; 6: 58–68 (in Russian).
14. Якушина В.Д., Васильева О.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Савельева О.Е., Прохоренко Т.С., Старикова Е.Г., Зима А.П. Галектин-1: роль в формировании особенностей врожденного и приобретенного иммунитета // *Медицинская иммунология*. 2012; 14 (1–2): 21–32.
- Jakushina V.D., Vasil'eva O.A., Rjazanceva N.V., Novickij V.V., Savel'eva O.E., Prohorenko T.S., Starikova E.G., Zima A.P. Galektin-1: rol' v formirovanii osobennostej vrozhdennogo i priobretennogo immuniteta [Galectin-1: a role in the formation of features of congenital and acquired immunity] // *Medicinskaja immunologija – Medical Immunology*. 2012; 14 (1–2): 21–32 (in Russian).
15. Якушина В.Д., Васильева О.А., Новицкий В.В., Андреева Н.В., Старикова Е.Г., Таширева Л.А., Прохоренко Т.С., Зима А.П., Рязанцева Н.В. Влияние галектина-1 на апоптоз CD4+-лимфоцитов, дифференцированных *in vitro* в направлении регуляторных Т-клеток // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013; 156(11): 616–619.
- Jakushina V.D., Vasil'eva O.A., Novickij V.V., Andreeva N.V., Starikova E.G., Tashireva L.A., Prohorenko T.S., Zima A.P., Rjazanceva N.V. Vlijanie galektina-1 na apoptoz CD4+-limfocitov, differencirovannyh *in vitro* v napravlenii reguljatornyh T-kletok [The effect of galectin-1 on apoptosis of CD4 + lymphocytes differentiated *in vitro* in the direction of regulatory T cells] // *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny – Bulletin Experimental of Biology and Medicine*. 2013; 156 (11): 616–619 (in Russian).
16. Gandhi M.K., Moll G., Smith C., Dua U., Lambley E., Ramuz O., Gill D., Marlton P., Seymour J.F., Khanna R. Galectin-1 mediated suppression of Epstein-Barr virus specific T-cell immunity in classic Hodgkin lymphoma // *Blood*. 2007; 110 (4): 1326–1329. DOI: 10.1182/blood-2007-01-066100.
17. Ito K., Ralph S.J. Inhibiting galectin-1 reduces murine lung metastasis with increased CD4(+) and CD8 (+) T cells and reduced cancer cell adherence // *Clinical & Experimental Metastasis*. 2012; 29 (6): 561–572. DOI: 10.1007/s10585-012-9471-7.
18. Haene N.D., Sauvage S., Maris C., Adanja I., Mercier M., Decaestecker C., Baum L., Salmon I. VEGFR1 and VEGFR2 involvement in extracellular galectin-1- and galectin-3-induced angiogenesis // *PLoS One*. 2013; 8 (6): e67029. DOI: 10.1371/journal.pone.0067029
19. Пивень Н.В., Бураковский А.И., Прохорова В.И., Красный С.А., Шишло Л.М. Эпидермальный фактор роста и его рецепторы как перспективные клинко-диагностические и прогностические маркеры онко-патологии // *Онкологический журнал*. 2014; 8, 1 (29): 82–92.
- Piven' N.V., Burakovskij A.I., Prohorova V.I., Krasnyj S.A., Shishlo L.M. Jepidermal'nyj faktor rosta i ego receptory kak perspektivnye kliniko-diagnosticheskie i prognosticheskie markery onkopatologii [Epidermal growth factor and its receptors as promising clinico-diagnostic and prognostic markers of oncopathology] // *Onkologicheskij zbornal – Oncological Journal*. 2014; 8, 1 (29): 82–92 (in Russian).
20. Lajoie P., Goetz J.G., Dennis J.W., Nabi I.R. Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane // *Journal of Cell Biology*. 2009; 185 (3): 381–385. DOI: 10.1083/jcb.200811059.

Поступила в редакцию 24.09.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Колобовникова Юлия Владимировна, д-р мед. наук, профессор, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.
Дмитриева Алла Ивановна, д-р мед. наук, профессор, кафедра патофизиологии, СибГМУ; зав. клинко-диагностической лабораторией, ОГАУЗ «ТООД», г. Томск.

Янкович Кристина Игоревна, аспирант, кафедра патофизиологии, СибГМУ; врач клинко-диагностической лаборатории, ОГАУЗ «ТООД», г. Томск.

Васильева Ольга Александровна, канд. мед. наук, доцент, кафедра патофизиологии; ассистент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск.

Пурлик Игорь Леонидович, д-р мед. наук, профессор, кафедра патологической анатомии, СибГМУ; зав. патолого-анатомическим отделением, ОГАУЗ «ТООД», г. Томск.

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, зав. кафедрой патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

Уразова Ольга Ивановна, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

(✉) Колобовникова Юлия Владимировна, e-mail: kolobovnikova.julia@mail.ru.

УДК 616.33-006.6:577.112

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-165-172

For citation: Kolobovnikova Yu.V., Dmitrieva A.I., Jankovic K.I., Vasilyeva O.A., Purlik I.L., Novitskiy V.V., Urazova O.I. Galectin-1-mediated expression of proteins-regulators of cell cycle and growth factors in gastric cancer. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 165–172.

Galectin-1-mediated expression of proteins-regulators of cell cycle and growth factors in gastric cancer

Kolobovnikova Yu.V.¹, Dmitrieva A.I.^{1,2}, Jankovic K.I.^{1,2}, Vasilyeva O.A.¹, Purlik I.L.^{1,2}, Novitskiy V.V.¹, Urazova O.I.¹

¹ *Siberian State Medical University (SSMU)
2, Moskow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation*

² *Tomsk Regional Oncologic Dispensary
115, Lenin Av., Tomsk, 634050, Russian Federation*

ABSTRACT

The purpose of the study was to analyze the expression of proteins-regulators of the cell cycle (p53 and p21) and receptors for endothelial (VEGFR) and epidermal (EGFR) growth factors depending on the expression of galectin-1 in tumor cells in gastric cancer.

Materials and methods. 52 patients with diagnosis of gastric cancer were examined. We used the tissue samples of malignant neoplasms of the stomach, which were obtained during surgical intervention. In tumor tissue the expression of galectin-1, p53 and p21 proteins, and receptors of VEGF and EGF were evaluated by immunohistochemistry. The obtained results were analyzed by statistical methods.

Results. It is shown that in patients with gastric cancer accompanied by overexpression of galectin-1, high expression of mutant protein p53 and EGFR in tumor tissue was recorded significantly more frequently. Low expression of VEGFR was observed in all patients with gastric cancer regardless of the level of expression of galectin-1 by tumor cells. Association of galectin-1 expression with expression of protein p53 and EGF receptor by stomach tumor cells was set.

Conclusion. The relationship between overexpression of galectin-1 and overexpression of mutant p53 protein (not showing antioncogenic properties) and receptor for epidermal growth factor (EGFR) by stomach tumor cells is a negative prognostic criterion of the neoplastic process in gastric cancer.

Key words: galectins, cell cycle, angiogenesis, stomach cancer.

Received September 24.2017

Accepted November 08.2017

Kolobovnikova Yuliya V., DM, Professor, Department of Pathophysiology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Dmitrieva Alla I., DM, Professor, Professor, Department of Pathophysiology, SSMU; Head of the Clinical and Diagnostic Laboratory, Tomsk Regional Oncological Dispansery, Tomsk, Russian Federation.

Jankovich Kristina I., Postgraduate Student, Department of Pathophysiology, SSMU; Doctor, Clinical and Diagnostic Laboratory, Tomsk Regional Oncological Dispansery, Tomsk, Russian Federation.

Vasilyeva Olga A., PhD, Associate Professor, Department of Pathophysiology; Assistant, Department of Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Purlic Igor L., DM, Professor, Department of Pathological Anatomy, SSMU; Head of the Anatomical Department, Tomsk Regional Oncological Dispansery, Tomsk, Russian Federation.

Novitsky Vyacheslav V., DM, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department Pathophysiology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Urazova Olga I., DM, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Department Pathophysiology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Kolobovnikova Yuliya V.**, e-mail: kolobovnikova.julia@mail.ru.

УДК 616.379-008.646:575.174.015.3

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-173-183

Для цитирования: Коненков В.И., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Климонтов В.В., Тянь Н.В., Черных В.В., Черных Д.В., Еремина А.В., Трунов А.Н. Комбинации полиморфизмов в регуляторных участках генов цитокинов ассоциированы с диабетической ретинопатией у больных сахарным диабетом 2 типа. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 173–183.

Комбинации полиморфизмов в регуляторных участках генов цитокинов ассоциированы с диабетической ретинопатией у больных сахарным диабетом 2 типа

Коненков В.И.¹, Шевченко А.В.¹, Прокофьев В.Ф.¹, Климонтов В.В.¹,
Тянь Н.В.¹, Черных В.В.², Черных Д.В.², Еремина А.В.², Трунов А.Н.²

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии (НИИКЭЛ), филиал Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук
Россия, 630060, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, Новосибирский филиал
Россия, 630096, г. Новосибирск, ул. Колхидская, 10

РЕЗЮМЕ

Диабетическая ретинопатия (ДР) является одной из ведущих причин предотвратимой потери зрения во всем мире. Хроническое воспаление низкой интенсивности и аномальный ангиогенез – важные элементы патогенеза ДР – сопровождаются нарушением баланса цитокинов. Показано, что однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs) в промоторах генов оказывают влияние на уровень продукции цитокинов в нормальных и патологических условиях.

В связи с этим целью данного исследования стал анализ частот комбинаций SNPs, локализованных в промоторах генов цитокинов, у больных сахарным диабетом (СД) 2 типа с наличием и отсутствием ДР.

Материал и методы. В исследование включены 201 больной СД 2 типа европеоидного происхождения, в том числе 90 пациентов с непролиферативной или препролиферативной ДР, и 111 пациентов без ДР. Изучены восемь SNPs, локализованных в промоторах генов *TNFA* (rs1800630, rs1800629, rs361525), *IL1B* (rs1143627), *IL4* (rs2243250), *IL6* (rs1800795) и *IL10* (rs1800896, rs1800872). В группах больных СД с наличием и отсутствием ДР рассчитана частота встречаемости аллелей, генотипов и их комбинаций, отношение шансов, специфичность. Визуализацию взаимодействий между генами и квартилями гликированного гемоглобина A1c (HbA_{1c}) в виде интерактивной биологической сети осуществляли в программе Cytoscape.

Результаты. Выявлены 36 комбинаций SNPs, частоты которых отличались в группах больных с наличием и отсутствием ДР. В комбинациях, ассоциированных с ДР со специфичностью >99%, наиболее часто выявлялся гомозиготный генотип GG в позиции -174 гена *IL6* (rs1800795), генотип CT в позиции -31 гена *IL1B* (rs1143627), генотип CC в позиции -592 гена *IL10* (rs1800872), генотип CT в позиции -590 гена *IL4* (rs2243250). Высокие уровни HbA_{1c} (>9,8%) были ассоциированы с комбинациями генотипа CA в позиции -863 *TNFA* (rs1800630) и с гомозиготными вариантами GG в позициях -238 и -308 *TNFA* (rs1800629, rs361525).

✉ Шевченко Алла Владимировна, e-mail: shalla64@mail.ru.

Заключение. В составе генетических комбинаций, ассоциированных с ДР у больных СД 2 типа, присутствует большое число гомозиготных вариантов в полиморфных позициях промоторов генов *IL6* (rs1800795), *IL1B* (rs1143627), *TNFA* (rs1800630, rs1800629, rs361525), продукты которых вовлечены в регуляцию воспаления и ангиогенеза. Сочетание определенных вариантов генов цитокинов с высоким уровнем HbA_{1c} может являться важным механизмом реализации индивидуальной генетической предрасположенности к развитию ДР.

Ключевые слова: сахарный диабет, диабетическая ретинопатия, полиморфизм генов, цитокины, гликированный гемоглобин.

Стремительное увеличение количества больных сахарным диабетом (СД) определяет значимость диабетической ретинопатии (ДР) как одной из ведущих причин слепоты [1]. Важную роль в развитии ДР и других сосудистых осложнений СД играет хроническое низкоинтенсивное воспаление и нарушения ангиогенеза [2–4]. В основе данных процессов лежат сложные нарушения синтеза и взаимодействий ростовых факторов, в числе которых фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF-1), фактор роста фибробластов (bFGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1 (MCP-1), фактор роста пигментного эпителия (PEDF), трансформирующий ростовой фактор β (TGF- β) и др. [5]. Определенный вклад в патогенез ДР вносит дисбаланс между провоспалительными и противовоспалительными, проангиогенными и антиангиогенными цитокинами [4].

Полиморфизм генов цитокинов обеспечивает как качественные различия в структуре кодируемых ими молекул, так и количественные различия в уровне продукции регуляторных факторов клетками пациентов с различным генотипом. Последнее направление в настоящее время активно развивается и анализируется в рамках исследования локусов количественных признаков (QTL) [6, 7]. Существует несколько механизмов функциональности генов цитокинов, связанных с однонуклеотидным полиморфизмом (single nucleotide polymorphism, SNP), включая: изменения аминокислот (IL-6R, IL-13, IL-1 α), пропускание экзонов (IL-7R α), проксимальные промоторные варианты (IL-1 β , IL-R α , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, TNF, IFN- γ TGF- β), варианты дистального промотора (IL-6, IL-18) и интронные энхансерные варианты (IL-8) [8]. Такой высокий уровень многокомпонентности исследуемой регуляторной сети делает затруднительной интерпретацию результатов исследования роли отдельных генов, отдельных цитокинов и отдельных полиморфизмов в

патогенезе ДР и заставляет искать новые подходы к комплексному генетическому исследованию [9].

Исходя из этого, целью исследования стал анализ частоты встречаемости комплексных генетических признаков, включающих в себя функционально значимые SNPs в регуляторных участках генов цитокинов, у пациентов с СД 2 типа с наличием и отсутствием ДР.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Пациенты. В исследование включен 201 пациент с СД 2 типа, в том числе 156 женщин и 45 мужчин, европеоидного происхождения, считающих себя и своих родителей русскими. Критериями исключения являлись: кетоацидоз в анамнезе и (или) наличие других клинических или лабораторных признаков СД 1 типа; признаки других специфических типов СД; пролиферативная ДР; хроническая болезнь почек 4- или 5-й стадий; лечение локальными или системными ингибиторами ангиогенеза в течение 3 мес перед исследованием.

Возраст обследованных 42–70 лет (медиана – 63 года). Большинство обследованных имели ожирение (155 человек); избыточная масса тела зафиксирована у 35 пациентов. В постменопаузе находились 42 женщины. Сахароснижающая терапия включала: инсулины ($n = 110$), метформин ($n = 88$), препараты сульфонилмочевины ($n = 36$), ингибиторы дипептидилпептидазы 4 типа ($n = 10$), в большинстве случаев – в виде комбинаций ($n = 89$). Уровень гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) варьировал в пределах 4,9–16,8% (медиана 8,4%). У большинства обследованных выявлены сосудистые осложнения и коморбидные состояния: артериальная гипертензия ($n = 193$), хроническая болезнь почек 1–3-й стадий ($n = 118$), ишемическая болезнь сердца ($n = 76$), макроангиопатия нижних конечностей ($n = 30$). Дислипидемия зафиксирована у 121 пациента, статины в постоянном режиме получали 60 больных, два пациента получали сочетанную гиполипидемическую терапию (статины и фенофибрат).

Все пациенты прошли офтальмологическое обследование в Новосибирском филиале МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова. Комплекс стандартного офтальмологического обследования включал определение остроты зрения, офтальмоскопию с широким зрачком, тонометрию, биомикроскопию. По показаниям выполнялась флуоресцентная ангиография сетчатки, оптическая когерентная томография. По результатам обследования больные были разделены на две группы: без признаков ДР (группа ДР-, 111 человек), с ДР (группа ДР+, 90 человек, в том числе 78 с непролиферативной ДР, 12 – с препролиферативной).

Генотипирование. Исследовались восемь SNPs в промоторных регионах генов фактора некроза опухолей- α TNFA: -238 A/G (rs361525), -308 A/G (rs1800629) и -863 C/A (rs1800630); интерлейкина-1 β IL1B: -31 C/T (rs1143627), интерлейкина-4 IL4: -590 C/T (rs2243250), интерлейкина-6: IL6 -174 C/G (rs1800795), интерлейкина-10 IL10: -592 C/A (rs1800872) и -1082 A/G (rs1800872). Исследование полиморфизма осуществляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием коммерческих тест-систем на основе интеркалирующего красителя SYBR GreenI (Литех, Россия) и методом TaqMan зондов (Синтол, Россия) на амплификаторе ДТ-96 (компания «ДНК-Технология») согласно инструкции фирм-производителей.

Статистический анализ. При статистическом анализе результатов генетических исследований рассчитывали частоту встречаемости аллелей, генотипов и их комбинаций, отношение шансов (OR) и его 95%-й доверительный интервал (OR95%CI), специфичность (Sp). Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди – Вайнберга. Достоверность различий частот распределения изучаемых признаков в альтернативных группах определяли по критерию χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность и двустороннему варианту точного метода Фишера для четырехпольных таблиц. Для описания количественных переменных использовались стандартные параметрические и непараметрические методы анализа с вычислением среднего значения, доверительного интервала среднего с уровнем вероятности 95%, дисперсии и стандартного отклонения, асимметрии и эксцесса распределений, медианы Me , значений верхнего и нижнего квартилей.

Математическую обработку связи генетических признаков с количественным содержанием HbA_{1c} (оптимальная концентрация, ее высокие

или низкие значения) проводили в соответствии с методическими и аналитическими подходами квартильного анализа. При данном подходе диапазон оптимума ограничивается значениями квартилей p_{25} и p_{75} . В качестве параметров повышенной концентрации показателей принимаются диапазоны выше p_{75} , а сниженной – ниже p_{25} . Визуализацию попарных ген-генных и ген-белковых (HbA_{1c}) взаимодействий в группах с наличием и отсутствием ДР в виде интерактивной биологической сети осуществляли в программе Cytoscape v.3.5.1 [10]. Интерпретация результатов визуализации осуществлялась на основе общих глобальных и локальных топологических свойств биологических сетей [11].

Статистическая обработка проводилась с помощью специализированных пакетов прикладных программ StatSoft Statistica 10.0, IBM SPSS Statistics 19 и пакета оригинальных программ объемной обработки биоинформации, включая многокомпонентный генетический анализ, на основе методов комбинаторики в теории вероятности [12, 13]. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиническая характеристика больных с наличием и отсутствием ДР представлена в табл. 1. Выделенные группы не различались между собой по возрасту, индексу массы тела (ИМТ), уровням HbA_{1c} , холестерина липопротеинов низкой и высокой плотности (ЛПНП и ЛПВП), общего холестерина и триацилглицеролов. Длительность СД и уровень HbA_{1c} ожидаемо оказались больше, а скорость клубочковой фильтрации (СКФ) – меньше у пациентов с ДР.

При сопоставлении частот комбинаций генотипов исследованных цитокинов у больных СД 2 типа (табл. 2) выявлено 36 генетических признаков, частоты которых отличались в группах с наличием и отсутствием ДР. Частота 27 из них оказалась повышенной среди пациентов с ДР, а частота 9 – сниженной.

Как следует из табл. 2, около половины генетических признаков, частота которых была повышена среди больных с ДР, либо полностью отсутствовали у пациентов без ДР, либо встречались с частотой менее 1%. Среди этих признаков у больных с ДР наиболее часто (84,6%) выявлялся гомозиготный вариант GG гена *IL6* в полиморфной позиции -174; в 65,4% случаев – гетерозиготный вариант СТ в позиции -31 гена *IL1B* и гомо-

зиготный вариант СС гена *IL10* в позиции -592, в 53,8% случаев выявлялся гетерозиготный вариант СТ в позиции -590 промотора гена *IL4*; несколько реже встречались генотипы в полиморфных участках в позициях -238, -308 и -863 *TNFA*. Среди больных без ДР с наибольшей частотой

встречались гетерозиготные варианты гена *IL10* в полиморфной позиции -1082, гетерозиготные варианты GC гена *IL6* в позиции -174, гомозиготные варианты GG гена *TNFA* в позициях -238 и -308, а также гомозиготный вариант СС того же гена в полиморфной позиции -863.

Т а б л и ц а 1

Клиническая характеристика больных СД 2 типа с наличием и отсутствием ДР, Ме (p25; p75)

Признак	Группа больных		p
	ДР+ (n = 90)	ДР- (n = 111)	
Возраст, годы	62 (57,5; 67)	63 (55; 67)	0,6
Длительность СД, годы	14 (11; 19)	11 (6; 16)	0,0002
ИМТ, кг/м ²	34,1 (32; 37,9)	33,3 (29,4; 38,7)	0,6
НЬА _{1с} , %	8,8 (8; 10,2)	7,8 (6,6; 9,5)	0,0004
Холестерол ЛПНП, ммоль/л	2,7 (2,2; 3,7)	3,1 (2,4; 3,9)	0,2
Холестерол ЛПВП, ммоль/л	1,2 (1,0; 1,4)	1,2 (1,0; 1,5)	0,4
Холестерол общий, ммоль/л	4,9 (4,4; 5,8)	5,1 (4,4; 5,9)	0,1
Триацилглицеролы, ммоль/л	1,7 (1,2; 2,7)	1,7 (1,3; 2,6)	0,4
СКФ, мл/мин/1,73 м ²	64 (52; 80)	71 (60; 85)	0,002

Т а б л и ц а 2

Частоты комбинаций генотипов цитокинов у больных СД 2 типа с наличием и отсутствием ДР

Комбинации генов	Генотипы	Частота комбинаций генотипов, %		OR	OR95%CI	Sp
		ДР+ (n = 90)	ДР- (n = 111)			
<i>IL1B-31:IL4-590:IL6-174:IL10-592</i>	TC-CT-GG-CC	8,89	0,00	22,98	1,31-403,76	100,00
<i>TNF-308:IL1B-31:IL4-590:IL6-174</i>	GG-TC-CT-GG	7,78	0,00	20,03	1,13-355,67	100,00
<i>TNF-863:TNF-308:IL1B-31:IL6-174:IL10-592</i>	CC-GG-TC-GG-CC	7,78	0,00	20,03	1,13-355,67	100,00
<i>TNF-238:IL1B-31:IL4-590:IL6-174:IL10-592</i>	GG-TC-CT-GG-CC	7,78	0,00	20,03	1,13-355,67	100,00
<i>IL1B-31:IL4-590:IL6-174</i>	TC-CT-GG	11,11	0,90	13,75	1,73-109,59	99,10
<i>TNF-863:IL1B-31:IL6-174:IL10-592</i>	CC-TC-GG-CC	11,11	0,90	13,75	1,73-109,59	99,10
<i>TNF-308:IL1B-31:IL6-174:IL10-592</i>	GG-TC-GG-CC	10,00	0,90	12,22	1,52-98,41	99,10
<i>TNF-863:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:IL10-592</i>	CC-GG-TC-GG-CC	10,00	0,90	12,22	1,52-98,41	99,10
<i>TNF-238:IL1B-31:IL4-590:IL6-174</i>	GG-TC-CT-GG	8,89	0,90	10,73	1,32-87,50	99,10
<i>TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:IL10-592</i>	GG-GG-TC-GG-CC	8,89	0,90	10,73	1,32-87,50	99,10
<i>TNF-863:IL1B-31:IL4-590:IL6-174</i>	CC-TC-CT-GG	7,78	0,90	9,28	1,12-76,87	99,10
<i>IL1B-31:IL6-174:IL10-592</i>	TC-GG-CC	14,44	2,70	6,08	1,67-22,06	97,30
<i>TNF-238:IL1B-31:IL6-174:IL10-592</i>	GG-TC-GG-CC	13,33	2,70	5,54	1,51-20,29	97,30
<i>IL1B-31:IL4-590:IL10-1082:IL10-592</i>	TC-CT-GG-CC	8,89	1,80	5,32	1,10-25,71	98,20
<i>IL1B-31:IL4-590:IL10-1082</i>	TC-CT-GG	11,11	2,70	4,50	1,20-16,88	97,30
<i>IL4-590:IL6-174:IL10-592</i>	CT-GG-CC	13,33	3,60	4,12	1,28-13,24	96,40
<i>TNF-308:IL1B-31:IL4-590:IL10-1082</i>	GG-TC-CT-GG	10,00	2,70	4,00	1,05-15,25	97,30
<i>TNF-238:IL1B-31:IL4-590:IL10-1082</i>	GG-TC-CT-GG	10,00	2,70	4,00	1,05-15,25	97,30
<i>TNF-308:IL4-590:IL6-174</i>	GG-CT-GG	12,22	3,60	3,72	1,14-12,13	96,40
<i>TNF-238:IL4-590:IL6-174:IL10-592</i>	GG-CT-GG-CC	12,22	3,60	3,72	1,14-12,13	96,40
<i>TNF-308:IL6-174:IL10-592</i>	GG-GG-CC	21,11	8,11	3,03	1,30-7,09	91,89

Комбинации генов	Генотипы	Частота комбинаций генотипов, %		OR	OR95%CI	Sp
		ΔP+ (n = 90)	ΔP- (n = 111)			
<i>IL4-590:IL6-174</i>	CT-GG	16,67	6,31	2,97	1,15–7,65	93,69
<i>TNF-308:TNF-238:IL6-174:IL10-592</i>	GG-GG-GG-CC	20,00	8,11	2,83	1,20–6,66	91,89
<i>IL6-174:IL10-592</i>	GG-CC	27,78	12,61	2,66	1,29–5,51	87,39
<i>TNF-238:IL6-174:IL10-592</i>	GG-GG-CC	26,67	12,61	2,52	1,21–5,23	87,39
<i>TNF-863:IL6-174:IL10-592</i>	CC-GG-CC	20,00	9,91	2,27	1,01–5,10	90,09
<i>TNF-238:IL10-1082:IL10-592</i>	GG-AG-CA	7,78	18,02	0,38	0,15–0,95	92,22
<i>TNF-863:IL4-590:IL6-174</i>	CC-CT-GC	7,78	18,92	0,36	0,15–0,89	92,22
<i>TNF-863:TNF-308:IL4-590:IL6-174</i>	CC-GG-CT-GC	6,67	17,12	0,35	0,13–0,91	93,33
<i>TNF-863:IL1B-31</i>	CA-TT	4,44	13,51	0,30	0,10–0,93	95,56
<i>IL4-590:IL10-1082:IL10-592</i>	CC-AG-CA	4,44	13,51	0,30	0,10–0,93	95,56
<i>TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:IL10-1082</i>	GG-GG-TC-GC-AG	3,33	11,71	0,26	0,07–0,94	96,67
<i>TNF-308:IL4-590:IL10-1082:IL10-592</i>	GG-CC-AG-CA	2,22	9,91	0,21	0,04–0,96	97,78
<i>TNF-863:TNF-308:IL1B-31:IL4-590:IL6-174</i>	CC-GG-TC-CT-GC	2,22	9,91	0,21	0,04–0,96	97,78
<i>TNF-238:IL4-590:IL10-1082:IL10-592</i>	GG-CC-AG-CA	2,22	11,71	0,17	0,04–0,78	97,78

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 3 достоверность различий оценивалась по двустороннему критерию Фишера.

Анализ ассоциированности уровня HbA_{1c} с комбинированными генотипами показал, что в группе с наиболее высокими значениями показателя (выше 75-го квартиля, >9,8%) преобладали

генотипы, включающие в свой состав гетерозиготный вариант CA гена *TNFA* в позиции -863, в сочетании с гомозиготными вариантами GG этого же гена, но в позициях -238 и -308 (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Частоты комбинаций генотипов цитокинов среди больных СД 2 типа с высоким и низким уровнем HbA_{1c}					
Комбинации генов	Генотипы	Уровень HbA_{1c}		OR	OR95%CL
		>9,8%	<7,3%		
<i>TNF-863:IL10-592</i>	CA-CC	21,28	2,13	12,43	1,52–101,60
<i>TNF-863:TNF-308:IL10-592</i>	CA-GG-CC	21,28	2,13	12,43	1,52–101,60
<i>TNF-863:IL10-1082</i>	CA-GG	19,15	2,13	10,89	1,32–89,88
<i>TNF-863:TNF-238:IL10-592</i>	CA-GG-CC	19,15	2,13	10,89	1,32–89,88
<i>TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL10-592</i>	CA-GG-GG-CC	19,15	2,13	10,89	1,32–89,88
<i>TNF-863:TNF-308:IL10-1082</i>	CA-GG-GG	17,02	2,13	9,44	1,13–78,79
<i>TNF-863:TNF-238:IL10-1082</i>	CA-GG-GG	17,02	2,13	9,44	1,13–78,79
<i>TNF-863:IL6-174:IL10-592</i>	CA-GC-CC	17,02	2,13	9,44	1,13–78,79
<i>TNF-863:TNF-308:IL6-174:IL10-592</i>	CA-GG-GC-CC	17,02	2,13	9,44	1,13–78,79
<i>TNF-863:IL6-174</i>	CA-GC	23,40	6,38	4,48	1,16–17,30
<i>TNF-863</i>	CA	36,17	12,77	3,87	1,36–10,99
<i>TNF-863:TNF-238</i>	CA-GG	34,04	12,77	3,53	1,24–10,06
<i>TNF-863:TNF-308</i>	CA-GG	31,91	12,77	3,20	1,12–9,19
<i>TNF-863:TNF-308:TNF-238</i>	CC-GG-GG	31,91	55,32	0,38	0,16–0,88

На следующем этапе нами проведено исследование попарных ген-генных и ген-белковых (генотипы- HbA_{1c}) взаимодействий в группах больных с наличием и отсутствием ΔP и выполнена визуализация этих взаимодействий в виде совмещенной биологической сети с помощью програм-

мы Cytoscape. Построенная сеть имела двухмодульное строение с тремя «хабами», отчетливо проявляющимися в виде вершин, представленными HbA_{1c} с большим количеством малоперекрывающихся взаимодействий с полиморфизмами различных генов цитокинов (рис.). Первый

модуль характеризует статистически значимую связь высоких и средних уровней HbA_{1c} (соответственно HbA_{1c} -ЛН и HbA_{1c} -НН) с определенными генотипами провоспалительных цитокинов. Такая структура сети оказалась характерной для пациентов с ДР. Второй модуль характеризуется присутствием одного «хаба» (HbA_{1c} -ЛЛ), характерной особенностью которого оказалась связь белковой вершины с определенными генотипами большинства исследованных противовоспалительных цитокинов, взаимодействия с которыми отсутствуют в первом модуле. Такая структура сети оказалась характерной для больных СД 2 типа с отсутствием ДР.

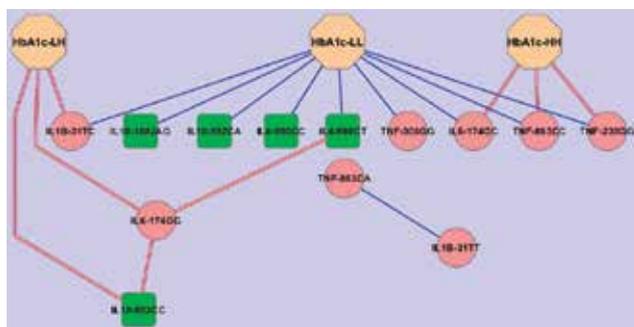


Рисунок. Совмещенная генно-белковая сеть цитокинов и HbA_{1c} при СД 2 типа с ДР (двойная красная линия) и без ДР (одинарная синяя линия): отчетливо выявляются три «хаба» (желтые восьмиугольники), образованные за счет многочисленных связей разных концентраций HbA_{1c} , сгруппированных в альтернативные диапазоны (HbA_{1c} -ЛЛ, HbA_{1c} -ЛН и HbA_{1c} -НН, соответственно, низкие (<7,3%), средние (7,3–9,8%) и высокие (>9,8%) уровни), с различными полиморфизмами провоспалительных (красные круги) и противовоспалительных (зеленые квадраты) цитокинов

Figure. Combined gene-protein network of cytokines and HbA_{1c} in type 2 diabetes with DR (double red line) and without DR (single blue line: three “hubs” (yellow octagons) formed due to numerous connections of different HbA_{1c} concentrations grouped into alternative ranges (HbA_{1c} -LL, HbA_{1c} -LH and HbA_{1c} -HH, respectively, low (<7,3%), medium (7,3–9,8%) and high (>9,8%) levels), with different polymorphisms of pro-inflammatory (red circles) and anti-inflammatory (green squares) cytokines

ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему моменту накоплены данные об ассоциированности ДР с полиморфизмами целого ряда генов. Белковые продукты ряда этих генов участвуют в регуляции активности воспаления и ангиогенеза. В частности, выявлена ассоциация ДР с полиморфизмом Pro12Ala в гене, кодирующем рецептор, активируемый пролифератором пероксисом (PPAR γ) – ядерный транскрипционный фактор, участвующий в дифференцировке адипоцитов, метаболизме глюкозы и

липидов и транспорте жирных кислот [14]. Изучены ассоциации с ДР генов ангиотензин-превращающего фермента (*ACE*), рецептора ангиотензина 2 (*AGTR*), альдозоредуктазы (*AR*), фактора Н комплемента (*CFH*), эндотелиальной синтазы оксида азота (*ENOS*), эритропоэтина (*EPO*), А/В интегрина (*ITGA/B*), эндотелиальной липазы (*EL*), метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), остеопротегерина (*OPG*), рецептора конечных продуктов гликирования (*RAGE*), селектина Р (*SELP*), транскрипционного фактора 7L2 (*TCF7L2*), разобщающего белка (*UCP*) и *VEGFA*. Некоторые факторы из этого перечня избирательно ассоциируются с пролиферативной и непролиферативной формой ДР [15]. В ряде работ изучались ассоциации полиморфизма промоторных участков генов цитокинов *IL6*, *IL10*, *TNFA* с развитием ДР. Однако их результаты, полученные при исследовании отличных по происхождению от русских кавказоидов индийцев и бразильцев, трудно сопоставить с полученными нами данными [16, 17].

Ранее в исследованиях в русской популяции нами показано, что больные СД 2 типа отличаются от общей популяции по частоте встречаемости комбинированных генетических признаков, включающих варианты генотипов цитокинов (*VEGF*, *IL1B*, *IL4*, *IL6*, *IL10*, *TNFA*), регулирующих воспаление и ангиогенез [18]. У больных СД 2 типа выявлены связи между полиморфными вариантами промоторов указанных генов с уровнем цитокинов в крови и наличием ишемической болезни сердца [19–22]. В данном исследовании нами идентифицированы комбинации генов промоторных областей цитокинов (*IL1B*, *IL4*, *IL6*, *IL10*, *TNFA*), ассоциированные с ДР у больных СД 2 типа.

При анализе результатов обращает внимание необычно высокая частота гомозиготных вариантов в промоторах генов провоспалительных цитокинов (*IL1B*, *IL6* и *TNFA*) в составе генетических комбинаций, ассоциированных с ДР. Данные литературы свидетельствуют о связи аллелей в полиморфных участках промоторных регионов цитокинов с уровнем продукции кодируемых этими генами белковых молекул [7, 19, 20, 23]. Так, выявленный нами с высокой частотой у пациентов с ДР генотип GG гена *IL6* в полиморфной позиции -174 способствует высокой продукции IL-6 лимфоидными и макрофагальными клетками [24]. Поскольку IL-6 обладает выраженным провоспалительным и проангиогенным эффектами, конституционально повышенный уровень его продукции у носителей генотипа GG

может способствовать ускоренному формированию ДР.

Хорошо известно, что формирование ДР – результат сложного взаимодействия генетических, метаболических и гемодинамических факторов [25]. Генетические факторы при этом объясняют 25–50% риска развития ДР [26]. Вместе с тем эффективность контроля гликемии остается важнейшим предиктором возникновения и прогрессирования данного осложнения [1]. Общими факторами реализации эффекта гипергликемии на сосудистую стенку являются и хроническое воспаление, и нарушения ангиогенеза [2, 4]. В данной работе нами проведено компьютерное моделирование связей генотипов цитокинов, вовлеченных в регуляцию воспаления и ангиогенеза, и уровней HbA_{1c} – интегрального маркера гипергликемии, выявившее особенности комбинаций генов цитокинов у пациентов с высоким и относительно низким уровнем HbA_{1c} . Результаты исследования показывают, что платформа Cytoscape, как одна из наиболее популярных среди биоинформатиков программ для анализа и визуализации биологических сетей позволяет строить и изучать генные и белковые взаимодействия применительно к исследованию патогенеза осложнений СД 2 типа для разработки в последующем подходов к персонализированной профилактики и терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В составе генетических комбинаций, ассоциированных с ДР у больных СД 2 типа, присутствует большое число гомозиготных вариантов в полиморфных позициях промоторов генов *IL6* (rs1800795), *IL1B* (rs1143627), *TNFA* (rs1800630, rs1800629, rs361525), продукты которых вовлечены в регуляцию воспаления и ангиогенеза. Сочетание определенных вариантов этих генов с высоким уровнем HbA_{1c} может являться важным механизмом реализации индивидуальной генетической предрасположенности к развитию ДР.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о вкладе авторов. Коненков В.И. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи. Шевченко А.В. – генотипирование. Прокофьев В.Ф. – статистическая обработка данных. Климонтов В.В. –

разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи. Тянь Н.В. – подбор и клиническое обследование пациентов. Черных В.В. – разработка концепции и дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания. Черных Д.В. – офтальмологическое обследование пациентов, анализ и интерпретация данных. Еремина А.В. – офтальмологическое обследование пациентов, анализ и интерпретация данных. Трунов А.Н. – обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств государственного задания НИИКЭЛ, а также в рамках договора о научно-практическом сотрудничестве между НИИКЭЛ и МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено этическими комитетами НИИКЭЛ (протокол № 104 от 20.10.2014) и Новосибирского филиала МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова (протокол № 3 от 04 сентября 2014 г.). У всех пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании, забор крови, а также использование данных исследования в научных целях.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sabanayagam C., Yip W., Ting D.S., Tan G., Wong T.Y. Ten Emerging Trends in the Epidemiology of Diabetic Retinopathy // *Ophthalmic Epidemiol.* 2016; 23 (4): 209–222. DOI: 10.1080/09286586.2016.1193618.
2. Климонтов В.В., Тянь Н.В., Фазуллина О.Н., Мьякина Н.Е., Лыков А.П., Коненков В.И. Клинические и метаболические факторы, ассоциированные с хроническим воспалением низкой интенсивности, у больных сахарным диабетом 2 типа // *Сахарный диабет.* 2016; 19 (4): 295–301. DOI: 10.14341/DM7928.
3. Klimontov V.V., Tyann N.V., Fazullina O.N., Myakina N.E., Lykov A.P., Konenkov V.I. Klinicheskiye i metabolicheskiye faktory, assotsiirovannyye s khronicheskim vospaleniym nizkoy intensivnosti, u bol'nykh sakharnym diabetom 2 tipa [Clinical and metabolic factors associated with chronic low-grade inflammation in type 2 diabetic patients] // *Sakharnyy Diabet – Diabetes Mellitus.* 2016; 19 (4): 295–302 (in Russian). DOI: 10.14341/DM7928.
4. Коненков В.И., Климонтов В.В., Мьякина Н.Е., Тянь Н.В., Фазуллина О.Н., Романов В.В. Повышенная концентрация воспалительных цитокинов в сыворотке крови

- у больных сахарным диабетом 2-го типа с хронической болезнью почек // *Терапевтический архив*. 2015; 87 (6): 45–49. DOI: 10.17116/terarkh201587645-49.
- Konenkov V.I., Klimontov V.V., Myakina N.E., Tyan N.V., Fazullina O.N., Romanov V.V. Povyshennaya kontsentratsiya vospalitel'nykh tsitokinov v syvorotke krovi u bol'nykh sakharnym diabetom 2-go tipa s khronicheskoy bolezn'yu pochek [Increased serum concentrations of inflammatory cytokines in type 2 diabetic patients with chronic kidney disease] // *Terapevticheskiy Arkhiv – Ter Arkh*. 2015; 87 (6): 45–49 (in Russian). DOI: 10.17116/terarkh201587645-49.
4. Коненков В.И., Климонтов В.В. Ангиогенез и васкулогенез при сахарном диабете: новые концепции патогенеза и лечения сосудистых заболеваний // *Сахарный диабет*. 2012; 15 (4): 17–27. DOI: 10.14341/2072-0351-5533.
- Konenkov V.I., Klimontov V.V. Angiogenez i vaskulogenez pri sakharnom diabete: novyye kontseptsii patogeneza i lecheniya sosudistyykh oslozhneniy [Vasculogenesis and angiogenesis in diabetes mellitus: Novel pathogenetic concepts for treatment of vascular complications] // *Sakhar-nyy Diabet – Diabetes Mellitus*. 2012; 15 (4): 17–27 (in Russian). DOI: 10.14341/2072-0351-5533.
5. Tarr J.M., Kaul K., Chopra M., Kohner E.M., Chibber R. Pathophysiology of diabetic retinopathy // *ISRN Ophthalmol*. 2013; 2013: 343–560. DOI: 10.1155/2013/343560.
6. McClay J.L., Shabalin A.A., Dozmorov M.G., Adkins D.E., Kumar G., Nerella S., Clark S.L., Bergen S.E.; Swedish Schizophrenia Consortium, Hultman C.M., Magnusson P.K., Sullivan P.F., Aberg K.A., van den Oord E.J. High density methylation QTL analysis in human blood via next-generation sequencing of the methylated genomic DNA fraction // *Genome Biology*. 2015; 16: 291. DOI: 10.1186/s13059-015-0842-7.
7. Шевченко А.В., Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., Повещенко О.В., Лыков А.П., Бондаренко Н.А., Ким И.И. Конституциональные основы уровней спонтанной и индуцированной продукции цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6 и IL-10 у здоровых лиц европейского населения России // *Иммунология*. 2016; 37 (5): 232–238. DOI: 10.18821/0206-4952-2016-37-5-232-238.
- Shevchenko A.V., Konenkov V.I., Prokofiev V.F., Poveschenko O.V., Lykov A.P., Bondarenko N.A., Kim I.I. Konstitutsional'nyye osnovy urovney spontannoy i indutsirovannoy produktsii tsitokinov TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6 i IL-10 u zdorovykh lits yevropeidnogo naseleniya Rossii [Constitutional basis of the levels of spontaneous and induced production of cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6 and IL-10 in healthy individuals of the european population of Russia] // *Immunologiya – Immunology*. 2016; 37 (5): 232–238 (in Russian). DOI: 10.18821/0206-4952-2016-37-5-232-238.
8. Smith A.J., Humphries S.E. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality // *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009; 20 (1): 43–59. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2008.11.006.
9. Коненков В.И., Повещенко О.В., Прокофьев В.Ф., Шевченко А.В. Анализ информативности клинических, функциональных, лабораторных и генетических показателей оценки состояния пациентов, перенесших инфаркт миокарда, в прогнозе эффективности аутологичной клеточной терапии хронической сердечной недостаточности // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2015; 11 (1): 23–29.
- Konenkov V.I., Poveschenko O.V., Prokofiev V.F., Shevchenko A.V. Analiz informativnosti klinicheskikh, funktsional'nykh, laboratornykh i geneticheskikh pokazateley otsenki sostoyaniya patsiyentov, perenessikh infarkt miokarda, v prognoze effektivnosti autologichnoy kletochnoy terapii khronicheskoy serdechnoy nedostatochnosti [The analysis of clinical, functional, laboratory and genetic parameters values on the condition of patients after myocardial infarction, and prognosis of intramyocardial autologous cell therapy effectiveness for chronic heart failure] // *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika – Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2015; 11 (1): 23–29 (in Russian).
10. Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N.S., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks // *Genome Res*. 2003; 13 (11): 2498–2504. DOI: 10.1101/gr.1239303.
11. Csermely P., Korcsmáros T., Kiss H.J., London G., Nussinov R. Structure and dynamics of molecular networks: a novel paradigm of drug discovery: a comprehensive review // *Pharmacol. Ther.* 2013; 138 (3): 333–408. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.01.016.
12. Бююль А., Цёфель П. SPSS: искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей. СПб: ДиаСофтЮп, 2005: 603.
- Byuyul' A., Tsofel' P. SPSS: iskusstvo obrabotki informat-sii. Analiz statisticheskikh dannykh i vosstanovleniye skrytykh zakonornostey [SPSS: the art of information processing. Analysis of statistical data and the restoration of hidden patterns]. Saint-Petersburg: DiaSoftYup Publ., 2005: 603 (in Russian).
13. Шахмейстер А.Х. Комбинаторика. Статистика. Вероятность. М.: МЦНМО, 2010: 296.
- Shakhmeyster A.Kh. Kombinatorika. Statistika. Veroyatnost' [Combinatorics. Statistics. Probability]. Moscow: MT: MTSNMO Publ., 2010: 296 (in Russian).
14. Ma J., Li Y., Zhou F., Xu X., Guo G., Qu Y.. Meta-analysis of association between the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 gene and diabetic retinopathy in Caucasians and Asians // *Mol. Vis*. 2012; 18: 2352–2360.
15. Agarwal A., Soliman M.K., Sepah Y.J., Do D., Nguyen Q.D. Diabetic retinopathy: variations in patient therapeutic outcomes and pharmacogenomics // *Pharmacogenomics Pers. Med*. 2014; 7: 399–409. DOI: 10.2147/PGPM.S52821.

16. Rodrigues K.F., Pietrani N.T., Sandrim V.C. Association of a large panel of cytokine gene polymorphisms with complications and comorbidities in type 2 diabetes patients // *J. Diabetes. Res.* 2015; 2015: 605965. DOI: 10.1155/2015/605965.
17. Paine S.K., Sen A., Choudhuri S. Association of tumor necrosis factor α , interleukin 6, and interleukin 10 promoter polymorphism with proliferative diabetic retinopathy in type 2 diabetic subjects // *Retina.* 2012; 32 (6): 1197–1203. DOI: 10.1097/IAE.0b013e31822f55f3.
18. Коненков В.И., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Климонтов В.В., Королев М.А., Фазулина О.Н., Лапсина С.А., Королева Е.А. Ассоциации вариантов гена фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и генов цитокинов (IL1B, IL4, IL6, IL10, TNFA) с сахарным диабетом 2 типа у женщин // *Сахарный диабет.* 2012; 15 (3): 4–10. DOI: org/10.14341/2072-0351-6079.
- Konenkov V.I., Shevchenko A.V., Prokofyev V.F., Klimontov V.V., Korolev M.A., Fazullina O.N., Lapsina S.A., Koroleva Ye.A. Assotsiatsii variantov gena faktora rosta sosudistogo endoteliya (VEGF) i genov tsitokinov (IL1V, IL4, IL6, IL10, TNFA) s sakharnym diabetom 2 tipa u zhenshchin [Associations of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene and cytokine (IL-1B, IL-4, IL-6, IL-10, TNFA) genes combinations with type 2 diabetes mellitus in women] // *Sakharnyy Diabet – Diabetes Mellitus.* 2012; 15 (3): 4–10 (in Russian). DOI: org/10.14341/2072-0351-6079.
19. Tyran N.V., Klimontov V.V., Shevchenko A.V., Fazullina O.N., Orlov N.B., Konenkov V.I. Polymorphisms in the gene promoters of IL4, IL6, IL10 and TNFA associated with serum levels of cytokines in type 2 diabetic subjects // *Diabetologia.* 2016; 59 (S1): 513.
20. Климонтов В.В., Тянь Н.В., Шевченко А.В., Фазулина О.Н., Орлов Н.Б., Коненков В.И. Полиморфизмы промоторов генов IL4, IL6, IL10 и TNFA взаимосвязаны с уровнем цитокинов в сыворотке крови у больных сахарным диабетом 2 типа // *Цитокины и воспаление.* 2016; 15 (2): 186–191.
- Klimontov V.V., Tyran N.V., Shevchenko A.V., Fazullina O.N., Orlov N.B., Konenkov V.I. Polimorfizmy promotorov genov IL4, IL6, IL10 i TNFA vzaimosvyazany s urovnem tsitokinov v syvorotke krovi u bol'nykh sakharnym diabetom 2 tipa [Polymorphisms in IL4, IL6, IL10 and TNFA gene promoters are related to serum levels of cytokines in type 2 diabetic patients] // *Tsitokiny i vospaleniye – Cytokines Inflammation.* 2016; 15 (2): 186–191 (in Russian).
21. Klimontov V.V., Shevchenko A.V., Tyran N.V. Serum levels and genetic variants of inflammatory cytokines are associated with coronary artery disease in type 2 diabetic subjects // *Diabetes.* 2016; 65: 113–114.
22. Климонтов В.В., Тянь Н.В., Орлов Н.Б., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Мякина Н.Е., Булумбаева Д.М., Коненков В.И. Взаимосвязь уровня фактора роста эндотелия сосудов в сыворотке крови и полиморфизма гена VEGFA с ишемической болезнью сердца у больных сахарным диабетом 2 типа // *Кардиология.* 2017; 57 (5): 17–22. DOI: 10.18565/cardio.2017.5.17-22.
- Klimontov V.V., Tyran N.V., Orlov N.B., Shevchenko A.V., Prokofyev V.F., Myakina N.Ye., Bulumbayeva D.M., Konenkov V.I. Vzaimosvyaz' urovnya faktora rosta endoteliya sosudov v syvorotke krovi i polimorfizma gena VEGFA s ishemicheskoy bolezn'yu serdtsa [Polymorphisms in the genes of cytokines and matrix metalloproteinases, associated with coronary artery disease, in type 2 diabetic patients] // *Kardiologiya – Kardiologiya.* 2017; 57 (5): 17–22 (in Russian). DOI: 10.18565/cardio.2017.5.17-22.
23. Warlé M.C., Farhan A., Metselaar H.J., Hop W.C.J., Perrey C., Zondervan P.E., Kap M., Kwekkeboom J., Ijzermans J.N.M., Tilanus H.W. Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles // *Liver Transplant.* 2003; 9 (2): 170–181. DOI: 10.1053/jlts.2002.50014.
24. Zhao K., Xu J., Tian H. Correlation analysis between an IL-6 genetic polymorphism and non-small cell lung cancer prognosis // *Genet. Mol. Res.* 2016; 15 (1): 15017021. DOI: 10.4238/gmr.15017021.
25. Трунов А.Н., Черных Д.В., Еремина А.В., Черных В.В. Цитокины и факторы роста в патогенезе пролиферативной диабетической ретинопатии // *Офтальмохирургия.* 2017; (1): 93–97.
- Trunov A.N., Chernykh D.V., Eremin A.V., Chernykh V.V. Citokiny i faktory rosta v patogeneze proliferativnoj diabeticheskoy retinopatii [Cytokines and Growth Factors in the Pathogenesis of Proliferative Diabetic Retinopathy] // *Oftal'mobiruriya – Ophthalmosurgery.* 2017; (1): 93–97 (in Russian).
26. Simó-Servat O., Hernández C., Simó R. Genetics in Diabetic Retinopathy: Current Concepts and New Insights // *Current Genomics.* 2013; 14 (5): 289–299. DOI: 10.2174/13892029113149990008.

Поступила в редакцию 17.07.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Коненков Владимир Иосифович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, зав. лабораторией клинической иммуногенетики, НИИКЭЛ, г. Новосибирск.

Шевченко Алла Владимировна, д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клинической иммуногенетики, НИИКЭЛ, г. Новосибирск.

Прокофьев Виктор Федорович, канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клинической иммуногенетики, НИИКЭЛ, г. Новосибирск.

Климонтон Вадим Валерьевич, д-р мед. наук, профессор РАН, зав. лабораторией эндокринологии, заместитель руководителя филиала по научной работе, НИИКЭД, г. Новосибирск.

Тян Надежда Викторовна, мл. науч. сотрудник, лаборатории эндокринологии, НИИКЭД, г. Новосибирск.

Черных Валерий Вячеславович, д-р мед. наук, профессор, директор МНТК «Микрохирургия глаза», Новосибирский филиал, г. Новосибирск.

Черных Дмитрий Валерьевич, канд. мед. наук, врач-офтальмолог, МНТК «Микрохирургия глаза», Новосибирский филиал, г. Новосибирск.

Еремина Алена Викторовна, науч. сотрудник, врач-офтальмолог, МНТК «Микрохирургия глаза», Новосибирский филиал, г. Новосибирск.

Трунов Александр Николаевич, д-р мед. наук, профессор, зам. директора по научной работе МНТК «Микрохирургия глаза», Новосибирский филиал, г. Новосибирск.

(✉) Шевченко Алла Владимировна, e-mail: shalla64@mail.ru.

УДК 616.379-008.646:575.174.015.3

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-173-183

For citation: Konenkov V.I., Shevchenko A.V., Prokofev V.F., Klimontov V.V., Tyan N.V., Chernykh V.V., Chernykh D.V., Eremina A.V., Trunov A.N. Combinations of polymorphisms in the regulatory regions of cytokine genes are associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 173–183.

Combinations of polymorphisms in the regulatory regions of cytokine genes are associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients

Konenkov V.I.¹, Shevchenko A.V.¹, Prokof'ev V.F.¹, Klimontov V.V.¹, Tyan N.V.¹, Chernykh V.V.², Chernykh D.V.², Eremina A.V.², Trunov A.N.²

¹ *Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences
2, Timakov Str., Novosibirsk, 630060, Russian Federation*

² *Novosibirsk Branch of the Academician S.N. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Complex “Eye microsurgery”
10, Kolkhidskaya Str., Novosibirsk, 630096, Russian Federation*

ABSTRACT

Diabetic retinopathy (DR) is one of the leading causes of avoidable blindness worldwide. Chronic low-grade inflammation and abnormal angiogenesis, which is considered to be principal components of DR pathogenesis, is accompanied by imbalance in cytokine production. It was shown that single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoters of cytokine genes affect the cytokine production in normal and pathological conditions. Accordingly, **we aimed to** assess the frequencies of combinations of SNPs from promoters of cytokine genes in type 2 diabetic subjects with and without DR.

Materials and methods: We enrolled 201 caucasian subjects with type 2 diabetes, including 90 ones with non-proliferative or preproliferative retinopathy and 111 subjects without DR. Eight SNPs, located in the gene promoters of *TNFA* (rs1800630, rs1800629, rs361525), *IL1B* (rs1143627), *IL4* (rs2243250), *IL6* (rs1800795) and *IL10* (rs1800896, rs1800872), were investigated. In groups of patients with and without DR, the frequencies of alleles, genotypes and their combinations, odds ratios and specificity were calculated. The networks between genes and quartiles of glycated hemoglobin A1c (HbA_{1c}) were visualized with Cytoscape.

Results. We revealed 36 combinations of SNPs with different frequencies in the groups of patients with and without DR. In the combinations associated with DR with a specificity >99% homozygous GG genotype in position -174 of *IL6* (rs1800795), CT genotype in position -31 of *IL1B* (rs1143627), CC genotype in position -592 of *IL10* (rs1800872), CT genotype in position -590 of *IL4* (rs2243250) were the most frequently detected

variants. High levels of HbA_{1c} (>9.8%) were associated with combinations of CA genotype in position -863 *TNFA* (rs1800630) with homozygous variants GG in positions -238 and -308 *TNFA* (rs1800629, rs361525).

Conclusion. Genetic combinations, associated with DR in type 2 diabetic subjects, include homozygous variants in polymorphic positions of the gene promoters of *IL6* (rs1800795), *IL1B* (rs1143627) and *TNFA* (rs1800630, rs1800629, rs361525). The combinations of the variants of cytokine genes with a high level of HbA_{1c} can be an important mechanism for realizing of individual genetic predisposition to the development of DR.

Key words: diabetes, diabetic retinopathy, gene polymorphism, cytokines, glycated hemoglobin.

Received July 17.2017
Accepted November 08.2017

Konenkov Vladimir I., DM, Professor, Academician of Russian Academy of Science, Head of the Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation.

Shevchenko Alla V., DBSc, Leading Researcher, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation.

Prokofev Viktor F., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation.

Klimontov Vadim V., DM, Professor, Head of the Laboratory of Endocrinology, Deputy Director for Science, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation.

Tyan Nadezhda V., Junior Researcher, Laboratory of Endocrinology, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation.

Chernykh Valeriy V., DM, Professor, Director, Novosibirsk Branch of the Academician S.N. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Complex “Eye microsurgery”, Novosibirsk, Russian Federation.

Chernykh Dmitriy V., PhD, Ophthalmologist, Novosibirsk Branch of the Academician S.N. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Complex “Eye microsurgery”, Novosibirsk, Russian Federation.

Eremina Alena V., MD, Ophthalmologist, Novosibirsk Branch of the Academician S.N. Fyodorov Federal State Institution “Intersectoral Research and Technology Complex “Eye microsurgery” Ministry of Health of the Russian Federation; Novosibirsk, Russian Federation.

Trunov Aleksandr N., DM, Professor, Deputy Director for Science, Novosibirsk Branch of the Academician S.N. Fyodorov, Intersectoral Research and Technology Complex “Eye microsurgery”, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) **Shevchenko Alla V.**, e-mail: shalla64@mail.ru.

УДК 618.146-007.415:575.174.015.3

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-184–194

Для цитирования: Кублинский К.С., Уразова О.И., Евтушенко И.Д., Куценко И.Г., Ковалева А.С. Связь аллельного полиморфизма генов ангиогенных факторов с развитием генитального эндометриоза, его клиническими проявлениями и эффективностью лечения. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 184–194.

Связь аллельного полиморфизма генов ангиогенных факторов с развитием генитального эндометриоза, его клиническими проявлениями и эффективностью лечения

Кублинский К.С., Уразова О.И., Евтушенко И.Д., Куценко И.Г., Ковалева А.С.

Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Цель. Проанализировать связь аллельных вариантов генов ангиогенных факторов с развитием генитального эндометриоза (ГЭ), его клиническими проявлениями и эффективностью лечения.

Материал и методы. Обследованы 417 женщин с лапароскопически верифицированным ГЭ (основная группа) и 112 женщин без ГЭ (группа контроля). Из них у 358 женщин обеих групп (251 с ГЭ и 107 без ГЭ) определялись полиморфные участки генов ангиогенных факторов G-1154A *VEGF*, 405C *VEGF*, T-604C *KDR* и G-735A *Ang2* с помощью ПДРФ-анализа.

Результаты. Установлено, что носительство отдельных полиморфных генов факторов ангиогенеза *VEGF* G-1154A (аллеля А и генотипов GA, AA) и G-405C (С и генотипа GC), *KDR* T-604C (аллеля С и генотипов TC и CC), *Ang2* G-735A (аллеля А и генотипов CA и GA) и их комбинаций предрасполагает к развитию ГЭ у женщин репродуктивного возраста. К развитию дисменореи при ГЭ предрасполагает носительство генотипа GA полиморфизма G-1154A гена *VEGF*. При этом тазовые боли и бесплодие при ГЭ и эффективность их гормонального лечения не ассоциированы с носительством отдельных полиморфизмов G-405C и G-1154A гена *VEGF*, T-604C гена *KDR*, G-735A гена *Ang2*. Наиболее значимой комбинацией полиморфизмов генов ангиогенных факторов, предрасполагающей к развитию ГЭ, является комбинация VEGF1154GA/KDRTC/Ang2AA, к развитию эндометриоз-ассоциированного бесплодия – комбинация VEGF1154AA/KDRCC/Ang2GG, к эффективному лечению бесплодия при ГЭ – комбинация VEGF1154GG/KDRTC/Ang2AA.

Заключение. Полиморфные варианты генов факторов ангиогенеза G-1154A и 405C *VEGF*, T-604C *KDR*, G-735A *Ang2* (в отдельности или при их комбинации) предрасполагают к развитию ГЭ, ассоциированы с его клиническими проявлениями и эффективностью лечения. Для формирования групп риска развития ГЭ с целью первичной его профилактики и эффективного лечения эндометриоз-ассоциированного бесплодия целесообразно определение комбинаций факторов ангиогенеза VEGF1154GA/KDRTC/Ang2AA, VEGF1154AA/KDRCC/Ang2GG, VEGF1154GG/KDRTC/Ang2AA.

Ключевые слова: генитальный эндометриоз, факторы ангиогенеза, аллельный полиморфизм генов.

✉ Кублинский Константин Сергеевич, e-mail: kublinskiy@gmail.com.

ВВЕДЕНИЕ

Эндометриоз – хроническое эстроген-зависимое воспалительное заболевание, связанное с доброкачественным эктопическим разрастанием подобной эндометрию ткани [1–4]. Эндометриоз является одним из самых распространенных заболеваний женской половой сферы, поражая каждую десятую женщину репродуктивного возраста [5, 6].

Развитию эндометриоза способствуют повышение адгезивной способности клеток эндометрия и структурно-функциональные особенности его кровоснабжения. Именно поэтому процессы ангиогенеза при эндометриозе являются чрезвычайно важными и характеризуются ростом новых кровеносных сосудов из уже существующих [7]. Генетически обусловленное увеличение продукции ангиогенных факторов создает благоприятные условия для развития и поддержания жизнеспособности клеток эндометриозных очагов. В этой связи особого внимания заслуживает изучение аллельного полиморфизма генов факторов ангиогенеза и его роли в патогенезе эндометриозной болезни, ее течения и возможных исходах заболевания [5, 8].

Цель исследования – проанализировать связь аллельных вариантов генов ангиогенных факторов с развитием генитального эндометриоза, его клиническими проявлениями и эффективностью гормонального лечения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 529 женщин репродуктивного возраста. Из них основную группу составили 417 пациенток в возрасте 18–42 лет, $(31,0 \pm 1,2)$ года, которым была проведена диагностическая либо оперативная лапароскопия в гинекологической клинике СибГМУ и гинекологическом отделении Центра женского здоровья. Выявлен наружный генитальный эндометриоз (ГЭ) с I–IV стадиями распространения согласно классификации Revised Classification of American Fertility Society (R-AFS), 1985.

В контрольную группу вошли 112 женщин сопоставимого возраста $((30,0 \pm 1,3)$ года), у которых при проведении лапароскопии (показанием для которой была хирургическая стерилизация в случае реализованной репродуктивной функции) не выявлено органической патологии. У женщин обеих групп проводился сравнительный анализ предъявляемых жалоб на тазовые боли, дисменорею и бесплодие.

После лапароскопии 342 женщинам с ГЭ проводилась гормономодулирующая терапия с использованием агонистов гонадотропин-рилизинг гормона (157 женщин) или гестагенов (48 женщин), комбинированных оральных контрацептивов (137 женщин). Эффективность лечения оценивали через 6–12 мес по исчезновению тазовых болей, дисменореи и наступлению маточной беременности (в случае предшествующего лечению эндометриоз-ассоциированного бесплодия).

Критерии исключения женщин из исследования: возраст до 18 и после 42 лет; другая патология органов малого таза (воспалительные заболевания в фазе обострения, миома матки); аномалии развития половых органов; мужской фактор бесплодия; тяжелые экстрагенитальные заболевания в стадии декомпенсации; онкологические заболевания; наследственные болезни; отказ от исследования.

В молекулярно-генетическом исследовании приняли участие 358 женщин европеоидного происхождения: 251 с ГЭ и 107 с лапароскопически верифицированным отсутствием эндометриоза. Проводили сравнительную оценку частоты встречаемости генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов *G-405C VEGF*, *G-1154A VEGF*, *T-604C KDR* и *G-735A Ang2*, их связь с развитием ГЭ, его симптомами (тазовые боли, дисменорея, бесплодие) и эффективностью гормонального лечения. У всех женщин было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Кровь для молекулярно-генетических методов исследования получали из кубитальной вены в стандартных условиях (у женщин с эндометриозом утром в день операции). Образцы крови хранили при -70°C до момента исследования.

Выделение ДНК из периферической крови проводили сорбентным методом по инструкции к коммерческому набору «ДНК-сорб-В» (ООО «ИнтерЛабСервис», г. Москва).

Полиморфные участки генов факторов ангиогенеза *G-405C VEGF*, *G-1154A VEGF*, *T-604C KDR* и *G-735A Ang2* определяли методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) в два этапа. На первом этапе проводили амплификацию фрагмента гена с использованием олигонуклеотидных праймеров к его специфическому участку (см. в скобках): *VEGF* (forward 5'-TAG-GAG-TCT-TGT-CTC-ATG-CC-3' и reverse 5'-GCA-CTT-AAG-CAG-TCT-GTT-TGA-G-3'); *VEGF* (forward 5'-GAA-CTG-CCA-CTT-CAG-CTG-TCT-3' и reverse: 5'-GAA-AGA-CCT-CCC-AGC-GGT-CA-3'); *KDR* (forward 5'-TGG-GAA-CTG-TAC-CTG-TCA-CTC-3' и reverse:

5'-GGC-CCA-GGA-TCC-TGA-GCC-3'); *Ang2* (forward 5'-GAA-AGA-CCT-CCC-AGC-GGT-CCA-3' и reverse: 5'-GAA-CTG-CCA-CTT-CAG-CTG-CT-3'). Смесь для амплификации (20 мкл) содержала 100–200 нг ДНК, 2,5 нМ праймера, 1 мМ смеси четырех высокоочищенных 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов (dNTP), 1мМ MgCl₂, 1 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы и 10× буфер («Лаборатория Медиген», г. Новосибирск). Программа амплификации включала 5 мин предварительной денатурации при 95 °С и 35 последующих ее циклов: 40 с при 95 °С, 15 с при 55 °С, 40 с при 72 °С. Программу завершала элонгация в течение 5 мин при 72 °С.

На втором этапе исследования проводили инкубацию ампликона с добавлением рестриктазы MspI (для *VEGF*), рестриктазы MteI (для *KDR*) и рестриктазы BlnI (для *Ang2*) («СибЭнзим», г. Новосибирск) в течение 5 ч при 37 °С. Продукты ампликации и рестрикции фракционировали в 3%-м агарозном геле с бромистым этидием в течение 30 мин при напряжении 130 В и визуализировали в ультрафиолетовом свете.

Для анализа качественных независимых данных использовали критерий χ^2 Пирсона либо точный критерий Фишера. Проверку соответствия наблюдаемых частот генотипов исследуемых полиморфизмов генов ожидаемым их частотам при соответствии равновесию Харди – Вайнберга проводили с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей, генотипов и их комбинаций в группах исследования использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность или точный тест Фишера (когда значение, по крайней мере, в одной из ячеек таблиц сопряженности было менее 5). Об ассоциации разных генотипов (или их комбинаций) с заболеванием, его основными симптомами и эффективностью лечения судили по величине отношения шансов (odds ratio, OR) с расчетом 95%-го доверительного интервала. При OR < 1 судили об отрицательной связи между признаками, при OR > 1 – о положительной. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Тазовые боли разной интенсивности, согласно шкале С.М. MacLavery, R.W. Shaw (1995), регистрировались у 229 (54,9%; $\chi^2 = 94,439$; $p < 0,001$), дисменорея – у 203 (48,7%; $\chi^2 = 78,578$; $p < 0,001$) женщин с ГЭ. Бесплодие диагностировали у 287 (68,8%) женщин с ГЭ: первичное – у 170 (40,7%), вторичное – у 117 (28,1%) в отсутствии связи со

стадией распространения патологического процесса ($\chi^2 = 0,42$; $p = 0,519$). Средняя продолжительность бесплодия ($Me (Q_1; Q_3)$) составляла 3 (2; 5) года.

При проведении молекулярно-генетического обследования в ходе анализа распространенности полиморфизма G-1154A гена *VEGF* у женщин с ГЭ было выявлено статистически достоверное ($p < 0,05$) снижение частоты встречаемости генотипа GG (53,4%), а также увеличение частоты встречаемости генотипов AA (11,2%) и GA (35,5%) по сравнению с группой женщин без ГЭ (соответственно 87,9, 1,9 и 10,3%) (рис. 1). Сравнение частоты встречаемости аллеля A также показало статистически достоверное ($p < 0,05$) ее повышение в основной группе (28,9%) по сравнению с группой контроля (7%). По результатам расчета OR выявлено, что носительство аллеля A (OR = 5,39), генотипов GA (OR = 4,79) и AA (OR = 6,59) предрасполагает к ГЭ, а гомозиготного генотипа GG полиморфизма G-1154A гена *VEGF*, напротив, обуславливает протективный эффект в отношении развития болезни (OR = 0,16).

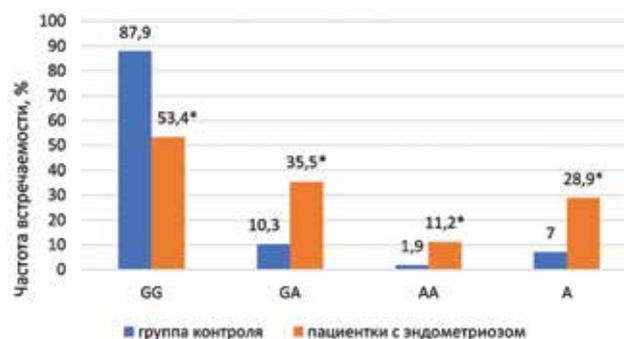


Рис. 1. Частота встречаемости генотипов и аллелей полиморфизма G-1154A гена *VEGF* у женщин с генитальным эндометриозом и без эндометриоза (группа контроля), %. Здесь и в рисунках 2–6: * уровень статистической значимости различий между группами $p < 0,05$

Fig. 1. Incidence of genotypes and alleles of G-1154A polymorphism of the *VEGF* gene in women with genital endometriosis and without endometriosis (control group), %. Here and in fig. 2–6: * the level of statistical significance of the differences between groups $p < 0,05$

При исследовании частоты встречаемости полиморфного участка G-405C гена *VEGF* показано, что у женщин с ГЭ частота встречаемости аллеля C (24,3% пациенток; $\chi^2=9,49$; $p = 0,002$) и гетерозиготного генотипа GC (35,1% пациенток; $\chi^2 = 11,218$; $p = 0,004$) была достоверно выше по сравнению с таковыми в контрольной группе (рис. 2). Выявлялась положительная ассоциация ГЭ с аллелем C (OR = 1,97) и генотипом GC (OR = 2,35) данного полиморфизма. Генотип

GG полиморфизма G-405C гена *VEGF* встречался достоверно чаще у женщин группы контроля (76,6%) и оказывал протективный эффект в отношении развития заболевания (OR = 0,42).



Рис. 2. Частота встречаемости генотипов и аллелей полиморфизма G-405C гена *VEGF* у женщин с генитальным эндометриозом и без эндометриоза (группа контроля), %

Fig. 2. Incidence of genotypes and alleles of G-405C polymorphism of the *VEGF* gene in women with genital endometriosis and without endometriosis (control group), %

Вместе с тем выявлено, что у женщин с ГЭ и без ГЭ распределение генотипов ($\chi^2 = 25,099$; $p < 0,001$) и аллелей ($\chi^2 = 27,552$; $p < 0,001$) полиморфизма T-604C гена *KDR* также существенно различалось: среди пациенток с ГЭ отмечалось снижение распространенности генотипа TT (55,8%) и увеличение частоты встречаемости генотипов TC, CC (31,5 и 12,8% соответственно) и аллеля C (28,5%) (рис. 3). Их носительство оказалось взаимосвязанным с развитием заболевания (для аллеля C OR = 3,48, для генотипа TC OR = 3,05, для генотипа CC OR = 3,76).



Рис. 3. Частота встречаемости генотипов и аллелей полиморфизма T-604C гена *KDR* у женщин с генитальным эндометриозом и без эндометриоза (группа контроля), %

Fig. 3. Incidence of genotypes and alleles of polymorphism T-604C of *KDR* gene in women with genital endometriosis and without endometriosis (control group), %

При анализе распределения аллелей и генотипов наиболее распространенного полиморфизма G-735A гена *Ang2*, вовлеченного в процессы ангиогенеза, выявлено статистически достовер-

ное ($p < 0,05$) повышение частоты встречаемости аллеля A (24,7%), гомозиготного генотипа AA (12,0%) и гетерозиготного генотипа GA (25,5%) в основной группе по сравнению с группой контроля (соответственно 5,1, 0,9 и 8,4%) (рис. 4). У больных женщин-носителей вариантного генотипа AA риск развития ГЭ оказался в 14,39 раза выше, чем у женщин без ГЭ. Носительство аллеля A и генотипа генотипа GA полиморфного участка G-735A гена *Ang2* также предрасполагало к ГЭ (OR = 6,05 и OR = 3,73 соответственно), в то время как генотип GG (OR = 0,17) проявлял протективные свойства в отношении развития заболевания.



Рис. 4. Частота встречаемости генотипов и аллелей полиморфизма G-735A гена *Ang2* у женщин с генитальным эндометриозом и без эндометриоза (группа контроля), %

Fig. 4. Incidence of genotypes and alleles of polymorphism G-735A of the gene *Ang2* in women with genital endometriosis and without endometriosis (control group), %

Для комплексной оценки влияния полиморфных вариантов G-405C и G-1154A гена *VEGF*, T-604C гена *KDR* и G-735A гена *Ang2* на развитие ГЭ был проведен анализ распространенности их комбинаций. Результатом проведенного исследования явились следующие сочетания генотипов, предрасполагающие к развитию заболевания:

- VEGF405GC/KDRTC/Ang2AA (у женщин без эндометриоза два случая (1,9%), больных ГЭ 21 случай (8,4%) ($p < 0,01$ по критерию Фишера)) (OR = 4,84);

- VEGF405GG/KDRTC/Ang2AA (у женщин без эндометриоза пять случаев (4,6%), больных ГЭ 36 случаев (14,3%) ($\chi^2 = 6,114$; $p = 0,013$)) (OR = 3,45);

- VEGF405GG/KDRTT/Ang2GA (у женщин без эндометриоза пять случаев (4,6%), а у больных ГЭ 31 случай (12,4%) ($\chi^2 = 4,170$; $p = 0,041$)) (OR = 2,90);

- VEGF1154GA/KDRTC/Ang2AA (у больных ГЭ 21 случай (8,4%), женщин без эндометриоза не обнаруживалось);

– VEGF1154GA/KDR TT/Ang2AA (у женщин без эндометриоза три случая (2,8%), больных ГЭ 26 случаев (10,2%) ($p < 0,01$ по критерию Фишера)) (OR = 4,04);

– VEGF1154GG/KDR TC/Ang2AA (у женщин без эндометриоза восемь случаев (7,4%), больных ГЭ 46 случаев (18,3%) ($\chi^2 = 6,217$; $p = 0,013$)) (OR = 2,81);

– VEGF1154GG/KDR TT/Ang2GA (у женщин без эндометриоза четыре случая (3,7%), больных ГЭ 27 случаев (10,8%) ($p < 0,01$ по критерию Фишера)) (OR = 3,13).

При сопоставлении распределения генотипов и аллелей полиморфизмов G-405C гена VEGF, G-1154A гена VEGF, T-604C гена KDR, G-735A гена Ang2 у женщин с ГЭ в зависимости от проявлений заболевания статистически значимых его различий у пациенток с тазовыми болями и бесплодием и у пациенток без данных симптомов не установлено ($p > 0,05$).

Вместе с тем при анализе данных, полученных в результате молекулярно-генетического тестирования, у пациенток без дисменореи и с дисменореей зарегистрировано значимое увеличение ($\chi^2 = 7,754$; $p = 0,021$) частоты генотипа GA (47,1%) и снижение частоты генотипа AA полиморфизма G-1154A гена VEGF (рис. 5). При этом носительство генотипа GA предрасполагало к наличию дисменореи у пациенток с эндометриозом (OR = 1,96).



Рис. 5. Частота встречаемости генотипов и аллелей полиморфизма G-1154A гена VEGF у женщин с дисменореей при генитальном эндометриозе, %

Fig. 5. Incidence of genotypes and alleles of G-1154A polymorphism of the VEGF gene in women with dysmenorrhea in genital endometriosis, %

Кроме того, у пациенток с дисменореей и без данного симптома при ГЭ выявлены статистически значимые различия характера распределения генотипов и аллелей полиморфизма T-604C гена KDR ($\chi^2=8,131$; $p = 0,017$ и $\chi^2 = 6,82$; $p = 0,009$ соответственно) (рис. 6). Установлено, что у пациенток с ГЭ без дисменореи частота встречаемости генотипа CC существенно выше, чем в группе



Рис. 6. Частота встречаемости генотипов и аллелей полиморфизма T-604C гена KDR у женщин с дисменореей при генитальном эндометриозе, %

Fig. 6. Incidence of genotypes and alleles of polymorphism T-604C of KDR gene in women with dysmenorrhea in genital endometriosis, %

больных с дисменореей (16,4%). Факторами, обуславливающими протективный эффект в отношении развития дисменореи при ГЭ, оказались генотип CC (OR = 0,15) и аллель C (OR = 0,53) полиморфизма T-604C гена KDR.

Проведенный анализ распределения генотипов и аллелей полиморфизма G-405C гена VEGF и G-735A гена Ang2 не установил статистически значимых различий у пациенток основной группы с дисменореей и без нее ($p > 0,05$).

При оценке отдаленных результатов применения гормонотерапии после оперативной лапароскопии выявлено, что на сохранение болевого синдрома достоверно чаще указывали пациентки с ГЭ, не получавшие гормонотерапию в послеоперационном периоде (90,3%), чем получавшие ее женщины (60,3%) ($p = 0,0034$). Дисменорея сохранялась в основном у пациенток с ГЭ, отказавшихся от гормонального лечения (76,7% против 37,0% после гормонального лечения; $\chi^2=14,85$; $p < 0,001$). При сравнении эффективности лечения эндометриоз-ассоциированного бесплодия показано, что беременность у пациенток на фоне гормонотерапии наступала достоверно чаще (51,4%), чем у пациенток без применения гормонов после операции (20,3%) ($\chi^2=18,13$; $p < 0,001$).

Наряду с этим не установлено статистически значимых различий распределения генотипов и аллелей полиморфизма G-405C гена VEGF, G-1154A гена VEGF, T-604C гена KDR, G-735A гена Ang2 ($p > 0,05$) у страдающих ГЭ женщин с эффективным и неэффективным лечением синдрома тазовых болей, дисменореи и эндометриоз-ассоциированного бесплодия.

Для комплексной оценки связи носительства полиморфных вариантов G-405C и G-1154A гена

VEGF, T-604C гена *KDR* и G-735A гена *Ang2* с развитием бесплодия при ГЭ и эффективностью его лечения был проведен анализ распространенности комбинаций их генотипов. Результатом проведенного исследования явились выявленные сочетания генотипов, предрасполагающие к развитию эндометриоз-ассоциированного бесплодия:

- VEGF405GG/KDRCC/Ang2GG (у женщин без бесплодия при эндометриозе два случая (2,6%), больных ГЭ и бесплодием 19 случаев (11,0%) ($p < 0,01$ по критерию Фишера)) (OR = 4,69);

- VEGF405GG/KDRTT/Ang2AA (у женщин без бесплодия при эндометриозе пять случаев (23,1%) ($\chi^2 = 9,099$; $p = 0,003$)) (OR = 4,39);

- VEGF1154AA/KDRCC/Ang2GG (у женщин без бесплодия при эндометриозе два случая (2,6%), больных ГЭ и бесплодием 21 случай (12,1%) ($p < 0,01$ по критерию Фишера)) (OR = 5,25);

- VEGF1154GA/KDRTC/Ang2AA (у женщин без бесплодия при эндометриозе четыре случая (5,1%), больных ГЭ и бесплодием 27 случаев (15,6%) ($p < 0,01$ по критерию Фишера)) (OR = 3,42);

- VEGF1154GG/KDRTT/Ang2AA (у женщин без бесплодия при эндометриозе семь случаев (9,0%), больных ГЭ и бесплодием 42 случая (24,3%) ($\chi^2 = 7,069$; $p = 0,008$)) (OR = 3,25).

Выявлены также сочетания генотипов, предрасполагающие к наступлению беременности у пациенток с эндометриоз-ассоциированным бесплодием после лечения:

- VEGF405GC/KDRTC/Ang2AA (частота наступления беременности после лечения у пациенток с ГЭ и бесплодием составила 17 случаев (22,7%); в четырех случаях (4,1%) у больных с эндометриоз-ассоциированным бесплодием наступление беременности не зафиксировано ($p < 0,01$ по критерию Фишера)) (OR = 6,89);

- VEGF1154GG/KDRTC/Ang2AA (частота наступления беременности после лечения у пациенток с ГЭ и бесплодием составила 18 случаев (24,0%); в четырех случаях (4,1%) у больных с эндометриоз-ассоциированным бесплодием наступление беременности не зафиксировано ($p < 0,01$ по критерию Фишера)) (OR = 7,42).

ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск ранних маркеров ГЭ среди аллельных вариантов генов ангиогенных факторов относится к перспективному разделу современных исследований, поскольку позволяет оценить генетический риск развития данного заболевания у женщин репродуктивного возраста [8].

Роль факторов ангиогенеза в развитии пролиферативных заболеваний женской половой сферы, равно как и других локализаций, является уже доказанной. Регуляция физиологического и патологического ангиогенеза – динамический процесс, представляющий собой совокупность позитивных (стимулирующих) и негативных (подавляющих) сигналов, генерируемых множеством факторов микроокружения. Наиболее важным из изученных факторов ангиогенеза является фактор роста сосудистого эндотелия (vascular endothelial growth factor, VEGF). Данный фактор отличается способностью стимулировать не только митогенную активность, но и подавлять апоптоз клеток эндотелия, а также (что изначально было определено как основной механизм его действия) вызывать повышение сосудистой проницаемости. Кроме того, VEGF опосредует мобилизацию и эмиграцию клеток-предшественниц эндотелиоцитов из костного мозга в очаги неоангиогенеза, активирует моноциты (клетки, регулирующие ангиогенез) и транспорт энергетических субстратов в эндотелиоциты [9, 10, 11].

VEGF способен проявлять свою биологическую активность при связывании с экстраклеточным фрагментом комплементарного рецептора VEGFR-2, или kinase insert domain receptor (KDR). Образование комплекса «лиганд – рецептор» (VEGF/VEGF-R2) опосредует димеризацию и аутофосфорилирование каталитического домена рецептора, запуск каскада внутриклеточных сигнальных молекул, активирующих транскрипцию генов, кодирующих процессы синтеза и секреции дополнительных ангиогенных факторов по механизму положительной обратной связи. К их числу относятся киназы Akt (опосредует защиту эндотелиоцитов от апоптоза) и Cdk (стимулирует вступление эндотелиоцитов в стадию G_1 клеточного цикла и их митогенез), сурвивин (ингибитор апоптоза), интегрин (молекулы адгезии) и др. [9, 12, 13].

Ангиопоэтины (Angs) – факторы, вовлекаемые в ангиогенез на этапе формирования новых сосудов на основе уже существующих. Подтверждено существование четырех их типов. При этом ангиопоэтин-1 (Ang1) – позитивный фактор ангиогенеза, стабилизирующий опорные клетки базальной мембраны – перициты, или клетки Руже (отростчатые клетки соединительной ткани в стенке капилляров). Ангиопоэтин-2 (Ang2), являясь естественным антагонистом Ang1, ослабляет фиксацию перицитов, но активирует ангиогенез в присутствии VEGF [14, 15]. Некоторые авторы полагают, что в патогенезе эндометриоза ключевую

роль играет дисбаланс продукции факторов клеточной пролиферации и ангиогенеза [9, 12, 13]. Очевидно, что гены, контролирующие процессы ангиогенеза, оказывают значительное влияние и на развитие ГЭ.

Одним из широко тестируемых полиморфизмов гена *VEGF* является полиморфизм в промоторной области -1154 G/A (rs1570360), связанный с высоким уровнем транскрипционной активности и синтеза белка [16]. Другой изученный в настоящей работе полиморфизм промоторного региона *VEGF* в позиции +405G/C (rs2010963), по данным литературы, сопряжен с повышением синтеза *VEGF* стимулированными мононуклеарными лейкоцитами крови [17–19].

В отечественной литературе сведения о связи полиморфизма G-1154A гена *VEGF* с развитием ГЭ представлены крайне фрагментарно. В работах зарубежных ученых данные о распределении аллельных вариантов полиморфизма G-1154A гена *VEGF* при ГЭ у женщин репродуктивного возраста представлены широко и настолько же противоречиво. В частности, M. Lamp и соавт. (2010) указывают, что данный полиморфизм не связан с развитием ГЭ у женщин Эстонии [20]. Другая группа авторов (Li Y.Z. и соавт., 2013), напротив, высказала предположение о протективном эффекте полиморфизма rs1570360 (G > A) в патогенезе эндометриоза [21]. Наконец, имеются сведения об ассоциации полиморфизма G-1154A гена *VEGF* с развитием ГЭ у коренных жительниц Китая [22].

Сведения о связи полиморфизма G-405C гена *VEGF* с риском развития ГЭ в зарубежной литературе также носят не менее противоречивый характер. Так, ряд авторов не обнаружили достоверных фактов, свидетельствующих о наличии триггерных генотипов, ассоциированных с этим заболеванием [21, 23, 24]. В то же время другие исследователи указывают на связь ГЭ с полиморфизмом G-405C гена *VEGF* [17, 25–27].

Что касается гена, кодирующего рецептор к *VEGF* (*KDR*), то его полиморфизм T-604C (rs2071559) в промоторной области связан со снижением транскрипционной активности гена *KDR* [28]. Описана повышенная экспрессия *VEGF* и *VEGFR-2* у пациенток с эндометриозом по сравнению со здоровыми женщинами [29]. *VEGFR-2*, кодируемый *KDR*, как указывалось выше, имеет существенное значение в стимулировании миграции и пролиферации (как естественной, так и патологической) эндотелиальных клеток [30]. Однако в доступной литературе указаний на связь данного полиморфизма с развитием ГЭ нами не найдено.

Во многих исследованиях показано повышение содержания *Ang2* в сыворотке крови и его экспрессии в эктопических очагах при ГЭ [31–33]. Несмотря на это, данные о возможной ассоциации полиморфизмов гена *Ang2* с эндометриозом в современной литературе представлены довольно фрагментарно.

Таким образом, выявленные полиморфные варианты генов факторов ангиогенеза, ассоциированные с ГЭ (генотипы GC полиморфизма G-405C и GA, AA полиморфизма 1154A гена *VEGF*), позволяют высказать предположение об их участии в увеличении синтеза фактора роста эндотелия сосудов и активации ангиогенеза при эндометриозе. С другой стороны, статистически достоверное повышение частот генотипов TC и CC полиморфизма T-604C гена *KDR*, а также GA и AA полиморфизма G-735A гена *Ang2* у женщин с эндометриозом, вероятно, опосредует дисбаланс факторов регуляции ангиогенеза и потенцирует эффекты полиморфизмов гена *VEGF*. Конечным итогом отмеченных изменений является формирование и рост новых кровеносных сосудов, что способствует имплантации эктопического эндометрия [33, 34]. Выявленные изменения могут лежать в основе дисменореи (генотип GA полиморфизма G-1154A гена *VEGF*) и развития эндометриоз-ассоциированного бесплодия, влиять на эффективность его гормонального лечения. Для формирования групп риска развития ГЭ с целью проведения первичной его профилактики и эффективного лечения эндометриоз-ассоциированного бесплодия целесообразно определение как отдельных генотипов факторов ангиогенеза, так и их комбинаций *VEGF1154GA/KDRTC/Ang2AA*, *VEGF1154AA/KDRCC/Ang2GG*, *VEGF1154GG/KDRTC/Ang2AA*.

ВЫВОДЫ

Носительство отдельных полиморфных генов факторов ангиогенеза *VEGF* G-1154A (аллеля A и генотипов GA, AA) и G-405C (C и генотипа GC), *KDR* T-604C (аллеля C и генотипов TC, CC), *Ang2* G-735A (аллеля A и генотипов GA, AA) и их комбинаций предрасполагает к развитию ГЭ у женщин репродуктивного возраста.

Наиболее значимой комбинацией полиморфизмов генов ангиогенеза, предрасполагающей к развитию ГЭ, является комбинация *VEGF1154GA/KDRTC/Ang2AA*, которая выявляется только при наличии заболевания и не обнаруживается у женщин без ГЭ.

Тазовые боли разной интенсивности, дисменорея и бесплодие у женщин с ГЭ диагностируются

чаще, чем у женщин без ГЭ. При этом тазовые боли и бесплодие при ГЭ и эффективность их гормонального лечения не ассоциированы с носительством отдельных полиморфизмов генов ангиогенеза G-405C и G-1154A гена *VEGF*, T-604C гена *KDR*, G-735A гена *Ang2*.

К развитию дисменореи при ГЭ предрасполагает носительство генотипа GA полиморфизма G-1154A гена *VEGF*. Протективным эффектом в отношении развития дисменореи при эндометриозе обладают генотип CC и аллель C полиморфизма T-604C гена *KDR*.

Наиболее значимой комбинацией полиморфизмов генов ангиогенеза, предрасполагающей к развитию бесплодия при ГЭ, является комбинация VEGF1154AA/KDRCC/Ang2GG, а предрасполагающей к эффективному лечению бесплодия при ГЭ – комбинация VEGF1154GG/KDRTC/Ang2AA (частота наступления беременности после лечения 24,0%).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ Минздрава России (протокол № 3148 от 26.12.2012 г.).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Адамян Л.В., Кулаков В.И., Андреева Е.Н. Эндометриозы. М.: Медицина, 2006: 416.
1. Adamyan L.V., Kulakov V.I., Andreeva E.N. Endometriozы [Endometriosis]. М.: Meditsina Publ., 2006: 416 (in Russian).
2. Богуславская Д.В., Leboviz D.I. Эндометриоз и бесплодие (обзор литературы) // *Проблемы репродукции*. 2011; 2: 69–73. <https://elibrary.ru/item.asp?id=18948695>
2. Boguslavskaya D.V., Leboviz D.I. Endometrioz i besplodiye (obzor literatury) [Endometriosis and infertility (a review)] // *Problemy reproduktcii – Reproduction Problems*. 2011; 2: 69–73 (in Russian).
3. Han S.J., O'Malley B.W. The dynamics of nuclear receptors and nuclear receptor coregulators in the pathogenesis of endometriosis // *Hum. Reprod. Update*. 2014; 20 (4): 467–484. DOI: 10.1093/humupd/dmu002.
3. Koukoura O., Sifakis S., Spandidos D.A. DNA methylation in endometriosis (Review) // *Mol. Med. Rep.* 2016; 13 (4): 2939–2948. DOI: 10.3892/mmr.2016.4925.
4. Дамиров М.М. Современная тактика ведения больных с аденомиозом: практическое руководство. М.: БИНОМ, 2015: 112.
4. Damirov M.M. Sovremennaya taktika vedeniya bol'nykh s adenomiozom: prakticheskoe rukovodstvo [Modern tactics of managing patients with adenomyosis: a practical guide]. М.: BINOM Publ., 2015: 112 (in Russian).
5. Iwabe T., Harada T., Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis-associated infertility // *Gynec. Obstet. Invest.* 2002; 53 (1): 19–25.
6. Rocha A.L.L., Reis F.M., Taylor R.N. Angiogenesis and Endometriosis // *Obstet. Gynecol. Int.* 2013; 2013:8596. DOI: 10.1155/2013/859619.
7. Nisolle M., Alvarez M.L., Colombo M., Foidart J.M. Pathogenesis of endometriosis // *Gynecol. Obstet. Fertil.* 2007; 35 (9): 898–903.
8. Чехонин В.П., Шейн С.А., Корчагина А.А., Гурина О.И. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза // *Вопросы онкологии*. 2012; 32: 23–34. <https://elibrary.ru/item.asp?id=17708128>
8. Chekhonin V.P., Shein S.A., Korchagina A.A., Gurina O.I. Rol' VEGF v razvitii neoplasticheskogo angiogeneza [Role of VEGF in the development of neoplastic angiogenesis] // *Voprosy onkologii – Problems of Oncology*. 2012; 32: 23–34 (in Russian).
9. Bilotas M., Meresman G., Buquet R., Sueldo C., Baracao R.I. Effect of vascular endothelial growth factor and interleukin-1beta on apoptosis in endometrial cell cultures from patients with endometriosis and controls // *J. Reprod. Immunol.* 2010; 84 (2): 193–198. DOI: 10.1016/j.jri.2009.12.002.
10. Ярмолинская М.И., Денисова В.М. Значение генитального эндометриоза в патогенезе бесплодия // *Журнал акушерства и женских болезней*. 2013; LXII (6): 67–77. <https://elibrary.ru/item.asp?id=21280646>
10. Yarmolinskaya M.I., Denisova V.M. Znachenie genital'nogo endometriozа v patogeneze besplodiya [Importance of genital endometriosis in pathogenesis of infertility] // *Zhurnal akusherstva i zhenских болезней – Journal of Obstetrics and Gynecological Diseases*. 2013; LXII (6): 67–77 (in Russian).
11. Кузнецова И.В. Роль ангиогенеза в патогенезе эндометриоза // *Акушерство и гинекология*. 2011; 5: 16–22. <https://elibrary.ru/item.asp?id=18085318>
11. Kuznetsova I.V. Rol' angiogeneza v patogeneze endometriozа [Role of angiogenesis in the pathogenesis of endometriosis] // *Akusherstvo i ginekologiya – Obstetrics and Gynecology*. 2011; 5: 16–22 (in Russian).
12. Волкова Л.В., Аляутдина О.С. Клинико-диагностическое значение сосудисто-эндотелиального фактора роста при неудачных попытках ЭКО // *Акушерство и гинекология*. 2011; 4: 126–129. <https://elibrary.ru/item.asp?id=18082091>

- Volkova L.V., Alyautdina O.S. Kliniko-diagnosticheskoye znachenie sosudisto-endothelial'nogo faktora rosta pri neudachnykh popytkakh EKO [The clinical and diagnostic value of vascular endo-thelial growth factor on IVF attempts] // *Akusherstvo i ginekologiya – Obstetrics and Gynecology*. 2011; 4: 126–129 (in Russian).
13. Белокурова М.В., Панина О.Б., Савельева Г.М., Самоходская Л.М., Садекова О.Н., Ткачук В.А., Крамаренко М.П. Аллельный полиморфизм генов ангиогенных факторов у пациенток с неудачными попытками экстракорпорального оплодотворения // *Вестник РУДН, серия Медицина. Акушерство и гинекология*. 2012; 5: 40–47.
 - Belokurova M.V., Panina O.B., Savel'eva G.M., Samokhodskaya L.M., Sadekova O.N., Tkachuk V.A., Kramarenko M.P. Allel'nyu polimorfizm genov angiogennykh faktorov u patsiyentok s neudachnymi popytkami ekstrakorporal'nogo oplodotvoreniya [Allele gene polymorphism of angiogenesis factors at patients with repeated IVF failure] // *Vestnik RUDN, seriya Meditsina. Akusherstvo i ginekologiya – Bulletin of Peoples' Friendship University, series Medicine. Obstetrics and Gynecology*. 2012; 5: 40–47 (in Russian).
 14. Бурлев А.В., Бурлев В.А., Ильясова Н.А., Сокологорский С.В., Шифман Е.М. Ангиогенные факторы роста в спинно-мозговой жидкости беременных при комбинированной спинально-эпидуральной анестезии при плановой операции кесарева сечения // *Анестезиология и реаниматология*. 2012; 6: 39–44. <https://elibrary.ru/item.asp?id=18687471>
 - Burlev A.V., Burlev V.A., Il'yasova N.A., Sokologorskii S.V., Shifman E.M. Angiogennyye faktory rosta v spinno-mozgovoy zhidkosti beremennykh pri kombinirovannoy spinal'no-epidural'noy anestezii pri planovoy operatsii kesareva secheniya [Angiogenic growth factors in the cerebrospinal liquid of pregnant woman during planned cesarean section under combined spinal-epidural anaesthesia] // *Anesteziologiya i reanimatologiya – Anesthesiology and Reanimatology*. 2012; 6: 39–44 (in Russian).
 15. Brogan I.J., Khan N., Isaac K., Hutchinson J.A., Pravica V., Hutchinson I.V. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene // *Hum. Immunol.* 1999; 60: 1245–1249.
 16. Bhanoori M., Arvind Babu K., Pavankumar Reddy N.G., Lakshmi Rao N.G., Zondervan K., Deenadayal M., Kennedy S., Shivaji S. The vascular endothelial growth factor (VEGF) +405G>C 5'-untranslated region polymorphism and increased risk of endometriosis in South Indian women: a case control study // *Hum. Reprod.* 2005; 20 (7): 1844–1849. DOI.org/10.1093/humrep/deh852.
 17. Huang C., Xu Y., Li X., Wang W. Vascular endothelial growth factor A polymorphisms and age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis // *Mol. Vis.* 2013; 19: 1211–1221.
 18. Hoeben A., Landuyt B., Highley M.S. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis // *Pharmacol. Rev.* 2004; 56 (4): 549–580.
 19. Lamp M., Saare M., Laisk T., Karro H., Kadastik U., Metspalu A., Peters M., Salumets A. Genetic variations in vascular endothelial growth factor but not in angiotensin I-converting enzyme genes are associated with endometriosis in Estonian women // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2010; 153(1): 85–89. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2010.07.021.
 20. Li Y.Z., Wang L.J., Li X., Li S.L., Wu Z.H., Gong L., Zhang X.D. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms contribute to the risk of endometriosis: an updated systematic review and meta-analysis of 14 case-control studies // *Genet. Mol. Res.* 2013; 12 (2): 1035–1044. DOI: 10.4238/2013.April.2.20.
 21. Liu Q., Li Y., Zhao J., Sun D.L., Duan Y.N., Wang N., Zhou R.M., Kang S. Association of polymorphisms -1154G/A and -2578C/A in the vascular endothelial growth factor gene with decreased risk of endometriosis in Chinese women // *Hum. Reprod.* 2009; 24(10): 2660–2666. DOI:10.1093/humrep/dep208.
 22. Fang F., Gong L., Wang X., Zhang L. The association between vascular endothelial growth factor (VEGF) +405G>C genetic polymorphism and endometriosis // *Exp. Biol. Med.* 2015; 240 (9): 1177–1182. DOI: 10.1177/1535370214564752.
 23. Trovy de Marqui A.B. Genetic polymorphisms and endometriosis: contribution of genes that regulate vascular function and tissue remodeling // *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2012; 58 (5): 620–632. DOI.org/10.1590/S0104-42302012000500022.
 24. Gyralczyk B., Smolarz B., Romanowicz H., Szyłło K. Single nucleotide polymorphisms of VEGF gene in endometriosis // *Pol. Merkur. Lekarski.* 2012; 32 (189): 151–153.
 25. Jiang Y., Tang J.Y., Wu Y., Zhao T.F. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and the risk of endometriosis: a systematic review // *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2012; 47 (3): 179–184.
 26. Vanaja M.C., Rozati R., Nassaruddin K., Vishnupriya S. Association of VEGF +405G>C polymorphism with endometriosis // *Front. Biosci. (Elite Ed).* 2013; 5: 748–754.
 27. Wang Y., Zheng Y., Zhang W., Yu H., Lou K., Zhang Y., Qin Q., Zhao B., Yang Y., Hui R. Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007; 50 (8): 760–767.
 28. Machado D.E., Abirro M.S., Berardo P.T., Takiya C.M., Nasciutti L.E. Vascular density and distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) are significantly higher in patients with deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum. // *Fertil. Steril.* 2008; 90 (1): 148–155.
 29. Su M.T., Lin S.H., Lee I.W., Chen Y.C., Hsu C.C., Pan H.A., Kuo P.L. Polymorphisms of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor gene and its receptor genes are associated with recurrent pregnancy loss // *Hum. Reprod.* 2010; 25 (11): 2923–2930. DOI: 10.1093/humrep/deq256.

30. Hur S.E., Lee J.Y., Moon H.S., Chung H.W. Angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 expression in eutopic endometrium in advanced endometriosis // *Mol. Hum. Reprod.* 2006; 12 (7): 421–426.
31. Jingting C., Yangde Z., Yi Z., Mengxiong L., Rong Y., Yu Z., Guoqing P., Lixiu P. Expression of heparanase and angiopoietin-2 in patients with endometriosis // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2008; 136 (2): 199–209.
32. Bourlev V., Iljasova N., Adamyan L., Larsson A., Olovsson M. Signs of reduced angiogenic activity after surgical removal of deeply infiltrating endometriosis // *Fertil. Steril.* 2010; 94 (1): 52–57. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.02.019.
33. Vodolazkaia A., Yesilyurt B.T., Kyama C.M., Bokor A., Schols D., Huskens D., Meuleman C., Peeraer K., Tomassetti C., Bossuyt X., Lambrechts D., D'Hooghe T., Fassbender A. Vascular endothelial growth factor pathway in endometriosis: genetic variants and plasma biomarkers // *Fertil. Steril.* 2016; 105 (4): 988–996. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.12.016.

Поступила в редакцию 12.09.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Кублинский Константин Сергеевич, канд. мед. наук, докторант кафедры акушерства и гинекологии, СибГМУ, г. Томск.

Уразова Ольга Ивановна, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

Евтушенко Ирина Дмитриевна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой акушерства и гинекологии, СибГМУ, г. Томск.

Куценко Ирина Георгиевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра акушерства и гинекологии, СибГМУ, г. Томск.

Ковалева Анна Сергеевна, соискатель кафедры акушерства и гинекологии, СибГМУ, г. Томск.

(✉) Кублинский Константин Сергеевич, e-mail: kublinskiy@mai.com.

УДК 618.146-007.415:575.174.015.3

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-184–194

For citation: Kublinskiy K.S., Urazova O.I., Evtushenko I.D., Kutsenko I.G., Kovaleva A.S. Relationship between allelic polymorphism of angiogenesis factor genes and development of genital endometriosis: clinical evidence and treatment efficacy. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2017; 16 (4): 184–194.

Relationship between allelic polymorphism of angiogenesis factor genes and development of genital endometriosis: clinical evidence and treatment efficacy

Kublinskiy K.S., Urazova O.I., Evtushenko I.D., Kutsenko I.G., Kovaleva A.S.

Siberian State Medical University (SSMU)
2, Moskow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Objective. To analyze the relationship between allelic variants of angiogenesis factor genes and development of genital endometriosis (GE), its clinical evidence and treatment efficacy.

Material and methods. 417 women with laparoscopically verified GE (main group) and 112 women without GE (control group) were examined. Among 358 women in both groups (251 with GE and 107 without GE) regions of polymorphic angiogenesis factor genes G-1154A *VEGF*, 405C *VEGF*, T-604C *KDR* and G-735A *Ang2* were identified by RFLP-analysis.

Results. It has been established that carriage of separate polymorphic angiogenesis factor genes *VEGF* G-1154A (allele A and genotypes GA, AA) and G-405C (allele C and genotype GC), *KDR* T-604C (allele C and genotypes TC and CC), *Ang2* G-735A (allele A and genotypes CA and GA) and their combinations

predispose to GE development in women of reproductive age. Carriage of genotype GA of polymorphism G-1154A of *VEGF* gene predisposes to the development of dysmenorrhea during GE. Pelvic pains and infertility during GE as well as efficacy of hormone treatment for these problems are not associated with carriage of separate polymorphisms of angiogenesis factor genes G-405C and G-1154A of *VEGF* gene, T-604C of *KDR* gene, G-735A of *Ang2* gene. The most potent combination of polymorphisms of angiogenesis factor genes which predisposes to the development of GE is VEGF1154GA/KDRTC/Ang2AA, while VEGF1154AA/KDRCC/Ang2GG combination predisposes to the development to endometriosis-associated infertility, and VEGF1154GG/KDRTC/Ang2AA combination predisposes to efficient treatment of infertility during GE.

Conclusion. Polymorphic variants of angiogenesis factor genes G-1154A and 405C *VEGF*, T-604C *KDR*, G-735A *Ang2* (separately or in their combinations) predispose to GE development. They are associated with its clinical evidence and treatment efficacy. For the formation of risk groups of GE development for primary prevention of GE and effective treatment of endometriosis-associated infertility it is advisable to identify combinations VEGF1154GA/KDRTC/Ang2AA, VEGF1154AA/KDRCC/Ang2GG, and VEGF1154GG/KDRTC/Ang2AA of angiogenesis factors.

Key words: genital endometriosis, angiogenesis factors, allelic polymorphism of genes.

Received September 12.2017

Accepted November 08.2017

Kublinskiy Konstantin S., PhD, Doctoral Student of the Department Obstetrics and Gynecology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Urazova Olga I., DM, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Department of Pathophysiology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Evtushenko Irina D., DM, Professor, Head of the Department Obstetrics and Gynecology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Kutsenko Irina G., DM, Professor, Department Obstetrics and Gynecology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Kovaleva Anna S., Competitor of the Department of Obstetrics and Gynecology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) Kublinskiy Konstantin S., e-mail: kublinskiy@gmil.com.

УДК 616.379-008.646:575.174.015.3

DOI 10.20538/1682-0363-2017-4-195–206

Для цитирования: Курочкина Ю.Д., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Сизиков А.Э., Сулутьян А.Э., Коненкова Л.П., Чумасова О.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Характеристика дендритных клеток у больных ревматоидным артритом с различным типом медикаментозной терапии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 195–206.

Характеристика дендритных клеток у больных ревматоидным артритом с различным типом медикаментозной терапии

Курочкина Ю.Д., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Сизиков А.Э., Сулутьян А.Э., Коненкова Л.П., Чумасова О.А., Останин А.А., Черных Е.Р.

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФиКИ)
Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Сравнительное исследование фенотипических и функциональных свойств дендритных клеток (ДК) в группах больных ревматоидным артритом (РА), получающих болезнь-модифицирующие препараты, либо биологические препараты и (или) пульс-терапию высокими дозами глюкокортикоидов.

Материал и методы. В исследование включены 39 пациентов с РА и 20 сопоставимых по возрасту и полу здоровых доноров. Девятнадцать больных на момент обследования получали терапию стандартными болезнь-модифицирующими препаратами (БМП) в виде монотерапии или в комбинации (группа РА1), 20 – биологические препараты либо пульс-терапию глюкокортикоидами (группа РА2). В последнем случае обследование проводилось на 2–7-е сут после последнего введения метилпреднизолона.

Результаты. В настоящем исследовании впервые описаны свойства ДК, генерируемых из моноцитов под действием IFN- α (IFN-ДК), при РА. Установлено, что общей особенностью ДК в группах РА1 и РА2 являются признаки незрелости ДК, проявляющиеся усилением экспрессии CD14 и снижением доли зрелых (CD14-CD83+) ДК. Несмотря на различия ДК в группах РА1 и РА2, оба типа клеток сохраняют *in vitro* чувствительность к действию дексаметазона, обработка которым приводит к значительному угнетению продукции TNF- α и снижению аллостимуляторной активности ДК. Таким образом, IFN-ДК у больных РА, получающих медикаментозную терапию, характеризуются наличием толерогенных свойств, которые наиболее выражены при использовании в программе лечения биологических препаратов или пульс-терапии кортикостероидами.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, дендритные клетки, дексаметазон, интерферон альфа.

ВВЕДЕНИЕ

Дендритные клетки (ДК) являются наиболее профессиональными антигенпрезентирующими клетками, способными активировать Т-клеточный иммунный ответ, но при патологии могут участвовать в инициации и поддержании ауто-

иммунных процессов. Вовлеченность ДК в патогенез ревматоидного артрита (РА) связывают со способностью ДК презентировать хрящевые гликопротеины [1], продуцировать провоспалительные цитокины [2], активировать Т-клетки к продукции Th1 и Th17 цитокинов и ингибировать генерацию регуляторных Т-клеток [3, 4]. В синовиальной ткани и жидкости пациентов с РА обнаруживается большое количество ДК,

✉ Курочкина Юлия Дмитриевна, e-mail: Juli_k@bk.ru.

которые часто локализованы в центре Т-клеточных кластеров [5], имеют зрелый активированный фенотип и индуцируют Th1-провоспалительный ответ [6, 7]. Наряду со стимулирующей активностью, ДК могут оказывать толерогенный эффект посредством индукции апоптоза и (или) анергии Т-лимфоцитов и генерации регуляторных Т-клеток [8]. Поскольку такие ДК являются негативными регуляторами аутореактивных Т-лимфоцитов [9], активация толерогенного потенциала ДК рассматривается в качестве новой стратегии лечения РА, а ДК – в качестве новых мишеней терапевтических воздействий [3]. При этом имеются основания полагать, что препараты, используемые в лечении РА, способны оказывать влияние на функции ДК. Так, в экспериментальных исследованиях на мышах показано, что метотрексат в сочетании с циклофосфамидом подавляет созревание ДК, ингибирует Th17-стимулирующую активность и усиливает способность ДК индуцировать генерацию регуляторных Т-клеток [10]. Толерогенный эффект на ДК продемонстрирован для глюкокортикоидов [11, 12]. Однако данные о влиянии медикаментозной терапии на свойства ДК у больных РА остаются во многом не исследованными.

Целью настоящего исследования явилось сравнительное исследование фенотипических и функциональных свойств ДК в группах больных РА, получающих болезнь-модифицирующие препараты, либо биологические препараты или пульс-терапию высокими дозами глюкокортикоидов. При этом в качестве объекта исследования впервые проанализированы ДК моноцитарного происхождения, генерируемые в присутствии IFN- α . Моноциты при воспалении являются важным источником тканевых ДК [13]. Исследования *in vitro* показали, что в присутствии GM-CSF и IL-4 моноциты быстро дифференцируются в ДК (IL4-ДК), которые у больных РА обладают сходством с тканевыми ДК [5]. Кроме того, мощным индукторами дифференцировки моноцитов ДК являются интерфероны I типа [14]. Учитывая важную патогенетическую роль интерферонов I типа (IFN α , IFN β) и их повышенный уровень при аутоиммунной патологии [15, 16], а также низкое содержание IL-4 в синовиальной жидкости и сыворотке крови [17, 18], логично полагать, что дифференцировка моноцитов в ДК у больных РА осуществляется с участием IFN- α . Соответственно, IFN-ДК (как и IL4-ДК) также могут являться мишенью терапевтических воздействий и представлять интерес в плане новых прогностических маркеров эффективности терапии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 39 пациентов с РА и 20 сопоставимых по возрасту и полу здоровых доноров. Диагностика РА проводилась в соответствии с критериями Американской коллегии ревматологов (ACR/EULAR, 2010). Все пациенты, рекрутируемые в исследование, имели давность заболевания более одного года и характеризовались умеренной или высокой степенью активности заболевания (DAS 28 > 3,1) [19]. Девятнадцать больных на момент обследования получали терапию стандартными болезнь-модифицирующими препаратами (БМП) в виде монотерапии или в комбинации, 20 – биологические препараты либо пульс-терапию глюкокортикоидами. В последнем случае обследование проводилось на 2–7-е сут после последнего введения метилпреднизолона. Забор крови и все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия.

Генерация дендритных клеток. Венозную кровь забирали в вакутейнерные пробирки с гепарином (Becton & Dickinson, США). Мононуклеарные клетки (МНК) из венозной гепаринизированной крови выделяли методом градиентного центрифугирования на фиколе-верографине. Далее клетки двукратно отмывали и для прилипания к пластику инкубировали в 6-луночных пластиковых планшетах (Nunclon, Дания) в течение 1 ч в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 2,5%-й сыворотки плодов коровы (FCS, БиолоТ, Санкт-Петербург). Неприлипающую фракцию МНК далее удаляли, а адгезивные к пластику моноциты продолжали культивировать в течение 4 сут при 37 °С в CO₂-инкубаторе в полной культуральной среде в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN- α (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария). Для индукции созревания на 4-е сут вносили липополисахарид (ЛПС, 10 мкг/мл, LPS E. coli 0114: B4, Sigma-Aldrich) и продолжали культивирование в течение последующих 24 ч. Генерацию IFN-ДК проводили в отсутствие (контрольные культуры) и присутствии дексаметазона (10⁻⁶ М), который добавляли на 3-и сут.

Фенотипический анализ ДК проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACSCalibur, Becton Dickinson, США) с использованием FITS-или PE-меченных моноклональных анти-CD14, -CD83, -CD86, -HLA-DR, -TLR-2,-B7H1антител (BD PharMingen, США). Экспрессию поверхностных маркеров оценивали по относительно-

О к о н ч а н и е т а б л . 1

му количеству позитивных клеток. Кроме того, отдельно для каждой субпопуляции оценивали уровень экспрессии поверхностных маркеров по средней интенсивности флуоресценции (MFI). Концентрацию цитокинов TNF-альфа и IL-10, а также IFN- γ и IL-6 в супернатантах соответствующих клеточных культур определяли методом иммуноферментного анализа, используя коммерческие тест-системы («Вектор-Бест», г. Новосибирск).

Алlostимуляторную активность IFN-ДК оценивали в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ). В качестве отвечающих клеток использовали МНК доноров ($0,1 \times 10^6$ /лунку), которые культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640 в присутствии 10%-й инактивированной сыворотки крови АВ (IV) группы при 37 °С в CO²-инкубаторе. Стимуляторами служили аллогенные IFN-ДК в соотношении МНК : ДК = 10 : 1. Пролиферативный ответ оценивали на 5-е сут радиометрически по включению ³H-тимидина (1 мкКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования. Индекс влияния ДК (ИВ) в алло-СКЛ рассчитывали как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии ДК к уровню спонтанной пролиферации МНК.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианных значений *Me* и квартильного диапазона *LQ-UQ* (25–75% квартили). Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрические критерии: Манна – Уитни (*u*) и парный критерий знаков. Корреляционный анализ проводили с помощью ранговой корреляции Спирмена *Rs*. Различия считали достоверными при уровне значимости *p* < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные, характеризующие пациентов исследуемых групп, представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1

Клиническая характеристика пациентов			
Параметр	Группы пациентов		Значимость различий
	РА 1 (БМП)	РА 2 (БП/ГК)	
Пол (М/Ж)	6/13	8/12	$p_{\text{ТМФ}} = 0,41$
Возраст, <i>Me</i> (<i>LQ-UQ</i>)	58 (48–64)	60 (44–64)	$p_u = 0,7$

Параметр	Группы пациентов		Значимость различий
	РА 1 (БМП)	РА 2 (БП/ГК)	
Длительность заболевания, мес <i>Me</i> (<i>LQ-UQ</i>)	71 (26–160)	76 (21–132)	$p_u = 0,9$
DAS 28, <i>Me</i> (<i>LQ-UQ</i>)	6 (5,4–6,2)	5,8 (5,2–6,6)	$p_u = 0,9$
Умеренная активность (DAS 28), %	84	75	$p_{\chi^2} = 0,11$
Высокая активность (DAS 28), %	16	25	
Наличие ревматоидного фактора, %	100	100	–

П р и м е ч а н и е. БП – биологические препараты; ГК – глюкокортикоиды в режиме пульстерапии; ТМФ – точный метод Фишера, p_{χ^2} – критерий хи-квадрат.

Пациенты первой группы (РА1) получали терапию противоревматическими БМП в стандартных терапевтических дозах: девять пациентов – метотрексат (15–25 мг/нед), четыре – лефлуномид (20 мг/сут), 1-сульфасалазин (2,0/сут), пять человек – комбинацию азатиоприна или сульфасалазина с метотрексатом. Девять больных, принимающих метотрексат, азатиоприн и их комбинации в связи с высокой активностью заболевания также получали глюкокортикоидную терапию *per os* в дозе 10–20 мг/сут.

Во второй группе (РА2) 11 человек получили метотрексат (20 мг/нед), один из которых в комбинации с адалимумабом (40 мг один раз в 2 нед), один человек в комбинации с мабтерой (500 мг). Шесть больных находились на терапии лефлуномидом (20 мг/сут), 3-сульфасалазином (2,0/сут). В связи с высокой активностью заболевания 17 пациентам (не получающим ГИБП) была проведена пульс-терапия метилпреднизолоном 500 мг № 3.

Анализ поверхностных маркеров (рис. 1, 2) показал, что ДК больных первой группы (ДК-РА1), получающие БМП, отличались от ДК доноров признаками меньшей зрелости – возрастание относительного содержания CD14+ и CD14+CD83- клеток, а также плотности экспрессии CD14, и меньшим содержанием зрелых ДК (CD14-CD83+). ДК пациентов второй группы (ДК-РА2), получавших биологические препараты или пульс-терапию кортикостероидами, также характеризовались повышенным содержанием и плотностью экспрессии CD14 и снижением доли CD14-CD83+. Однако в этой группе отмечалось значимое возрастание популяции ДК,

одновременно экспрессирующих CD14 и CD83 (CD14+CD83+), и плотности экспрессии коингибиторной молекулы В7-Н1 (PD1-L) (как по сравнению с ДК доноров, так ДК-РА1). Кроме того, по сравнению с ДК-РА1 ДК-РА2 отличались (на уровне тренда) меньшим содержанием ДК, экспрессирующих костимуляторную молекулу CD86, и большей долей ДК, несущих TLR2, опосредующей толерогенные сигналы.

Для оценки функциональных свойств далее исследовали продукцию цитокинов и аллостимуляторную активность ДК. Продукцию цитокинов (TNF-α, IL-10 и IL-6) оценивали в супернатантах IFN-ДК больных сравниваемых групп. ДК-РА1

продуцировали схожие уровни TNF-α, IL-6, IL-10 и не отличались соотношением TNF α и IL-10 по сравнению с ДК доноров (табл. 2). В то же время ДК-РА2 в сравнении с ДК доноров продуцировали более высокие уровни TNF-α (на уровне тренда) и IL-6 ($p_u = 0,01$). При этом концентрация IL-6 превышала таковую в культурах ДК-РА1. Следует отметить, что выход ДК у больных 1- и 2-й групп значимо не различался ($0,10 \times 10^6/1$ млн МНК и $0,12 \times 10^6/1$ млн МНК, соответственно; $p = 0,5$) и соответствовал таковому для ДК доноров ($0,08 \times 10^6/1$ млн МНК). Поэтому выявленные различия были обусловлены уровнем продукции цитокина, а не количеством цитокин-продуцирующих клеток.

Т а б л и ц а 2

Продукция цитокинов IFN-ДК здоровых доноров и больных РА, Me (LQ-UQ)						
Цитокин	ДК-РА1, пг/мл, n = 5	ДК-РА2, пг/мл, n = 8	p_u (1-2)	ДК-доноров, пг/мл, n = 9	p_u (1-3)	p_u (2-3)
TNF-α	3 780 (850-4 230)	5 275 (2 490-5 995)	0,24	3 570 (1 110-3 960)	0,84	0,09
IL-10	1 902 (756-3 186)	1 992 (1 818-3 174)	0,85	1 834 (666-2 224)	0,52	0,37
IL-6	16 960 (14 680-22 180)	23 970 (22 800-24 780)	0,017	19 580 (18 480-20 960)	0,4	0,01
TNF-α / IL-10	1,5 (0,85-5,49)	1,96 (1,75-3,25)	0,2	1,7 (0,2-2,8)	0,63	0,4

Пр и м е ч а н и е. Представлены концентрации отдельных цитокинов в 5-суточных супернатантах ДК. 1, 2, 3 – группы пациентов и доноров, участвующих в эксперименте.

Сравнение пролиферативной активности МНК и индексов стимуляции в СКЛ, индуцированной ДК-РА1 и доноров (рис. 3) не выявило различий в аллостимуляторной активности ДК. В то же время ДК-РА2 отличались как от ДК доноров, так и ДК-РА1 существенно более низкой аллостимуляторной активностью как на уровне интенсивности пролиферации в СКЛ, так и ИВДК. Выше отмечалось, что ДК-РА2 содержали большее количество TLR2+ клеток. Корреляционный анализ между экспрессией TLR2 и аллостимуляторной активностью ДК в общей группе больных выявил достоверную обратную зависимость ($rS = -0,62$; $p = 0,003$; $n = 21$).

В завершении была исследована чувствительность ДК у больных сравниваемых групп к действию дексаметазона *in vitro*. Ранее было показано, что одним из проявлений толерогенного эффекта дексаметазона в отношении IFN-ДК доноров является значимое подавление продукции TNF-α, приводящее к уменьшению индекса TNF-α /IL-10, а также угнетение аллостимуляторной активности ДК [20]. Действительно, как видно из данных табл. 3, ДКDex+ здоровых доноров отличались от ДКDex- значимым сниже-

нием продукции TNF-α на фоне умеренного и недостоверного уменьшения уровня IL-10, что приводило к значительному снижению индекса TNF-α /IL-10, а также двукратному угнетению аллостимуляторной активности.

Присутствие дексаметазона в культурах ДК больных РА также оказывало выраженный ингибирующий эффект на продукцию TNF-α. Медианные значения супрессорной активности дексаметазона в отношении продукции TNF-α ДК-РА1 и ДК-РА2 составляли соответственно 71 (42-79) и 75 (48-83)%. При этом дексаметазон практически не оказывал супрессорного эффекта на продукцию IL-10. Соответственно ДК Dex+ пациентов обеих групп характеризовались выраженным снижением индекса соотношения TNF-α и IL-10 в сторону преобладания последнего.

Несмотря на более низкую исходную аллостимуляторную активность ДК-РА2, эти клетки обладали сходной чувствительностью к ингибирующему действию дексаметазона. Так, медианные значения супрессии аллостимуляторной активности ДК-РА1 и ДК-РА2 составили 51 и 57%.

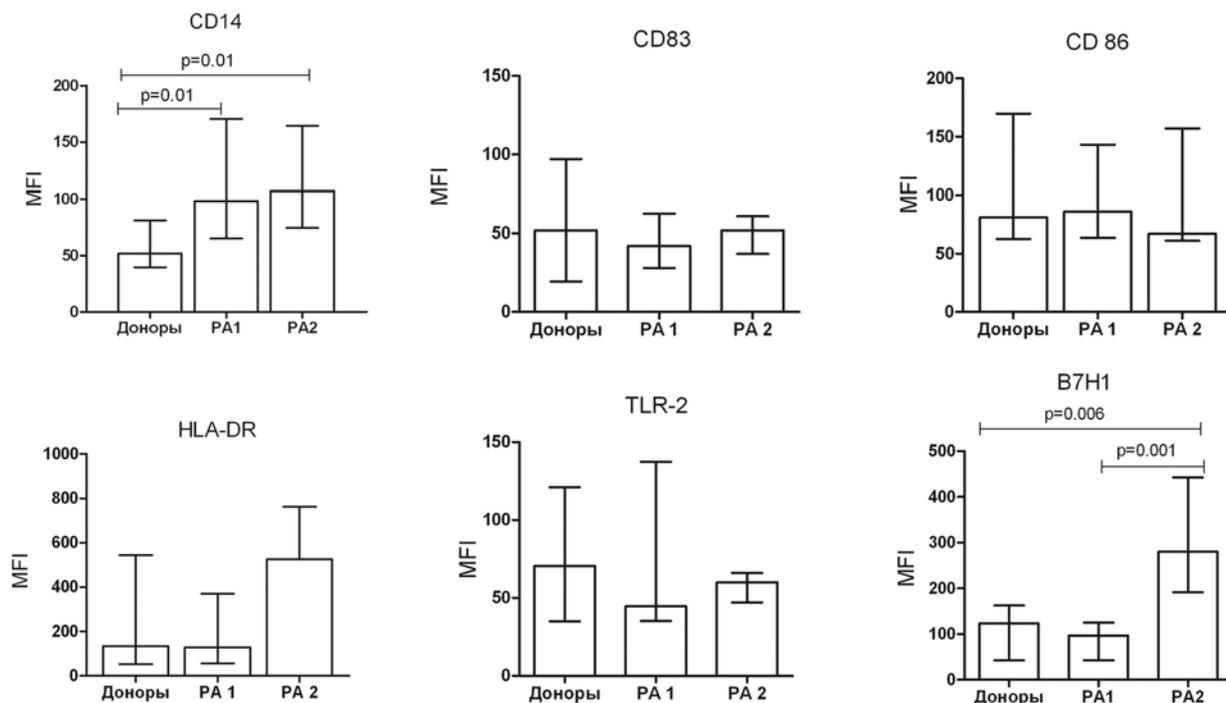


Рис. 1. Сравнительная характеристика поверхностных маркеров IFN-ДК больных РА и здоровых доноров: данные представлены в виде $Me (LQ-UQ)$; p – критерий Манна – Уитни; MFI – средняя интенсивность флуоресценции

Fig. 1 Expression level of surface IFN-DK markers in PA patients and healthy donors. NB: the data are presented in the form of medians and interquartile ranges; MFI – medium fluorescence strength; p – Mann – Whitney test

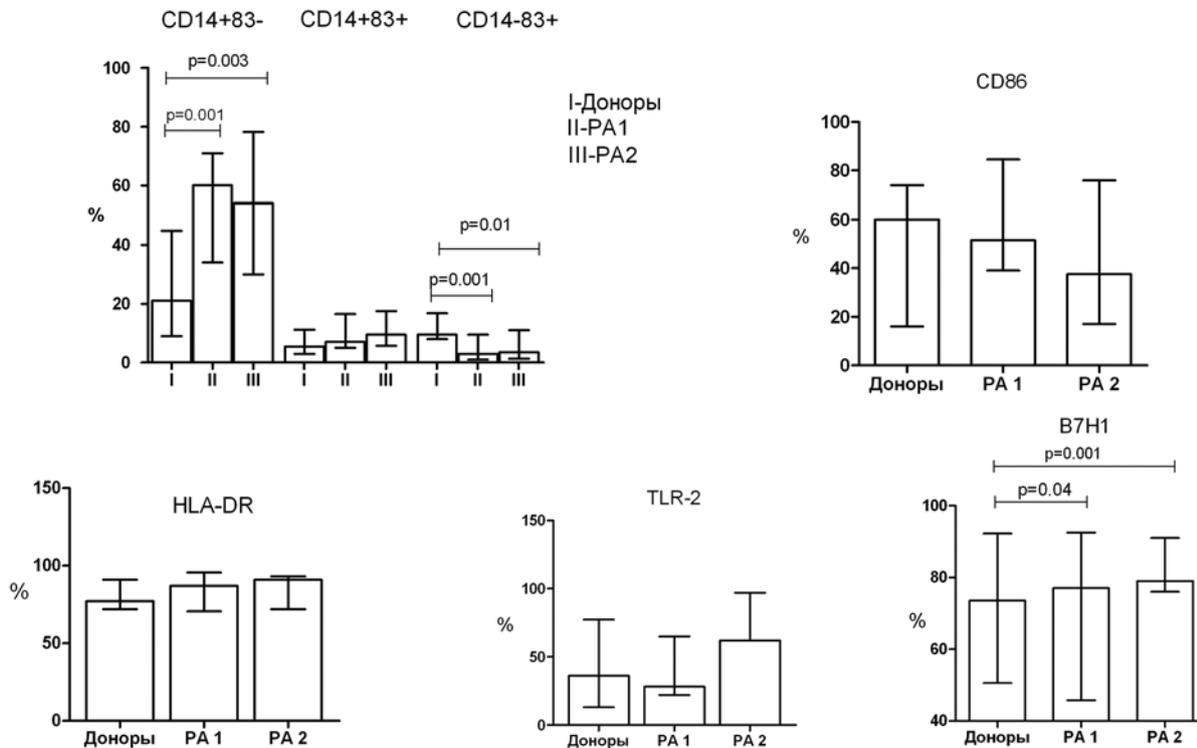


Рис. 2. Уровень экспрессии поверхностных маркеров IFN-ДК больных РА и здоровых доноров: данные представлены в виде медиан и интерквартильных диапазонов, % – относительное содержание клеток; p – критерий Манна – Уитни

Fig. 2 Comparative analysis of surface IFN-DK markers in PA patients and healthy donors: the data are presented in the form of medians and interquartile ranges; p – Mann – Whitney test

Т а б л и ц а 3

Сравнительная чувствительность ДК пациентов 1- и 2-й групп к толерогенному действию дексаметазона, <i>Me (LQ-UQ)</i>						
Параметр	ДК-РА1 Dex- (1)	ДК-РА1 Dex+ (2)	ДК-РА2 Dex- (3)	ДК-РА2 Dex+ (4)	ДК-доноров Dex- (5)	ДК-доноров Dex+ (6)
TNF- α , пг/мл	3 780 (850–4230)	510 (250–900)	5 275 (2490–5 995)	970 (165–24 550)	3 660 (1495–4 365)	510 (230–2 110)
*Супрессия, %	$p_{1-2} = 0,007; n = 5$ 71 (42–79)		$p_{3-4} = 0,013; n = 8$ 75 (48–83)		$p_{5-6} = 0,049; n = 9$ 50 (0–83)	
IL-10, пг/мл	1902 (756–3186)	2036 (1132–2640)	1992 (1836–3174)	1808 (1596–2724)	1834 (666–2224)	1020 (750–1538)
*Супрессия, %	11 (0–18)		14 (1–39)		26 (15–34)	
Индекс TNF- α /IL-10	1,5 (0,85–5,5)	0,72 (0,75–1,19)	1,96 (1,75–3,25)	0,59 (0,17–1,1)	2,14 (1,1–5,5)	0,41 (0,22–2,8)
	$p_{1-2} = 0,13; n = 5$		$p_{3-4} = 0,04; n = 7$		$p_{5-6} = 0,023; n = 8$	
Ответ в СКЛ, имп./мин	7975 (3 697–13 445)	4110 (1 758–6 064)	2526 (1 058–6 323)	1552 (503–2 800)	10 528 (5 489–16 006)	4 540 (1 954–6 885)
	$p_{1-2} = 0,0013; n = 18$		$p_{3-4} = 0,002; n = 18$		$p_{5-6} = 0,00048; n = 21$	
* Супрессия, %	51 (33–72)		57 (23–75)		64 (54–70)	

Примечание. Продукция цитокинов и аллостимуляторная активность оценивалась для ДК, полученных от пациентов группы 1 (ДК-РА1), группы 2 (ДК-РА2) и здоровых доноров (ДК доноров). Для каждой группы сравнивалась активность интактных ДК (Dex-) и ДК, генерированных в присутствии дексаметазона (Dex+).

*супрессорный эффект дексаметазона на продукцию цитокинов рассчитывали как отношение продукции цитокинов в культурах Dex+ к продукции цитокинов в культурах Dex-. Супрессорный эффект дексаметазона на аллостимуляторную активность ДК рассчитывали как ответ в СКЛ, индуцированный Dex+, к ответу в СКЛ, индуцированному Dex-.

ОБСУЖДЕНИЕ

Дендритным клеткам отводится важная роль в патогенезе РА, а также в ускоренном развитии атеросклероза и тромбозов при данной патологии [21, 22]. С этой точки зрения подавление иммуностимулирующей активности и индукция толерогенных свойств ДК рассматриваются в качестве новой стратегии подавления не только аутоиммунного процесса, но и сопутствующих осложнений [23]. Согласно данным литературы, используемые в терапии РА препараты способны индуцировать толерогенный потенциал ДК. В частности показано, что глюкокортикоиды угнетают созревание генерируемых из моноцитов ДК [11, 12, 24]. Терапия больных РА моноклональными антителами к TNF- α сопровождается количественным снижением в циркуляции миелоидных и в меньшей степени плазмоцитоидных ДК и снижением экспрессии CD83 [25]. Данные об эффекте метотрексата на ДК менее однозначны. В экспериментальных исследованиях введение овальбумин-иммунизированным мышам метотрексата в сочетании с циклофосфамидом ингиби-

рует созревание ДК и смещает баланс в сторону уменьшения Th17 и возрастания регуляторных T-клеток [10]. В то же время, по данным других авторов, метотрексат не подавляет иммуностимулирующей активности циркулирующих ДК [26].

В настоящем исследовании впервые описаны свойства ДК, генерируемых из моноцитов под действием IFN- α , при РА. Свойства IFN-ДК проанализированы с учетом терапии в двух группах пациентов: получающих базисную терапию БМП (РА1) и генно-инженерные биологические препараты или пульс-терапию глюкокортикоидами (РА2).

Результаты работы продемонстрировали, что генерируемые из моноцитов IFN-ДК у больных РА различаются не только по сравнению с ДК доноров, но и в зависимости от типа проводимой терапии. Общей особенностью ДК в группах РА1 и РА2 являются признаки незрелости ДК, проявляющиеся усилением экспрессии CD14 и снижением доли зрелых (CD14-CD83+). При этом ДК-РА2 имеют ряд дополнительных отличий – характеризуются достоверно повышенным (по сравнению с ДК доноров) содержанием

промежуточных по степени зрелости клеток CD14+CD83+, более высокой (в сравнении с ДК-доноров и ДК-РА1) экспрессией коингибиторной молекулы В7-Н1 (PD-1L), а также тенденцией к более низкой экспрессии CD86 и более высокому содержанию TLR-2+ДК. Учитывая, что незрелость ДК, низкая экспрессия костимуляторных молекул, а также высокая экспрессия PD-1L и TLR-2 характерны для толерогенных ДК [8, 27, 28], полученные результаты свидетельствуют о более выраженном толерогенном фенотипе ДК-РА2. Наряду с фенотипическими особенностями ДК-РА2 отличаются от ДК доноров и ДК-РА1 более высокой продукцией IL-6 и двукратно сниженной аллостимуляторной активностью, что также подтверждает их более высокий толерогенный потенциал. Несмотря на выявленные различия ДК-РА1 и ДК-РА2, оба типа ДК сохраняют *in vitro* чувствительность к действию дексаметазона, обработка которым приводит к значительному угнетению продукции TNF-а и снижению аллостимуляторной активности ДК. При этом ДК-РА2 практически теряют способность стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток.

Следует отметить, что в группу РА2 вошли пациенты, получающие два различных типа терапии – биологические препараты и пульс-терапию глюкокортикоидами, что, безусловно, является ограничением работы. Объединение этих пациентов было проведено с целью формирования группы, оппозитной больным РА1. Действительно, именно эта категория пациентов обычно исключается при исследовании свойств ДК у больных РА в связи с более выраженной иммуносупрессивной активностью биологических препаратов и высоких доз глюкокортикоидов. В то же время в настоящем исследовании оценка влияния на ДК терапии с более выраженным иммуносупрессивным эффектом являлась одной из задач. Кроме того, индивидуальный анализ показал, что более выраженные толерогенные свойства были характерны для ДК пациентов, получающих как пульс-терапию, так и биологические препараты.

Согласно данным литературы ДК, полученные у больных РА при культивировании моноцитов с GM-CSF и IL4 (IL4-ДК), не обладают признаками незрелости и сохраняют стимулирующую активность [29–31], что расходится с результатами данного исследования в отношении IFN-ДК. Эти расхождения могут быть отчасти обусловлены различными свойствами ДК, генерируемых в присутствии IL-4 и IFN-а. С другой стороны, отсутствие выраженных изменений IL4-ДК может быть связано с особенностями рекрутирова-

ния пациентов в цитируемых исследованиях, то есть включением в исследование ранее не леченных пациентов или больных, получающих низкие дозы метотрексата, и исключением больных, принимающих высокие дозы стероидов или биологические препараты. Эти пациенты отличались также меньшей продолжительностью приема болезнь-модифицирующих препаратов.

Выявленные изменения свойств IFN-ДК у больных РА, особенно в группе пациентов РА2, которые получали препараты с более выраженной иммуносупрессивной активностью, очевидно отражают эффект медикаментозной терапии *in vivo*. Учитывая, что ДК генерировались из прилипающей фракции выделенных *ex vivo* МНК, мишенями терапевтического воздействия являлись циркулирующие моноциты.

Известно, что моноциты представляют гетерогенную популяцию и включают классические (CD14++CD16–), промежуточные (CD14++CD16+) и неклассические (CD14+CD16++) моноциты [32]. Эти клетки различаются не только фенотипически, но и функционально, что сказывается на свойствах генерируемых из них ДК [33]. Например, моноциты с повышенной экспрессией CD16 у больных сепсисом, дифференцируются в альтернативные ДК, индуцирующие анергию Т-клеток и генерацию Т-рег [33], а ДК моноцитарного происхождения у больных туберкулезом легких (также содержащих повышенное количество CD16+ моноцитов) обладают слабой антигенпрезентирующей активностью [34]. Учитывая эти данные, можно предположить, что более выраженные толерогенные свойства ДК в группе РА2 могут быть связаны с повышенным содержанием моноцитов CD16+.

Возрастание доли CD16+ моноцитов при РА отмечено рядом авторов [35, 36]. При этом выявлено, что терапия метотрексатом не сказывается на содержании моноцитов CD16+ [37]. Данные о влиянии глюкокортикоидов на субпопуляционный состав моноцитов у больных РА отсутствуют. Тем не менее показано, что при аутоиммунном увеите терапия глюкокортикоидами приводит к селективному накоплению промежуточных (CD14++CD16+) моноцитов, которые ингибируют пролиферацию Т-клеток и индуцируют генерацию Т-рег [38]. Относительно биологических препаратов L. Chaga с соавт. продемонстрировали, что терапия моноклональными а-TNFα антителами вызывает изменения субпопуляционного состава моноцитов с различной направленностью эффекта в группах пациентов, ответивших и не ответивших на терапию [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом полученные результаты свидетельствуют, что медикаментозная терапия при РА оказывает ингибирующее действие на генерируемые из моноцитов ДК, причем терапия биологическими препаратами и пульс-терапия глюкокортикоидами имеют более выраженный толерогенный эффект. Учитывая, что созревание моноцитов в ДК *in vitro* отражает процессы, происходящие *in vivo* [40–41], оценка свойств ИФН-ДК может иметь прогностическое значение при проведении медикаментозной терапии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о вкладе авторов. Курочкина Ю.Д., Тыринова Т.В. – культуральные работы. Тихонова М.А. – пробоподготовка для цитометрического анализа, цитометрический анализ проб. Курочкина Ю.Д., Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Черных Е.Р. – анализ и интерпретация данных. Курочкина Ю.Д., Сизиков А.Э, Чумасова О.А., Коненкова Л.П., Сулутьян А.Э. – рекрутирование пациентов с ревматоидным артритом, анализ клинических данных. Курочкина Ю.Д., Черных Е.Р. – подготовка текста статьи. Останин А.А., Черных Е.Р. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии (протокол № 96 от 14.10.2016 г.)

ЛИТЕРАТУРА

1. Tsark E.C., Wang W., Teng Y.C., Arkefeld D., Dodge G.R., Kovats S. Differential MHC class II-mediated presentation of rheumatoid arthritis autoantigens by human dendritic cells and macrophages // *J. Immunol.* 2002; 169 (11): 6625–6633. DOI: 10.4049/jimmunol.169.11.6625.
2. Wenink M.H., Han W., Toes R.E., Radstake T.R. Dendritic cells and their potential implication in pathology and treatment of rheumatoid arthritis // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2009; 188: 81–98. DOI: 10.1007/978-3-540-71029-5_4.
3. Khan S., Greenberg J.D., Bhardwaj N. Dendritic cells as targets for therapy in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev.Rheumatol.* 2009; 5 (10): 566–571. DOI: 10.1038/nrrheum.2009.185.
4. Liu J., Cao X. Regulatory dendritic cells in autoimmunity: a comprehensive review // *J. Autoimmun.* 2015; 63: 1–12. DOI: 10.1016/j.jaut.2015.07.011.
5. Thomas R., MacDonald K.P., Pettit A.R., Cavanagh L.L., Padmanabha J., Zehntner S. Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis // *J. Leukoc. Biol.* 1999; 66 (2): 286–292. PMID: 10449169.
6. Santiago-Schwarz F., Anand P., Liu S., Carsons S.E. Dendritic cells (DCs) in rheumatoid arthritis (RA): progenitor cells and soluble factors contained in RA synovial fluid yield a subset of myeloid DCs that preferentially activate Th1 inflammatory-type responses // *J. Immunol.* 2001; 167 (3): 1758–1768. DOI: 10.4049/jimmunol.167.3.1758.
7. Chen K., Wang J.M., Yuan R., Yi X., Li L., Gong W., Yang T., Li L., Su S. Tissue-resident dendritic cells and diseases involving dendritic cell malfunction // *Int. Immunopharmacol.* 2016; 34: 1–15. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.02.007.
8. Hilkens C.M.U., Isaacs J.D. Tolerogenic dendritic cells in clinical practice // *Open Arthritis Journal.* 2010; 3: 8–12. DOI: 10.2174/1876539401003010008.
9. Torres-Aguilar H., Aguilar-Ruiz S.R., Gonzalez-Perez G., Munguia R., Bajaca S., Meraz-Rios M.A., Sanchez-Torres C. Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells // *J. Immunol.* 2010; 184 (4): 1765–1775. DOI: 10.4049/jimmunol.0902133.
10. Yu X., Wang C., Luo J., Zhao X., Wang L., Li X. Combination with methotrexate and cyclophosphamide attenuated maturation of dendritic cells: inducing Treg skewing and Th17 suppression in vivo // *Clin. Dev. Immunol.* 2013; 2013: 238035. DOI: 10.1155/2013/238035.
11. Piemonti L., Monti P., Allavena P., Sironi M., Soldini L., Leone B.E., Soggi C., Di Carlo V. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation // *J. Immunol.* 1999; 162 (11): 6473–6481.
12. Xia C.Q., Peng R., Beato F., Clare-Salzler M.J. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity // *Scand. J. Immunol.* 2005; 62 (1): 45–54. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2005.01640.x.
13. Leyn B., Ardañn C. Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity // *Immunol. Cell. Biol.* 2008; 86 (4): 320–324. DOI: 10.1038/icb.2008.14. Epub 2008 Mar 25.
14. Gessani S., Conti L., Del Corni M., Belardelli F. Type I interferons as regulators of human antigen presenting cell functions // *Toxins (Basel).* 2014; 6 (6): 1696–1723. DOI: 10.3390/toxins6061696.

15. Runnblom L., Eloranta M.L. The interferon signature in autoimmune diseases // *Curr. Opin. Rheumatol.* 2013; 25 (2): 248–253. DOI: 10.1097/BOR.0b013e32835c7e32.
16. Rodriguez-Carrio J., de Paz B., Lypez P., Prado C., Alperi-Lypez M., Ballina-Garcia F.J., Suarez A. IFN α serum levels are associated with endothelial progenitor cells imbalance and disease features in rheumatoid arthritis patients // *PLoS One.* 2014; 9 (1): e86069. DOI: 10.1371/journal.pone.0086069.
17. Miossec P., Nviliat A., Duput-dAngeac A., Sany J., Banchereau J. Low levels of interleukin-4 and high levels of transforming growth factor beta in rheumatoid synovitis // *Arthr. Rheum.* 1999; 33: 1180–1187. DOI: 10.1002/art.1780330819.
18. Chen E., Keystone E.C., Fish E.N. Restricted cytokine expression in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* 1993; 36 (7): 901–910. PMID:8318038.
19. Prevoo M.L., van 't Hof M.A., Kuper H.H., van Leeuwen M.A., van de Putte L.B., van Riel P.L. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* 1995; 38 (1): 44–8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.1780380107>.
20. Курочкина Ю.Д., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Баторов Е.В., Сизиков А.Э., Останин А.А., Черных Е.П. Влияние дексаметазона на интерферон- α - индуцированную дифференцировку моноцитов в дендритные клетки // *Медицинская иммунология.* 2016; 18 (4): 347–356. DOI: 10.15789/1563-0625-2016-4-347-356.
- Kurochkina Y.D., Leplina O.Y., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Batorov E.V., Sizikov A.E., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Effect of dexamethasone on interferon- α -induced differentiation of monocytes to dendritic cells // *Medical Immunology (Russia).* 2016; 18 (4): 347–356 (in Russian). DOI: 10.15789/1563-0625-2016-4-347-356.
21. Rutella S., De Cristofaro R., Ferraccioli G. Function and dysfunction of dendritic cells in autoimmune rheumatic diseases // *Hum. Immunol.* 2009; 70: 360–373. PMID: 19405176.
22. Broder A., Chan J.J., Putterman C. Dendritic cells: an important link between antiphospholipid antibodies, endothelial dysfunction, and atherosclerosis in autoimmune and non-autoimmune diseases // *Clin. Immunol.* 2013; 146 (3): 197–206. DOI: 10.1016/j.clim.2012.12.002.
23. Wenink M.H., Han W., Toes R.E., Radstake T.R. Dendritic cells and their potential implication in pathology and treatment of rheumatoid arthritis // *Handb. Exp Pharmacol.* 2009; 188: 81–98. DOI: 10.1007/978-3-540-71029-5_4.
24. García-González P.A., Schinnerling K., Sepúlveda-Gutiérrez A., Maggi J., Hoyos L., Morales R.A., Mehdi A.M., Nel H.J., Soto L., Pesce B., Molina M.C., Cuchacovich M., Larrondo M.L., Neira Y., Catalán D.F., Hilkens C.M., Thomas R., Verdugo R.A., Aguilin J.C. Treatment with dexamethasone and monophosphoryl lipid a removes disease-associated transcriptional signatures in monocyte-derived dendritic cells from rheumatoid arthritis patients and confers tolerogenic features // *Front. Immunol.* 2016; 7: 458. eCollection 2016.
25. Balanescu A., Radu E., Nat R., Regalia T., Bojinca V., Ionescu R., Balanescu S., Savu C., Predeteanu D. Early and late effect of infliximab on circulating dendritic cells phenotype in rheumatoid arthritis patients // *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* 2005; 25 (1): 9–18. PMID: 15864873.
26. Wehner R., Bitterlich A., Meyer N., Kloß A., Schäkel K., Bachmann M., Schmitz M. Impact of chemotherapeutic agents on the immunostimulatory properties of human 6-sulfo LacNAc+ (slan) dendritic cells // *Int. J. Cancer.* 2013; 132 (6): 1351–1359. DOI: 10.1002/ijc.27786.
27. Raker V.K., Domogalla M.P., Steinbrink K. Tolerogenic dendritic cells for regulatory T cell induction in man // *Front. Immunol.* 2015; 6: 569. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00569.
28. Chamorro S. TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program // *J. Immunol.* 2009; 183 (5): 2984–2994. DOI: 10.4049/jimmunol.0801155.
29. Radstake T.R., Nabbe K.C., Wenink M.H., Roelofs M.F., Oosterlaar A., van Lieshout A.W., Barrera P., van Lent P.L., van den Berg W.B. Dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis lack the interleukin 13 mediated increase of FcRII expression, which has clear functional consequences // *Ann. Rheum. Dis.* 2005; 64: 1737–1743. DOI: 10.1136/ard.2004.034405.
30. Harry R.A., Anderson A.E., Isaacs J.D., Hilkens C.M. Generation and characterization of therapeutic tolerogenic dendritic cells for rheumatoid arthritis // *Ann. Rheum. Dis.* 2010; 69 (11): 2042–2050. DOI: 10.1136/ard.2009.126383.
31. Estrada-Capetillo L., Hernandez-Castro B., Monsivais-Urenda A., Alvarez-Quiroga C., Layseca-Espinosa E., Abud-Mendoza C., Baranda L., Urzainqui A., Sanchez-Madrid F., Gonzalez-Amaro R. Induction of Th17 lymphocytes and Treg cells by monocyte-derived dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus // *Clin. Dev. Immunol.* 2013; 2013, Article ID 584303, 9. DOI: 10.1155/2013/584303.
32. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J., Liu Y.J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood // *Blood.* 2010; 116: e74–e80. DOI: 10.1182/blood-2010-02-258558.
33. Sprangers S., de Vries T.J., Everts V. Monocyte heterogeneity: consequences for monocyte-derived immune cells // *Journal of Immunology Research.* 2016; Article ID 1475435, 10.
34. Balboa L., Romero M.M., Laborde E. et al. Impaired dendritic cell differentiation of CD16-positive monocytes in tuberculosis: role of p38 MAPK // *European*

- Journal of Immunology*. 2013; 43 (2); 335–347. DOI: 10.1002/eji.201242557.
35. Rossol M., Kraus S., Pierer M., Baerwald C., Wagner U. The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population // *Arthritis Rheum*. 2012; 64: 671–677. DOI: 10.1002/art.33418.
 36. Radwan W.M., Khalifa R.A., Esaily H.A., Lashin N.A. CD14++CD16+ monocyte subset expansion in rheumatoid arthritis patients: Relation to disease activity and interleukin-17 // *The Egyptian Rheumatologist*. 2016; 38 (3): 161–169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejr.2015.12.002>.
 37. Cooper D.L., Martin S.G., Robinson J.I., Mackie S.L., Charles C.J., Nam J., Consortium Y., Isaacs J.D., Emery P., Morgan A.W. FcγRIIIa expression on monocytes in rheumatoid arthritis: role in immune-complex stimulated TNF production and non-response to methotrexate therapy // *PLoS ONE*. 2012;7:e28918. DOI: 10.1371/journal.pone.0028918.
 38. Liu B., Dhanda A., Hirani S., Williams E.L., Sen H.N., Martinez Estrada F., Ling D., Thompson I., Casady M., Li Z., Si H., Tucker W., Wei L., Jawad S., Sura A., Dailey J., Hannes S., Chen P., Chien J.L., Gordon S., Lee R.W., Nussenblatt R.B. CD14++CD16+ Monocytes are enriched by glucocorticoid treatment and are functionally attenuated in driving effector T-cell responses // *J. Immunol*. 2015; 194 (11): 5150–5160. DOI: 10.4049/jimmunol.1402409.
 39. Chara L., Sánchez-Atrio A., Pérez A., Cuende E., Albarán F., Turrión A., Chevarria J., Sánchez M.A., Monserrat J., de la Hera A., Prieto A., Sanz I., Diaz D., Alvarez-Mon M. Monocyte populations as markers of response to adalimumab plus MTX in rheumatoid arthritis // *Arthritis Res. Ther*. 2012; 14 (4): R175. DOI: 10.1186/ar3928.
 40. Randolph G.J., Beaulieu S., Lebecque S., Steinman R.M., Muller W.A. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking // *Science*. 1998; 282: 480–483.
 41. Farkas A., Kemény L. Interferon-α in the generation of monocyte-derived dendritic cells: recent advances and implications for dermatology // *Br. J. Dermatol*. 2011; 165 (2): 247–54. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10301.x.

Поступила в редакцию 18.01.2017

Утверждена к печати 30.06.2017

Курочкина Юлия Дмитриевна, аспирант, лаборатория клеточной иммунотерапии, врач-ревматолог клиники иммунопатологии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Тихонова Марина Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Тыринова Тамара Викторовна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Леплина Ольга Юрьевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Сизиков Алексей Эдуардович, канд. мед. наук, зав. отделением ревматологии клиники иммунопатологии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Сулутьян Анна Эдуардовна, канд. мед. наук, врач-ревматолог отделения ревматологии клиники иммунопатологии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Коненкова Людмила Петровна, врач-ревматолог, отделение ревматологии клиники иммунопатологии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Чумасова Оксана Александровна, канд. мед. наук, врач-ревматолог, отделение ревматологии клиники иммунопатологии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Останин Александр Анатольевич, д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

Черных Елена Рэмовна, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией клеточной иммунотерапии, НИИФиКИ, г. Новосибирск.

(✉) Курочкина Юлия Дмитриевна, e-mail: Juli_k@bk.ru

УДК 616.379-008.646:575.174.015.3

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-195-206

For citation: Kurochkina Yu.D., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Sizikov A.E., Sulutian A.E., Konenkova L.P., Chumasova O.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Characteristics of dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis and different type of drug therapy. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 195–206.

Characteristics of dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis and different type of drug therapy

Kurochkina Yu.D., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Sizikov A.E., Sulutian A.E., Konenkova L.P., Chumasova O.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

*Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14, Yadrintsevskaya Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation*

ABSTRACT

Purpose of the study. Comparative study of the phenotypic and functional properties of dendritic cells (DC) in groups of patients with rheumatoid arthritis (RA) receiving disease-modifying drugs, or biological drugs and (or) pulse therapy with high doses of glucocorticoids.

Materials and methods. The study included 39 patients with RA and 20 age-appropriate and semi-healthy donors. Nineteen patients were treated with standard disease-modifying drugs (BMP) in the form of monotherapy or in combination (group PA1) at the time of the examination, 20 – biological preparations or pulse-therapy with glucocorticoids (group PA2). In the latter case, the examination was carried out for 2–7 days after the last injection of methylprednisolone.

Results. In this study, the properties of DC generated from monocytes under the action of IFN- α (IFN-DK) for RA are described for the first time. It has been established that the general feature of DC in the PA1 and PA2 groups are signs of immaturity of the DC, manifested by increased CD14 expression and a decrease in the proportion of mature (CD14-CD83+) DC. Despite the differences in DC in the PA1 and PA2 groups, both cell types retain in vitro sensitivity to dexamethasone, the treatment of which leads to a significant inhibition of TNF- α production and a decrease in allostimulant activity of the DC. Thus, IFN-DK in RA patients receiving medical therapy is characterized by the presence of tolerogenic properties, which are most pronounced when used in a program of treatment of biological agents or pulse therapy with corticosteroids.

Key words: rheumatoid arthritis, dendritic cells, dexamethasone, interferon α .

Received January 18.2017
Accepted November 08.2017

Kurochkina Yuliya D., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Doctor-rheumatologist, Clinic of Immunopathology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

Tikhonova Marina A., PhD, Superior Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

Tyrinova Tamara V., PhD, Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

Leplina Olga Yu., DM, Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

Sizikov Alexey E., PhD, Head of Rheumatology Department, Clinic of Immunopathology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

Sulutian Anna E., PhD, Doctor-rheumatologist of the Rheumatology Department, Clinic of Immunopathology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

Konenkova Ludmila P., PhD, Doctor-rheumatologist of the Rheumatology Department, Clinic of Immunopathology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

Chumasova Oksana A., PhD, Doctor-rheumatologist of the Rheumatology Department, Clinic of Immunopathology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

Ostanin Alexander A., DM, Professor, Main Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

Chernykh Elena R., DM, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Cellular Immunotherapy, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) **Kurochkina Yuliya D.**, e-mail: Juli_k@bk.ru.

УДК 616.72-002.77-085-092.4

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-207-219

Для цитирования: Литвинова Л.С., Тодосенко Н.М., Хазиахматова О.Г., Малинина И.П., Юрова К.А. Клеточные реакции CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов на дексаметазон в норме и при ревматоидном артрите в системе *in vitro*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 207–219.

Клеточные реакции CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов на дексаметазон в норме и при ревматоидном артрите в системе *in vitro*

Литвинова Л.С.¹, Тодосенко Н.М.¹, Хазиахматова О.Г.¹, Малинина И.П.², Юрова К.А.¹

¹ Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта (БФУ им. И. Канта)
Россия, 236016, г. Калининград, ул. Боткина, 3

² Областная клиническая больница Калининградской области (КОКБ)
Россия, 236019, г. Калининград, ул. Клиническая, 74

РЕЗЮМЕ

Целью исследования явился анализ влияния глюкокортикоида (ГК) дексаметазона (Dex) на изменение числа CD4⁺ Т-клеток, экспрессирующих поверхностные молекулы активации (CD25, CD71, HLA-DR и CD95), и их способности продуцировать провоспалительные медиаторы в культурах TCR-стимулированных Т-лимфоцитов CD3⁺CD45RO⁺, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (РА), в системе *in vitro*. В исследование включены 50 больных и 20 условно здоровых доноров.

Материал и методы. Культуры Т-клеток (CD3⁺CD45RO⁺) получали из мононуклеарных лейкоцитов методом иммуномагнитной сепарации (технология MACS®). В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали антибиотиновые частицы с биотинилированными антителами против CD2⁺, CD3⁺, CD28⁺ человека, имитирующие процесс костимуляции Т-клеток антиген-презентирующими клетками. В эксперименте использованы следующие концентрации дексаметазона – 2; 8; 16; 32; 64 мг. Методом проточной цитофлуориметрии проанализировано изменение иммунофенотипа Т-лимфоцитов; иммуноферментным анализом оценена секреция Т-клетками CD3⁺CD45RO⁺ провоспалительных цитокинов: IL-2, IFN γ , TNF α , IL-17 и IL-21.

Результаты. Подтвержден общий супрессорный эффект Dex на культуры Т-клеток CD3⁺CD45RO⁺, опосредованный снижением числа Т-клеток CD4⁺, экспрессирующих молекулы активации (CD25) и пролиферации (CD71), а также угнетением продукции медиаторов воспаления: IL-2, IFN γ и TNF α . Показано, что на фоне TCR-активации Dex повышает число клеток CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ в культурах CD3⁺CD45RO⁺, полученных от больных РА, и не изменяет их содержание в контроле. Корреляции между числом Т-клеток CD4⁺CD45RO⁺ CD95⁺HLA-DR⁺ с уровнем провоспалительных факторов (IL-17, IL-21 и TNF α) в супернатантах клеточных культур у больных РА свидетельствуют о наличии провоспалительного потенциала этой популяции Т-клеток. Предполагается, что резистентность Т-клеток CD4⁺CD45RO⁺CD95⁺HLA-DR⁺ больных РА к супрессорному действию ГК в целом приводит к сохранению и усилению функциональных возможностей аутореактивных клеток в патогенезе РА.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, молекулы активации, провоспалительные медиаторы, дексаметазон.

✉ Литвинова Лариса Сергеевна, e-mail: larisalitvinova@yandex.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Ревматоидный артрит (РА) характеризуется гиперплазией синовиальной мембраны и ее инфильтрацией клетками с провоспалительным потенциалом [1]. В частности, аутореактивные CD4⁺CD45RO⁺ Т-клетки памяти обеспечивают инициацию и пролонгацию воспалительного процесса, лежащего в основе РА, что приводит к разрушению суставов, и как следствие – к инвалидности индивидуума [1]. Известно, что при РА хроническая антигенная стимуляция приводит к гиперактивации иммунной системы, что сопровождается неконтролируемой экспрессией аутореактивными Т-лимфоцитами молекул активации (CD25, CD71, CD95, HLA-DR) [1, 2]. Предполагают, что высокая экспрессия эффекторными (CD3⁺CD4⁺/CD8⁺CD27⁻CD62L⁻CD45RO⁺) Т-клетками молекул HLA-DR и CD95 может являться признаком терминальной фазы дифференцировки и созревания Т-клеток [2, 3]. Эти процессы тесно ассоциированы с приобретением эффекторными Т-клетками CD4⁺ новых свойств (функционала), в частности усиливается продукция медиаторов с провоспалительной активностью (таких как TNF-α, IFN γ , IL-17, IL-21, но не IL-2 или IL-4) [3–7].

Основным методом лечения РА по-прежнему является противовоспалительная терапия синтетическими глюкокортикоидами (ГК) [8]. ГК оказывают комплексное воздействие на компоненты иммунной системы, в частности регулируют процессы клеточного гомеостаза Т-лимфоцитов [9–11]. Несмотря на широкое применение ГК, исследований, посвященных их влиянию на функциональную активность аутореактивных CD4⁺ Т-клеток, недостаточно, чтобы интерпретировать позитивные и негативные эффекты гормонального лечения этой патологии.

Целью исследования явилась оценка влияния дексаметазона (в системе *in vitro*) на функциональную активность TCR-стимулированных Т-клеток памяти CD4⁺CD45RO⁺, ассоциированную с изменением экспрессии мембранных молекул активации и их цитокинпродуцирующей способности, в норме и при РА.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили мононуклеарные лейкоциты (МНК), выделенные из венозной гепаринизированной крови, полученной от 50 больных ревматоидным артритом (РА) (38 женщин и 12 мужчин в возрасте $(36,4 \pm 7,2)$ лет) и 20 условно здоровых доноров (10 жен-

щин и 10 мужчин в возрасте $(35,3 \pm 8,9)$ лет). Верификация диагноза и набор пациентов в группы исследования осуществлялся на базе Областной клинической больницы (г. Калининград). Постановка диагноза ревматоидного артрита была выполнена согласно приказа № 21 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным ревматоидным артритом» от 13 января от 2006 г. Диагностические исследования включали опрос пациентов, рентгенографию, компьютерную и ЯМР-томографию суставов, выявление ревматоидного фактора и титра антител к циклическому цитрулин-содержащему пептиду, оценку скорости оседания эритроцитов и содержания С-реактивного белка в крови. На основании оценки анамнеза болезни в исследование были включены пациенты, отвечающие следующим критериям.

Активность болезни – ремиссия (DAS28 (визуальный калькулятор оценки активности заболевания при ревматоидном артрите) < 2,6) (10 человек) или низкая (DAS28 – 2,6–3,2) (40 человек).

Ревматоидный фактор – серопозитивный.

Антитела к циклическому цитрулин-содержащему пептиду – серопозитивный.

Отсутствие терапии стероидными и цитостатическими препаратами с момента манифестации заболевания (не менее 6 мес).

Продолжительность заболевания – не более 1 года с момента постановки диагноза.

Критерием исключения пациентов из исследования явилось получение медикаментозной терапии на момент взятия крови и наличие внесуставных осложнений заболевания. Со всеми обследованными лицами было подписано добровольное информационное согласие на исследование.

Клетки получали методом центрифугирования в градиенте плотности ($1,077 \text{ г/см}^3$) фиколл-урографина (Schering, Испания и Pharmacia, Швеция) по стандартной методике. Культуры Т-клеток (CD3⁺CD45RO⁺) из МНК получали методом иммуномагнитной сепарации с использованием технологии MACS[®] (MidiMACS Separator, LS Columns, MiltenyiBiotec, Германия) и моноклональных антител к CD3 и CD45RO с парамагнитными частицами (MicroBeads human, Miltenyi Biotec, Германия), согласно протокола фирмы-изготовителя. В эксперименте использовали клеточные культуры, чистота которых после магнитной сепарации составляла в среднем $(97,5 \pm 2,12)\%$ (фенотип CD3⁺CD45RO⁺CD14⁻CD19⁻) (далее – CD3⁺CD45RO⁺-клетки). Число живых клеток в культурах составляло не менее 98%.

CD3⁺CD45RO⁺-клетки (10^6 клеток/мл) культивировали в 48-луночном планшете в бессыво-

роточной среде Искова (Sigma, США), содержащей 0,5% сывороточного альбумина человека (Микроген, Россия), 5×10^{-5} М β -меркаптоэтанол (Acros Organic, США) и 30 мкг/мл гентамицина, в присутствии синтетического ГК (МП) (Orion Pharma, Россия) в разных концентрациях или без него (контроль) при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 , в течение 48 ч. В качестве активатора Т-лимфоцитов использовали реагент T-Cell Activation/Expansion Kit human (Miltenyi Biotec, Германия) – антибиотинные частицы MACSiBead™ с биотинилированными антителами против CD2⁺, CD3⁺, CD28⁺ человека (далее Ас/Ехр). Нагруженные антителами антибиотинные частицы MACSiBead™ используются в качестве имитации антиген-презентирующих клеток (АПК) для активации Т-клеточного рецептора (TCR) покоящихся Т-клеток (TCR-активатор). Реагент Ас/Ехр добавляли в пробы в количестве 5 мкл, которые содержали $0,5 \times 10^6$ антибиотинных MACSiBead™ частиц, соотношение клеток и активирующих частиц составило 1 : 2.

Регистрацию жизнеспособности и подсчет числа клеток в исследуемых клеточных культурах проводили методом проточной лазерной цитометрии на цитофлуориметре Guava Easy-Cite Plus (Millipore, США) с использованием реагента Guava ViaCount и одноименной программы (Millipore, США) согласно протоколу производителя. Число клеток, несущих поверхностные маркеры (CD45RO, CD3, CD4, CD25, CD71, HLA-DR, CD95), определяли методом проточной лазерной цитометрии с помощью моноклональных антител, конъюгированных с Viablu (CD45RO); аллофицианином (APC; CD3) (Miltenyi Biotec, Германия); флуоресцеином изотиоцианатом (FITC; CD95), фикозритрином (PE; CD4) (Abcam, Cambridge, Великобритания); с конъюгатом PE с цианином (PE-Cy7; CD25, CD71) и конъюгатом PE с пиридинхлорофиллом (PerCP; HLA-DR) (e-Bioscience, США) согласно методикам производителя. Регистрацию результатов проводили на проточном цитофлуориметре MACSQuant (Miltenyi Biotec, Германия).

Все результаты цитометрического анализа анализировали с помощью программы KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США). Выбор срока культивирования (48 ч) исследуемых проб обоснован тем фактом, что изменение фенотипических маркеров, характеризующих состояние активации Т-клеток после стимуляции TCR, реализуется через экспрессию генов с последующим синтезом соответствующих белков и соответствует геномному механизму действия ГК [12].

Варианты культивирования: 1) в среде без добавок (контроль); 2) в среде, содержащей Ас/Ехр ($0,5 \times 10^6$ MACSiBead™ частиц); 3) в среде, содержащей Ас/Ехр ($0,5 \times 10^6$ MACSiBead™ частиц) и Dex (2; 8; 16; 32; 64 мг). Дозы ГК, используемые в эксперименте, были определены, исходя из математической фармакокинетической двухкамерной модели, где учитывался расчетный объем распределения ГКС в организме (то есть гипотетический объем жидкости организма (V_d), в котором лекарственное вещество распределено равномерно и находится в концентрации, равной концентрации (Q) данного вещества в плазме крови (C_p); $V_d = Q / C_p$; для ГКС величина V_d составляет 0,35 л/кг). Таким образом, добавляемые концентрации Dex на 1 млн культивируемых Т-клеток/мл, составили (10^{-6} М; 2×10^{-6} М; 4×10^{-6} М; 8×10^{-6} М; $1,6 \times 10^{-5}$ М), что соответствует действию Dex в концентрациях 2; 8; 16; 32; 64 мг, распределенных условно в 5 л крови. Содержание цитокинов (IL-2, IFN γ , TNF α , IL-17 и IL-21) в супернатантах CD3⁺CD45RO⁺ культур оценивали методом иммуноферментного анализа с использованием стандартных наборов реактивов согласно протоколу фирм-производителей («Вектор-Бест», Россия и Cusabio Biotech, США).

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences). Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез [13]. Для проверки гипотезы о принадлежности исследуемых выборок к нормальному закону распределения использовали критерий Колмогорова – Смирнова. Учитывая несоответствие выборок нормальному закону распределения для их попарного сравнения применялись непараметрические критерии: Т-критерий Вилкоксона (для зависимых выборок) и U-критерий Манна – Уитни (для независимых выборок). Результаты представляли в виде медианы Me , первого и третьего квартилей (Q_1 – Q_3). С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный (путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена r) и регрессионный (с вычислением коэффициента регрессии r^2) анализы. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общее количество клеток (10^6 клеток/мл) в интактных культурах Т-лимфоцитов CD3⁺CD45RO⁺ у здоровых доноров и больных РА составляло

1,01 (0,87–1,21) и 0,88 (0,85–0,91) × 10⁶ клеток/мл, соответственно (табл. 1). Число живых клеток в интактных пробах CD3⁺CD45RO⁺ здоровых доноров было равным 71,68 (64,44–79,06)%, превышая аналогичный показатель у больных РА в среднем на 30%. На фоне TCR-активации в культурах CD3⁺CD45RO⁺, полученных у здоровых доноров, регистрировалось увеличение общего числа клеток, тогда как содержание живых лимфоцитов значительно снижалось. В культурах клеток от больных РА аналогичные параметры оставались неизменными. Dex не оказывал значимого

действия на изменение общего числа клеток, полученных от здоровых доноров и больных РА.

Низкие концентрации Dex (2–8 мг) достоверно повышали число живых клеток в TCR-активированных CD3⁺CD45RO⁺-культурах контрольной группы, тогда как высокие дозы (64 мг) способствовали снижению исследуемого показателя в сравнении с пробами только с добавлением активатора. Добавление Dex значимо не влияло на изменение числа живых клеток в культурах CD3⁺CD45RO⁺ Т-клеток больных РА (см. табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Общее число клеток (10 ⁶ клеток/мл) и содержание живых клеток (%) в культурах Т-лимфоцитов CD3 ⁺ CD45RO ⁺ , полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, в условиях инкубации с разными концентрациями дексаметазона (Dex) и активатором (Ac/Exp), Me (Q ₁ –Q ₃)				
Показатель	Условия культивирования	Здоровые доноры	Больные РА	
Общее число клеток, 10 ⁶ клеток/мл	Без активации	1,01 (0,88–1,21)	0,88 (0,85–0,91) [◊]	
	Ac/Exp	1,21 (1,05–1,28) [*]	0,91 (0,80–0,96) [◊]	
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	1,19 (1,16–1,25)	0,93 (0,82–0,99) [◊]
		8	1,22 (1,18–1,27)	0,90 (0,79–0,98) [◊]
		16	1,20 (1,19–1,30)	0,95 (0,86–1,01) [◊]
		32	1,18 (1,15–1,22)	0,92 (0,88–0,98) [◊]
64	1,21 (1,12–1,27)	0,94 (0,81–0,97) [◊]		
Содержание живых клеток, %	Без активации	71,68 (64,44–79,06)	51,33 (41,39–60,08) [◊]	
	Ac/Exp	60,25 (55,73–66,84) [*]	55,29 (40,29–59,06)	
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	68,72 (59,75–75,78) ^{**}	56,82 (48,32–61,97) [◊]
		8	69,11 (63,68–76,23) ^{**}	56,56 (41,32–60,42) [◊]
		16	66,34 (60,07–74,64) ^{**}	57,20 (38,20–62,87)
		32	64,52 (58,74–76,10)	59,89 (53,44–61,44)
64	48,3 (39,73–52,05) ^{**}	53,20 (31,2–55,35)		

П р и м е ч а н и е. Здесь и в таблицах 2, 3: * $p < 0,05$ – уровень статистической значимости различий по сравнению с Т-клетками, культивированными без активационных частиц; ** $p < 0,05$ – по сравнению с Т-клетками, культивированными с активационными частицами; ◊ $p < 0,05$ – по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров.

Данные, отражающие содержание (%) Т-клеток CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺, экспрессирующих поверхностные маркеры активации (CD25, CD71, CD95, HLA-DR), при воздействии на культуры активатора и ГК, представлены в табл. 2.

Инкубация CD3⁺CD45RO⁺-клеток (у здоровых доноров и больных РА) с Ac/Exp приводила к однонаправленному (разной степени выраженности) росту числа лимфоцитов CD4⁺, экспрессирующих поверхностные активационные маркеры (см. табл. 2). Сочетанное внесение Ac/Exp и Dex в культуральную среду способствовало значительному снижению содержания CD25- и CD71-позитивных Т-лимфоцитов CD4⁺CD45RO⁺ в контроле и у больных РА. На фоне активации Dex (2–16 мг) способствовал снижению числа Т-клеток CD4⁺CD95⁺ и не изменял содержание Т-лимфоцитов CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ у здоровых доноров. Высокие дозы Dex (32–64 мг) способ-

ствовали росту числа Т-клеток CD4⁺CD95⁺ и снижению лимфоцитов CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺. Добавление Dex (8–64 мг) в TCR-активированные CD3⁺CD45RO⁺ культуры больных РА индуцировало равномерный рост содержания Т-клеток CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ и снижение числа Т-лимфоцитов CD4⁺CD95⁺.

Данные о содержании провоспалительных цитокинов (IL-2, IFN γ , TNF α , IL-17, IL-21) в супернатантах культур Т-лимфоцитов CD3⁺CD45RO⁺ представлены в табл. 3. У больных РА в супернатантах клеточных культур в интактных пробах выявлено более высокое содержание цитокинов (IFN γ , TNF α , IL-17, IL-21) (по сравнению со значениями контрольной группы), за исключением IL-2. TCR-активация способствовала достоверному повышению содержания провоспалительных медиаторов в пробах как здоровых доноров, так и больных РА.

Т а б л и ц а 2

Содержание Т-лимфоцитов CD4 ⁺ , несущих поверхностные маркеры активации в культурах Т-клеток CD3 ⁺ CD45RO ⁺ , полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, в условиях инкубации с разными концентрациями дексаметазона (Dex) и активатором (Ac/Exp), Me (Q _i -Q _j)				
Показатель	Условия культивирования	Здоровые доноры	Больные РА	
CD4 ⁺ CD25 ⁺	Без активации	3,11 (2,99–3,14)	1,95 (1,60–2,70) ^φ	
	Ac/Exp	35,22 (30,19–36,29)*	25,13 (15,75–27,52) ^{*φ}	
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	35,92 (30,79–37,02)	19,75 (13,48–23,08) ^{**φ}
		8	34,87 (29,89–35,93)	19,48 (12,70–22,18) ^{**φ}
		16	26,68 (22,87–27,49)**	15,58 (9,85–17,54) ^{**φ}
		32	21,35 (18,29–21,99)**	16,37 (10,87–19,87) ^{**φ}
64	22,15 (18,99–22,82)**	12,78 (9,05–15,80) ^{**φ}		
CD4 ⁺ CD71 ⁺	Без активации	4,70 (4,58–5,43)	0,64 (0,35–0,85) ^φ	
	Ac/Exp	15,04 (12,45–17,38)*	8,04 (5,42–11,02) ^{*φ}	
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	12,43 (10,29–14,36)**	6,60 (4,02–8,61) ^{**φ}
		8	10,37 (8,59–11,98)**	5,29 (3,06–6,77) ^{**φ}
		16	9,77 (8,08–11,28)**	4,73 (2,61–5,37) ^{**φ}
		32	5,19 (4,29–5,99)**	4,68 (3,14–4,97) ^{**φ}
64	3,39 (2,80–3,91)**	3,60 (2,53–4,47) ^{**φ}		
CD4 ⁺ CD95 ⁺	Без активации	11,96 (11,19–14,01)	8,18 (7,01–9,87) ^φ	
	Ac/Exp	21,46 (20,07–25,05)*	28,99 (25,75–33,16) ^{*φ}	
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	18,51 (16,24–22,78)**	17,44 (15,79–21,13)**
		8	17,96 (15,28–21,32)**	19,86 (18,71–22,72)**
		16	18,68 (16,88–20,32)**	19,29 (16,89–22,21)**
		32	26,60 (22,02–27,56)**	19,57 (16,55–21,54) ^{**φ}
64	28,75 (26,88–33,57)**	22,05 (17,24–23,03) ^{**φ}		
CD4 ⁺ CD95 ⁺ HLA-DR ⁺	Без активации	4,94 (3,95–5,79)	7,52 (6,51–8,95) ^φ	
	Ac/Exp	11,36 (9,08–13,33)*	14,12 (12,83–15,91) ^{*φ}	
	Ac/Exp + Dex (мг)	2	11,48 (9,71–13,47)	13,64 (11,96–16,00)
		8	12,38 (9,89–14,53)**	18,21 (13,06–17,39) ^{**φ}
		16	13,98 (11,17–16,40)**	18,91 (17,97–20,39) ^{**φ}
		32	9,36 (8,28–12,16)**	19,05 (18,36–20,22) ^{**φ}
64	8,74 (6,98–10,28)**	21,14 (19,64–21,99) ^{**φ}		

Изменения носили однонаправленный характер, но имели разную степень выраженности. На фоне активации инкубация с Dex CD3⁺CD45RO⁺-клеток, полученных у здоровых доноров и больных РА, приводила к снижению (в разной степени выраженности) содержания IL-2, IFN γ и TNF α в супернатантах клеточных культур. Эффект ГК (весь диапазон концентраций) в отношении продукции CD3⁺CD45RO⁺

Т-клетками здоровых доноров IL-17 и IL-21 был супрессорным. Dex не оказывал значимого влияния на секрецию активированными Т-клетками CD3⁺CD45RO⁺ у больных РА цитокинов – IL-17 (2–16 мг) и IL-21 (весь диапазон концентраций). Только высокие дозы ГК (32–64 мг) достоверно снижали секрецию IL-17 активированными Т-клетками CD3⁺CD45RO⁺ у больных РА (см. табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Уровень провоспалительных цитокинов (пг/мл) в супернатантах культур CD3 ⁺ CD45RO ⁺ Т-лимфоцитов, полученных у здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, в условиях инкубации с разными концентрациями дексаметазона (Dex) и активатором (Ac/Exp), Me (Q _i -Q _j)				
Показатель	Условия культивирования	Здоровые доноры	Больные РА	
IL-2	Без активации	88,14 (79,05–89,84)	61,84 (61,04–63,79) ^φ	
	Ac/Exp	741,3 (672,95–869,30)*	421,55 (396,60–430,96) ^{*φ}	
	Ac/Exp + Dex, мг	2	720,30 (675,80–803,63)	281,03 (264,40–287,31) ^{**φ}
		8	765,30 (692,78–786,03)	135,98 (127,94–139,02) ^{**φ}
		16	680,35 (655,80–765,45)	102,07 (96,03–104,35) ^{**φ}
		32	550,40 (485,33–597,90)**	77,35 (72,77–79,07) ^{**φ}
64	410,80 (305,53–446,78)**	57,59 (54,18–58,87) ^{**φ}		

Окончание табл. 3

Показатель	Условия культивирования	Здоровые доноры	Больные РА	
TNF α	Без активации	44,38 (38,22–51,29)	55,89 (48,39–61,29) ^o	
	Ас/Ехр	279,59 (240,79–323,13)*	1100,70 (885,05–1120,99)* ^o	
	Ас/Ехр + Дех, мг	2	93,20 (80,26–115,20)**	163,79 (131,70–166,81)** ^o
		8	50,84 (50,39–58,75)**	118,23 (95,06–120,41)** ^o
		16	55,48 (47,78–64,11)**	121,79 (97,93–124,03)** ^o
		32	41,12 (35,41–47,52)**	128,89 (103,64–131,26)** ^o
64	31,42 (27,05–36,31)**	105,48 (84,82–107,43)** ^o		
IFN γ	Без активации	18,66 (16,92–20,95)	25,32 (24,42–28,13) ^o	
	Ас/Ехр	365,32 (332,07–400,30)*	632,88 (610,50–703,13)* ^o	
	Ас/Ехр + Дех, мг	2	341,48 (335,30–373,35)	540,92 (512,79–600,97)** ^o
		8	319,88 (312,58–343,13)	349,66 (337,29–388,47)** ^o
		16	311,62 (298,71–321,31)**	405,69 (391,35–450,72)** ^o
		32	303,37 (278,39–315,12)**	381,25 (367,78–423,57)** ^o
64	281,43 (266,72–293,58)**	314,86 (303,73–349,81)** ^o		
IL-17	Без активации	2,9 (2,38–3,18)	1,93 (1,58–2,11) ^o	
	Ас/Ехр	17,98 (14,76–19,73)*	54,04 (44,31–59,08)*	
	Ас/Ехр + Дех, мг	2	19,78 (16,23–21,70)**	48,60 (41,65–52,20) ^o
		8	16,21(13,3–17,79)**	49,78 (47,93–56,93) ^o
		16	11,24 (9,22–13,33)**	49,52 (45,94–57,92) ^o
		32	3,28 (1,74–3,78)**	43,36 (27,35–36,47)** ^o
64	1,77 (0,32–2,55)**	42,82 (24,89–33,19)** ^o		
IL-21	Без активации	1,2 (0,00–1,23)	1,40 (1,37–1,60)	
	Ас/Ехр	7,11 (5,11–7,20)*	13,97 (13,67–15,97)* ^o	
	Ас/Ехр + Дех, мг	2	6,45 (4,65–6,55)**	12,45 (11,21–13,09) ^o
		8	5,46 (3,93–5,54)**	11,92 (11,00–12,57) ^o
		16	5,38 (3,87–5,45)**	12,75 (11,50–13,43) ^o
		32	4,73 (3,41–4,80)**	11,03 (10,79–12,60) ^o
64	4,39 (3,19–4,44)**	12,94 (11,69–13,65) ^o		

ОБСУЖДЕНИЕ

Стимуляция Ас/Ехр CD3⁺CD45RO⁺-клеток здоровых доноров и больных РА сопровождалась ростом числа CD4⁺-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры активации, пролиферации и апоптоза (CD25, CD71, HLA-DR и CD95) (см. табл. 2). Выявленные изменения вполне согласуются с данными мировой литературы, отражающими реакцию Т-клеток на TCR-стимуляцию [2, 14]. Так, IL-2-зависимая стадия иммунного ответа ассоциирована с экспрессией молекулы CD25 (α -цепь рецептора IL-2). Т-клетки памяти находятся в фазе G1, что способствует их быстрому вхождению в IL-2-зависимую стадию иммунного ответа. Появление на мембране Т-лимфоцита рецептора к трансферрину (CD71/TfR1) характеризует стадию пролиферации, менее зависимую от IL-2 [10]. Установленное повышение общего числа клеток, мл, в CD3⁺CD45RO⁺ -культурах здоровых доноров при действии Ас/Ехр имело ассоциацию с содержанием Т-клеток CD4⁺, экспрессирующих молекулы CD71 и CD25 (соответственно $r = 0,675$; $r = 0,489$; $p < 0,05$). В свою очередь индуцированный добавлением Ас/Ехр рост числа Т-клеток CD4⁺, несущих мембранные молекулы

поздней активации и апоптоза – CD95 и HLA-DR, в культурах здоровых доноров и больных РА может свидетельствовать о развитии клеточной гибели, индуцированной активацией, которая является важным механизмом, обеспечивающим толерантность на периферии за счет устранения аутореактивных лимфоцитов [15]. Отрицательные корреляции между содержанием живых клеток и числом Т-клеток CD4⁺ (см. табл. 1) с фенотипом CD95⁺ и CD95⁺HLA-DR⁺ в культурах здоровых доноров, выявляемые при действии на клетки Ас/Ехр (соответственно $r = -0,367$; $r = -0,452$; $p < 0,05$) подтверждают вышесказанное. Следует отметить меньшую чувствительность Т-клеток CD4⁺CD45RO⁺ больных РА к пролиферативному и апоптогенному действию Ас/Ехр, что может быть связано с изменением их функциональной активности, опосредованной непрерывной стимуляцией Т-клеточного рецептора аутоантигенами *in vivo* [1, 16]. Выявленное супрессорное действие Дех на экспрессию молекул активации (CD25) и пролиферации (CD71) TCR-активированными Т-клетками CD4⁺CD45RO⁺, полученными от здоровых доноров и больных РА (см. табл. 2), вполне укладывается в эффекты, оказываемые ГК [8]. Прямая связь между негативными эффектами

Dex на продукцию (экспрессию гена IL-2 и его секрецию) IL-2 и зависимым от IL-2 подавлением экспрессии молекул CD25 и CD71 на активированных CD4⁺-лимфоцитах подтверждена в исследованиях других авторов [8, 10, 17–19].

Молекула CD95 обладает рядом функций, среди которых не только участие в процессах апоптоза, но и в пролиферации, канцерогенезе, созревании Т-лимфоцитов и др. [20, 21]. Добавление Dex в TCR-активированные культуры CD3⁺CD45RO⁺ больных РА (весь диапазон концентраций ГК) и здоровых доноров (2–16 мг) способствовало значимому снижению числа клеток CD4⁺CD95⁺ (см. табл. 2), что согласуется со способностью ГК ингибировать активационно-индуцированную гибель клеток с помощью прямой ДНК-зависимой репрессии гена CD95L [22, 23]. Обнаруженное увеличение числа клеток CD4⁺CD95⁺ в CD45RO⁺-культурах здоровых доноров (но не у больных РА) в результате сочетанного действия активатора и Dex (32–64 мг) отрицательно коррелировало с содержанием живых клеток в культурах ($r = -0,563$; $r = -0,861$; $p < 0,05$), что подтверждает проапоптогенный эффект высоких концентраций ГК [24]. В то же время отсутствие таких ассоциаций при действии ГК в пробах больных РА (весь диапазон доз) и при добавлении низких доз Dex (2–16 мг) в культуры здоровых доноров может свидетельствовать об участии гликопротеина CD95 в процессах активации и созревания Т-клеток [3, 10].

Экспрессия молекулы HLA-DR Т-клетками отражает их длительную активацию. Кроме того, предполагают, что CD3⁺HLA-DR⁺ представляют собой зрелые регуляторные Т-клетки с высокой супрессорной активностью [1, 16]. Как уже упоминалось ранее, высокая экспрессия зрелыми эффекторными (CD3⁺CD4⁺/CD8⁺CD27⁺CD62L⁺CD45RO⁺) Т-клетками здоровых доноров молекул HLA-DR и CD95 может являться признаком терминальной фазы дифференцировки и созревания Т-клеток [3]. При этом выявлено, что все CD3⁺HLA-DR⁺-лимфоциты здоровых доноров экспрессируют гликопротеин CD95, однако не все CD3⁺CD95⁺-клетки являются HLA-DR-позитивными.

Инкубация TCR-активированных CD3⁺CD45RO⁺-культур с Dex (2–16 мг) значимо не влияла на изменение числа Т-клеток CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ у здоровых доноров (см. табл. 2). Только максимальные концентрации Dex (32–64 мг) способствовали снижению содержания CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺-лимфоцитов. Выявленные отрицательные взаимосвязи между числом

CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ Т-клеток и содержанием живых лимфоцитов в пробах с добавлением Dex (32–64 мг) и активатора может быть доказательством регуляторной активности Т-клеток CD3⁺HLA-DR⁺, механизмы которой опосредованы контактными взаимодействиями между соседними клетками (включая CTLA-4-сигнализацию) [1, 16]. В то же время, согласно N. Bertho и соавт. (2000), сигналы, генерируемые с помощью HLA-DR, приводят к гибели зрелых профессиональных АПК и активированных Т- и В-лимфоцитов, утративших способность к экспрессии Fas-антигена (каспаз-независимый механизм) [26].

Напротив, в TCR-активированных CD3⁺CD45RO⁺-культурах больных РА добавление Dex (8–64 мг) индуцировало равномерный рост содержания Т-клеток CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ (см. табл. 2). Отсутствие взаимосвязей между содержанием HLA-DR-позитивных клеток и числом живых и мертвых лимфоцитов (см. табл. 1) в культурах может свидетельствовать о нарушении супрессорных функций этой популяции клеток. Полученные результаты согласуются с опубликованными ранее данными о наличии в периферической крови больных РА популяции активированных Т-лимфоцитов CD4⁺CCR7⁺CD45RA⁺HLA-DR⁺ с выраженными провоспалительными свойствами, способных рециркулировать через воспаленную синовиальную оболочку сустава, численность которых возрастает на периферии во время активной фазы заболевания [1, 25–28].

Основываясь на предположении, что Т-клетки CD4⁺CD45RO⁺CD95⁺HLA-DR⁺ являются вероятной артритогенной субпопуляцией, далее нами была предпринята попытка оценить влияние Dex на секрецию активированными Т-клеточными культурами CD3⁺CD45RO⁺ основных провоспалительных цитокинов (IL-2, IL-17, IL-21, TNF α и IFN γ), принимающих участие в патогенезе РА. Так, IL-17 и IFN γ играют ключевую роль в инициации РА, приводя к появлению первичных симптомов заболевания, усиливая воспалительный ответ [29, 30], тогда как IL-21 и TNF α в большей степени участвуют в пролонгации заболевания, способствуя инфильтрации клеток в синовиальные ткани с последующим разрушением суставного хряща при РА [31, 32].

Нами был обнаружен ряд интересных зависимостей между содержанием клеток CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ в культурах CD3⁺CD45RO⁺ и показателями, отражающими секрецию провоспалительных медиаторов. Так, в Ac/Exp-активированных пробах больных РА число Т-клеток CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ позитивно коррелировало с содержанием

провоспалительных цитокинов в супернатантах клеточных культур: IL-17 ($r = 0,617$; $p < 0,05$), IL-21 ($r = 0,430$; $p < 0,05$). Все эти взаимосвязи подтверждают роль Т-клеток CD4⁺CD95⁺H-LA-DR⁺ в продукции провоспалительных медиаторов у больных РА при TCR-активации. Более низкая (в сравнении с контрольной группой) продукция Т-клетками CD3⁺CD45RO⁺ у больных РА IL-2 в ответ на TCR-стимуляцию (см. табл. 3) в целом может свидетельствовать об ослаблении у них пролиферативных иммунных реакций, что может приводить к нарушению механизмов, ответственных за формирование Т-клеточной памяти [28, 33]. У здоровых доноров такие зависимости отсутствовали.

Инкубация TCR-активированных клеток CD3⁺CD45RO⁺, полученных у больных РА с Dex (весь диапазон концентраций), приводила к снижению содержания IL-2 в супернатантах клеточных культур (дозозависимый эффект $r^2 = -0,616$, $p < 0,05$) (см. табл. 3). У здоровых доноров статистически значимый супрессорный эффект ГК ($p \leq 0,05$) отмечался только при действии высоких концентраций гормона (16–64 мг). Многие исследования подтверждают негативную регуляцию ГК генной экспрессии IL-2 в иммунных клетках [10, 34]. Выявлено, что Dex ингибирует транскрипцию гена IL-2, снижая стабильность его мРНК [34]. Кроме того, ГК способны связывать транскрипционные факторы (NFAT, AP-1), индуцирующие экспрессию гена IL-2, препятствуя образованию димерных комплексов (NFAT+AP-1) и предотвращая их прямое взаимодействие с промоторными областями гена [16, 31]. Выявленный нами супрессорный эффект Dex на экспрессию CD25-молекулы Т-клетками CD4⁺ может быть опосредован снижением аутопродукции IL-2 [10, 34].

В культурах, полученных у больных РА и здоровых доноров, Dex оказывал умеренный супрессорный эффект ($p < 0,05$) в отношении секреции TCR-активированными клетками CD3⁺CD45RO⁺ IFN γ (см. табл. 3). Результаты опубликованных исследований свидетельствуют об ингибирующем эффекте ГК на продукцию IFN γ стимулированными Th1-лимфоцитами человека [11], предполагаемым механизмом которого может быть непрямая транскрипция [16, 24, 34, 36], реализуемая через белок-белковые взаимодействия ГКР с транскрипционными факторами (AP-1/CREB/ATF). Установлено, что фармакологические дозы ГК, подавляя активность T-bet зависимого фактора STAT4, снижают синтез и секрецию IFN γ [8, 36].

Добавление Dex (весь диапазон концентраций) в TCR-активированные культуры CD3⁺CD45RO⁺,

полученные у здоровых доноров и больных РА, приводило к значимому снижению содержания TNF α в супернатантах клеточных культур (см. табл. 3). Более выраженные изменения регистрировались в пробах, полученных у больных РА. Известно, что ГК способствуют деградации мРНК гена TNF α и снижают его экспрессию за счет белок-белковых взаимодействий (ГК-NFkB), предотвращая связь внутриклеточных сигнальных гликопротеинов (мессенджеров) с промоторными областями провоспалительных генов [36].

Влияние Dex (весь диапазон концентраций ГК) на Т-клетки CD3⁺CD45RO⁺ здоровых доноров в отношении их секреции IL-17 и IL-21 носило угнетающий характер, при этом снижение содержания IL-17 в супернатантах клеточных культур было дозозависимым ($r^2 = -0,672$, $p < 0,05$). Данные литературы в отношении эффектов ГК на продукцию IL-17 Т-клетками крайне противоречивы. Согласно одним источникам, клоны Th17 устойчивы к супрессорному влиянию ГК; более того, ГК опосредуют дифференцировку клеток Th17 *in vitro* [24, 37]. Тогда как другими исследователями были получены прямо противоположные данные [38]. ГК-опосредованное угнетение секреции IL-17 Т-лимфоцитами ассоциируют с белок-белковыми взаимодействиями, при которых ГКР изолирует транскрипционные факторы (такие как STAT3, NFkB и AP-1) от промотора его гена [24]. В источниках научной периодики данных, освещающих влияние ГК на продукцию Т-клетками памяти IL-21, крайне мало. В целом снижение уровня секреции IL-21 Т-клетками связывают с прямым блокированием экспрессии гена IL-21 за счет взаимодействия ГК с транскрипционным фактором AP-1/NFAT [34, 39].

Интересно, что Т-клетки CD3⁺CD45RO⁺ больных РА были не чувствительны к супрессорному действию Dex в отношении секреции цитокинов IL-17 (2–16 мг) и IL-21 (весь диапазон концентраций). Лишь максимальные дозы ГК (32–64 мг) достоверно снижали секрецию IL-17 активированными Т-клетками CD3⁺CD45RO⁺. Данные настоящего исследования не противоречат литературным. M. Noack (2016) описан ингибиторный эффект ГК в отношении продукции IL-17 *in vitro* в смешанной культуре периферических клеток крови и синовиоцитов, полученной у больных РА [40]. Также выявлено супрессорное действие ГК на содержание Th17-клеток на периферии и их секрецию IL-17 при активной фазе РА [37]. В эксперименте с использованием нокаутных мышей было показано, что IL-17 является одним из основных таргетных медиаторов воспаления (при

моделировании РА) для действия ГК [41]. Проведенный нами корреляционный анализ позволил обнаружить взаимосвязь числа CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ с содержанием IL-17 в супернатантах TCR-активированных CD3⁺CD45RO⁺-культур больных РА при действии Dex ($r = 0,563$; $r = 0,470$; $r = 0,783$; $r = 0,873$; $p < 0,05$ при добавлении в среду активатора и Dex в дозе 8, 16, 32 и 64 мг соответственно); с IL-21 ($r = 0,352$; $r = 0,465$; $p < 0,05$ при добавлении в среду активатора и Dex в дозе 16 и 32 мг соответственно) и IFN γ ($r = 0,673$; $r = 0,782$; $r = 0,820$; $p < 0,05$ при добавлении в среду активатора и Dex в дозе 16, 32 и 64 мг соответственно). Выявленные ассоциации могут свидетельствовать о резистентности TCR-активированной популяции Т-клеток CD4⁺CD45RO⁺ CD95⁺HLA-DR⁺ больных РА к противовоспалительному действию синтетического ГК Dex и сохранению высокого провоспалительного потенциала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ограничивая процессы активации и пролиферации Т-клеток CD4⁺CD45RO⁺ при РА, Dex подавляет их чрезмерный рост. Индуцированное ГК повышение числа CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ и CD4⁺CD95⁺ Т-лимфоцитов у больных РА может свидетельствовать об относительной резистентности этих клеток, возможно связанной с дефектами их апоптоза, к противовоспалительному супрессорному действию Dex. Эффекты Dex на секрецию TCR-активированными клетками CD3⁺CD45RO⁺, полученными у больных РА, провоспалительных факторов (IFN γ , IL-2 и TNF α) в целом носят угнетающий характер, подтверждая общий иммуносупрессорный механизм действия ГК, реализуемый через инактивацию основных транскрипционных факторов воспалительного ответа.

Наряду с этим CD3⁺CD45RO⁺ Т-клетки больных РА оказались не чувствительны к супрессорному действию Dex в отношении продукции IL-17 и IL-21. Выявленные нами ассоциации между числом Т-клеток CD4⁺CD45RO⁺CD95⁺HLA-DR⁺ и содержанием провоспалительных медиаторов (IL-17, IL-21 и IFN γ) у больных РА свидетельствуют о сохранении провоспалительного потенциала TCR-активированной популяции Т-клеток CD4⁺CD45RO⁺CD95⁺HLA-DR⁺ у больных РА на фоне действия ГК. Мы предполагаем, что резистентность Т-клеток CD4⁺CD45RO⁺ CD95⁺HLA-DR⁺ у больных РА к супрессорному действию Dex приводит к сохранению и усилению функциональных возможностей аутореактивных клеток в патогенезе РА.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности («дорожной карты») и субсидии «Организация проведения научных исследований 20.4986.2017/ВУ» Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Перед включением в исследование от каждого пациента и их законных представителей было получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование проводилось согласно Хельсинкской Декларации ВМА 2000 г. и протоколу Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Исследования одобрено локальным этическим комитетом (№ 2 от 11 ноября 2014 г.).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Matsuki F., Saegusa J., Miyamoto Y., Misaki K., Kumagai S., Morinobu A. CD45RA-Foxp3(high) activated/effector regulatory T cells in the CCR7+CD45RA-CD27+CD28+ central memory subset are decreased in peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 438 (4): 778–783. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.05.120.
2. Sava F., Toldi G., Treszl A., Hajdú J., Harmath Á., Tulasay T., Vásárhelyi B. Expression of lymphocyte activation markers of preterm neonates is associated with perinatal complications // *BMC Immunol.* 2016; 17 (1): 19. DOI: 10.1186/s12865-016-0159-7.
3. Сохоневич Н.А. Роль цитокинов, имеющих общую γ -цепь рецепторов (IL-2, IL-7, IL-15), в регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2015: 24.
Sohonevich N.A. Rol' citokinov, imeyushchih obshchuyu γ -cep' receptorov (IL-2, IL-7, IL-15), v regulyacii funkcional'noj aktivnosti T-limfocitov [The role of cytokines, contains a common γ -chain of receptors (IL-2, IL-7, IL-15), in the regulation of the functional activity of T-lymphocytes]: avtoref. ... dis. kand. med. nauk. Tomsk, 2015: 24 (in Russian).
4. Cho B.A., Sim J.H., Park J.A., Kim H.W., Yoo W.H., Lee S.H., Lee D.S., Kang J.S., Hwang Y.I., Lee W.J., Kang I., Lee E.B., Kim H.R. Characterization of effector memory

- CD8+ T cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis // *J. Clin. Immunol.* 2012; 32 (4): 709–720. DOI: 10.1007/s10875-012-9674-3.
5. Van Amelsfort J.M., Jacobs K.M., Bijlsma J.W., Lafaber F.P., Taams L.S. CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid // *Arthritis Rheum.* 2004; 50 (9): 2775–2785. DOI: 10.1002/art.20499.
 6. Gattorno M., Prigione I., Morandi F., Gregorio A., Chiesa S., Ferlito F., Favre A., Uccelli A., Gambini C., Martini A., Pistoia V. Phenotypic and functional characterisation of CCR7+ and CCR7- CD4+ memory T cells homing to the joints in juvenile idiopathic arthritis // *Arthritis. Res. Ther.* 2005; 7 (2): R256–257. DOI: 10.1186/ar1485.
 7. Okada R., Kondo T., Matsuki F., Takata H., Takiguchi M. Phenotypic classification of human CD4+ T cell subsets and their differentiation // *Int. Immunol.* 2008; 20 (9): 1189–1199. DOI: 10.1093/intimm/dxn075.
 8. Baschant U., Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2010; 120 (2–3): 69–75. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2010.03.058.
 9. Bischof F., Melms A. Glucocorticoids inhibit CD40 ligand expression of peripheral CD4+ lymphocytes // *Cell Immunol.* 1998; 187 (1): 38–44. DOI: 10.1006/cimm.1998.1308.
 10. Gutsol A.A., Sokhnevich N.A., Iurova K.A., Haziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Litvinova L.S. Dose-dependent effects of dexamethasone on functional activity of T-lymphocytes different grade of differentiation // *Mol. Biol. (Mosk).* 2015; 49 (1): 149–157.
 11. Pandolfi J., Baz P., Fernández P., Discianni Lupi A., Payaslián F., Billordo L.A., Fainboim L., Arruvito L. Regulatory and effector T-cells are differentially modulated by dexamethasone // *Clin. Immunol.* 2013; 149 (3): 400–410. DOI: 10.1016/j.clim.2013.09.008.
 12. Ayroldi E., Macchiarulo A., Riccardi C. Targeting glucocorticoid side effects: selective glucocorticoid receptor modulator or glucocorticoid-induced leucine zipper? A perspective // *Faseb. J.* 2014; 28 (12): 5055–5070. DOI: 10.1096/fj.14-254755.
 13. Кремер Н.Ш. Теория вероятностей и математическая статистика. М.: ЮНИТИ-ДАНА, 2004: 573.
 - Kremer N.Sh. Teoriya veroyatnostej i matematicheskaya statistika [Theory of Probability and Mathematical Statistics]. М.: YUNITI-DANA Publ., 2004: 573 (in Russian).
 14. Reddy M., Eirikis E., Davis C., Davis H.M., Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function // *J. Immunol. Methods.* 2004; 293 (1–2): 127–142. DOI: 10.1016/j.jim.2004.07.006.
 15. Tang X., Yocum D.E., Dejonghe D., Nordensson K., Lake D.F., Richard J. Increased activation-induced cell death in peripheral lymphocytes of rheumatoid arthritis patients: the mechanism of action // *Immunology.* 2004; 112 (3): 496–505. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01888.x.
 16. Matsuki F., Saegusa J., Nishimura K., Miura Y., Kurosaka M., Kumagai S., Morinobu A. CD45RA-Foxp3(low) non-regulatory T cells in the CCR7-CD45RA-CD27+CD28+ effector memory subset are increased in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis // *Cell Immunol.* 2014; 290 (1): 96–101. DOI: 10.1016/j.cellimm.2014.05.011.
 17. Boumpas D.T., Anastassiou E.D., Older S.A., Tsokos G.C., Nelson D.L., Balow J.E. Dexamethasone inhibits human interleukin 2 but not interleukin 2 receptor gene expression *in vitro* at the level of nuclear transcription // *J. Clin. Invest.* 1991; 87 (5): 1739–1747. DOI: 10.1172/JCI115192.
 18. Liberman A.C., Druker J., Perone M.J., Arzt E. Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis. Cytokine Growth // *Factor Rev.* 2007; 18 (1–2): 45–56. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2007.01.005.
 19. Shipkova M., Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation // *Clin. Chim. Acta.* 2012; 413 (17–18): 1338–1349. DOI: 10.1016/j.cca.2011.11.006.
 20. Paulsen M., Janssen O. Pro- and anti-apoptotic CD95 signaling in T-cells // *Cell. Commun. Signal.* 2011; 9: 7. DOI: 10.1186/1478-811X-9-7.
 21. Paulsen M., Valentin S., Mathew B., Adam-Klages S., Bertsch U., Lavrik I., Krammer P.H., Kabelitz D., Janssen O. Modulation of CD4+ T-cell activation by CD95 co-stimulation // *Cell. Death. Differ.* 2011; 18 (4): 619–631. DOI: 10.1038/cdd.2010.134.
 22. Liberman A.C., Refojo D., Antunica-Noguerol M., Holsboer F., Arzt E. Underlying mechanisms of cAMP- and glucocorticoid-mediated inhibition of FasL expression in activation-induced cell death // *Mol. Immunol.* 2012; 50 (4): 220–235. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.01.008.
 23. Baumann S., Dostert A., Novac N., Bauer A., Schmid W., Fas S.C., Krueger A., Heinzel T., Kirchhoff S., Schütz G., Krammer P.H. Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer // *Blood.* 2005; 106(2): 617–625. DOI: 10.1182/blood-2004-11-4390.
 24. Banuelos J., Lu N.Z. A gradient of glucocorticoid sensitivity among helper T-cell cytokines // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016; 31: 27–35. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2016.05.002.
 25. Spreafico R., Rossetti M., Whitaker J.W., Wang W., Lovell D.J., Albani S. Epi polymorphisms associated with the clinical outcome of autoimmune arthritis affect CD4+ T-cell activation pathways // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016; 113 (48): 13845–13850. DOI: 10.1073/pnas.1524056113.
 26. Bertho N., Drénou B., Laupeze B., Berre C.L., Amiot L., Grosset J.M., Fardel O., Charron D., Mooney N., Fau-

- chet R. HLA-DR-mediated apoptosis susceptibility discriminates differentiation stages of dendritic/monocytic APC // *J. Immunol.* 2000; 164 (5): 2379–2385.
27. Muehling L.M., Mai D.T., Kwok W.W., Heymann P.W., Pomés A., Woodfolk J.A. Circulating Memory CD4+ T-cells target conserved epitopes of rhinovirus capsid proteins and respond rapidly to experimental infection in humans // *J. Immunol.* 2016; 197 (8): 3214–3224. DOI: 10.4049/jimmunol.1600663.
 28. Spreafico R., Rossetti M., van Loosdregt J., Wallace C.A., Massa M., Magni-Manzoni S., Gattorno M., Martini A., Lovell D.J., Albani S. A circulating reservoir of pathogenic-like CD4+ T cells shares a genetic and phenotypic signature with the inflamed synovial micro-environment // *Ann. Rheum. Dis.* 2016; 75 (2): 459–465. DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-206226.
 29. Astry B, Harberts E, Moudgil KD. A cytokine-centric view of the pathogenesis and treatment of autoimmune arthritis // *J. Interferon Cytokine Res.* 2011; 31 (12): 927–940. DOI: 10.1089/jir.2011.0094.
 30. Konya C., Paz Z., Apostolidis S.A., Tsokos G.C. Update on the role of Interleukin 17 in rheumatologic autoimmune diseases // *Cytokine.* 2015; 75 (2): 207–215. DOI: 10.1016/j.cyto.2015.01.003.
 31. Elshabrawy H.A., Chen Z., Volin M.V., Ravella S., Virupannavar S., Shahrara S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis // *Angiogenesis.* 2015; 18 (4): 433–448. DOI: 10.1007/s10456-015-9477-2.
 32. Gharibi T., Majidi J., Kazemi T., Dehghanzadeh R., Motallebnezhad M., Babaloo Z. Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases // *Immunobiology.* 2016; 221 (2): 357–367. DOI: 10.1016/j.imbio.2015.09.021.
 33. Koetz K., Bryl E., Spickschen K., O'Fallon W.M., Goronzy J.J., Weyand C.M. T-cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97 (16): 9203–9208.
 34. Liberman A.C., Refojo D., Druker J., Toscano M., Rein T., Holsboer F., Arzt E. The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction // *Faseb. J.* 2007; 21 (4): 1177–1188. DOI: 10.1096/fj.06-7452com.
 35. Ratman D., Vanden Berghe W., Dejager L., Libert C., Tavernier J., Beck I.M., De Bosscher K. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013; 380 (1–2): 41–54. DOI: 10.1016/j.mce.2012.12.014.
 36. Altonsy M.O., Sasse S.K., Phang T.L., Gerber A.N. Context-dependent cooperation between nuclear factor κ B (NF- κ B) and the glucocorticoid receptor at a TNFAIP3 intronic enhancer: a mechanism to maintain negative feedback control of inflammation // *J. Biol. Chem.* 2014; 289 (12): 8231–8239. DOI: 10.1074/jbc.M113.545178.
 37. Banuelos J., Cao Y., Shin S.C., Lu N.Z. Immunopathology alters Th17 cell glucocorticoid sensitivity // *Allergy.* 2016; 72 (3): 331–341. DOI: 10.1111/all.13051.
 38. Glass C.K., Saijo K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells // *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10 (5): 365–376. DOI: 10.1038/nri2748.
 39. Hermann-Kleiter N., Baier G. NFAT pulls the strings during CD4+ T helper cell effector functions // *Blood.* 2010; 115 (15): 2989–2997. DOI: 10.1182/blood-2009-10-233585.
 40. Noack M., Ndongo-Thiam N., Miossec P. Evaluation of anti-inflammatory effects of steroids and arthritis-related biotherapies in an in vitro coculture model with immune cells and synoviocytes // *Front Immunol.* 2016; 7: 509. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00509.
 41. Baschant U., Frappart L., Rauchhaus U., Bruns L., Reichardt H.M., Kamradt T., Bräuer R., Tuckermann J.P. Glucocorticoid therapy of antigen-induced arthritis depends on the dimerized glucocorticoid receptor in T-cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108 (48): 19317–19322. DOI: 10.1073/pnas.1105857108.

Поступила в редакцию 23.05.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Литвинова Лариса Сергеевна, д-р мед. наук, зав. лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград.

Тодосенко Наталья Михайловна, аспирант, мл. науч. сотрудник, лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград.

Хазиахматова Ольга Геннадьевна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград.

Юрова Кристина Алексеевна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий, БФУ им. И. Канта, г. Калининград.

Малинина Ирина Петровна, врач высшей категории, заслуженный врач РФ, главный внештатный ревматолог МЗ Калининградской области, зав. отделением ревматологии, КОКБ, г. Калининград.

(✉) Литвинова Лариса Сергеевна, e-mail: larisalitvinova@yandex.ru.

УДК 616.72-002.77-085-092.4

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-207-219

For citation: Litvinova L.S., Todosenko N.M., Khaziakhmatova O.G., Malinina I.P., Yurova K.A. Cellular reactions of CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ T-lymphocytes on dexamethason in normal patients and in patients with with rheumatoid arthritis *in vitro*. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 207–219.

Cellular reactions of CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ T-lymphocytes on dexamethason in normal patients and in patients with with rheumatoid arthritis *in vitro*

Litvinova L.S.¹, Todosenko N.M.¹, Khaziakhmatova O.G.¹, Malinina I.P.², Yurova K.A.¹

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University (IKBFU)
3, Botkina Str., Kaliningrad, 236016, Russian Federation

² Regional Clinical Hospital of the Kaliningrad Region
74, Klinicheskaya Str., Kaliningrad, 236019, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the study was to analyze the influence of glucocorticoid (GC) dexamethasone (Dex) on changes in CD4⁺ T-cells expressing the surface molecule of activation (CD25, CD71, HLA-DR and CD95) and their ability to produce proinflammatory mediators in cultures of TCR-stimulated CD3⁺CD45RO⁺ T-lymphocytes obtained from healthy donors and patients with rheumatoid arthritis *in vitro*.

Materials and methods. The study included 50 patients and 20 healthy donors. T-cell cultures (CD3⁺CD45RO⁺) were obtained from mononuclear leukocytes of immunomagnetic separation (MACS[®] technology). As an activator of T-lymphocytes, antibiotic particles with biotinylated antibodies against CD2⁺, CD3⁺, CD28⁺, which simulate the process of costimulation of T cells by antigen-presenting cells, were used. The following concentrations of dexamethasone (2, 8, 16, 32, 64 mg) were used in the experiment. The change in the immunophenotype of T-lymphocytes was analyzed by flow cytometry. The secretion of CD3⁺CD45RO⁺ T-cells of proinflammatory cytokines IL-2, IFN γ , TNF α , IL-17 and IL-21 was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay.

Results. The general suppressor effect of Dex on CD3⁺CD45RO⁺ T-cell cultures mediated by a decrease in the number of CD4⁺ T cells expressing activation molecules (CD25) and proliferation (CD71), as well as inhibition of the production of inflammatory mediators: IFN γ , IL-2 and TNF α . It is shown that against the background of TCR activation Dex increases the number of CD4⁺CD95⁺HLA-DR⁺ cells in CD3⁺CD45RO⁺ cultures obtained from RA patients and does not change their content in the control. The correlations between the number of proinflammatory factors (IL-17, IL-21 and TNF α) in CD4⁺CD45RO⁺CD95⁺HLA-DR⁺ T cells in supernatants of cell cultures in RA patients indicate the presence of a pro-inflammatory potential of this population of T cells. We assume that the resistance of CD4⁺CD45RO⁺CD95⁺HLA-DR⁺ T cells in RA patients to the suppressor effect of GC generally leads to the preservation and enhancement of the functionality of autoreactive cells in the pathogenesis of RA.

Key words: rheumatoid arthritis, activation molecules, proinflammatory mediators, dexamethasone.

Received May 23.2017
Accepted November 08.2017

Litvinova Larisa S., DM, Head of the Laboratory Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation.

Todosenko Natalia M., Postgraduate Student, Junior Researcher, Laboratory Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation.

Khaziakhmatova Olga G., PhD, Researcher, Laboratory Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation.

Yurova Kristina A., PhD, Researcher, Laboratory Immunology and Cell Biotechnology, IKBFU, Kaliningrad, Russian Federation.

Malinina Irina P., Honored Doctor of the Russian Federation, Doctor of the Highest Category, Chief Freelance Rheumatologist of the Ministry of Health of Kaliningrad Region, Head of the Department of Rheumatology of the Regional Clinical Hospital of the Kaliningrad Region, Kaliningrad, Russian Federation.

(✉) **Litvinova Larisa S.**, e-mail: larisalitvinova@yandex.ru.

УДК 616.37-098-003.93:615.38

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-220–232

Для цитирования: Пахомова А.В., Першина О.В., Крупин В.А., Ермолаева Л.А., Ермакова Н.Н., Кудряшова А.И., Дыгай А.М., Пан Э.С., Рыбалкина О.Ю., Скурихин Е.Г. Роль стволовых и прогениторных клеток в регенерации поджелудочной железы и семенников при метаболических нарушениях. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 220–232.

Роль стволовых и прогениторных клеток в регенерации поджелудочной железы и семенников при метаболических нарушениях

Пахомова А.В., Першина О.В., Крупин В.А., Ермолаева Л.А., Ермакова Н.Н., Кудряшова А.И., Дыгай А.М., Пан Э.С., Рыбалкина О.Ю., Скурихин Е.Г.

Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины (НИИФирМ) имени Е.Д. Гольдберга, Томский национальный исследовательский медицинский центр (ТНИМЦ) Российской академии наук (РАН)
Россия, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – изучить регенеративный потенциал стволовых и прогениторных клеток поджелудочной железы и семенников при метаболических нарушениях.

Материал и методы. Эксперименты проведены на мышах линии C57Bl/6. Метаболические нарушения моделировали стрептозотоцином и жировой диетой. Морфологические методы использовали для оценки морфопатологических изменений поджелудочной железы и тестикулярной ткани, фертильности. В иммуногистохимических исследованиях изучалась экспрессия инсулина в островках Лангерганса, CD16 – в семенниках. Биохимическими методами и методом иммуноферментного анализа в биологических образцах оценивали липидный спектр, глюкозу, медиаторы воспаления, тестостерон и глюкозозависимый инсулинопотропный полипептид. Цитометрическими методами исследовали поверхностные антигены стволовых и прогениторных клеток, культуральные методы и трансплантационный тест позволили изучить регенераторный потенциал стволовых и прогениторных клеток.

Результаты. Введение стрептозотоцина и жировая диета вызывали нарушение обмена липидов, тестостерона, глюкозы и инсулинорезистентности у мышей самцов линии C57BL/6. Вследствие метаболических нарушений развивались воспаление, диабет 2 типа, астено- и олигозооспермия, снижался индекс плодовитости. При метаболических нарушениях наблюдали увеличение количества олигопотентных предшественников β -клеток (CD45⁻TER119⁻CD133⁺CD49f^{low}) и предшественников гемангиогенеза (CD45⁻TER119⁻cKit⁺Flk-1⁺) в поджелудочной железе, сперматогонияльных стволовых клеток (CD117⁻CD90⁺ и CD117⁺CD90⁺) и предшественников гемангиогенеза (CD45⁻TER119⁻cKit⁺Flk-1⁺) в семенниках. Стволовые и прогениторные клетки демонстрировали высокую клональную активность и потенциал к самообновлению, способность дифференцироваться в зрелые клетки *in vitro*, эффективно приживлялись в травмированной ткани.

Заключение. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* выявлен высокий регенеративный потенциал предшественников гемангиогенеза и инсулин-продуцирующих β -клеток, сперматогонияльных стволовых клеток мышей самцов линии C57BL/6 при метаболических нарушениях. Низкие темпы регенерации микроциркуляторного русла, инсулин-продуцирующих β -клеток и половых клеток при метаболических

✉ Пахомова Ангелина Владимировна, e-mail: angelinapakhomova2011@gmail.com.

нарушениях связаны с ингибирующим действием диабетических факторов и воспаления на стволовые и прогениторные клетки.

Ключевые слова: метаболические нарушения, воспаление, диабет, гипогонадизм, сперматогонияльные стволовые клетки, предшественники гемангиогенеза, предшественники β -клеток, регенерация.

Метаболический синдром (МС) – это патологическое состояние, характеризующееся центральным (абдоминальным) ожирением, нарушениями гомеостаза и метаболизма глюкозы, дислипидемией и артериальной гипертензией [1–4]. Основными этиологическими факторами МС являются генетическая предрасположенность, избыточное потребление жиров и гиподинамия [4, 6–7]. По своей медико-социальной значимости МС стоит в ряду важнейших медицинских проблем XXI в. [4, 8–9]. Распространенность симптомокомплекса во всех странах весьма значительна. В среднем МС встречается у каждого пятого взрослого человека среди населения развитых стран и в ближайшие 25 лет ожидается увеличение темпов его роста на 50% [3, 10]. В России МС диагностируют у 20,6% лиц в возрасте 30–69 лет, при этом частота его встречаемости у мужчин 40–55 лет составляет 44,4%, у женщин той же возрастной группы – 20,8%, с возрастом число больных увеличивается [11]. Вызывает серьезную озабоченность устойчивый рост частоты МС среди подростков и молодежи [9, 12]. За последние 10 лет количество детей, имеющих признаки МС, возросло с 4,2 до 6,4% [13–15].

МС проявляется в виде таких широко распространенных заболеваний, как сахарный диабет 2 типа, атеросклероз, артериальная гипертензия и ишемическая болезнь сердца [14, 16]. У мужчин с МС одновременно с нарушениями углеводного и жирового обмена регистрируется низкий уровень тестостерона [17–20]. Сохранение в течение длительного времени этой патологической триады приводит к мужскому гипогонадизму. По некоторым данным, примерно у 15% мужчин с МС старше 40 лет диагностирован гипогонадизм [21–22]. Сниженная гонадотропная функция гипофиза сформировала тактику лечения мужского гипогонадизма. Терапия базируется на восполнении дефицита тестостерона [21, 23].

Ввиду заместительного характера лечения гормональные препараты назначаются постоянно. Гормонотерапия лишь уменьшает симптомы андрогенной недостаточности [20]. Между тем тестостероном невозможно полностью восстановить структуру и функцию клеток, образующих ткань яичек. По современным представлениям,

основой регенерации тканей организма постнатального развития выступают костномозговые и тканеспецифичные стволовые клетки (СК) и прогениторные клетки. Однако при МС стволовые клетки мало изучены. Это не позволяет сформировать тактику фармакологической регуляции СК и прогениторных клеток в целях стимуляции регенерации пораженных клеток и тканей при МС.

Целью настоящего исследования явилось изучение регенераторного потенциала стволовых и прогениторных клеток поджелудочной железы и семенников у мышей линии C57BL/6 при метаболических нарушениях.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на мышах линии C57BL/6 (самцы $n = 250$, самки $n = 60$), полученных из питомника отдела биомоделирования НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (квалификационный сертификат имеется). Исследование проводилось в несколько этапов, на каждом из которых количество животных в группах составляло не менее 10 особей. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах или в иных научных целях.

Рождение животных принимали за 0-й день эксперимента. Метаболические нарушения моделировали однократным подкожным введением стрептозотоцина (Sigma, США) (200 мг/кг) через 24 ч после рождения и жировой диетой (Siff EF R/M with 30% Fat кат. № E15116-34, Германия) на 28–70-е сут после рождения [24]. Эвтаназию мышей проводили в CO_2 -камере на 70-е сут эксперимента. Биохимическими методами оценивали содержание в крови холестерина, триацилглицеролов, липопротеинов высокой, низкой и очень низкой плотности, и глюкозы. С применением иммуноферментного анализа (ИФА) определяли содержание тестостерона, инсулина, глюкозозависимого инсулинотропного полипептида, IFN- γ , TGF- β 1, IL-1 β , 2, 5, 17, 23 в биологических пробах. Проводили морфологическое исследование поджелудочной железы и семенников. Иммуногистохимически изучали экспрессию инсулина в островках Лангерганса и CD16 в семенниках. Дополнительно оценивали продуктивность

сперматогенеза и индекс плодовитости у мыш-ей-самцов [25]. По экспрессии мембранных ре-цепторов (CD24, CD31, CD34, CD45, CD49f, CD51, CD52, CD90, CD117 (cKit), CD133, TER119, Flk-1, PDX1) делали вывод о содержании предшествен-

ников β -клеток, прогениторных эндотелиальных клеток, предшественников гемангиогенеза, спер-матогоний, сперматогонияльных СК, клеток Ле-йдига, пан-гемопоэтических клеток, моноцитов в тканях (таблица).

Т а б л и ц а

Содержание в тканях (% от всех окрашенных мононуклеаров) стволовых и прогениторных клеток у мышей с метаболическими нарушениями на 70-е сут эксперимента и прирост клеточной массы в культуре (% от исходного содержания клеток в культуре), $M \pm m$				
Клетки (иммунофенотип)	Интактный контроль		Метаболические нарушения	
	Содержание клеток	Прирост клеток в культуре	Содержание клеток	Прирост клеток в культуре
<i>Поджелудочная железа</i>				
Клетки-предшественники гемангиогенеза (CD45 ⁻ TER119 ⁻ cKit ⁺ Flk-1 ⁺)	0,070 ± 0,017	124 ± 24 ●	1,063 ± 0,057 *	72 ± 10 ●
Мультипотентные прогениторные клетки (CD45 ⁻ TER119 ⁻ cKit ⁺ Flk-1 ⁻)	81,326 ± 0,081	102 ± 21 ●	92,271 ± 0,090 *	187 ± 20 ●
Олигопотентные предшественники β -клеток (CD45 ⁻ TER119 ⁻ CD133 ⁺ CD49f ^{low})	0,023 ± 0,023	110 ± 19 ●	0,097 ± 0,009 *	234 ± 31 ●
Общая популяция PDX1 ⁺ - клетки	0,086 ± 0,009	–	0,0542 ± 0,002 *	–
β -клетки (CD45 ⁻ TER119 ⁻ PDX1 ⁺)	0,083 ± 0,009	–	0,0013 ± 0,002 *	–
<i>Семенники</i>				
Пан-гемопоэтические клетки (CD45 ⁺)	5,660 ± 0,008	–	7,416 ± 0,329 *	–
Моноциты (CD45 ⁺ CD90 ⁺ CD31 ⁺ CD34 ⁻)	0,115 ± 0,005	–	0,153 ± 0,014 *	–
Клетки-предшественники гемангиогенеза (CD45 ⁻ CD117 ⁺ Flk1 ⁺)	0,500 ± 0,007	144 ± 16 ●	2,187 ± 0,009 *	102 ± 8 ●
Эндотелиальные клетки (CD45 ⁻ CD31 ⁺)	0,506 ± 0,149	374 ± 34 ●	1,050 ± 0,061 *	192 ± 22 ●
Сперматогонияльные стволовые клетки (CD117 ⁻ CD90 ⁺)	0,726 ± 0,299	325 ± 36 ●	0,933 ± 0,139	1742 ± 200 ●
Сперматогонияльные стволовые клетки (CD117 ⁺ CD90 ⁺)	10,587 ± 0,695	280 ± 35 ●	12,137 ± 1,119 *	74 ± 8 ●
Сперматогонияльные стволовые клетки (CD51 ⁻ CD24 ⁺ CD52 ⁺)	0,912 ± 0,127	12,8 ± 3	0,767 ± 0,241	20 ± 3
Клетки Лейдига (CD51 ⁺)	17,747 ± 1,447	219 ± 28 ●	16,469 ± 0,508	143 ± 16 ●

П р и м е ч а н и е. Результаты представлены от трех независимых серий экспериментов.

* различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$, U-критерий Манна – Уитни),

● различия достоверны по сравнению с исходным содержанием клеток в культуре ($p < 0,05$, U-критерий Манна – Уитни).

Свойства СК и прогениторных клеток были изучены *in vitro*. У олигопотентных предшественников β -клеток (CD45⁻TER119⁻CD133⁺CD49f^{low}) и мультипотентных прогениторных клеток (CD45⁻TER119⁻cKit⁺Flk-1⁻) поджелудочной железы изучали потенциал к самообновлению, клональную активность и дифференцировку в инсулин-продуцирующие β -клетки [26]. У сперматогонияльных стволовых клеток (CD117⁻CD90⁺; CD117⁺CD90⁺; CD51⁻CD24⁺CD52⁺) и прогениторных эндотелиальных клеток (CD45⁻CD31⁺) семенников по методу М. Kanatsu-Shinohara [27] в авторской модификации оценивали потенциал к самообновлению и клональную активность.

По результатам трансплантационного теста определяли эффективность приживления сперматогонияльных СК (CD117⁻CD90⁺; CD117⁺CD90⁺; CD51⁻CD24⁺CD52⁺) и эндотелиальных прекурсоров (CD45⁻CD31⁺) семенников мыш-ей с метаболическими нарушениями (доноры) в тестикулярной ткани мыш-ей с угнетенным бусульфано-м сперматогенезом (реципиенты). Бусульфан реципиентам вводили внутривенно однократно (40 мг/кг) [28–29]. Забор недифференцированных клеток из семенников доноров осуществлялся на 70-е сут от начала моделирования метаболических нарушений. Трансплантацию клеток донора ($\times 10^4$) осуществляли в зону *rete testis* тестикул реципиентов

на 30-е сут после введения бусульфана [28]. На 60-е сут после введения бусульфана мышей-реципиентов эвтаназировали в CO_2 -камере. Проводили морфологическое исследование тестикулярной ткани, анализ содержания тестостерона в сыворотке крови, гомогенате семенников и количества сперматогонимальных СК, сперматогоний (CD9^+) и прогениторных эндотелиальных клеток в семенниках.

Для статистической обработки данных использовали пакет программного обеспечения Statistica 6.0. Данные представляли в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, m – стандартная ошибка среднего. Для оценки различий использовали непараметрический критерий Манна – Уитни, а также t-критерий Стьюдента. Различия между показателями в разных группах считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После инъекции стрептозотоцина и жировой диеты в сыворотке крови у самцов мышей линии C57Bl/6 отмечалось достоверное увеличение концентрации триацилглицеролов (на 15%) и липопротеинов очень низкой плотности (на 38%), индекса атерогенности (на 43%) относительно интактного контроля, при этом концентрация липопротеинов высокой плотности, напротив, достоверно снижалась (на 15%). Одновременно с нарушением жирового обмена регистрировалась гипергликемия и нарушение глюкозотолерантного теста, повышение концентрации инсулина и глюкозозависимого инсулинотропного полипептида в сыворотке крови (рис. 1, *a-d*). Дополнительно проводилась оценка индекса Caro и Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance (НОМА-IR) с расчетом по формулам: $\text{Caro} = \text{ГН} / \text{ИН}$ и $\text{НОМА-IR} = (\text{ИН} \times \text{ИГ}) / 22,5$, где ИН – инсулин натощак, мЕ/мл; ГН – глюкоза натощак, ммоль/л (рис. 1, *e-g*) [30], тканевую чувствительность к инсулину определяли по индексу Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI): $\text{QUICKI} = 1 / (\log \text{ИН} + \log \text{ГН})$ [31]. Из представленных на рис. 1 данных следует, что у животных с метаболическими нарушениями изменялась тканевая чувствительность к глюкозе и развивалась инсулинорезистентность.

Морфологическое исследование тканевых препаратов выявило отек экзокринной части поджелудочной железы, мелко- и средне-капельную жировую дистрофию ацинарных клеток, утолщение и разрастание междольковых перегородок (рис. 2, *a, b*). У мышей опытной группы наблюдалось

снижение количества (на 53%, $p < 0,05$) и площади островков Лангерганса (на 52%, $p < 0,05$), количества островковых клеток (на 52,3%, $p < 0,05$) относительно интактных мышей, при этом в 2,8 раза ($p < 0,05$) возрастало число пикнотизированных клеток. Цитометрическая и иммуногистохимическая оценка антигенов позволила обнаружить сокращение популяции PDX1^+ -клеток и снижение экспрессии инсулина в островках Лангерганса у мышей опытной группы (рис. 2, *c-j*).

Одновременно с диабетическими изменениями у мышей развивались деструктивные изменения канальцевого аппарата семенников: разрежение и снижение количества слоев сперматогенного эпителия в семенных канальцах, отек интерстициальной ткани (рис. 3, *a, b*). В просвете части извитых канальцев обнаруживался клеточный детрит, состоящий из погибших сперматозоидов и сперматид. Изучение половых клеток и фертильности позволило выявить у животных с метаболическими нарушениями астено- и олигозооспермию, а также снижение индекса плодовитости на 64,7% ($p < 0,05$) относительно интактного контроля.

Как известно, ключевым гормоном развития гонад и сперматогенеза является тестостерон [32]. Гормон продуцируется клетками Лейдига и в небольшом количестве – корой надпочечников [33]. По данным представленного исследования стрептозотоцин и жировая диета снижали концентрацию тестостерона в гомогенате (на 10%, $p < 0,05$) и сыворотке крови (на 44,5%, $p < 0,05$) относительно интактного контроля, при этом уменьшалось количество клеток Лейдига (CD51^+) в интерстициальной ткани яичек (на 7,2%), в ряде клеток Лейдига наблюдалась вакуолизация цитоплазмы и гиперхромия ядра (рис. 3, *a, b, e, f*).

Резюмируя изложенное, следует заключить, что моделирование метаболических нарушений вызывает у самцов мышей линии C57Bl/6 нарушения жирового обмена, диабет 2 типа и патологические изменения в репродуктивной системе, что во многом соответствует клинической картине метаболического синдрома. По современным представлениям, неогенез β -клеток и половых клеток поддерживается СК и прогениторными клетками [29]. Согласно данным, полученным при изучении различных популяций предшественников β -клеток, метаболические нарушения у животных сопровождались значительным приростом количества панкреатических олигопотентных предшественников β -клеток ($\text{CD45}^-\text{TER119}^-\text{CD133}^+\text{CD49flow}$), но менее выраженным увеличением числа мультипотентных прогениторных клеток ($\text{CD45}^-\text{TER119}^-\text{cKit}^-\text{Flk-1}^-$) (см. таблицу).

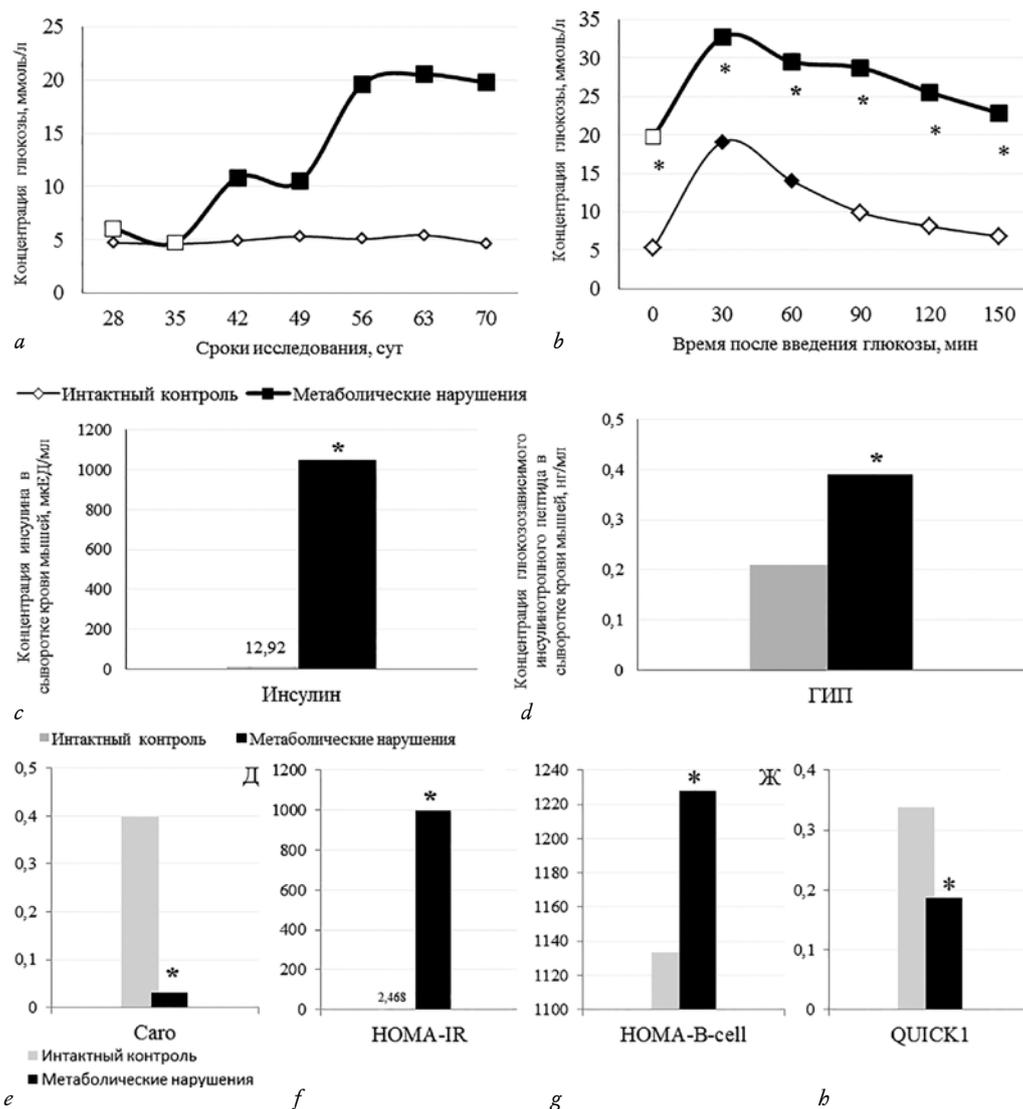
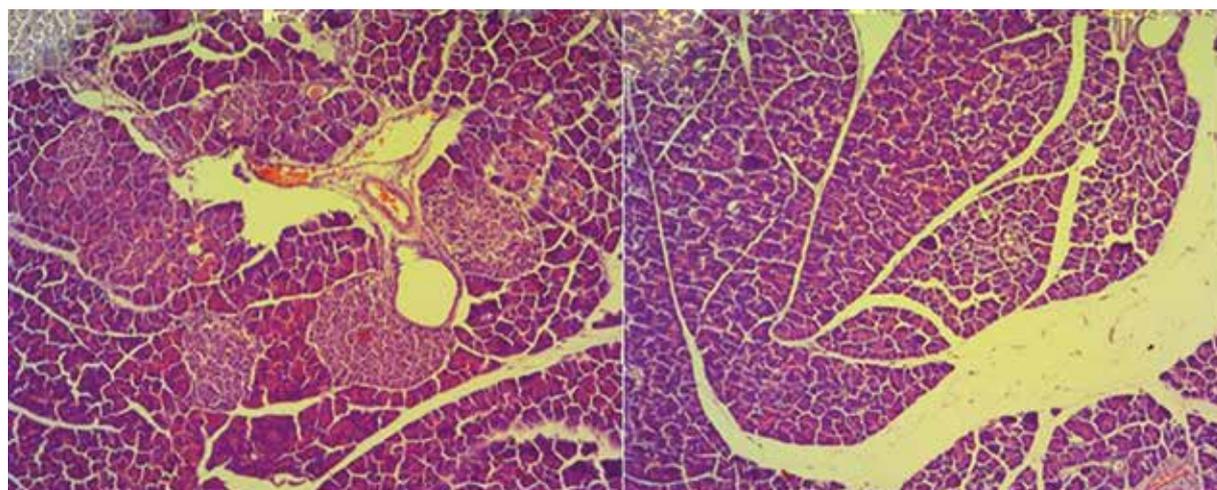


Рис. 1. Уровень глюкозы в сыворотке крови самцов мышей линии C57Bl/6 в условиях моделирования метаболических нарушений в 28–70-е сут эксперимента (a) и при проведении глюкозотолерантного теста на 70-е сут (b); уровень инсулина (c) и глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (d) в сыворотке крови, значения индексов Caro (e) и HOMA-IR (f), HOMA-B-cell (g), QUICKI (h), UE, на 70-е сут. Во фрагментах a и b окрашенным символом обозначены статистически значимые различия по сравнению с показателями исходных значений, во фрагментах b–b символом * статистически значимые различия по сравнению с показателями у интактных животных

Fig. 1. The level of glucose in the blood serum of male mice of the C57Bl / 6 line under the conditions of modeling metabolic disorders from the 28th to the 70th day of the experiment (a) and during the glucose tolerance test on the 70th day (b); the level of insulin (c) and the glucose-dependent insulinotropic polypeptide (d) in the serum, and the values of Caro (e) indices and HOMA-IR (f), HOMA-B-cell (g), QUICKI (h), UE, on the 70th day. In a and b fragments, the colored symbol indicates statistically significant differences in comparison with the values of the initial values, in b–b fragments the symbol * means statistically significant differences in comparison with the indices in intact animals

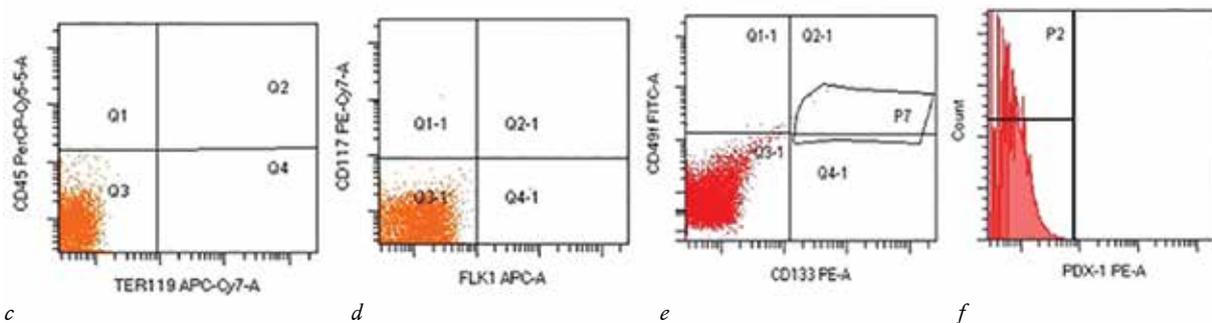
В культуре фракция олигопотентных предшественников β -клеток у подопытных мышей продемонстрировала высокий потенциал к самообновлению. Использование протоколов S. Bonner-Weir et al. [34] и A. Suzuki et al. [35] позволило выявить способность олигопотентных предшественников β -клеток дифференцироваться в направлении инсулин-продуцирующих клеток (дитизон-положительные) в присутствии GLP-1 (7-37) *in*

vitro, при этом дитизон-положительные клетки были способны секретировать инсулин в ответ на глюкозную нагрузку. Следует отметить, что у подопытных мышей интенсивность генерации дитизон-положительных клеток из предшественников β -клеток и уровень инсулина в супернатантах дитизон-положительных клеток значительно превосходили таковые у интактных мышей (в контроле).



a

b

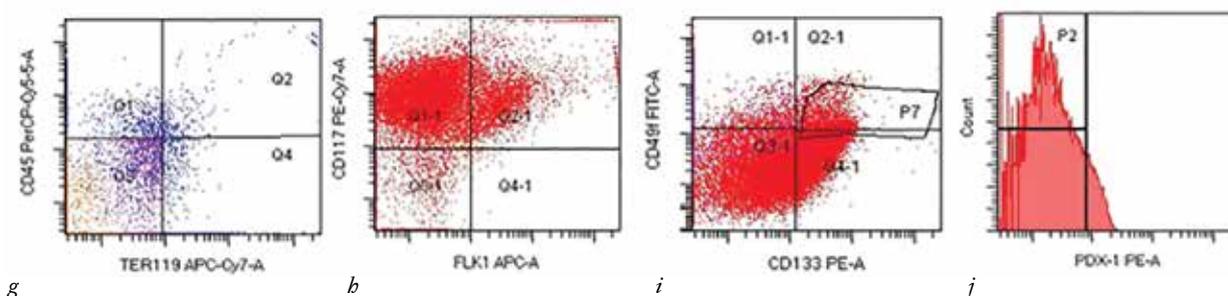


c

d

e

f



g

h

i

j

Рис. 2. Морфологическая картина поджелудочной железы мышей-самцов линии C57Bl/6 контрольной группы (*a*) и с метаболическими нарушениями (*b*) на 70-е сут эксперимента при окрашивании гематоксилином и эозином, $\times 100$. Данные анализа количественной и качественной экспрессии олигопотентных предшественников бета-клеток (CD45⁺ TER119⁺ CD133⁺ CD49^{low}), мультипотентных прогениторных клеток (CD45⁺ TER119⁺ cKit⁺ Flk-1⁺), PDX-1 позитивных клеток на мононуклеарах поджелудочной железы мышей линии C57Bl/6 на 70-е сут эксперимента (*c-j*); *c-f* – дот-плоты и гистограмма изотипического контроля для IgG2a PerCP-Cy 5.5/ IgG2b APC-Cy7; IgG2a APC/ IgG2b APC-Cy7 (*d*); IgG2b FITC/ IgG1 PE (*e*); IgG1 PE (*f*); *g-j* – подтверждение фенотипа и качественный анализ экспрессии CD45 PerCP-Cy 5.5/ TER119 APC-Cy7 (*g*), CD117(c-Kit) APC/ Flk1 APC-Cy7 (*h*); CD49f FITC/ CD133 PE (*i*); гистограмма PDX 1 PE (*j*)

Fig. 2. Morphological pattern of the pancreas of male C57Bl/ 6 mice from the control group (*a*) and metabolic disorders (*b*) on the 70th day of the experiment when stained with hematoxylin and eosin, $\times 100$. Data from the analysis of quantitative and qualitative expression of oligopotent beta precursor cells (CD45⁺ TER119⁺ CD133⁺ CD49^{low}), multipotent progenitor cells (CD45⁺ TER119⁺ cKit⁺ Flk-1⁺), PDX-1 positive cells on pancreatic mononuclears of C57Bl/ 6 on the 70th day of the experiment (*c-j*); *c-f* – dot-rafts and histogram of isotypic control for IgG2a PerCP-Cy 5.5 / IgG2b APC-Cy7; IgG2a APC / IgG2b APC-Cy7 (*d*), IgG2b FITC / IgG1 PE (*e*), IgG1 PE (*f*); *g-j* – confirm phenotype and qualitative analysis of CD45 expression PerCP-Cy 5.5 / TER119 APC-Cy7 (*g*), CD117 (c-Kit) APC / Flk1 APC-Cy7 (*h*); CD49f FITC / CD133 PE PDX 1 PE (*j*)

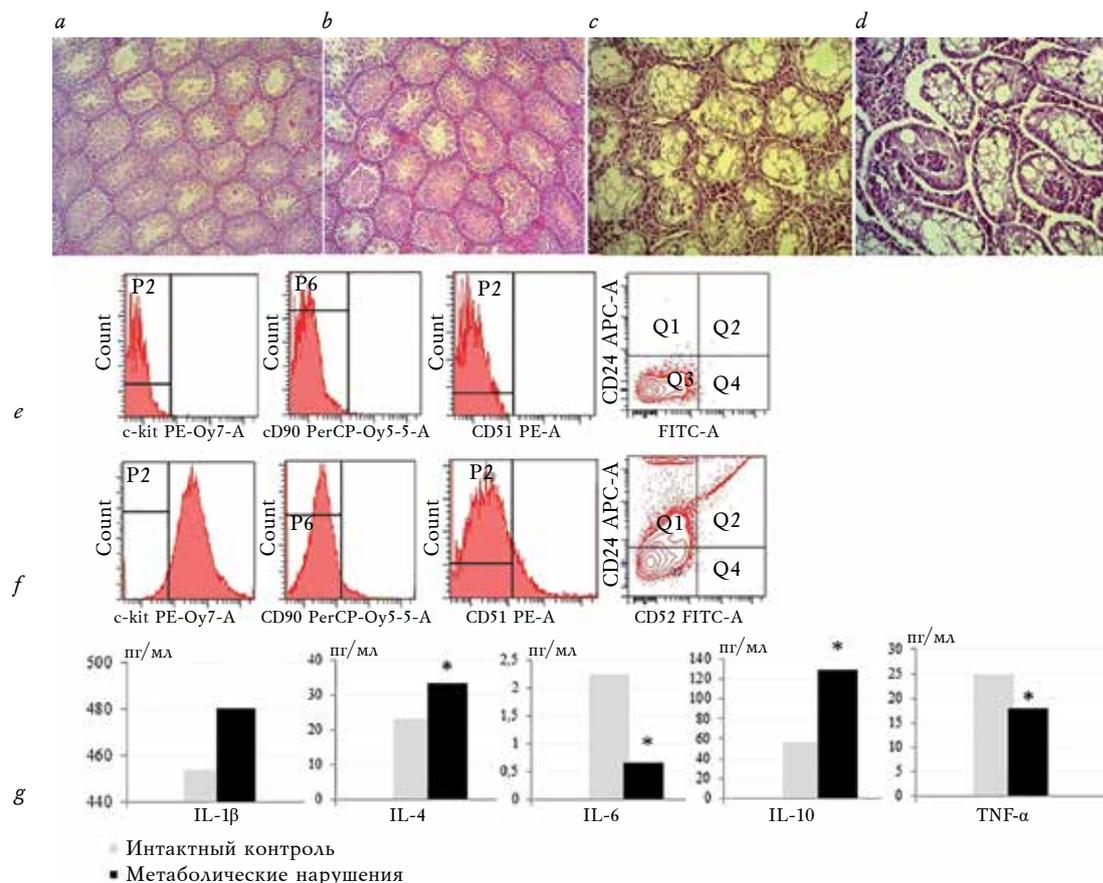


Рис. 3. Морфологическая картина семенников у самцов мышей линии C57Bl/6 контрольной группы (a) и с метаболическими нарушениями (b) на 70-е сут эксперимента при окрашивании гематоксилином и эозином, $\times 100$; у мышей самцов линии C57Bl/6 через 30 сут после введения бусульфана (c) и у мышей-реципиентов в условиях введения бусульфана после трансплантации клеток из семенников мышей-доноров с метаболическими нарушениями (d) при окрашивании гематоксилином и эозином, $\times 200$. Гистограммы и дот-плоты, представляющие данные анализа количественной и качественной экспрессии маркеров сперматогонимальных стволовых клеток с фенотипом c-kit/CD90 и CD51/CD52/CD24 мононуклеаров семенников мышей линии C57Bl/6 (e, f); e – гистограммы и дот-плот изотипического контроля для IgG2b PE-Cy7, IgG2a PerCP-Cy 5.5, IgG1 PE, IgG2b APC/ IgG2a FITC; f – подтверждение фенотипа и качественный анализ экспрессии c-kit(PE-Cy7), CD90(PerCP-Cy5.5), CD51(PE) на гистограммах; CD24(APC)/CD52(FITC) на дот-плоте; g – уровень IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10 и TNF-α в гомогенате семенников у мышей с метаболическими нарушениями на 70-е сут эксперимента. * статистически значимые различия по сравнению с показателями интактных животных

Fig. 3. Morphological pattern of testes in male C57Bl / 6 mice of the control group (a) and with metabolic disorders (b) on the 70th day of the experiment when stained with hematoxylin and eosin, $\times 100$; in male C57Bl / 6 mice 30 days after the administration of busulfan (c) and in recipient mice under busulfan administration following transplantation of cells from the testes of donor mice with metabolic disturbances (d) when stained with hematoxylin and eosin, $\times 200$. Histograms and dot-plots presenting the analysis of quantitative and qualitative expression of markers of spermatogonial stem cells with the phenotype of c-kit / CD90 and CD51 / CD52 / CD24 mononuclears of testes of C57Bl / 6 mice (e, f); e – histograms and dot-plot of isotypic control for IgG2b PE-Cy7, IgG2a PerCP-Cy 5.5, IgG1 PE, IgG2b APC / IgG2a FITC; f – phenotype confirmation and qualitative analysis of c-kit expression (PE-Cy7), CD90 (PerCP-Cy5.5), CD51 (PE) on histograms; CD24 (APC) / CD52 (FITC) on the dot-plot; g – the level of IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10 and TNF-α in the testis homogenate in mice with metabolic disturbances on the 70th day of the experiment. * statistically significant differences compared to those of intact animals

Второй класс предшественников, изученный в настоящей работе, относился к сперматогонимальным СК. Как и предшественники β-клеток, популяция сперматогонимальных СК весьма неоднородная и представлена пролиферирующими и дифференцирующимися клетками [36]. В исследовании установлено, что количество пролиферирующих сперматогонимальных СК (CD117⁺CD90⁺) в семенниках у мышей с метаболическими

нарушениями не изменялось, а число дифференцирующихся сперматогонимальных СК с иммунофенотипом CD117⁺CD90⁺ и CD51⁺CD24⁺CD52⁺ увеличивалось (см. таблицу). *In vitro* сперматогонимальные СК CD117⁺CD90⁺ у подопытных мышей активно генерировали колонии и демонстрировали значительный прирост клеточной массы по сравнению с контролем (рис. 3 e, f). В то же время на сперматогонимальные СК культивирова-

ние CD117⁺CD90⁺ и CD51⁺CD24⁺CD52⁺ оказывало ингибирующее действие.

Одним из тестов, позволяющих оценить регенеративный потенциал СК, является трансплантационный тест. В травмированную ткань вводят донорские СК, после чего оценивают их приживание и (или) регенерацию тканей. В настоящей работе сперматогонимальные СК вводились в пораженные бусульфаном семенники самцов мышей C57Bl/6. После введения цитостатика отмечалось падение уровня тестостерона в семенниках (на 82% от интактного контроля), некробиоз, деструкция клеток сперматогенного эпителия и слущивание их в просвет семенных канальцев (рис. 3, *c, d*).

В извитых канальцах отсутствовали все слои сперматогенного эпителия вплоть до базальной мембраны, клетки Сертоли обнаруживались в единичных канальцах, клетки Лейдига в большинстве своем разрушались. Дополнительно бусульфан вызывал гемодинамические нарушения, набухание неклеточных слоев собственной оболочки семенных канальцев, отек и просветление цитоплазматического матрикса миоидных клеток, увеличение площади интерстициальной ткани за счет отека и инфильтрации интерстиция лимфоцитами и макрофагами. Зрелые половые клетки не определялись, количество предшественников уменьшалось (см. таблицу).

На 30-е сут у мышей-реципиентов после введения в их семенники сперматогонимальных СК мышей с метаболическими нарушениями количество клеток с иммунофенотипом CD117⁺CD90⁺ увеличивалось в 4,83 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, прирост числа сперматогонимальных СК CD117⁺CD90⁺ оказался существенно меньше и составил 51% ($p < 0,05$), изменения числа сперматогонимальных СК CD51⁺CD24⁺CD52⁺ были незначительными (см. таблицу). Представленные данные позволяют говорить о том, что обладающие высокой пролиферативной активностью сперматогонимальные СК CD117⁺CD90⁺ эффективно приживаются в пораженных бусульфаном семенниках и активно пролиферируют. Антиген CD117 (c-Kit) является маркером дифференцировки предшественников половых клеток [29]. В этой связи накопление CD117⁺CD90⁺ клеток в бусульфановых семенниках, вероятно, отражает дифференцировку сперматогонимальных СК CD117⁺CD90⁺.

О полноценности регенерации поврежденных тканей судят не только по восстановлению числа и функций специализированных клеток, но и по состоянию микроциркуляторной сети. Морфологические исследования позволили выявить инво-

люцию микрососудистого русла (гиперемия сосудов, сокращение площади микрососудистой сети) поджелудочной железы и семенников у мышей с метаболическими нарушениями. На этом фоне количество клеток-предшественниц гемангиогенеза (CD45⁺TER119⁺cKit⁺Flk-1⁺) в поджелудочной железе увеличивалось в 15 раз ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, в семенниках – в 4,3 раза (см. таблицу). Количество прогениторных эндотелиальных клеток (CD45⁺CD31⁺) в семенниках у подопытных животных возрастало в 2,07 раза ($p < 0,05$). Результаты культуральных исследований и трансплантационный тест продемонстрировали высокий потенциал к самообновлению прогениторных эндотелиальных клеток *in vitro* и эффективное приживание в пораженных бусульфаном семенниках у подопытных мышей.

Таким образом, у самцов мышей C57Bl/6 с метаболическими нарушениями происходит запуск программы регенерации поджелудочной железы и тестикулярной ткани, а также неоваскулогенеза с привлечением СК и прогениторных клеток. Между тем восстановления гистоархитектоники островков Лангерганса и тестикулярной ткани не происходит; напротив, развиваются инфертильность и микрососудистые осложнения. Причину этого можно увидеть в ингибирующем действии диабетических факторов и медиаторов воспаления на сперматогонимальные СК, предшественники β-клеток, прогениторные эндотелиальные клетки и предшественники гемангиогенеза. Подтверждением данного предположения служат результаты ИФА, морфологических, иммуногистохимических и цитометрических исследований.

Развитие моделируемых метаболических нарушений сопровождалось повышением уровня IFN-γ и IL-17 в сыворотке крови, концентрации IL-1β в гомогенате поджелудочной железы и TGF-beta1 и IL-2, 5, 17, 23 в гомогенате семенников (см. рис. 3, *g*). При этом отмечалась инфильтрация тканей подопытных мышей клетками-эффекторами воспаления: поджелудочной железы – CD16⁺-лимфоцитами, семенников – CD45⁺CD90⁺CD31⁺CD34⁺ макрофагами (рис. 3, *d-f*).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При моделировании метаболических нарушений стрептозотоцином и жировой диетой у самцов мышей линии C57Bl/6 изменялся жировой метаболизм и развивалось воспаление в поджелудочной железе и семенниках. Набор воспалительных медиаторов указывал на хронизацию процес-

са воспаления. Во многом факторы воспаления на фоне нарушения жирового обмена вызывали развитие диабетических изменений у животных (гипергликемия и нарушения глюкозотолерантного теста, инсулинорезистентность, патоморфологические изменения поджелудочной железы, уменьшение количества островковых β -клеток).

Между тем значение индекса НОМА В-cell, характеризующий функциональную активность β -клеток [37], в 2,67 раза превосходил таковое у интактных животных на 40-е сут эксперимента. Это указывает на формирование компенсаторной реакции поджелудочной железы в ответ на развитие диабета. Однако к 70-м сут регистрировалось угасание активности β -клеток: у подопытных животных НОМА В-cell составил 108 UE от такового в контроле.

Хроническое воспаление и факторы диабета вызывали развитие нарушений репродуктивной системы у самцов мышей линии C57Bl/6, выражавшиеся в деструктивных изменениях канальцевого аппарата семенников, отеке интестициальной ткани, дегенеративных изменениях в клетках Лейдига, нарушении обмена тестостерона, сокращении площади микрососудистой сети в семенниках, развитии астено-, олигозооспермии и инфертильности.

Одновременно с метаболическими и репродуктивными нарушениями обнаруживалось увеличение числа СК и прогениторных клеток поджелудочной железы и семенников. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* выявлялась значительная активность предшественников гемангиогенеза (CD45⁻TER119⁻cKit⁺Flk-1⁺), прогениторных эндотелиальных клеток (CD45⁻CD31⁺), предшественников инсулин-продуцирующих β -клеток (CD45⁻TER119⁻CD133⁺CD49f^{low}), сперматогонияльных СК (CD117⁻CD90⁺, CD117⁺CD90⁺), признаками которой были: клональная активность, потенциал к самообновлению, дифференцировка в зрелые клетки, эффективное приживление в пораженных цитостатиках тканях. Все перечисленные феномены указывают на запуск программы регенерации поджелудочной железы, тестикулярной ткани и неоваскулогенеза с привлечением СК и прогениторных клеток. Между тем нормализация метаболизма жиров, обмена глюкозы, инсулина и тестостерона, восстановление гистоархитектоники (в том числе микроциркуляторной сети) поджелудочной железы и семенников не наблюдалось. С нашей точки зрения, это связано с ингибирующим действием диабетических факторов и медиаторов воспаления на тканеспецифические СК и прогениторные клетки.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о вкладе авторов. Пахомова А.В., Першина О.В., Скурихин Е.Г. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных; обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания. Крупин В.А., Ермолаева Л.А., Ермакова Н.Н., Кудряшова А.И., Пан Э.С., Рыбалкина О.Ю. – анализ и интерпретация данных. Дыгай А.М. – проверка критически важного интеллектуального содержания.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено комитетом по этике НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН (протокол № 114062016 от 14.06.2016 г.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают свою признательность генеральному директору ООО «ФАРМИНТЕР-ПРАЙСЕЗ» канд. хим. наук Небольсину Владимиру Евгеньевичу за предоставленные реактивы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Рекомендации экспертов Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению метаболического синдрома. Второй пересмотр // *Практическая медицина*. 2010; 44: 81–101.
2. Rekomendatsii ekspertov Vserossiyskogo nauchnogo obshchestva kardiologov po diagnostike i lecheniyu metabolicheskogo sindroma. Vtoroy peresmotr [Recommendations of the experts of the All-russian scientific society of cardiologists on diagnosis and treatment of metabolic syndrome. Second revision] // *Prakticheskaya meditsina – Practical Medicine*. 2010; 44: 81–101 (in Russian).
3. Мамедов М.Н. Руководство по диагностике и лечению метаболического синдрома: Методические рекомендации. М., 2004: 72.
4. Mamedov M.N. Rukovodstvo po diagnostike i lecheniyu metabolicheskogo sindroma: Metodicheskie rekomendatsii [Manual on diagnosis and treatment of metabolic syndrome: Methodological recommendations]. М., 2004: 72 (in Russian).
5. Чазова И.Е., Мычка В.Б. Метаболический синдром. М.: Медиа Медика, 2004: 168.

- Chazova I.E., Mychka V.B. Metabolicheskiy sindrom [Metabolic Syndrome]. M.: Media Medika Publ., 2004: 168 (in Russian).
4. Кравец Е.Б., Самойлова Ю.Г., Матюшева Н.Б., Буланова А.А., Дорохова В.В., Ядмаа О. Метаболический синдром в общеврачебной практике // Бюллетень сибирской медицины. 2008; 1: 80–87.
 - Gravets E.B., Samoylova Yu.G., Matyusheva N.B., Bulanova A.A., Dorokhova V.V., Yadmaa O. Metabolicheskiy sindrom v obshchevrachebnoy praktike [Metabolic syndrome in general medical practice] // *Byulleten' sibirskoy meditsiny – Bulletin of Siberian Medicine*. 2008; 1: 80–87 (in Russian).
 5. Тишова Ю.А., Калинин С.Ю. Роль коррекции гипогонадизма в лечении метаболического синдрома у мужчин и аспекты безопасности терапии препаратом тестостерона пролонгированного действия // Ожирение и метаболизм. 2010; 2: 36–43.
 - Tishova Yu.A., Kalinchenko S.Yu. Rol' korrektsii gipogonadizma v lechenii metabolicheskogo sindroma u muzhchin i aspekty bezopasnosti terapii preparatom testosterona prolongirovannogo deystviya [The role of correction of hypogonadism in the treatment of metabolic syndrome in men and safety aspects of testosterone with prolonged action] // *Ozbirenie i metabolism – Obesity and Metabolism*. 2010; 2: 36–43 (in Russian).
 6. Бутрова С.А., Дзогоева Ф.Х. Висцеральное ожирение – ключевое звено метаболического синдрома // *Ожирение и метаболизм*. 2004; 1: 10–16.
 - Butrova S.A., Dzogoeva F.Kh. Vistseral'noe ozhirenie – klyuchevoe zveno metabolicheskogo sindroma [The role of correction of hypogonadism in the treatment of metabolic syndrome in men and aspects of safety of therapy with a long-acting testosterone drug] // *Ozbirenie i metabolism – Obesity and Metabolism*. 2004; 1: 10–16 (in Russian).
 7. Мкртумян А.М. Особенности течения и лечения нарушений углеводного обмена при метаболическом синдроме // *Сердце*. 2005; 4–5 (23): 273–276.
 - Mkrtumyan A.M. Osobennosti techeniya i lecheniya narusheniy uglevodnogo obmena pri metabolicheskom sindrome [Features of the course and treatment of disorders of carbohydrate metabolism in metabolic syndrome] // *Serditse – Russian Heart Journal*. 2005; 4–5 (23): 273–276 (in Russian).
 8. Мамедов М.Н. Возможны ли диагностика и лечение метаболического синдрома в реальной практике? // *Лечащий врач*. 2006; 6: 34–39.
 - Mamedov M.N. Vozmozhny li diagnostika i lechenie metabolicheskogo sindroma v real'noy praktike? [Is it possible to diagnose and treat the metabolic syndrome in real practice?] // *Lechashchiy vrach*. 2006; 6: 34–39 (in Russian).
 9. Rask-Madsen C., Kahn C. R. Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome and cardiovascular disease // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2012; 32 (9): 2052–2059. DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.241919.
 10. Урясьев О.М., Горбунова Д.Ю., Щербак О.Н., Пыко А.А. Метаболический синдром – нерешенная проблема медицины и современного общества // *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2017; 16 (1): 160–164.
 - Uryas'ev O.M., Gorbunova D.Yu., Shcherbakova O.N., Pyko A.A. Metabolicheskiy sindrom – nereshennaya problema meditsiny i sovremennogo obshchestva [Metabolic syndrome - the unresolved problem of medicine and modern society] // *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoy meditsinskoy akademii*. 2017; 16 (1): 160–164 (in Russian).
 11. Mamedov M., Suslonova N., Lisenkova I. Metabolic syndrome prevalence in Russia: Preliminary results of a cross-sectional population study // *Diab. Vasc. Dis. Res*. 2007; 4(1): 46–47.
 12. Волков В.П. Метаболический синдром: история вопроса // *Universum: медицина и фармакология*. 2017; 38 (4): 36–45.
 - Volkov V.P. Metabolicheskiy sindrom: istoriya voprosa [Metabolic syndrome: the history of the issue] // *Universum: meditsina i farmakologiya*. 2017; 38 (4): 36–45 (in Russian).
 13. Метаболический синдром / под ред. чл.-корр. РАМН Г.Е. Ройтберг. М.: МЕД Пресс-информ. 2007: 224.
 - Metabolicheskiy sindrom [Metabolicheskiy sindrom] / pod red. chl.-korr. RAMN G.E. Roytberg. M.: MED Press-inform Publ., 2007: 224 (in Russian).
 14. Ольховский Д.В. Гиперурикемия и метаболический синдром у больных хронической сердечной недостаточностью // *Медицина сегодня и завтра*. 2007; 3: 82–86.
 - Ol'khovskiy D.V. Giperurikemiya i metabolicheskiy sindrom u bol'nykh khronicheskoy serdechnoy nedostatochnost'yu [Hyperuricemia and metabolic syndrome in patients with chronic heart failure] // *Meditsina segodnya i zavtra*. 2007; 3: 82–86 (in Russian).
 15. Мамедов М. Н. Школа по диагностике и лечению гиперлипидемий: пособие для врачей. М.: Изд. Пфайзер, 2007: 317.
 - Mamedov M. N. Shkola po diagnostike i lecheniyu giperlipidemiy (Posobie dlya vrachey) [School for the diagnosis and treatment of hyperlipidemia: a manual for doctors]. M.: Izd. Pfayzer Publ., 2007: 317 (in Russian).
 16. Оганов Р.Г. Современные представления о метаболическом синдроме: понятие, эпидемиология, риск развития сердечно-сосудистых осложнений и сахарного диабета // *Международный эндокринологический журнал*. 2008; 6 (18): 15–21.
 - Oganov R.G. Sovremennyye predstavleniya o metabolicheskom sindrome: ponyatie, epidemiologiya, risk razvitiya serdechno-sosudistyx oslozhneniy i sakharnogo diabeta [Modern concepts of the metabolic syndrome: concept, epidemiology, risk of cardiovascular complications and diabetes mellitus, International] // *Mezhdunarodnyy endokrinologicheskiy zhurnal – Endocrinology Journal*. 2008; 6 (18): 15–21 (in Russian).

17. Wespes E. Metabolic syndrome and hypogonadism // *European Urology Supplements*. 2013; 12 (2): 2–6. DOI: 10.1016/j.eursup.2013.03.003.
18. Калинин С.Ю., Тишова Ю.А. Роль коррекции гипогонадизма в лечении метаболического синдрома у мужчин // *Ожирение и метаболизм*. 2006; 2: 48–51.
- Kalinchenko S.Yu., Tishova Yu.A. Rol' korrektsii gipogonadizma v lechenii metabolicheskogo sindroma u muzhchin [The role of correction of hypogonadism in the treatment of metabolic syndrome in men] // *Ozbirenie i metabolism — Obesity and Metabolism*. 2006; 2: 48–51 (in Russian).
19. Оранская А.Н., Романова Е.В., Мкртумян А.М. Значение инсулинрезистентности в нарушении половой функции мужчин (обзор) // *Вестник новых медицинских технологий*. 2009; 16 (1): 55–56.
- Oranskaya A.N., Romanova E.V., Mkrtumyan A.M. Znachenie insulinrezistentnosti v narushenii polovoy funktsii muzhchin (obzor) [The importance of insulin resistance in the violation of men's sexual function (review)] // *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2009; 16 (1): 55–56 (in Russian).
20. Савельева Л.В., Роживанов Р.В., Шурдумова Б.О., Фадеев В.В. Нормогонадотропный гипогонадизм у мужчин с ожирением // *Ожирение и метаболизм*. 2009; 3: 39–42.
- Savel'eva L.V., Rozhivanov R.V., Shurdumova B.O., Fadeev V.V. Normogonadotropnyy gipogonadizm u muzhchin s ozhireniem [Normogonadotropic hypogonadism in obese men] // *Ozbirenie i metabolism — Obesity and Metabolism*. 2009; 3: 39–42 (in Russian).
21. Ebrahimi F., Christ-Crain M. Metabolic syndrome and hypogonadism--two peas in a pod // *Swiss. Med. Wkly*. 2016; 21 (146): 14283. DOI: 10.4414/smw.2016.14283.
22. Gorbachinsky I., Akpınar H., Assimos D.G. Metabolic syndrome and urologic diseases // *Rev. Urol*. 2010; 12 (4): 157–180. DOI: 10.3909/riu0487.
23. Роживанов Р.В., Яшина Ю.Н. Аспекты применения андрогенной заместительной терапии при лечении гипогонадизма у мужчин с сахарным диабетом и метаболическом синдромом // *Ожирение и метаболизм*. 2015; 12 (1): 11–14.
- Rozhivanov R.V., Yashina Yu.N. Aspekty primeneniya androgennoy zamestitel'noy terapii pri lechenii gipogonadizma u muzhchin s sakharnym diabetom i metabolicheskom sindromom [Aspects of androgen replacement therapy in the treatment of hypogonadism in men with diabetes mellitus and metabolic syndrome] // *Ozbirenie i metabolism — Obesity and Metabolism*. 2015; 12 (1): 11–14 (in Russian).
24. Дыгай А.М., Скурихин Е.Г., Ермакова Н.Н., Пахомова А.В., Першина О.В., Крупин В.А., Кудряшова А.И. Пат. 2611936 RU, МПК G09B 23/28. Способ моделирования гипогонадизма, вызванного метаболическими нарушениями. № 2016105189; Заявл. 16.02.2016; Оpubл. 01.03.2017. Бюл. № 7.
- Dygay A.M., Skurikhin E.G., Ermakova N.N., Pakhomova A.V., Pershina O.V., Krupin V.A., Kudryashova A.I. Pat. 2611936 RU, MPK G09B 23/28. Sposob modelirovaniya gipogonadizma, vyzvannogo metabolicheskimi narusheniyami [Method for modeling hypogonadism caused by metabolic disorders]. № 2016105189; Zayavl. 16.02.2016; Opubl. 01.03.2017. Byul. № 7 (in Russian).
25. Skurikhin E.G., Pakhomova A.V., Ermakova N.N., Pershina O.V., Pan E.S., Ermolaeva L.A., Kudryashova A.I., Krupin V.A., Rybalkina O.Y., Dygai A.M. Response of stem and progenitor cells to testicular ischemia // *Bull. Exp. Biol. Med*. 2016; 161(4): 523–528. DOI: 10.1007/s10517-016-3452-9.
26. Skurikhin E.G., Ermakova N.N., Khmelevskaya E.S., Pershina O.V., Krupin V.A., Ermolaeva L.A., Dygai A.M. Differentiation of pancreatic stem and progenitor β -cells into insulin secreting cells in mice with diabetes mellitus // *Bull. Exp. Biol. Med*. 2014; 156 (6): 726–730. DOI: 10.1007/s10517-014-2434-z.
27. Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Inoue K., Ogura A., Toyokuni S, Honjo T, Shinohara T. Allogeneic Offspring Produced by Male Germ Line Stem Cell Transplantation into Infertile Mouse Testis // *Biol. Reprod*. 2003; 69: 612–616. DOI: 10.1095/biolreprod.102.008516.
28. Ogawa T., Aréchaga J.M., Avarbock M.R., Brinster R.L. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules // *Int. J. Dev. Biol*. 1997; 41: 111–122. PMID: 9074943.
29. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Т. 2; под ред. М.А. Пальцева. М.: Медицина, 2009: 456.
- Biologiya stvolovykh kletok i kletochnye tekhnologii. T. 2. pod red. M.A. Pal'tseva [Cell Biology and Cell Technologies. V. 2 / ed. M.A. Paltseva]. M.: Meditsina Publ., 2009: 456 (in Russian).
30. Mari A., Akiren B., Pacini G. Assessment of insulin secretion in relation to insulin resistance // *Curr. Opin. Clin. Metab. Care*. 2005; 8 (5): 529–533. DOI: 10.4103/2230-8210.146874.
31. Katz A., Nambi S., Mather K., Baron A., Follman D., Sullivan G., Quon M. Quantitative insulin sensitivity check index: A Simple Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity in Humans // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2000; 85 (7): 2402–2410. DOI: 10.1210/jcem.85.7.6661.
32. Zheng Y., Zhang Y., Qu R., He Y., Tian X., Zeng W. Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects // *Reproduction*. 2014; 147: 65–74. DOI: 10.1530/REP-13-0466.
33. Zang Z. J., Wang J., Chen Z., Zhang Y., Gao Y., Su Z., Tuo Y., Liao Y., Zhang M., Yuan Q., Deng C., Jiang M. H., Xiang A. P. Regenerative Medicine Transplantation of CD51+ Stem Leydig cells: A New Strategy for the Treatment of Testosterone Deficiency // *Stem Cells*. 2017; 35(5): 1222–1232. DOI: 10.1002/stem.2569.
34. Bonner-Weir S., Taneja M., Weir G.C., Tatarkiewicz K., Song K.H., Sharma A., O'Neil J.J. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue // *Proc*.

- Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97 (14): 7999–8004. PMID: 10884429
35. Suzuki A., Nakauchi H., Taniguchi H. Prospective Isolation of Multipotent Pancreatic Progenitors Using Flow-Cytometric Cell Sorting // *Diabetes.* 2004; 53(8): 2143–2152. PMID: 15277399.
36. Zhang M., Zhou H., Zheng C. Xiao J., Zuo E., Liu W., Xie D., Shi Y., Wu C., Wang H., Li D., Li J. The Roles of Testicular C-kit Positive Cells in De novo Morphogenesis of Testis // *Scientific Reports.* 2014; 4: 5936. DOI: 10.1038/srep05936.
37. Matthews D.R., Hosker J.P., Rudenski A.S. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and b-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man // *Diabetologia.* 1985; 28: 412–419. DOI: 10.1007/bf00280883.

Поступила в редакцию 27.06.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Пахомова Ангелина Владимировна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория регенеративной фармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Першина Ольга Викторовна, д-р мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория регенеративной фармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Крупин Вячеслав Андреевич, канд. мед. наук, лаборант-исследователь, лаборатория регенеративной фармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Ермолаева Любовь Александровна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория лекарственной фармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Ермакова Наталия Николаевна, канд. мед. наук, науч. сотрудник, лаборатория регенеративной фармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Кудряшова Анастасия Игоревна, аспирант, лаборатория регенеративной фармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Дыгай Александр Михайлович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, науч. руководитель учреждения, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Пан Эдгар Сергеевич, лаборант-исследователь, лаборатория регенеративной фармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Рыбалкина Ольга Юрьевна, канд. биол. наук, науч. сотрудник, лаборатория онкофармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Скурихин Евгений Германович, д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией регенеративной фармакологии, НИИФиРМ имени Е.Д. Гольдберга, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

✉ Пахомова Ангелина Владимировна, e-mail: angelinapakhomova2011@gmail.com.

УДК 616.37-098-003.93:615.38

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-220–232

For citation: Pakhomova A.V., Pershina O.V., Krupin V.A., Ermolaeva L.A., Ermakova N.N., Kudryashova A.I., Dygai A.M., Pan E.S., Rybalkina O.Yu., Skurikhin E.G. The role of stem and progenitor cells in the regeneration of the pancreas and testes in metabolic disorders. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2017; 16 (4): 220–232.

The role of stem and progenitor cells in the regeneration of the pancreas and testes in metabolic disorders

Pakhomova A.V., Pershina O.V., Krupin V.A., Ermolaeva L.A., Ermakova N.N., Kudryashova A.I., Dygai A.M., Pan E.S., Rybalkina O.Yu., Skurikhin E.G.

*Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine (GRIPRM), Tomsk National Research Medical Centre (TNRMC), Russian Academy of Sciences (RAS)
3, Lenin Str., Tomsk, 634028, Russian Federation*

ABSTRACT

The aim of this research was to investigate the regenerative potential of stem and progenitor cells derived from the pancreas and testes in metabolic disorders.

Materials and methods. The experiments were performing on C57Bl/6 mice. Metabolic disorders (MD) were modeling by streptozotocin and fat diet. Morphological methods were used to assess morphopathological changes in the pancreas and testicular tissue and fertility. We investigated the insulin expression in the islets of Langerhans, CD16 in testes by immunohistochemical methods. We evaluated the blood lipids, level of glucose, inflammatory mediators, testosterone and a glucose-dependent insulintropic polypeptide levels in biological samples by biochemical methods and ELISA. We used cytometric methods to study the surface markers of stem and progenitor cells, culture methods and transplantation test to investigate the regenerative potential of stem and progenitor cells.

Results. After streptozotocin injection and fatty diet we observed the metabolic imbalance of lipids, testosterone, glucose and insulin resistance in C57BL/6 male mice. The inflammation, type 2 diabetes, asthenozoospermia were developed and the fertility index was decreased after the metabolic disorders. We observed the increase of oligopotent β -cell precursors (CD45⁺TER119⁻CD133⁺CD49f^{low}) and precursors of hemangiogenesis (CD45⁺TER119⁻cKit-1⁺Flk-1⁺) count in the pancreas, spermatogonial stem cells (CD117⁺CD90⁺ and CD117⁺CD90⁺) and precursors of hemangiogenesis (CD45⁺TER119⁻cKit-1⁺Flk-1⁺) in the testes in MD. Stem and progenitor cells had a high clonal activity and self-renewal capacity, the ability to differentiate into mature cells in vitro, the effective engraftment in injured tissue.

Conclusions. In experiments in vitro and in vivo we detected a high regenerative potential of precursors of hemangiogenesis and insulin-producing β -cells, spermatogonial stem cells of C57BL/6 male mice with metabolic disorders. Low rates of regeneration of the microvasculature, insulin-producing β -cells and germ cells in metabolic disorders are associated with the inhibitory effect of diabetic factors and inflammation on stem and progenitor cells.

Key words: metabolic disorders, inflammation, diabetes mellitus, hypogonadism, spermatogonial stem cells, precursors of hemangiogenesis, precursors of β -cells, regeneration.

Received June 27.2017

Accepted November 08.2017

Pakhomova Angelina V., PhD, Researcher, Laboratory of Regenerative Pharmacology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Pershina Olga V., DM, Senior Researcher, Laboratory of Regenerative Pharmacology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Krupin Vyacheslav A., PhD, Researcher, Laboratory of Regenerative Pharmacology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Ermolaeva Lybov A., PhD, Researcher, Laboratory of Drug Toxicology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Ermakova Natalia N., PhD, Researcher, Laboratory of Regenerative Pharmacology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Kudryashova Anastasia I., Graduate Student, Laboratory of Regenerative Pharmacology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Dygai Alexander M., DM, Professor, Academician of RAS, Scientific Head of Institute, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Pan Edgar S., Junior Researcher, Laboratory of Regenerative Pharmacology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Rybalkina Olga Yu., PhD, Researcher, Laboratory of Oncopharmacology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

Skurikhin Evgenii G., DM, Professor, Head of the Laboratory of Regenerative Pharmacology, GRIPRM, TNRMC, RAS, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Pakhomova Angelina V.**, e-mail: angelinapakhomova2011@gmail.com.

УДК 616-056.43-097

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-233–241

Для цитирования: Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Семенова Л.Ю. Иммунопатогенез формирования atopических заболеваний. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 233–241.

Иммунопатогенез формирования atopических заболеваний

Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Семенова Л.Ю.

Российский национальный исследовательский медицинский университет (РНИМУ) им. Н.И. Пирогова Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянинова, 1

РЕЗЮМЕ

Цель работы – сравнительное изучение изменений поверхностного фенотипа лимфоцитов крови у больных с различными формами atopических заболеваний и латентной сенсibilизацией.

Материал и методы. Исследование проведено на лимфоцитах периферической крови 22 больных с латентной сенсibilизацией, 30 больных поллинозом, 44 больных atopической бронхиальной астмой и 36 пациентов с atopическим дерматитом. Контрольную группу составили 26 здоровых людей.

Результаты проведенных исследований убедительно свидетельствуют, что atopические болезни различаются не только клиническими проявлениями, но и механизмами нарушений функций иммунной системы. Сравнительное изучение поверхностного фенотипа лимфоцитов у больных с различными формами atopии позволило выявить существенное нарастание изменений их субпопуляционного состава по мере усиления тяжести клинических проявлений заболеваний. У больных всеми исследованными формами atopии отмечалось повышение содержания в периферической крови В-лимфоцитов, экспрессирующих маркер CD72, и лимфоцитов, несущих ранние активационные антигены CD23, CD25, CD71 и рецепторы адгезии CD54. Развитие поллиноза, atopической бронхиальной астмы и atopического дерматита сопровождалось дополнительным повышением содержания в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих поздний маркер активации HLA-DR, предшественников плазматических клеток и лимфоцитов CD38⁺, несущих поверхностные иммуноглобулины. В крови у больных atopией с выраженными клиническими проявлениями выявлено достоверное повышение содержания всех изученных субпопуляций В-лимфоцитов. У больных с латентной сенсibilизацией зарегистрировано повышенное содержание в крови лимфоцитов, экспрессирующих CD95-рецептор запуска Fas-индуцированного апоптоза, и снижение количества клеток, экспрессирующих его лиганд – рецептор CD178. У больных с atopической бронхиальной астмой и atopическим дерматитом содержание в крови CD95⁺ лимфоцитов, напротив, снижено, а CD178⁺-лимфоцитов – повышено, что отражает нарушение Fas-зависимого апоптоза при тяжелых atopических заболеваниях.

Ключевые слова: atopическая бронхиальная астма, atopический дерматит, поллиноз, латентная сенсibilизация, CD-антигены.

ВВЕДЕНИЕ

Перенос результатов фундаментальных исследований из биомедицины в медицинскую практику с целью улучшения лечения и диагно-

стики – одно из важнейших направлений развития современной медицины. В настоящее время аллергические заболевания, имеющие в своей основе нарушения функции иммунной системы, являются ведущей причиной инвалидизации населения во многих развитых странах, в том числе и в Российской Федерации. Вопросы качественной

✉ Казимирский Александр Николаевич, e-mail: alnica10@mail.ru.

диагностики и эффективной терапии этих заболеваний не могут быть решены без понимания их патогенеза. Однако, несмотря на длительное изучение патогенеза аллергии, механизмы аллергической перестройки иммунной системы остаются невыясненными.

Полноценное представление об особенностях функционирования иммунной системы при патологии, поиск механизмов прогрессирования заболеваний, подбор оптимальной терапии можно получить лишь при комплексной оценке функционального состояния различных звеньев иммунной системы. Одним из используемых в этих целях эффективных методических подходов является оценка экспрессии отдельных функциональных молекул на поверхности иммунокомпетентных клеток (лимфоцитов и др.). Используя широкий спектр моноклональных антител к поверхностным рецепторам лимфоцитов, возможно оценить как количественные (популяционные и субпопуляционные) параметры, так и функциональное состояние иммунной системы. Более того, подобный подход позволяет оценить уровень патогенетического дефекта иммунной системы.

Существенную роль в развитии аллергии играют нарушения активности различных субпопуляций и апоптоза лимфоцитов [1–3], которые могут быть исследованы с помощью оценки экспрессии отдельных функциональных молекул на поверхности лимфоцитов. Для аллергологии концепция персонализированного подхода на основе трансляционной медицины наиболее эффективно может быть реализована при изучении таких заболеваний, как поллиноз, бронхиальная астма, atopический дерматит.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследованы 22 больных латентной сенсibilизацией, 30 больных поллинозом, 44 больных atopической бронхиальной астмой (АБА) и 36 пациентов с atopическим дерматитом. Все больные с поллинозом, atopической бронхиальной астмой и atopическим дерматитом были обследованы в период обострения заболевания. Контрольную группу составили 26 здоровых людей.

Оценку относительного и абсолютного содержания в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих антигены CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD20, CD72, CD38, CD23, CD25, CD71, HLA-DR, CD95, CD54, CD30, CD178 и мембранные иммуноглобулины mIgM и mIgG, проводили методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител ИКО,

ДАСО (eBioscience). В качестве вспомогательных методов использовали выделение лимфоцитов по методу Воуит в градиенте плотности фиколл-верографина, оценку их жизнеспособности сразу после выделения из крови и подсчет их числа в периферической крови. Статистическую обработку полученных результатов с целью оценки достоверности регистрируемых изменений проводили при большой выборке с помощью критерия *t* Стьюдента; при малой выборке с ненормальным распределением, а также при сравнении попарно связанных вариантов – с применением непараметрического критерия Вилкоксона – Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Латентную сенсibilизацию рассматривают как состояние, предшествующее развитию многих аллергических заболеваний. При проведении кожных проб у большинства пациентов выявлена повышенная чувствительность к бытовым аллергенам. Клинически латентная сенсibilизация не проявлялась. При проведении иммунологических исследований у пациентов регистрировали следующие особенности иммунного статуса (табл. 1–4):

- снижение содержания Т-лимфоцитов при нормальном количестве хелперно-индукторных лимфоцитов (CD4⁺-клетки) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺-клетки);

- двукратное снижение количества НК-клеток (CD16⁺-лимфоциты);

- увеличение (в 2,7 раза) количества активированных CD23⁺ В-лимфоцитов при отсутствии изменений (относительно нормы) общего количества В-лимфоцитов (CD20⁺-клетки), количества премированных антигеном клеток (CD72⁺-клетки) и IgM⁺- и IgG⁺-лимфоцитов;

- увеличение количества лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации (CD25 и CD71), при соответствующем норме содержания клеток, несущих маркер поздней активации (HLA-DR);

- увеличение (в 3,5 раза) количества клеток, экспрессирующих рецептор адгезии CD54;

- увеличение (в 2,5 раза) количества лимфоцитов, несущих маркер индукции апоптоза CD95;

- снижение (в 2 раза) количества лимфоцитов, экспрессирующих лиганд рецептора активационного апоптоза (CD178⁺-лимфоциты).

Анализируя полученные результаты, можно заключить, что иммуннопатогенез латентной сенсibilизации характеризуется активацией Т-лим-

Т а б л и ц а 1

Содержание субпопуляций Т-лимфоцитов и NK-клеток в крови у больных разными формами atopических заболеваний, $X \pm m$					
Антигенный маркер	Здоровые доноры	Латентная сенсibilизация	Поллиноз	АБА	Атопический дерматит
CD3 ⁺	66,74 ± 0,99	51,60 ± 3,80 ***	52,69 ± 2,06 ***	56,64 ± 1,72 ***	59,03 ± 1,53 **
CD4 ⁺	36,71 ± 1,26	37,15 ± 1,92	34,11 ± 2,13	33,42 ± 0,73 **	35,90 ± 2,65
CD8 ⁺	26,34 ± 0,75	23,61 ± 3,58	24,87 ± 1,69	20,69 ± 0,73 ***	21,79 ± 1,33 *
CD16 ⁺	12,84 ± 0,68	6,21 ± 1,25 ***	12,27 ± 1,22	9,73 ± 0,33 ***	12,5 ± 1,49
CD56 ⁺	4,78 ± 0,52	6,73 ± 2,04	15,12 ± 4,29 ***	15,58 ± 1,14***	–

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,01$ по сравнению с группой здоровых доноров (здесь и в табл. 2–4).

Т а б л и ц а 2

Содержание субпопуляций В-лимфоцитов в крови у больных разными формами atopических заболеваний, $X \pm m$					
Антигенный маркер	Здоровые доноры	Латентная сенсibilизация	Поллиноз	АБА	Атопический дерматит
CD20 ⁺	9,97 ± 0,42	9,97 ± 1,66	17,07 ± 1,30 ***	17,44 ± 0,64 ***	19,75 ± 1,71 ***
CD72 ⁺	10,43 ± 0,51	10,37 ± 1,21	11,80 ± 1,08	15,67 ± 0,56***	9,52 ± 1,82
mIgM ⁺	5,98 ± 0,39	7,30 ± 1,83	10,29 ± 0,97 ***	14,22 ± 0,32 ***	13,51 ± 1,39 ***
mIgG ⁺	6,27 ± 0,75	7,46 ± 0,92%	10,48 ± 1,12 **	14,17 ± 0,31 ***	14,36 ± 1,63 ***
CD38 ⁺	7,33 ± 0,52	9,89 ± ,36	15,33 ± 1,65 ***	13,76 ± 0,55 ***	–

Т а б л и ц а 3

Содержание лимфоцитов, экспрессирующих маркеры активации, в крови у больных разными формами atopических заболеваний, $X \pm m$					
Антигенный маркер	Здоровые доноры	Латентная сенсibilизация	Поллиноз	АБА	Атопический дерматит
CD23 ⁺	5,29 ± 0,30	14,54 ± 0,70 ***	11,56 ± 1,08 ***	13,26 ± 0,36 ***	14,09 ± 2,55 ***
CD25 ⁺	6,04 ± 0,24	9,57 ± 1,08 *	12,86 ± 1,40 **	15,70 ± 0,37 ***	13,37 ± 1,34 ***
CD71 ⁺	6,32 ± 0,21	9,49 ± 1,60 *	15,73 ± 1,77 **	13,11 ± 0,77 ***	15,13 ± 2,04 ***
HLA-DR ⁺	11,83 ± 0,30	11,78 ± 1,10	14,94 ± 1,14 *	23,85 ± 0,65 ***	20,11 ± 1,69 **
CD54 ⁺	5,55 ± 0,33	20,30 ± 2,30 ***	22,35 ± 4,27 ***	27,92 ± 1,55 ***	20,12 ± 2,20 ***

Т а б л и ц а 4

Содержание лимфоцитов, экспрессирующих маркеры апоптоза, в крови у больных разными формами atopических заболеваний, $X \pm m$					
Антигенный маркер	Здоровые доноры	Латентная сенсibilизация	Поллиноз	АБА	Атопический дерматит
CD30 ⁺	2,00 ± 0,61	–	2,76 ± 0,45	7,33 ± 0,70 ***	5,87 ± 0,62 ***
CD95 ⁺	4,42 ± 0,20	11,57 ± 1,98 *	13,03 ± 1,59 **	3,74 ± 0,68	3,60 ± 0,81
CD178 ⁺	5,30 ± 0,96	2,57 ± 0,83	–	16,66 ± 2,44 ***	–

фоцитов, о чем свидетельствует увеличение числа CD54⁺-лимфоцитов, и повышением содержания в крови лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации (CD25 и CD71) (см. табл. 3). Развивается активация и В-клеточного звена иммунной системы, но она, по-видимому, не является эффективной.

Практически 3-кратное увеличение содержания в крови активированных CD23⁺ В-лимфоцитов не сопровождается изменением численности зрелых субпопуляций В-лимфоцитов (mIgM⁺ и mIgG⁺) (см. табл. 2). По-видимому, значительная часть активированных В-лимфоцитов элиминируются, не достигая стадии зрелых плазматических клеток. Ведущую роль в элиминации сенсibilизированных лимфоцитов играет усиление индукции Fas-зависимого апоптоза, что проявляется значительным увеличением числа CD95⁺-лимфоцитов в крови (см. табл. 4).

Таким образом, дисбаланс в иммунной системе (увеличение содержания клеток, экспрессирующих CD54-антиген, и количества CD95⁺-лимфоцитов), парциальное усиление активационных процессов и положительные кожные пробы могут служить доказательными признаками (критериями) латентной сенсibilизации при выявлении групп риска в условиях отсутствия клинических проявлений для проведения иммуннокорректирующей терапии [4–6].

Поллиноз, или сезонный аллергический риноконъюнктивит, – классическое atopическое заболевание, характеризующееся небольшим объемом воспаленной ткани и непродолжительным периодом обострения (2–3 нед в году в период цветения растений).

При проведении иммунологических исследований у пациентов с поллинозом также регистрировались существенные отклонения иммунологических параметров от нормы:

- снижение содержания Т-лимфоцитов при нормальном количестве хелперно-индукторных лимфоцитов (CD4⁺-клетки) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺-клетки);

- сохраняющееся в норме количество CD16⁺ НК-клеток при увеличении численности CD56⁺-лимфоцитов;

- увеличение содержания В-лимфоцитов (CD20⁺) при нормальном количестве В-клеток, полноценно проходящих этапы дифференцировки (CD72⁺-клетки); повышение (в 2 раза) количества активированных В-лимфоцитов (CD23⁺);

- увеличение числа лимфоцитов с признаками ранней (CD25⁺ и CD71⁺) и поздней (HLA-DR⁺) активации;

- увеличение (в 4 раза) количества клеток, экспрессирующих антиген CD54;

- увеличение (почти в 3 раза) количества CD95⁺-лимфоцитов;

- существенное увеличение (в 2 раза) количества CD38⁺-предшественников плазматических клеток, способных к синтезу IgE после превращения в плазматические клетки.

Полученные результаты позволяют заключить, что для поллиноза характерна полноценная активация как Т-, так и В-клеточного звена иммунной системы. Существенное повышение содержания CD56⁺-лимфоцитов при отсутствии значимых изменений числа CD16⁺-лимфоцитов (см. табл. 1) указывает на присутствие в периферической крови у больных поллинозом минорной субпопуляции НКТ-лимфоцитов, которые в норме локализуются в слизистых оболочках.

Показано, что НКТ-клетки способны непосредственно активироваться некоторыми гликолипидами, присутствующими в спорах грибов и пыльце растений, минуя этап антигенной презентации, и продуцировать высокий уровень IL-4 после взаимодействия с молекулами гликолипидов. В частности, повышение содержания IL-4-продуцирующих НКТ-лимфоцитов в крови у больных бронхиальной астмой способствует поддержанию синтеза IgE [7].

Повышение количества CD95⁺-клеток у больных поллинозом по сравнению с группой здоровых доноров свидетельствует об активации апоптоза лимфоцитов. Клональная пролиферация лимфоцитов, ведущая к увеличению количества антиген-активированных клеток, уравнивается механизмами их программируемой гибели (апоптоза), вследствие чего у этих больных не наблюдается резкого повышения в крови числа лимфоцитов с маркерами поздней активации HLA-DR (см. табл. 3).

Atopическая бронхиальная астма и atopический дерматит характеризуются сходными изменениями иммунофенотипа и функций лимфоцитов [6–9]. При этих заболеваниях наблюдается обширный воспалительный процесс, характеризующийся синтезом большого количества цитокинов, а также усилением процессов перекисного окисления липидов и образования их конечных продуктов [10–12]. Для этих заболеваний характерно (см. табл. 1–4):

- снижение общего содержания Т-лимфоцитов, преимущественно за счет цитотоксических Т-клеток;

- соответствующее норме (при atopическом дерматите) или пониженное (при АБА) количество CD16⁺ НК-клеток при выраженном уве-

личении (в случае АБА) численности CD56⁺-лимфоцитов;

– увеличение содержания в крови всех субпопуляций В-лимфоцитов;

– пропорциональное (в среднем в два раза) увеличение количества лимфоцитов, экспрессирующих поверхностные маркеры как ранней (CD25 и CD21), так и поздней (HLA-DR) активации;

– значительное снижение содержания в крови CD95⁺-лимфоцитов.

Очевидно значительное повышение количества активированных В-лимфоцитов (CD23⁺) и (в 2–3 раза) предшественников плазматических клеток (CD38⁺) в сочетании с увеличением числа зрелых (HLA-DR⁺) лимфоцитов у больных atopическим дерматитом и АБА обуславливается нарушениями активационного апоптоза (см. табл. 2–4). Свидетельством этому является сохраняющийся в норме уровень экспрессии рецептора CD95 (количества CD95⁺ лимфоцитов), что можно объяснить некомпенсированными процессами перекисного окисления липидов и накоплением малонового диальдегида, вызывающего образование белок-белковых и белок-липидных комплексов в плазматической мембране. В таких условиях CD95 становится нестабильным и переходит в растворимое состояние, что приводит к нарушению реализации механизмов Fas/FasL-зависимого апоптоза [2, 7].

ОБСУЖДЕНИЕ

У больных с изученными формами атопии отмечается снижение содержания в крови Т-лимфоцитов (CD3⁺) с параллельным увеличением числа активированных В-лимфоцитов (CD23⁺) и лимфоцитов, экспрессирующих CD54⁺, или рецептор адгезии ICAM-1 (см. табл. 1–3).

Сравнительное изучение поверхностных маркеров лимфоцитов у больных с различными формами атопии позволило выявить существенное нарастание изменений субпопуляционного состава лимфоцитов крови по мере усиления тяжести клинических проявлений заболевания. При этом у больных с латентной сенсibilизацией содержание общего числа В-лимфоцитов (CD20⁺) и их зрелых субпопуляций (CD72⁺, mIgM⁺, mIgG⁺) в крови не изменялось (см. табл. 2). Обращало на себя внимание высокое содержание в крови больных с латентной сенсibilизацией CD72⁺-лимфоцитов, превышающее содержание CD20⁺-лимфоцитов.

В литературе имеется информация, что одна из функций рецептора CD72 состоит в регуля-

ции дифференцировки зрелых В-лимфоцитов, особенно в предотвращении дифференцировки наивных В-клеток в плазматические клетки [13, 14]. Вероятно, именно этот механизм играет существенную роль в блокаде синтеза высоких концентраций IgE при латентной сенсibilизации.

У больных атопией с выраженными клиническими проявлениями выявлено также достоверное повышение содержания всех изученных популяций и субпопуляций В-лимфоцитов в крови. Кроме того, у этих больных отмечалось существенное повышение содержания в крови лимфоцитов, несущих маркеры ранней (CD25, CD71) и поздней (HLA-DR) активации (см. табл. 3).

Интересные результаты были получены при оценке содержания в периферической крови лимфоцитов, несущих маркеры CD95 и CD30. Известно, что экспрессия рецептора CD95 отражает способность клеток к вхождению в апоптоз. Экспрессия маркера CD30 может играть двоякую роль. С одной стороны, взаимодействие CD30 с лигандом вызывает индукцию апоптоза, однако с другой стороны, высокая экспрессия CD30 на поверхности лимфоцита сопровождается значительным поступлением растворимой формы CD30 в плазму крови, блокадой лиганда и торможением апоптоза [15]. В литературе имеются данные о том, что у больных АБА регистрируется значительное повышение содержания sCD30 в сыворотке крови [16].

У больных латентной сенсibilизацией и поллинозом содержание CD95⁺-лимфоцитов в крови повышалось, в то же время у больных АБА и atopическим дерматитом оно не изменялось. Напротив, содержание в крови CD30⁺-лимфоцитов у больных АБА и atopическим дерматитом увеличивалось, а у больных поллинозом – не отличалось от контроля. Аналогичные изменения содержания CD30⁺-лимфоцитов в крови представлены и в литературе [17–19]. Существенное увеличение числа лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD30⁺, продуцирующих IL-4 при стимуляции *in vitro*, было обнаружено при обследовании больных бронхиальной астмой [12]. У больных atopическим дерматитом выявлено, что количество CD30⁺-лимфоцитов возрастает пропорционально тяжести заболевания [20]. Полученные результаты позволяют утверждать, что для тяжелых atopических заболеваний характерно сочетание дефицита CD95⁺-лимфоцитов с высоким содержанием CD30⁺-клеток в крови.

Таким образом, у больных с выраженными клиническими проявлениями атопии (АБА и atopический дерматит) отмечаются признаки угне-

тения апоптоза лимфоцитов, что, по-видимому, играет ведущую роль в поддержании длительной активации иммунной системы и многолетней сенсибилизации, связанной с гиперпродукцией IgE.

Результаты представленных исследований убедительно свидетельствуют, что atopические заболевания различаются не только клиническими проявлениями, но и механизмами нарушений функций иммунной системы. Полученные результаты позволяют объяснить такой хорошо известный факт, как предотвращение перехода поллиноза в бронхиальную астму после проведенной аллерген-специфической иммунотерапии. В то же время субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у больных АБА и atopическим дерматитом является сходным.

Величина экспрессии CD95 на лимфоцитах отражает их готовность к вступлению в апоптоз – включение процесса программируемой клеточной гибели по Fas-зависимому механизму. Тяжелые проявления atopии сопровождаются ослаблением экспрессии рецептора Fas-опосредованного апоптоза – CD95-антигена, индуцирующего гибель клеток путем его связывания с Fas-лигандом.

Нарушение индукции апоптоза у больных с тяжелыми atopическими заболеваниями возможно связано с действием медиаторов острой фазы воспаления и является одним из механизмов развития функционального дисбаланса иммунорегуляции при atopии. В основе выявленных изменений лежит нарушение соотношения циклических нуклеотидов цАМФ/цГМФ в лимфоцитах (двукратное снижение концентрации цГМФ на фоне нарастания концентрации цАМФ). Эти изменения, в свою очередь, приводят к подавлению экспрессии CD95 и индукции апоптоза, что сопровождается преобладанием процессов пролиферации над гибелью клеток, нарушением функционального баланса Т-хелперов 1 и 2 типов с преобладанием Th2-зависимых иммунных реакций, накоплением клонов В-лимфоцитов и усиленным синтезом IgE.

Таким образом, развитие atopии, по итогам наших исследований – это проявление некомпенсированной В-клеточной активации, индуцированной, по-видимому, минорной субпопуляцией НКТ-клеток. Их переход из слизистых оболочек в кровь поддерживает активацию лимфоцитов, а присутствие аллергена вызывает избыточную генерацию радикалов кислорода, тканевое повреждение, изменение состава мембранных липидов и нарушение активационного апоптоза лимфоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Atopические заболевания различаются не только клиническими проявлениями, но и механизмами нарушений функций иммунной системы. У больных с исследованными формами atopии выявляется повышение содержания в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих маркеры CD72, CD23, CD25, CD71, CD54. Развитие поллиноза, atopической бронхиальной астмы и atopического дерматита сопровождается дополнительным повышением содержания в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих маркеры CD38, CD56, mIgM, mIgG, HLA-DR. У больных с латентной сенсибилизацией отмечается высокое содержание в крови лимфоцитов, экспрессирующих CD95-рецептор запуска Fas-индуцированного апоптоза и дефицит клеток, экспрессирующих его лиганд – CD178. У больных с atopической бронхиальной астмой и atopическим дерматитом содержание в крови CD95⁺-лимфоцитов, наоборот, снижено, а CD178⁺-лимфоцитов – повышено, что отражает нарушение Fas-зависимого апоптоза при тяжелых atopических заболеваниях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено комитетом по этике РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Nagafuku M., Okuyama K., Onimaru Y., Suzuki A., Odagiri Y., Yamashita T., Iwasaki K., Fujiwara M., Takayanagi M., Ohno I., Inokuchi J. CD4 and CD8 T cells require different membrane gangliosides for activation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. 109; 6: 336–342.
2. Albacker L.A., Chaudhary V., Chang Y.J., Kim H.Y., Chuang Y.T., Pichavant M., DeKruyff R.H., Savage P.B., Umetsu D.T. Invariant natural killer T cells recognize a fungal glycosphingolipid that can induce airway hyperreactivity // *Nat. Med.* 2013; 19 (10): 1297–1304.
3. Inokuchi J., Nagafuku M., Ohno I., Suzuki A. Distinct selectivity of gangliosides required for CD4⁺ T- and CD8⁺ T-cell activation // *Biochim. Biophys. Acta*. 2015; 1851 (1): 98–106.

4. Порядин Г.В., Оршанко А.М., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Латышева Т.В. Активационные процессы в лимфоцитах пациентов с латентной сенсibilизацией // *Патофизиология и экспериментальная терапия*. 2009; 1: 3–25.
- Poryadin G.V., Orshanko A.M., Salmasi J.M., Kazimirskiy A.N., Latysheva T.V. Aktivatsionnyye protsessy v limfotsitakh patsiyentov s latentnoy sensibilizatsiyey [Activation processes in lymphocytes of patients with latent sensitization] // *Patofiziologiya i eksperimentalnaya terapiya – Patophysiology and Experimental Therapy*. 2009; 1: 3–25 (in Russian).
5. Poryadin G.V., Sharpan Yu.V., Orshanko A.M., Salmasi J.M., Kazimirskiy A.N., Latysheva T.V. Features of the immune status in patients with latent sensitization // *Russian Journal of Immunology*. 2009; 3 (2): 177–183.
6. Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н. Способ оценки эффективности лечения бронхиальной астмы. Патент на изобретение № 2389023, 2010: 6.
- Poryadin G.V., Salmasi J.M., Kazimirskiy A.N. Sposob ocenki effektivnosti lecheniya bronkhialnoy astmy [A method of evaluating the effectiveness of treatment of bronchial asthma]. Patent № 2389023, 2010: 6 (in Russian).
7. Wei H., Zhang J., Xiao W., Feng J., Sun R., Tian Z. Involvement of human natural killer cells in asthma pathogenesis: natural killer 2 cells in type 2 cytokine predominance // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005. 115 (4): 841–847.
8. Poryadin G.V., Zhuravleva N.E., Salmasi J.M., Kazimirskiy A.N., Semenova L.Yu., Polner S.A., Chervinskaya T.A. Immunological Mechanisms of Recovery from an Acute Stage in Patients with Atopic Bronchial Asthma // *Russian Journal of Immunology*. 2002; 7 (3): 259–264.
9. Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Алиева З.О., Казимирский А.Н. Характеристика поверхностных рецепторов лимфоцитов крови больных атопическим дерматитом // *Аллергология и иммунология*. 2004; 5 (1): 54–70.
- Salmasi J.M., Poryadin G.V., Alieva Z.O., Kazimirskiy A.N. Kharakteristika poverkhnostnykh receptorov limfocitov krovi bolnykh atopicheskim dermatitom [Characteristics of surface receptors of blood lymphocytes in patients with atopic dermatitis] // *Allergologiya i immunologiya – Allergology and Immunology*. 2004; 5 (1): 54–70 (in Russian).
10. Fabian E., Pölöskey P., Kósa L., Elmadfa I., Réthy L.A. Activities of antioxidant enzymes in relation to oxidative and nitrosative challenges in childhood asthma // *J. Asthma*. 2011; 48 (4): 351–357.
11. Ahmad A., Shameem M., Husain Q. Relation of oxidant-antioxidant imbalance with disease progression in patients with asthma // *Ann. Thorac. Med.* 2012; 7 (4): 226–232.
12. Fatani S.H. Biomarkers of oxidative stress in acute and chronic bronchial asthma // *J. Asthma*. 2014; 51 (6): 578–584.
13. Kazimirskiy A.N., Salmasi J.M., Makarov T.V., Poryadin G.V., Terentev A.A. Immune depression effect of oligopeptides from pregnancy specific globulin and carcinoembryonic antigen J. Intern. Society for Oncology and Biomarkers // *Tumor Biology*. 2010; 44: 31, OP-12.
14. Poryadin G.V., Salmasi J.M., Semenova L.Yu. Anti-inflammatory effect of plant composition of Tibetan medicine in vitro on early rheumatoid arthritis // *Health*. 2011; 3 (9): 560–565.
15. Oflazoglu E., Grewal I.S., Gerber H. Targeting CD30/CD30L in oncology and autoimmune and inflammatory diseases // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009; 647: 174–185.
16. Rojas-Ramos E., Garfias Y., Jiménez-Martínez Mdel., Martínez-Jiménez N., Zenteno E., Gorocica P., Lascurain R. Increased expression of CD30 and CD57 molecules on CD4(+) T cells from children with atopic asthma: a preliminary report // *Allergy Asthma Proc.* 2007; 28 (6): 659–666.
17. Беловешкин А.Г. Роль телец Гассалья тимуса человека в позитивной и негативной селекции тимоцитов // *Молодой ученый*. 2012; 7: 334–338.
- Beloveshkin A.G. Rol telecz Gassalya timusa cheloveka v pozitivnoy i negativnoy selekcii timocitov [The role of Kassala Taurus thymus of a person in positive and negative selection of thymocytes] // *Molodoy uchenyy – Young Scientist*. 2012; 7: 334–338 (in Russian).
18. Ярилин А.А., Балабанова Р.М., Латышева Т.В., Никонова М.Ф., Варфоломеева М.И., Григорьева Т.Ю., Станислав М.А. Неравномерное вовлечение в активационный апоптоз Т-лимфоцитов субклассов CD4+ и CD8+ и высокая чувствительность к нему CD30+ клеток крови здоровых лиц и больных с иммунопатологией // *Иммунология*. 2002; 5: 262–267.
- Yarilin A.A., Balabanova R.M., Latysheva T.V., Nikonova M.F., Varfolomeeva M.I., Grigoreva T.Yu., Stanislav M.L. Neravnomernoe вовлечение v aktivacionnyy apoptoz T-limfocitov subklassov CD4+ i CD8+ i vysokaya chuvstvitelnost k nemu CD30+ kletok krovi zdorovykh lic i bolnykh s immunopatologiyey [Uneven involvement in the activation of apoptosis of T-lymphocytes subclasses of CD4+ and CD8+ and high sensitivity to CD30+ cells in the blood of healthy individuals and patients with immunopathologies] // *Immunologiya – Immunology*. 2002; 5: 262–267 (in Russian).
19. Romagnani P., Annunziato F., Manetti R., Mavilia C., Lasagni L., Manuelli C., Vannelli G.B., Vanini V., Maggi E., Pupilli C., Romagnani S. High CD30 ligand expression by epithelial cells and Hassall's corpuscles in the medulla of human thymus. // *Blood*. 1998; 91 (9): 3323–3332.
20. Oflazoglu E., Simpson E.L., Takiguchi R., Grewal I.S., Hanifin J.M., Gerber H.P. CD30 expression on CD1a+ and CD8+ cells in atopic dermatitis and correlation with disease severity. // *Eur. J. Dermatol.* 2008; 18 (1): 41–49.

Поступила в редакцию 30.06.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Порядин Геннадий Васильевич, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, зав. кафедрой патофизиологии и клинической патофизиологии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва.

Салмаси Жан Мустафаевич, д-р мед. наук, профессор, кафедра патофизиологии и клинической патофизиологии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва.

Казимирский Александр Николаевич, д-р биол. наук, доцент, вед. инженер отдела токсикологии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва.

Семенова Людмила Юрьевна, д-р мед. наук, доцент, профессор кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии, РНИМУ им. Н.И. Пирогова, г. Москва.

(✉) Казимирский Александр Николаевич, e-mail: alnica10@mail.ru.

УДК 616-056.43-097

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-233-241

For citation: Poryadin G.V., Salmasi J.M., Kazimirsky A.N., Semenova L.Yu. Immunopathogenesis of atopic diseases formation. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 233–241.

Immunopathogenesis of atopic diseases formation

Poryadin G.V., Salmasi J.M., Kazimirsky A.N., Semenova L.Yu.

*Pirogov Russian National Research Medical University (PRNRMU)
1, Ostrovitianov Str., Moscow, 117997, Russian Federation*

ABSTRACT

The aim of this investigation is the comparative study of changes in the surface phenotype of lymphocyte in patients with different forms of atopic diseases and latent sensitization.

Materials and methods. The study was conducted on peripheral blood lymphocytes from 22 latent sensitization patients, 30 pollinosis patients, 44 atopic bronchial asthma patients and 36 atopic dermatitis patients. The control group consisted of 26 healthy people.

The results of our studies demonstrate that atopic diseases are different not only in clinical manifestations, but also in mechanisms of disturbances in the functions of the immune system. Comparative study of surface markers of lymphocytes in patients with different forms of atopic diseases revealed a significant increase of surface changes of lymphocyte phenotype according to the severity of the clinical manifestations of the disease. All patients with studied forms of atopy had an increase in content of B-lymphocytes expressing CD72 marker in the peripheral blood and of lymphocytes expressing early activation antigens CD23, CD25, CD71 and adhesion receptor CD54. The developments of pollinosis, atopic bronchial asthma and atopic dermatitis are accompanied by an additional increase levels of lymphocytes expressing the late activation marker HLA-DR, the CD38⁺ precursors of plasma cells, and of lymphocytes carrying surface immunoglobulins in peripheral blood. In the blood of patients with atopic disease during exacerbation with evident clinical symptoms revealed a significant increase in all the studied populations and subpopulations of B-lymphocytes. Patients with latent sensitization had increasing blood lymphocytes expressing the CD95 receptor of Fas inducing apoptosis and low content of cells expressing its ligand CD178. Content of CD95⁺ lymphocytes in peripheral blood at atopic bronchial asthma and atopic dermatitis patients is reduced, and CD178⁺ lymphocytes increased, reflecting infringement of Fas-dependent apoptosis in severe atopic diseases.

Key words: atopic bronchial asthma, atopic dermatitis, pollinosis, latent sensitization, CD antigens.

Received June 30.2017
Accepted November 08.2017

Poryadin Gennady V., DM, Professor, Corresponding Member of RAS, Head of the Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, PRNRMU, Moscow, Russian Federation.

Salmasi Jean M., DM, Professor, Pathophysiology and Clinical Pathophysiology Department, PRNRMU, Moscow, Russian Federation.

Kazimirsky Alexander N., DBSc, Associate Professor, Leading Engineer of the Toxicology Department, Moscow, Russian Federation.

Semenova Lyudmila Yu., DM, Associate Professor, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, Moscow, Russian Federation.

(✉) **Kazimirsky Alexander N.**, e-mail: alnica10@mail.ru.

УДК 616.8.018.74-002-092.4

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-242-249

Для цитирования: Салмина А.Б., Бойцова Е.Б., Моргун А.В., Панина Ю.А., Горина Я.В., Писарева Н.В., Нода М., Кутищева И.А., Мартынова Г.П. Экспрессия NLRP3 инфламмасом церебрального эндотелия при воспалении вирусного генеза *in vitro*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 242–249.

Экспрессия NLRP3 инфламмасом церебрального эндотелия при воспалении вирусного генеза *in vitro*

Салмина А.Б.¹, Бойцова Е.Б.¹, Моргун А.В.¹, Панина Ю.А.¹, Горина Я.В.¹,
Писарева Н.В.¹, Нода М.², Кутищева И.А.¹, Мартынова Г.П.¹

¹Красноярский государственный медицинский университет (КГМУ) имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Россия, 660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

² Университет Кюшу Япония, 812-8582, г. Фукуока, Maidashi Higashi-ku, 3-1-1

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Изучить влияние индукторов нейровоспаления вирусного генеза на экспрессию NLRP3 и структурную целостность эндотелиальных клеток головного мозга *in vitro*.

Материал и методы. Исследование проведено на клеточной культуре церебральных эндотелиоцитов. Источником клеток служил головной мозг крыс линии Wistar. К культуре эндотелиальных клеток добавляли полиинозиновую-полицитидиловую кислоту (PolyI:C) – 20 мкг/мл. В качестве группы сравнения использовали культуру эндотелиоцитов, к которым в культуральную среду добавляли спинномозговую жидкость, полученную от пациента с энтеровирусным менингитом (100 мкл). Ликвор был стандартизирован по концентрации белка методом Лоури. Концентрация белка составила 1 мкг/мл. В качестве контроля использовались эндотелиоциты, культивируемые в стандартной культуральной среде. Культивирование осуществляли с использованием культуральных вставок для 12-луночных планшетов. Через 24 и 72 ч культивирования во всех группах регистрировали трансэндотелиальное сопротивление. Через 24 ч оценивали экспрессию молекул NLRP3 с использованием двойного непрямого метода иммуноферментного окрашивания согласно протоколу производителя. Первичные антитела к NLRP3 (Abcam, США, ab51952) – разведение 1 : 100. Вторичные антитела меченые Alexa Fluor 488 (Abcam, США, ab150117) – разведение 1 : 200. Визуализация проводилась с помощью конфокальной лазерной микроскопии на микроскопе Olympus FV10i (Olympus, Япония).

Результаты. Через 24 ч культивирования эндотелиоцитов с PolyI:C и вирусным ликвором наблюдается снижение показателей трансэндотелиального сопротивления по сравнению с контролем. Через 72 ч трансэндотелиальное сопротивление оставалось значимо более низким по сравнению с группой контроля. Установлено, что количество эндотелиальных клеток, экспрессирующих молекулу NLRP3, максимально в культуре с добавлением патологического ликвора. После инкубации клеток с PolyI:C количество NLRP3-иммунопозитивных эндотелиоцитов увеличилось по сравнению с контролем, но было ниже, чем в группе сравнения.

Заключение. Влияние PolyI:C и патологически измененного ликвора приводит к нарушению структурной целостности эндотелиального монослоя, что проявляется в уменьшении показателя трансэндотелиального сопротивления. Одновременно с этим увеличивается количество эндотелиоцитов, которые

✉ Бойцова Елизавета Борисовна, e-mail: elizaveta.boicova@mail.ru.

экспрессируют NLRP3, что дает право предполагать участие этих механизмов в повреждении гематоэнцефалического барьера при нейроинфекции.

Ключевые слова: гематоэнцефалический барьер, трансэндотелиальное сопротивление, воспаление, вирусный менингит, эндотелиальные клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Полиинозиновая-полицитидиловая кислота (PolyI:C) – синтетический двухцепочечный полирибонуклеотид, который широко применяется в экспериментальных исследованиях как индуктор воспаления для создания модели вирусного воспаления [1]. PolyI:C взаимодействует в клетках с рецепторами TLR и способствует формированию инфламмосом NLRP3 [2]. Активация инфламмосом может играть определенную роль в защите организма против вирусной инфекции [3]. Вирусные инфекции индуцирует выработку интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) и интерлейкина-18 (ИЛ-18) в макрофагах путем активации каспазы-1. Стимулирование макрофагов PolyI:C индуцирует секрецию ИЛ-1 β и ИЛ-18 криопирин-зависимым путем (криопирин – основной компонент интерлейкина-1 инфламмосомы NLRP3) [4]). В исследовании T.D. Kanneganti (2006) в модели *in vitro* была показана роль криопирин в образовании ИЛ-1 β в ответ на воздействие PolyI:C в интактных условиях. NLRP3 активирует каспазу-1 и каспазу-5. В макрофагах, которые не содержат криопирин, не происходит активации каспаз, ИЛ-1 β и ИЛ-18 под влиянием вирусной РНК или PolyI:C. Авторы доказали, что заражение Сендай вирусом (парамиксовирус) и вирусом гриппа активирует NLRP3. Позднее подобный эффект был зарегистрирован для всех РНК-содержащих вирусов. Также авторы показали необходимость NLRP3 для синтеза ИЛ-1 β в ответ на воздействие PolyI:C *in vivo* [5]. В других исследованиях изучение активации инфламмосом с использованием PolyI:C и бактериальной РНК показали индуцирование ИЛ-1 β после длительного воздействия (24 ч) [6, 7].

Повреждение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) – одно из ключевых событий при вирусных нейроинфекциях. Обнаружены различные эффекты PolyI:C в клетках ГЭБ. Так, в работе L.N. Pan et al. (2012) представлены данные о том, что инкубирование астроцитов с PolyI:C заметно ослабляет повреждения, вызванные кислородной депривацией, значительно повышает жизнеспособность клеток и снижает утечку лактатдеги-

дрогиназы. PolyI:C значительно усиливает экспрессию TRIF, сопровождающуюся уменьшением образования интерферона β (IFN β). Кроме того, PolyI:C значительно подавляет образование провоспалительных цитокинов – фактора некроза опухолей (ФНО α) и ИЛ-6. Доказан дозозависимый эффект PolyI:C на увеличение продукции ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО α , IFN β [8].

В последнее время все большее внимание уделяется роли инфламмосомы NLRP3 в центральной нервной системе (ЦНС), которая играет значимую роль в патогенезе невровоспалительных заболеваний. Доказано, что микроглия, астроциты, нейроны и эндотелиоциты экспрессируют NLRP3 [9]. Одним из механизмов активации инфламмосомного комплекса NLRP3 является экзогенный путь, который реализуется в результате инфекционного воздействия, повреждения тканей и метаболических нарушений [10]. Участие NLRP3 в развитии невровоспаления не подвергается сомнению. Например, в исследовании T. Hoegen et al. (2011) обнаружено снижение тяжести заболевания пневмококковым менингитом у мышей нокаутных по NLRP3 в десятки раз [11]. Логично предполагать, что инфламмосомо-опосредованные механизмы могут играть роль в нарушении структурно-функциональной целостности ГЭБ при вирусных менингитах.

Цель исследования – изучить влияние индукторов невровоспаления вирусного генеза на экспрессию NLRP3 и структурную целостность эндотелиальных клеток головного мозга *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Источником клеток служила кора головного мозга крыс линии Wistar возрастом 10 сут. Выделение церебральных эндотелиоцитов проводилось по модифицированному протоколу Y. Liu et al. (2013). Выделение мозга с удалением мозговых оболочек и крупных церебральных сосудов осуществлялось с помощью роллинга на асептической фильтровальной бумаге. Выделяли кору головного мозга и удаляли крупные сосуды в хо-

лодном растворе Хенкса (ПанЭко, Россия). Центрифугирование мелко нарезанной коры головного мозга проводили в пробирке объемом 15 мл в течение 3 мин при 150 g и комнатной температуре. Следующие этапы включали: 1) добавление к осадку в двухкратном объеме 25% FBS (Fetal Bovine Serum, HyClone, South America), тритурирование в количестве 25 раз пипеткой объемом 5 мл с последующим центрифугированием гомогената в течение 10 мин при 600 g при комнатной температуре; 2) забор самого нижнего слоя и перенос в новую коническую пробирку. Затем этапы тритурирования, центрифугирования повторяли три раза, после чего проводилась ферментативная обработка пеллета в двухкратном объеме (по отношению к объему пеллета) 0,1%-й коллагеназой II (ПанЭко, Россия) в течение 35 мин при +37 °С с периодическим перемешиванием. Умеренное ресуспензирование осадка с последующим центрифугированием осуществляли при 150 g в течение 5 мин, культивирование фрагментов и отдельных эндотелиальных клеток при +37 °С, 5% CO₂ в культуральных флаконах, предварительно покрытых желатином (Gelatin Solution 0,1%, Biological Industries, США) в культуральной среде: DMEM/F12 (HyClone, South America) + 20% FBS (HyClone, South America), 3 мг/мл глюкозы (Sigma Aldrich), 0,58 мг/мл глутамина (Sigma Aldrich), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина (HyClone, South America). Смена среды проводилась каждые 3 дня. При достижении 90% конfluence среды удаляли. Клетки во флаконе промывались дважды раствором Хенкса (ПанЭко, Россия) и обрабатывались раствором 0,25%-го трипсина и ЭДТА (Gibco, США).

Культивирование эндотелиоцитов осуществляли в культуральных 12-луночных планшетах в присутствии PolyI:C, 20 мкг/мл, 24 ч, в бессывороточной среде (Pan, 2012), а также в присутствии ликвора (100 мкл), полученного от пациентов с энтеровирусным менингитом. Ликвор был стандартизирован по концентрации белка методом Лоури. Концентрация белка составила 1 мкг/мл. В качестве контроля использовались эндотелиоциты, культивируемые в интактной среде.

Для измерения трансэндотелиального сопротивления эндотелиоциты культивировали на поликарбонатных мембранных фильтрах-вставках в 12-луночных планшетах (0,4 мкм – размер пор, вставка 12 мм, Transwell 3493, Costar, США). Через 24 и 72 ч культивирования производилась регистрация ТЭС с помощью эпителиального вольт-

метра EVOM2 с использованием электрода STX2 (World Precision Instruments, США). Экспрессию молекул NLRP3 оценивали с использованием двойного непрямого метода иммуоферментного окрашивания согласно протоколу производителя с использованием следующих антител: первичные антитела к NLRP3 в рабочем разведении 1 : 100 (Abcam, США, ab51952). В качестве вторичных антител использовались антитела, меченые Alexa Fluor 488 (Abcam, США, ab150117). Визуализация проводилась с помощью конфокальной лазерной микроскопии на микроскопе Olympus FV10i (Olympus, Япония).

Статистическая обработка. Использовались методы описательной статистики. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – ошибка среднего. Использовались методы непараметрической статистики. Для оценки межгрупповых различий значений трансэндотелиального сопротивления, имеющих непрерывное распределение, применяли критерий Краскела – Уоллиса с последующим парным сравнением групп с использованием критерия Манна – Уитни. Для оценки различий экспрессии NLRP3 эндотелиоцитами использовался критерий χ^2 . Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При измерении трансэндотелиального сопротивления через 24 ч культивирования эндотелиальных клеток с PolyI:C обнаружено статистически значимое снижение показателей сопротивления во всех группах по сравнению с контролем ($p < 0,01$). Также зарегистрировано статистически значимое снижение трансэндотелиального сопротивления при культивировании эндотелия в присутствии ликвора, полученного от пациента с вирусным менингитом, $p < 0,01$ (рис. 1).

В дальнейшем измерение ТЭС проводили через 72 ч. Установлено, что на 3-и сут происходило незначительное повышение ТЭС в культуре клеток с добавлением ликвора от пациента с вирусным менингитом, но статистически значимое уменьшение снижения ТЭС в культуре клеток с добавлением PolyI:C, $p < 0,01$ (рис. 2).

При регистрации экспрессии NLRP3 в культуре эндотелиальных клеток обнаружено статистически значимое увеличение экспрессии в опытных группах в сравнении с контролем, особенно это увеличение видно в группе вирусного ликвора, $p < 0,01$ (рис. 3).

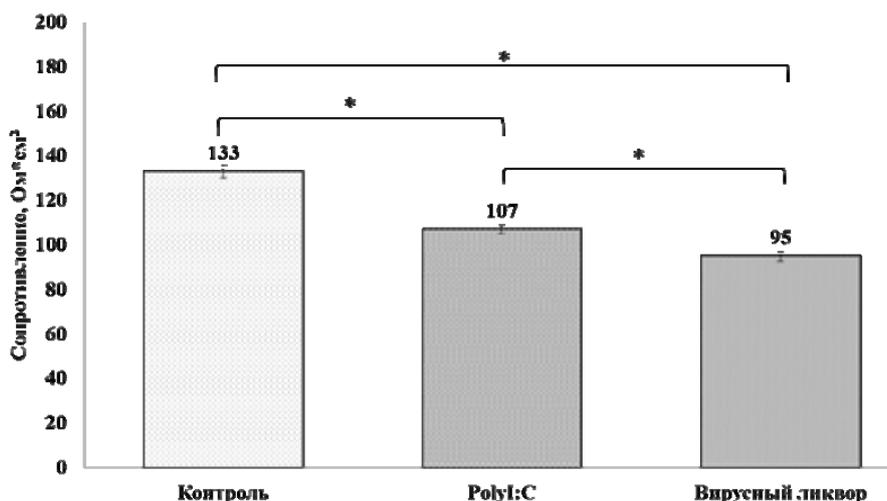


Рис. 1. Показатели трансэндотелиального сопротивления церебральных эндотелиоцитов при инкубации с PolyI:C, вирусным ликвором в течение 24 ч

* статистически значимые различия $p < 0,01$ (критерий Манна – Уитни).

Fig. 1. Measurements of transendothelial resistance of cerebral endotheliocytes during the incubation with PolyI:C, cerebrospinal fluid within 24 hours

* statistically significant differences $p < 0,01$ (Mann – Whitney test).

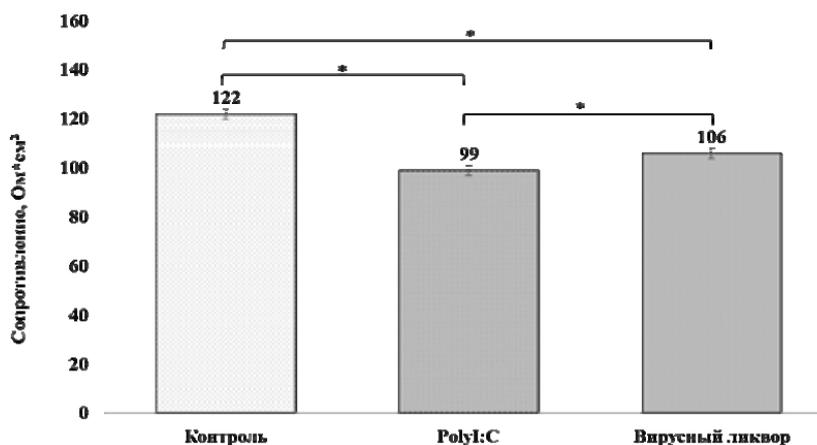


Рис. 2. Показатели трансэндотелиального сопротивления церебральных эндотелиоцитов при инкубации с PolyI:C, вирусным ликвором в течение 72 ч

* статистически значимые различия $p < 0,01$ (критерий Манна – Уитни).

Fig. 2. Measurements of transendothelial resistance of cerebral endotheliocytes during the incubation with PolyI:C, cerebrospinal fluid within 72 hours

* statistically significant differences $p < 0,01$ (Mann – Whitney test).

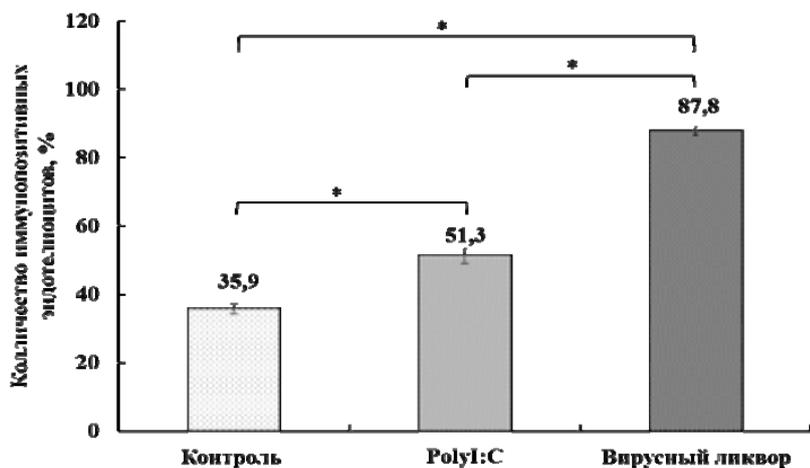


Рис. 3. Уровень экспрессии NLRP3 в церебральных эндотелиоцитах *in vitro*

* статистически значимые различия $p < 0,01$ (критерий χ^2).

Fig. 3. NLRP3 expression level in cerebral endotheliocytes *in vitro*

* statistically significant differences $p < 0,0$ (χ^2 test).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании показано, что при действии PolyI:C нарушается структурная целостность эндотелиального монослоя, что проявляется в уменьшении показателя трансэндотелиального сопротивления. Одновременно с этим увеличивается количество эндотелиоцитов, которые экспрессируют NLRP3. Отмечен более выраженный эффект влияния ликвора, полученного от пациентов с вирусным менингитом, по сравнению с PolyI:C.

Снижение трансэндотелиального сопротивления можно объяснить нарушением межэндотелиальных плотных контактов, сформированных белками окклюдинами, клаудинами и др. Ранее в работе L.Y. Huang et al. [12] показано, что при воздействии вирусов, а также PolyI:C наблюдается изменение экспрессии эндотелиальными клетками легких белков плотных контактов, снижается трансэндотелиальное сопротивление и увеличивается проницаемость монослоя пульмональных эндотелиоцитов. Учитывая, что плотные контакты играют особенную роль в формировании ГЭБ, изменения, вызванные вирусными патогенами или PolyI:C в церебральном эндотелии, могут носить более выраженный характер.

Разницу в выраженности изменений, которые преобладают в группе клеток, культивируемых с патологическим ликвором, можно объяснить следующим образом. Известно, что увеличение экспрессии инфламмасом *in vivo* происходит не только за счет эндотелиоцитов, но и астроцитов, нейронов, клеток микроглии [13, 14]. NLRP3, в свою очередь, приводит к увеличению синтеза ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО α , продуктов метаболизма арахидоновой кислоты. Таким образом, можно предположить, что более выраженное влияние ликвора связано с наличием в нем остатков вирусных частиц, провоспалительных цитокинов, которые оказывают свое провоспалительное и повреждающее действие.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что двухцепочечная РНК повреждает клетки эндотелия церебральных микрососудов и индуцирует формирование инфламмасом *in vitro*, и эти эффекты могут быть воспроизведены при действии спинномозговой жидкости, полученной от пациентов с острым вирусным менингитом.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о

вкладе авторов. Салмина А.Б. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, окончательное утверждение для публикации рукописи. Бойцова Е.Б. – выполнение практической части исследования, написание основного текста рукописи. Моргун А.В. – анализ и интерпретация данных, написание и проверка рукописи. Панина Ю.А. – выполнение практической части исследования. Горина Я.В. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Нода М. – анализ и интерпретация данных. Кутищева И.А. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Мартынова Г.П. – анализ и интерпретация данных, редактирование рукописи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в НИИ молекулярной медицины и патобиохимии при финансовой поддержке гранта РФФИ и ККФПНИНТД (проект № 16-44-243073, оценка повреждения барьера), гранта УМНИК (проект № 0020121, разработка и применение модели барьера).

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Исследование одобрено локальным этическим комитетом КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 66 от 15.12.2015 г.)

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sato-Kasai M., Kato T.A., Ohgidani M., Mizoguchi Y., Sagata N., Inamine S., Horikawa H., Hayakawa K., Shimokawa N., Kyuragi S., Seki Y., Monji A., Kanba S. Aripiprazole inhibits polyI:C-induced microglial activation possibly via TRPM7 // *Schizophrenia Research*. 2016; Sep 7. DOI: 10.1016/j.schres.2016.08.022.
2. Rajan J.V., Warren S.E., Miao E.A., Aderem A. Activation of the NLRP3 inflammasome by intracellular polyI:C // *FEBS Letters*. 2010; Nov. 19; 584 (22): 4627–4632. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.10.036.
3. Thomas P.G., Dash P., Aldridge J.R. Jr., Ellebedy A.H., Reynolds C., Funk A.J., Martin W.J., Lamkanfi M., Webby R.J., Boyd K.L., Doherty P.C., Kanneganti T.D. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1 // *Immunity*. 2009; Apr. 17; 30 (4): 566–575. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.02.006.
4. Levy R., Gerard L., Kummerle-Deschner J., Lachmann H.J., Kone-Paut I., Cantarini L., Woo P., Naselli A., Bader-Meunier B., Insalaco A., Al-Mayouf S.M., Ozen S., Hofer M., Frenkel J., Modesto C., Nikishina I., Schwarz T., Martino S., Meini A., Quartier P., Martini A., Ruper-ton N., Neven B., Gattorno M. Phenotypic and genotypic

- characteristics of cryopyrin-associated periodic syndrome: a series of 136 patients from the Eurofever Registry // *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2015; Nov. 74 (11): 2043–2049. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-204991.
5. Kanneganti T.D., Body-Malapel M., Amer A., Park J.H., Whitfield J., Franchi L., Taraporewala Z.F., Miller D., Patton J.T., Inohara N., Nunez G. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA // *The Journal of Biological Chemistry*. 2006; Dec. 1; 281 (48): 36560–36568. DOI: 10.1074/jbc.M607594200.
 6. Kanneganti T.D., Ozoren N., Body-Malapel M., Amer A., Park J.H., Franchi L., Whitfield J., Barchet W., Colonna M., Vandenabeele P., Bertin J., Coyle A., Grant E.P., Akira S., Nunez G. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3 // *Nature*. 2006; Mar. 9; 440 (7081): 233–236. DOI: 10.1038/nature04517.
 7. Kanneganti T.D., Body-Malapel M., Amer A., Park J.H., Whitfield J., Franchi L., Taraporewala Z.F., Miller D., Patton J.T., Inohara N., Nunez G. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA // *The Journal of Biological Chemistry*. 2006; Dec 1; 281 (48): 36560–36568. DOI: 10.1074/jbc.M607594200.
 8. Pan L.N., Zhu W., Li C., Xu X.L., Guo L.J., Lu Q. Toll-like receptor 3 agonist Poly I:C protects against simulated cerebral ischemia in vitro and in vivo // *Acta Pharmacologica Sinica*. 2012; Oct. 33 (10): 1246–1253. DOI: 10.1038/aps.2012.122.
 9. Hanamsagar R., Torres V., Kielian T. Inflammasome activation and IL-1beta/IL-18 processing are influenced by distinct pathways in microglia // *Journal of Neurochemistry*. 2011; Nov. 119 (4): 736–748. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07481.x.
 10. Koizumi Y., Toma C., Higa N., Nohara T., Nakasone N.; Suzuki T. Inflammasome activation via intracellular NLRs triggered by bacterial infection // *Cellular Microbiology*. 2012; Feb. 14 (2): 149–154. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2011.01707.x.
 11. Hoegen T., Tremel N., Klein M., Angele B., Wagner H., Kirschning C., Pfister H.W., Fontana A., Hammerschmidt S., Koedel U. The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md: 1950). 2011; Nov. 15; 187 (10): 5440–5451. DOI: 10.4049/jimmunol.1100790.
 12. Huang L.Y., Stuart C., Takeda K., D'Agnillo F., Golding B. Poly(I:C) Induces Human Lung Endothelial Barrier Dysfunction by Disrupting Tight Junction Expression of Claudin-5 // *PLoS One*. 2016; 11 (8): e0160875. DOI: 10.1371/journal.pone.0160875.
 13. Lammerding L., Slowik A., Johann S., Beyer C., Zendedel A. Poststroke Inflammasome Expression and Regulation in the Peri-Infarct Area by Gonadal Steroids after Transient Focal Ischemia in the Rat Brain // *Neuroendocrinology*. 2016; 103 (5): 460–475. DOI: 10.1159/000439435.
 14. Lu M., Sun X.L., Qiao C., Liu Y., Ding J.H., Hu G. Uncoupling protein 2 deficiency aggravates astrocytic endoplasmic reticulum stress and nod-like receptor protein 3 inflammasome activation // *Neurobiology of Aging*. 2014; Feb. 35 (2): 421–430.

Поступила в редакцию 10.05.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Салмина Алла Борисовна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Бойцова Елизавета Борисовна, аспирант, кафедра биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Моргун Андрей Васильевич, канд. мед. наук, ассистент, кафедра педиатрии ИПО, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Панина Юлия Анатольевна, канд. мед. наук, ассистент, кафедра биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Горина Яна Валерьевна, канд. фарм. наук, доцент, кафедра биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Писарева Наталья Валерьевна, канд. фарм. наук, доцент, кафедра биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Кутищева Ирина Александровна, канд. мед. наук, доцент, кафедра детских инфекционных болезней с курсом ПО, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

Нода Маами, доцент, лаборатория патофизиологии, факультет фармации, Университет Кюсю, г. Фукуока, Япония.

Мартынова Галина Петровна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой детских инфекционных болезней с курсом ПО, КГМУ имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого, г. Красноярск.

(✉) Бойцова Елизавета Борисовна, e-mail: elizaveta.boicova@mail.ru.

УДК 616.8.018.74-002-092.4

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-242-249

For citation: Salmina A.B., Boytsova E.B., Morgun A.V., Panina Yu.A., Gorina Ya.V., Pisareva N.V., Kutishcheva I.A., Noda M., Martynova G.P. Expression of cerebral endothelial NLRP3 inflammasome in viral inflammation *in vitro*. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 242–249.

Expression of cerebral endothelial NLRP3 inflammasome in viral inflammation *in vitro*

Salmina A.B.¹, Boytsova E.B.¹, Morgun A.V.¹, Panina Yu.A.¹, Gorina Ya.V.¹, Pisareva N.V.¹, Kutishcheva I.A.¹, Noda M.², Martynova G.P.¹

¹ Krasnoyarsk State Medical University (KSMU) named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky 1, Partizan Zheleznyak Str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

² Kyushu University 3-1-1, Maidashi Higashi-ku, Fukuoka, 812-8582, Japan

ABSTRACT

The goal is to study the effects of pro-inflammatory agents on the expression of NLRP3 and the structural integrity of cerebral microvessel endothelial cells *in vitro*.

Materials and methods. The study was conducted on a culture of cerebral endothelial cells. The cells were isolated from Wistar rat brains. Polyinosinic-polycytidylic acid (PolyI:C) – 20 µg / ml was added to cerebral microvessel endothelial cells. In another series of experiments, cells incubated with cerebrospinal fluid (CSF) obtained from patients with enteroviral meningitis (100 µl) were used as a comparison group. CSF was standardized for protein concentration by the Lowry method. The protein concentration was 1 µg / ml. As a control group, cerebral endothelial cells have been cultured in a standard medium. We used the culture insert for 12-well plates. After 24 and 72 h of culturing, we measured transendothelial electrical resistance (TEER) in the endothelial layer. Expression of NLRP3 inflammasomes was assessed with immunocytochemistry 24 hrs from the beginning of cell culture. We used double indirect immunoenzymatic staining method according to the manufacturer's protocol. Primary antibodies to NLRP3 (Abcam, USA, ab51952) in 1: 100 dilution, secondary antibodies labeled with Alexa Fluor 488 (Abcam, USA, ab150117) in dilution 1: 200 have been applied. Visualization was performed by confocal laser microscopy microscope Olympus FV10i (Olympus, Japan).

Results. TEER decreased in PolyI:C and CSF-treated cells after 24 hr from the beginning of incubation. After 72 hours, TEER was significantly lower in these groups compare to the control one. NLRP3 expression was maximal in the cells treated with CSF. After incubation of the cells with PolyI:C, NLRP3 expression in cerebral endothelial cells was elevated compare to the control group, but did not reached the level seen in CSF-treated cells.

Conclusion. PolyI:C and CSF obtained from the patients with viral meningitis induce disruption of cerebral microvessels endothelial layer integrity with the corresponding rise in NLRP3 expression in the cells, thereby suggesting mechanism of blood-brain barrier impairment in neuroinfection.

Key words: blood-brain barrier, transendothelial resistance, inflammation, viral meningitis, endothelial cells.

Received May 10.2017
Accepted November 08.2017

Salmina Alla B., DM, Professor, Head of the Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Head of the Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Boytsova Elizaveta B., Postgraduate Student, Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Morgun Andrej V., PhD, Assistant, Department of Pediatrics, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Panina Yuliya A., PhD, Assistant, Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Gorina Yana V., PhD, Associate Professor, Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Pisareva Natalya V., PhD, Associate Professor, Department of Biological Chemistry with Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Kutishcheva Irina A., PhD, Associate Professor, Department of Pediatric Infectious Diseases, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Mami Noda, PhD, Laboratory of Pathophysiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

Martynova Galina P., DM, Professor, Head of the Department Pediatric Infectious Diseases, KSMU named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russian Federation.

(✉) **Boytsova Elizaveta B.**, e-mail: elizaveta.boicova@mail.ru.

УДК 618.19-018-006-097:575.222.78:575.117.2

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-250-259

Для цитирования: Цыганов М.М., Дерюшева И.В., Гарбуков Е.Ю., Ибрагимова М.К., Казанцева П.В., Бычков В.А., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В. Явление потери гетерозиготности в опухолевой ткани молочной железы: связь с экспрессией генов монорезистентности. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 250–259.

Явление потери гетерозиготности в опухолевой ткани молочной железы: связь с экспрессией генов монорезистентности

Цыганов М.М.¹, Дерюшева И.В.¹, Гарбуков Е.Ю.¹, Ибрагимова М.К.^{1,2},
Казанцева П.В.¹, Бычков В.А.¹, Слонимская Е.М.^{1,3}, Литвяков Н.В.^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт (НИИ) онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (ТНИМЦ) Российской академии наук (РАН)
Россия, 634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5

² Национальный исследовательский Томский государственный университет (НИ ТГУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36

³ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Цель исследования. Широкогеномное исследование связи потери гетерозиготности (loss of heterozygote, LOH) в опухоли молочной железы с экспрессией генов монорезистентности при проведении неоадьювантной химиотерапии (НХТ).

Материал и методы. В исследование включены 68 больных раком молочной железы РМЖ IIА–IIIВ стадий. РНК выделяли из опухолевого материала до и после лечения с помощью набора RNeasy mini kit Plus. Уровень экспрессии исследуемых генов (*RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *BRCA1*) оценивали при помощи RT-qPCR. ДНК выделяли из 68 биопсийных образцов опухолевой ткани с помощью набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Германия). Для оценки статуса LOH проведен микроматричный анализ на ДНК-чипах высокой плотности фирмы Affymetrix CytoScan™ HD Array.

Результаты. В исследовании потеря гетерозиготности оценена у 13 815 генов. Частота LOH составила 0–63%. Наибольшая частота встречаемости явления потери гетерозиготности характерна для генов хромосом 16, 17 и X-хромосомы. Установлено, что наличие явления LOH в генах монорезистентности (*BRCA1*, *ERCC1*, *RRM1*, *TOP1*, *TOP2A*, *TUBB3* и *TYMS*) не сопряжено с их уровнем экспрессии в опухоли. Отмечено 54 гена, LOH в которых статистически значимо ассоциирована с уровнем экспрессии исследуемых генов. Среди них следует отметить гены, кодирующие miRNA и «цинковые пальцы», участвующие в регуляции транскрипции многих генов, трансмембранные транспортеры лекарственных препаратов и ионные каналы, гены MAP-киназного сигнального пути и др.

Заключение. Результаты, полученные в данном исследовании, могут более точно определить экспрессионный портрет в опухоли генов монорезистентности, указать на новые кандидатные гены, участвующие в регуляции экспрессии этих генов. Оценка потери гетерозиготности в опухолевой ткани может быть использована в качестве дополнительного критерия для персонализации назначения химиотерапии.

Ключевые слова: потеря гетерозиготности, рак молочной железы, гены монорезистентности, микроматричные исследования.

✉ Цыганов Матвей Михайлович, e-mail: TsyganovMM@yandex.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что одним из факторов, определяющим на индивидуальном уровне вариабельность опухоли, в том числе и опухоли молочной железы, является нормальная генетическая изменчивость, обусловленная генным полиморфизмом (single nucleotide polymorphism, SNP). Для SNP в опухолевой ткани характерно так называемое явление аллельного имбаланса (АИ) и его частный случай – потеря гетерозиготности (loss of heterozygote, LOH), при котором происходит потеря (структурная или функциональная) одного из аллелей гетерозиготного генотипа и уменьшение детектируемых частот гетерозиготных генотипов по сравнению с геномной ДНК. Аллельный имбаланс может быть результатом аллельных делеций (потери одной из копий данного локуса), дупликации, амплификации одного из аллелей. В результате чего только один аллельный вариант SNP определяется в опухоли [1].

Впервые явление LOH в опухоли было описано А. Knudson в 1971 г. Согласно данной двухударной модели канцерогенеза предполагалось, что для инактивации генов-супрессоров необходимо два последовательных мутационных события – утрата одного аллеля в результате LOH и соматические мутации либо метилирование в другом аллеле. Утрата аллеля дает возможность проявления фатальных рецессивных мутаций в оставшемся аллеле [2]. Кроме этого, LOH может приводить к активации онкогенов и инактивации опухолевых генов-супрессоров, которые могут в свою очередь приводить к неконтролируемому росту клеток и метастазированию [3, 4].

В настоящее время LOH хорошо изучена и показана для многих генов в различных локализациях опухолевого процесса. Предполагается, что биологический смысл LOH применительно к канцерогенезу связан с инактивацией гетерозиготных локусов патогенетически значимых генов, в результате чего может происходить прогрессирование и (или) метастазирование опухоли [5–7]. Что касается рака молочной железы, то основным направлением исследований является изучение LOH в таких биомаркерах, как *ERBB2* (*HER2*) [8], *BRCA1* и *BRCA2* [9, 10].

В крупной работе на предмет аллельного имбаланса и LOH при РМЖ авторами были исследованы такие гены, как *EGFR*, *TERT*, *TP53*, *CASP8*, *PARP2*, *GATA3*, и *BRCA1* [11]. В 2012 г. в исследовании N.J. Virkбак продемонстрировано, что потеря гетерозиготности в теломерных участках хромосом опухолевых клеток молочной железы

и яичника является хорошим прогностическим маркером для данных злокачественных новообразований [12]. Таким образом, большинство исследований потери гетерозиготности в опухоли молочной железы сосредоточено на изучении данного феномена в рамках одного или нескольких генов, и, как правило, связано с процессом малигнизации [13]. При этом LOH практически не изучалась в широкогеномном формате.

Целью данной работы явилось широкогеномное исследование связи потери гетерозиготности в опухоли молочной железы с экспрессией генов монорезистентности, определяющих чувствительность опухоли к отдельным препаратам. В частности, изучена экспрессия генов *BRCA1*, *ERCC1*, *RRM1*, *TOP1*, *TOP2A*, *TUBB3* и *TYMS*, которые определяют чувствительность опухоли к препаратам платины (*BRCA1* и *ERCC1*), гемзару (*RRM1*), иринотекану (*TOP1*), доксорубицину (*TOP2a*), таксанаму (*TUBB3*) и капецитабину (*TYMS*) [14].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 68 больных РМЖ IIА–IIIВ стадий с морфологически верифицированным диагнозом в возрасте 28–68 лет, в среднем ($53,43 \pm 0,78$) года ($M \pm SE$) (табл. 1). В соответствии с Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast (April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania) [15] все больные получали 2–4 курса неoadъювантной химиотерапии по схемам FAC (фторурацил, доксорубицин, циклофосфан), САХ (циклофосфан, доксорубицин, кселода) или монотерапию таксотером. Через 3–5 нед после НХТ проводилась операция, затем больным проводили два курса адъювантной химиотерапии по схеме FAC, а лучевая терапия и (или) гормональное лечение назначались по показаниям. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (исправленной в 1975 и 1983 гг.). Были использованы биопсийные опухолевые образцы (~10 мм³), взятые до лечения под контролем УЗИ и после НХТ. Образцы опухоли помещали в раствор RNAlater (Ambion, США) и сохраняли при температуре –80 °С (после 24-часовой инкубации при 4 °С) для дальнейшего выделения РНК и ДНК.

Выделение РНК. Тотальную РНК выделяли из 68 образцов опухоли до лечения с помощью набора RNeasy mini kit Plus, содержащего ДНК-азу I (Qiagen, Германия), с добавлением в раствор РНК ингибитора РНК-аз Ribolock (Fermentas, Lithuania).

Концентрацию и чистоту выделения РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, США) (125–210 нг/мкл, $A_{260/A280} = 1,85–1,95$; $A_{260/A230} = 1,80–2,00$). RIN составил 6,6–8,0. Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAid™ (Fermentas, Lithuania) со случайными гексануклеотидами.

Т а б л и ц а 1

Клинико-патологические параметры обследованных больных РМЖ		
Клинико-патологический параметр		Число больных, абс. (%)
Возраст (лет)	≤45	21 (30,9)
	>45	47 (69,1)
Менструальный статус	Пременопауза	36 (52,9)
	Постменопауза	32 (47,1)
Гистологический тип	Инвазивный протоковый рак	58 (85,3)
	Инвазивный дольковый рак	3 (4,4)
	Медулярный рак	2 (2,9)
	Другие типы	5 (7,4)
Размер опухоли	T ₁	9 (13,2)
	T ₂	52 (76,5)
	T ₃	3 (4,4)
	T ₄	4 (5,9)
Лимфогенное метастазирование	N ₀	27 (39,7)
	N ₁	31 (45,6)
	N ₂	4 (5,9)
	N ₃	6 (8,8)
Рецепторы эстрогена	+	33 (48,5)
	–	31 (42,6)
	Нет данных	4 (5,9)
Рецепторы прогестерона	+	35 (51,5)
	–	29 (42,26)
	Нет данных	4 (5,9)
Рецепторы эпидермального фактора роста HER2	0/+	47 (69,1)
	++	10 (14,7)
	+++	6 (8,8)
	Нет данных	5 (7,4)
Молекулярный подтип	Люминальный В	40 (59,7)
	Трижды негативный	17 (25,4)
	HER2-позитивный	10 (14,9)
Гистологическая форма	Уницентрическая	45 (66,2)
	Мультицентрическая	23 (33,8)
Схема НХТ	САХ	21 (30,9)
	ФАС	33 (48,5)
	Таксотер	14 (20,6)
Ответ на НХТ	Частичная регрессия	39 (57,4)
	Стабилизация	18 (26,5)
	Прогрессирование	11 (16,2)

Количественная ПЦР. Уровень экспрессии генов монорезистентности: *BRCA1*, *ERCC1*, *RRM1*, *TOP1*, *TOP2A*, *TUBB3* и *TYMS* оцени-

вали при помощи обратно-транскриптазной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) с праймерами и зондами по технологии TaqMan на амплификаторе Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Австралия). ПЦР ставилась в трех репликах в объеме 15 мкл, содержащем 250 мкМ dNTPs (Sibenzyme, Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров, 200 нМ зонда, 2,5 мМ MgCl₂, 19 SE buffer (67 мМ Tris-HCl, pH 8,8 при 25 °С, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20), 2,5 ед HotStart Taq polymerase (Sibenzyme, Россия) и 50 нг кДНК. Двухшаговая программа амплификации включала один цикл – 94 °С, 10 мин – предварительная денатурация; 40 циклов – 1-й шаг 94 °С, 10 с и 2-й шаг 20 с – при температуре 60 °С. Праймеры и зонды (FAM-BHQ1) представлены в табл. 1 статьи Е.А. Юмова и соавт. [16]. В качестве гена-рефери использовался ген «домашнего хозяйства» фермента *GAPDH* (glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase), уровень экспрессии каждого целевого гена нормализовался по отношению к экспрессии гена-рефери. Относительная экспрессия генов монорезистентности оценивалась с помощью метода Pfaffl [17]. В качестве калибратора использовалась пулированная от 10 пациентов РНК, выделенная из нормальной ткани молочной железы во время операции у больных, которым не проводилась НХТ.

Выделение ДНК. ДНК выделяли из 68 биопсийных образцов опухолевой ткани с помощью набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Германия). Концентрацию ДНК и чистоту выделения оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) (50–150 нг/мкл, $A_{260/A280} = 2,10–2,35$; $A_{260/A230} = 2,15–2,40$). Целостность ДНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, США), фрагменты ДНК имели массу более 48 kb.

Микроматричный анализ. Микроматричный анализ проводили на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности фирмы Affymetrix CytoScan™ HD Array (США), которые содержат 2 млн 670 тыс. маркеров – 1 млн 900 тыс. неполиморфных маркеров для анализа аберраций числа копий (CNA) и более 750 тыс. однонуклеотидных полиморфизмов. Наличие полиморфных маркеров на микроматрице позволяет также определить участки с потерей гетерозиготности у 13 815 генов. Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, USA). Для обработки результатов микрочипирования

использовали программу Chromosome Analysis Suite 3.1 (Affymetrix, USA), которая разработана специально для анализа результатов чипирования на матрице CytoScan™ HD Array.

Поиск участков потери гетерозиготности осу-

ществлялся автоматически с помощью программного обеспечения. В результате идентифицировалось три вида LOH: герминальные (рис. 1, *a*), LOH обусловленные делециями (рис. 1, *b*) и мозаичные участки LOH (рис. 1, *c*).

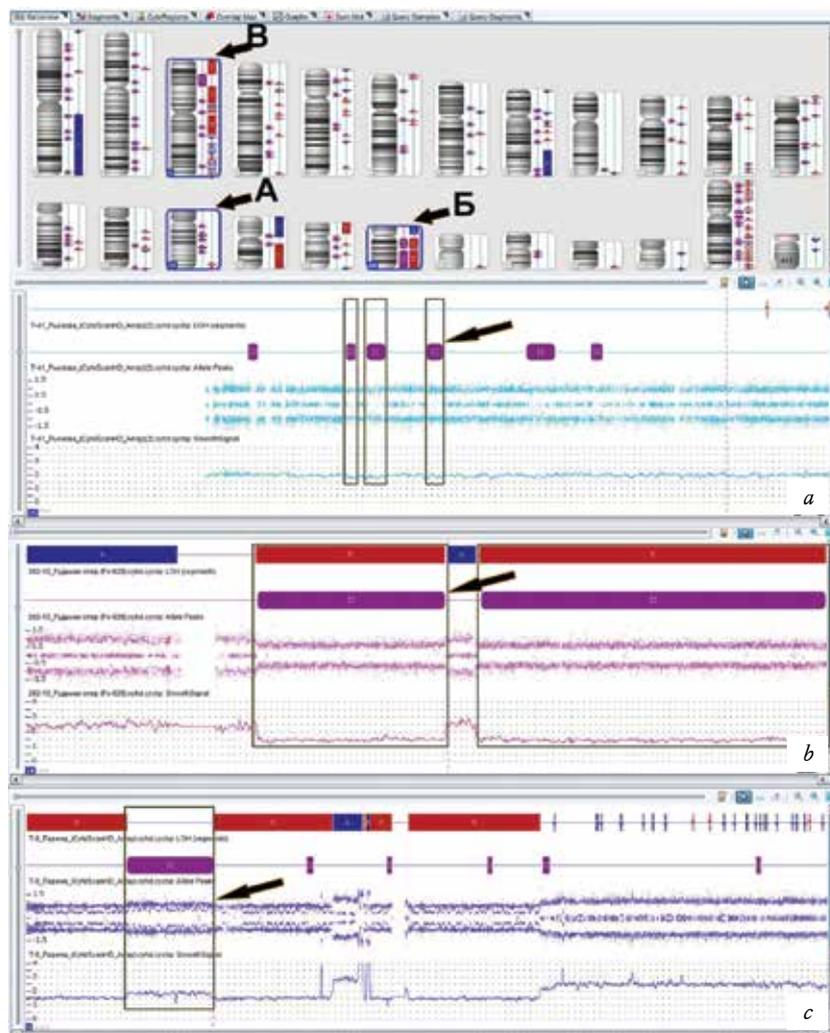


Рис. 1. Участки потери гетерозиготности (показаны стрелками), определяемые программой Chromosome Analysis Suite 3.1: *a* – пример герминальной потери гетерозиготности, фиолетовыми прямоугольниками показаны участки LOH; *b* – пример LOH, обусловленные делециями, красными прямоугольниками обозначены участки делеций и соответствующие им участки потери гетерозиготности; *c* – пример мозаичной LOH

Fig. 1. Areas of heterozygosity loss determined by “Chromosome Analysis Suite 3.1” program (shown by arrows): *a* – is an example of a germinal loss of heterozygosity; purple rectangles show LOH sites; *b* – is an example of LOH caused by deletions, red rectangles denote deletion areas and their corresponding sites of loss of heterozygosity; *c* – is an example of a mosaic LOH

Статистические методы. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий Вилкоксона – Манна – Уитни. Различия между исследуемыми группами считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Для

анализа общей и безметастатической выживаемости использовались кривые выживаемости, построенные по методу Каплана – Майера [18]. Сравнение достоверности различий между группами производилось с помощью log-rank теста. Сравнение частот по качественным данным анализировали при помощи двухстороннего критерия Фишера (<http://vassarstats.net/odds2x2.html>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Всего на предмет потери гетерозиготности было оценено 13 815 генов. Частота LOH составила 0–63%, (см. рис. 1). Из рис. 2 видно, что наибольшая частота встречаемости явления потери гетерозиготности характерна для хро-

мосом 16, 17 и X-хромосомы. Стоит отметить, что для данных хромосом явление потери гетерозиготности в основном обусловлено наличием делеций. Согласно литературным данным, наибольшая частота делеций в опухоли молочной железы характерна для хромосом 1q, 8p, 8q, 11q, 16q, 17p [19, 20].

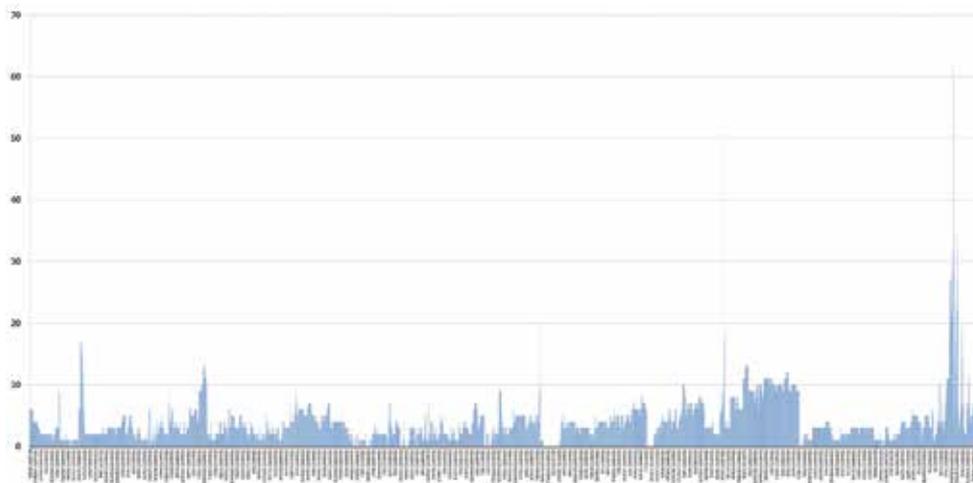


Рис. 2. Частота встречаемости LOH в исследуемых генах по локализации в хромосомах: по оси ординат – частота LOH, %; по оси абсцисс – гены, в которых исследована потеря гетерозиготности

Fig. 2. Frequency of occurrence of LOH in the studied genes by localization in chromosomes: Y – axis shows the LOH frequency, %; X – axis shows the genes in which the heterozygosity loss was investigated

Наибольшая частота LOH (30–60%) наблюдалась в генах *ZNF267*, *PAGE3*, *MAGEH1*, *RRAGB*, *KLF8*, *UBQLN2*, *SPIN2B*, *SPIN2A*, *FAAH2*, *ZXDB*, *ZXDA*, *ARHGEF9*, *FAM123B*, *MSN*, *MIR223*, *VSIG4*, *HEPH*, *EDA2R*, *AR*, *SLC16A2*, *RLIM*, *KIAA2022*, *ABCB7*, *UPRT*, *ZDHHC15*, *MAGEE2*, *MAGEE1*. Поскольку именно потеря одного из аллелей гетерозиготного локуса в таких известных генах-супрессорах, как *TP53*, *RB1*, *BRCA1*, *CDKN1A*, *CDKN1B* и др., сопряжена с повышенным риском развития опухолей различных локализаций [10, 21], то, возможно, имеет смысл проверить значение идентифицированных генов как генов-супрессоров опухолевого

роста. В хромосомах 6, 7, 11 и 14 есть обширные участки, в которых LOH не наблюдалась ни в одном из 68 обследованных случаев. Из 13 815 генов OMIM (PubMed) LOH не встречалась у 873 генов.

В первую очередь оценивалось влияние LOH в самих генах монорезистентности на их начальный уровень экспрессии, а также частоту встречаемости явления потери гетерозиготности (табл. 2). Установлено, что в исследуемых генах монорезистентности частота LOH варьировала 1,5–36,8%. При этом связи с экспрессией не обнаружено, что согласуется с результатами, полученными другими авторами.

Т а б л и ц а 2

Связь начального уровня экспрессии генов монорезистентности с потерей гетерозиготности					
Ген	Экспрессия ($M \pm SE$)		p	Частота, абс. (%)	
	Больные с LOH гена	Нормальное состояние гена		Больные с LOH гена	Нормальное состояние гена
BRCA1	0,803±0,201	0,661±0,091	0,412	13 (19,1)	55 (80,9)
ERCC1	1,058±0,858	0,862±0,13	0,590	3 (4,4)	65 (95,6)
RRM1	0,396±0,085	0,541±0,124	0,704	5 (7,4)	63 (92,6)
TOP1	0,359±0,091	0,575±0,201	0,340	5 (7,4)	63 (92,6)
TOP2A	7,303±1,691	9,928±2,63	0,953	25 (36,8)	43 (63,2)
TUBB3	3,023±0,838	4,463±0,601	0,418	10 (14,7)	58 (85,3)
TYMS	5,835±0,00	1,612±0,185	1,000	1 (1,5)	67 (98,5)

$M \pm SE$ – среднее значение ± ошибка средней

Так, показано, что мутации и LOH в гене *BRCA1* сопряжены с риском развития многих злокачественных новообразований [22], но при этом не коррелируют с экспрессией данного гена [23]. Для другого гена репарации ДНК *ERCC1* также было установлено, что наличие в данном гене метилированного промотора, мутаций, LOH и подобных нарушений может иметь важное значение для развития трипл-негативного рака молочной железы [24]. Еще один интересный результат получен для генов группы топоизомераз. Наличие LOH в *TOP1* сопряжено с низ-

ким начальным уровнем экспрессии гена *TOP2A* ($p = 0,008$), что можно объяснить взаимной корреляцией и взаимодействием двух данных генов (<http://www.genecards.org/>; <http://string-db.org/>).

Далее пациентов разделили на равные группы с экспрессией гена больше или меньше медианы и сравнили частоты встречаемости LOH всех 13 815 генов в данных группах при помощи двухстороннего критерия Фишера. В табл. 3 представлено значение медианы экспрессии для каждого гена до лечения и после НХТ.

Т а б л и ц а 3

Медиана экспрессии генов монорезистентности в опухоли молочной железы до проведения неоадьювантной химиотерапии			
Ген	Название	Локализация	Медиана экспрессии
<i>BRCA1</i>	Breast Cancer 1	17q21.31	0,55
<i>RRM1</i>	Ribonucleotide Reductase Catalytic Subunit M1	11p15.4	0,33
<i>ERCC1</i>	Excision Repair Cross-Complementation Group 1	19q13.32	0,54
<i>TOP1</i>	Topoisomerase (DNA) I	20q12	0,20
<i>Top2A</i>	Topoisomerase (DNA) II Alpha	17q21.2	3,69
<i>TYMS</i>	Thymidylate Synthetase	18p11.32	1,10
<i>TUBB3</i>	Tubulin Beta 3 Class III	16q24.3	3,36

В результате проведенного анализа установлено 54 гена, наличие потери гетерозиготности в которых статистически связано с начальным уровнем экспрессии исследуемых генов (табл. 4). При этом показано, что наличие LOH в данных генах опухоли молочной железы сопряжено с повышенным и со сниженным уровнем экспрессии генов монорезистентности. По литературным данным только для некоторых генов можно проследить связь с изучаемыми генами монорезистентности. Два гена *SPIN2B* и *SPIN2A* участву-

ют в регуляции клеточного цикла, связанного с ингибированием апоптоза [25], и сопряжены с экспрессией двух генов репарации ДНК *ERCC1* и *BRCA1*. Также транскрипционные факторы из группы генов «цинковые пальцы» (Zinc Finger): *ZXDA*, *ZXDB*, *ZNF469*, *ZFPM1*, участвующих в регуляции транскрипции многих генов [26].

Для гена *SCN4A* в базе данных GeneCards показано, что данный ген кодирует тетродотоксин-резистентный натриевый канал, локализуемый на мембране клетки.

Т а б л и ц а 4

Связь LOH с начальным уровнем экспрессии генов монорезистентности	
Ген	Гены, явление LOH в которых сопряжено с уровнем экспрессии генов монорезистентности
<i>BRCA1</i>	<i>PFKFB1</i> (↑), <i>PAGE3</i> (↑), <i>SPIN2B</i> (↑), <i>SPIN2A</i> (↑), <i>ZXDB</i> (↑), <i>ZXDA</i> (↑) - (<i>Xp11.21</i>)
<i>RRM1</i>	<i>NUP88</i> (↑) - (<i>17p13.2</i>), <i>EFNB1</i> (↑) - (<i>Xq13.1</i>)
<i>ERCC1</i>	<i>P2RY10</i> (↑) - (<i>Xq21.1</i>)
<i>TOP1</i>	<i>PAGE1</i> (↓), <i>PAGE4</i> (↓), <i>CLCN5</i> (↓) - (<i>Xp11.23</i>), <i>DGKK</i> (↓), <i>SHROOM4</i> (↓), <i>BMP15</i> (↓) - (<i>Xp11.22</i>)
<i>TOP2A</i>	<i>FBXO31</i> (↓), <i>MAP1LC3B</i> (↓), <i>JPH3</i> (↓), <i>SLC7A5</i> (↓), <i>CA5A</i> (↓), <i>BANP</i> (↓), <i>ZNF469</i> (↓), <i>ZFPM1</i> (↓), <i>IL17C</i> (↓), <i>CYBA</i> (↓), <i>MVD</i> (↓), <i>SNAI3</i> (↓) - (<i>16q24.2</i>); <i>DCAF7</i> (↓), <i>TACO1</i> (↓), <i>MAP3K3</i> (↓), <i>STRADA</i> (↓), <i>DDX42</i> (↓), <i>PSMC5</i> (↓), <i>SMARCD2</i> (↓), <i>TCAM1P</i> (↓), <i>CSH2</i> (↓), <i>GH2</i> (↓), <i>CSH1</i> (↓), <i>CSHL1</i> (↓), <i>GH1</i> (↓), <i>CD79B</i> (↓), <i>SCN4A</i> (↓), <i>ICAM2</i> (↓), <i>ERN1</i> (↓), <i>PECAM1</i> (↓), <i>POLG2</i> (↓), <i>DDX5</i> (↓) - (<i>17q23.3</i>), <i>SMURF2</i> (↓), <i>GNAI3</i> (↓), <i>RGS9</i> (↓), <i>AXIN2</i> (↓) - (<i>17q24.1</i>)
<i>TYMS</i>	<i>HEPH</i> (↓) - (<i>Xq12</i>)
<i>TUBB3</i>	<i>GATA1</i> (↓) - (<i>Xp11.23</i>), <i>EDA2R</i> (↓) - (<i>Xq12</i>)

П р и м е ч а н и е. Для всех представленных генов показана статистическая значимая связь с уровнем экспрессии генов монорезистентности. Уровень значимости находится в пределах $0,05 < p < 0,005$. Жирным шрифтом выделена локализация генов в хромосоме. Рядом с генами стрелками указана сопряженность LOH с повышенным (↑) или сниженным уровнем (↓) экспрессии гена монорезистентности.

В недавней публикации показана роль генов семейства SCN в индуцированной химиотерапии гастро-интестинальной токсичности [27]. Кроме этого, наличие LOH в гене *SLC7A5* (solute carrier family) сопряжено с уровнем экспрессии гена *TOP2A*. При этом во многих исследованиях показана важная роль данного гена, в том числе и физиологическая, в транспорте веществ и лекарственных препаратов [28]. Другое исследование продемонстрировало, что наличие нарушений в *SLC7A5* связано с поступлением лекарственных препаратов внутрь клетки, и как следствие они могут влиять на формирование чувствительности и химиорезистентности [29].

Таким образом, была показана связь наличия потери гетерозиготности в 54 генах с уровнем экспрессии генов химиочувствительности у больных РМЖ, и это в дальнейшем может быть использовано как маркер прогноза химиочувствительности опухолевых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало наличие явления потери гетерозиготности в опухоли молочной железы. Установлено явление LOH для всех исследуемых генов монорезистентности. Но при этом показано отсутствие его влияния на их экспрессию, что можно объяснить низкой частотой встречаемости LOH на локусах хромосом, где локализованы данные гены. При помощи микроматричного исследования показано влияние потери гетерозиготности в других генах на экспрессию генов монорезистентности. Всего установлено 54 гена, LOH в которых сопряжена с повышенным или сниженным уровнем экспрессии генов монорезистентности. Среди них следует отметить гены, кодирующие miRNA и «цинковые пальцы», участвующие в регуляции транскрипции многих генов, трансмембранные транспортеры лекарственных препаратов и ионные каналы, гены MAP-киназного сигнального пути и т.д.

Поскольку все гены монорезистентности определяют эффективность определенных химиопрепаратов, то результаты, полученные в данном исследовании, могут более точно определить экспрессионный портрет исследуемых генов, указать на новые кандидатные гены, участвующие в регуляции экспрессии генов монорезистентности. Кроме этого, оценка потери гетерозиготности в опухолевой ткани может быть использована в качестве дополнительного критерия для персонализации назначения как неоадьювантной, так и адьювантной химиотерапии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают информацию о вкладе. Цыганов М.М. – разработка концепции и дизайна статьи. Дерюшева И.В. – проведение лабораторного исследования. Гарбуков Е.Ю. – проверка критически важного интеллектуального содержания. Ибрагимов М.К., Бычков В.А. – анализ и интерпретация экспериментальных данных. Казанцева П.В. – анализ и интерпретация клинических данных. Слонимская Е.М., Литвяков Н.В. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФ № 17-15-01203 «Метастатические клоны опухоли молочной железы».

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Проведенная работа соответствует этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. От лиц, участвующих в исследовании, получено информированное согласие. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН (протокол № 1 от 14.01.2013 г.).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer // *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2006; 12: 192–198.
2. Knudson A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1971; 68: 820–823.
3. Chen Y., Chen C. DNA copy number variation and loss of heterozygosity in relation to recurrence of and survival from head and neck squamous cell carcinoma: a review // *Head & Neck*. 2008; 30: 1361–1383.
4. Silva J.M., Silva J., Sanchez A., Garcia J.M., Dominguez G., Provencio M., Sanfrutos L., Jareco E., Colas A., Espaca P. Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast can-

- cer patients is a valuable predictor of disease-free survival // *Clinical Cancer Research*. 2002; 8: 3761–3766.
5. Ha G., Roth A., Khattra J., Ho J., Yap D., Prentice L.M., Melnyk N., McPherson A., Bashashati A., Laks E. TITAN: inference of copy number architectures in clonal cell populations from tumor whole-genome sequence data // *Genome Research*. 2014; 24: 1881–1893.
 6. Fleming J.L., Dworkin A.M., Allain D.C., Fernandez S., Wei L., Peters S.B., Iwenofu O.H., Ridd K., Bastian B.C., Toland A.E. Allele-specific imbalance mapping identifies HDAC9 as a candidate gene for cutaneous squamous cell carcinoma // *International Journal of Cancer*. 2014; 134: 244–248.
 7. Shikeeva A., Kekeeva T., Zavalishina L., Andreeva I., Frank G. Allelic imbalance in patients with non-small cell lung cancer // *Архив Патологии*. 2012; 75: 3–8.
 8. Staaf J., Jonsson G., Ringnér M., Baldetorp B., Borg A. Landscape of somatic allelic imbalances and copy number alterations in HER2-amplified breast cancer // *Breast Cancer Res*. 2011; 13: 129.
 9. Timms K.M., Abkevich V., Hughes E., Neff C., Reid J., Morris B., Kalva S., Potter J., Tran T.V., Chen J. Association of BRCA1/2 defects with genomic scores predictive of DNA damage repair deficiency among breast cancer subtypes // *Breast Cancer Research*. 2014; 16: 475.
 10. Shen J., Medico L., Zhao H. Allelic imbalance in BRCA1 and BRCA2 gene expression and familial ovarian cancer // *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2011; 20: 50–56.
 11. Kotoula V., Zagouri F., Timotheadou E., Alexopoulou Z., Wirtz R., Lyberopoulou A., Lakis S., Gogas H., Charalambous E., Pentheroudakis G. The clinical relevance of genomic characteristics in luminal A and B breast cancer (BC) // *Annals of Oncology*. 2014; 25: iv87–iv87.
 12. Birkbak N.J., Wang Z.C., Kim J.-Y., Eklund A.C., Li Q., Tian R., Bowman-Colin C., Li Y., Greene-Colozzi A., Iglehart J.D. Telomeric allelic imbalance indicates defective DNA repair and sensitivity to DNA-damaging agents // *Cancer Discovery*. 2012; 2: 366–375.
 13. Rosenberg C.L. Allele imbalance or loss of heterozygosity, in normal appearing breast epithelium as a novel biomarker to predict future breast cancer, 2011, DTIC Document.
 14. Цыганов М.М., Родионов Е.О., Миллер С.В., Литвяков Н.В. Обоснование использования экспрессионных маркёров для персонализации химиотерапии рака лёгкого // *Антибиотики и химиотерапия*. 2015; 60: 38–45.
 - Tsyganov M.M., Rodionov E.O., Miller S.V., Litvyakov N.V. Obosnovaniye ispol'zovaniya ekspressionnykh markorov dlya personalizatsii khimioterapii raka logkogo [Substantiation of Expressive Markers Use to Personalize Lung Cancer Chemotherapy] // *Antibiotiki i khimioterapiya – Antibiotics and Chemotherapy*. 2015; 60: 38–45 (in Russian).
 15. Schwartz G.F., Hortobagyi G.N. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania // *The Breast Journal*. 2004; 10: 273–294.
 16. Юмов Е.А., Цыганов М.М., Литвяков Н.В., Полищук Т.В., Миллер С.В., Родионов Е.О., Тузиков С.А. Экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости и монорезистентности при немелкоклеточном раке легкого // *Сибирский онкологический журнал*. 2013; 61: 16–22.
 - Yumov E.L., Tsyganov M.M., Litviakov N.V., Polishchuk T.V., Miller S.V., Rodionov E.O., Tuzikov S.A. Ekspressiya genov mnozhestvennoy lekarstvennoy ustoychivosti i monorezistentnosti pri nemelkokletochnom rake legkogo [Expression of MDR-genes and monoresistance genes in non-small-cell lung cancer] // *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal – Siberian Journal of Oncology*. 2013; 61: 16–22 (in Russian).
 17. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR // *Nucleic Acids Research*. 2001; 29: e45–e45.
 18. Kaplan E.L., Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations // *Journal of the American Statistical Association*. 1958; 53: 457–481.
 19. Litviakov N.V., Cherdyntseva N.V., Tsyganov M.M., Slonimskaya E.M., Ibragimova M.K., Kazantseva P.V., Kzhyshkowska J., Choinzonov E.L. Deletions of multi-drug resistance gene loci in breast cancer leads to the down-regulation of its expression and predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy // *Oncotarget*. 2016; 7: 7829–7841.
 20. Jönsson G., Staaf J., Vallon-Christersson J., Ringnér M., Holm K., Hegardt C., Gunnarsson H., Fagerholm R., Strand C., Agnarsson B.A. Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics // *Breast Cancer Research*. 2010; 12: 42.
 21. Olivier M., Hollstein M., Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010; 2: a001008.
 22. Alane S., Shah S., Murali R., Rau-Murthy R., Schrader K.A., Offit K. Absence of loss of heterozygosity of BRCA1 in a renal tumor from a BRCA1 germline mutation carrier // *Familial Cancer*. 2013; 12: 125–127.
 23. Roy R., Chun J., Powell S.N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection // *Nature Reviews Cancer*. 2012; 12: 68–78.
 24. Ribeiro E., Ganzinelli M., Andreis D., Bertoni R., Giardini R., Fox S.B., Broggin M., Bottini A., Zanoni V., Bazzola L. Triple negative breast cancers have a reduced expression of DNA repair genes // *PLoS One*. 2013; 8: e66243.
 25. Fletcher B., Dragstedt C., Notterpek L., Nolan G. Functional cloning of SPIN-2, a nuclear anti-apoptotic protein with roles in cell cycle progression // *Leukemia*. 2002; 16: 1507–1518.

26. Gersbach C.A., Gaj T., Barbas C.F. Synthetic zinc finger proteins: the advent of targeted gene regulation and genome modification technologies // *Accounts of Chemical Research*. 2014; 47: 2309–2318.
27. He Y., Winham S., Hoskins J., Glass S., Paul J., Brown R., Motsinger-Reif A., McLeod H. Carboplatin/taxane-induced gastrointestinal toxicity: a pharmacogenomics study on the Scotroc1 trial // *The Pharmacogenomics Journal*. 2015.
28. Liang Y., Li S., Chen L. The physiological role of drug transporters // *Protein & Cell*. 2015; 6: 334–350.
29. Ostertag E.M., Crawford J.S. Genetically Modified Rat Models for Pharmacokinetics, 2010, Google Patents.

Поступила в редакцию 15.03.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Цыганов Матвей Михайлович, канд. биол. наук, мл. науч. сотрудник, лаборатория онковирусологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Дерюшева Ирина Валерьевна, мл. науч. сотрудник, лаборатория онковирусологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Гарбуков Евгений Юрьевич, канд. мед. наук, врач, ст. науч. сотрудник, отделение общей онкологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Ибрагимова Марина Константиновна, мл. науч. сотрудник, лаборатория онковирусологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Казанцева Полина Вадимовна, мл. науч. сотрудник, отделение общей онкологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Бычков Вячеслав Алексеевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория онковирусологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Слонимская Елена Михайловна, д-р мед. наук, врач, профессор, зав. отделением общей онкологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН; профессор кафедры онкологии, СибГМУ, г. Томск.

Литвяков Николай Васильевич, д-р биол. наук, зав. лабораторией онковирусологии, НИИ онкологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

✉ Цыганов Матвей Михайлович, e-mail: TsyganovMM@yandex.ru.

УДК 618.19-018-006-097:575.222.78:575.117.2

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-250–259

For citation: Tsyganov M.M., Deryusheva I.V., Garbukov E.Yu., Ibragimova M.K., Kazantseva P.V., Bychkov V.A., Slonimskaya E.M., Litviakov N.V. Phenomenon of loss of heterozygosity in tumour tissue of breast cancer: association with expression of monoresistance genes. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 250–259.

Phenomenon of loss of heterozygosity in tumour tissue of breast cancer: association with expression of monoresistance genes

Tsyganov M.M.^{1,2}, Deryusheva I.V., Garbukov E. Yu.¹, Ibragimova M.K.^{1,2}, Kazantseva P.V.¹, Bychkov V.A.¹, Slonimskaya E.M.^{1,3}, Litviakov N.V.^{1,2}

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (TNRMC) of Russian Academy of Sciences (RAS) 5, Kooperativny Str., Tomsk, 634050, Russian Federation

² National Research Tomsk State University (NR TSU) 36, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

³ Siberian State Medical University (SSMU) 2, Moskow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Purpose of work. To perform a genome-wide association study of loss of heterozygosity (LOH) with monoresistance genes expression during neoadjuvant chemotherapy (NAC) in breast cancer.

Materials and methods. The study involved 68 patients with breast cancer. The tumour stages were IIA–IIIB. RNA was extracted from tissue specimens (before and after NAC) using RNeasy Plus mini Kit (Qiagen,

Germany). Expression profiling of the *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *BRCA1* genes was carried out using quantitative real-time PCR (qPCR). DNA was extracted from 68 biopsy specimens of tumour tissues using QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany). LOH status was detected using microarray analysis using high density DNA-chip manufactured by Affymetrix CytoScan™ HD Array company.

Results. As a result of the study of loss of heterozygosity was evaluated in 13815 genes. The frequency of LOH varied from 0% to 63%. The highest incidence of heterozygosity loss events is characteristic for genes of 16, 17 and the X-chromosome. Our study established that the phenomenon of loss of heterozygosity in monoresistance genes (*BRCA1*, *ERCC1*, *RRM1*, *TOP1*, *TOP2A*, *TUBB3* and *TYMS*), is not associated with their level of expression in the tumor. A statistical association has been found between LOH and level of expression of the studied genes in 54 genes. Among them it is necessary to note genes encoding miRNA and «zinc fingers» involved in the regulation of transcription of many genes, transmembrane drug transporters and ion channels, genes of the MAP kinase signaling pathway, and others.

Conclusion. The results of this study allow for the more exact determination of the expression picture of monoresistance genes in the tumor and the indication of new candidate genes which are involved in the regulation of the expression of these genes. Evaluation of the loss of heterozygosity in tumor tissue can be used as an additional criterion for personalizing chemotherapy.

Key words: loss of heterozygosity, breast cancer, monoresistance genes, microarray analysis.

Received March 15.2017
Accepted November 08.2017

Tsyganov Matvey M., PhD, Junior Researcher, Laboratory of Oncovirology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Deryusheva Irina V., Junior Researcher, Laboratory of Oncovirology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Garbukov Evgeniy Yu., PhD, Doctor, Senior Researcher, Department of General Oncology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Ibragimova Marina K., Junior Researcher, Laboratory of Oncovirology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Kazantseva Polina V., Junior Researcher, Department of General Oncology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Bychkov Viacheslav A., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Oncovirology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Slonimskaya Elena M., DM, Professor, Head of the Department of General Oncology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

Litviakov Nikolay V., DBSc, Head of the Laboratory Oncovirology, Cancer Research Institute, TNRMC RAS, Tomsk, Russian Federation.

(✉) **Tsyganov Matvey M.**, e-mail: TsyganovMM@yandex.ru.

УДК 616.132.2-008.64-002:577.112

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-260–268

Для цитирования: Чумакова С.П., Уразова О.И., Шипулин В.М., Новицкий В.В., Хардикова С.А. Цитокины как индукторы постперфузионной системной воспалительной реакции у кардиохирургических больных с различной продолжительностью коронарной патологии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 260–268.

Цитокины как индукторы постперфузионной системной воспалительной реакции у кардиохирургических больных с различной продолжительностью коронарной патологии

Чумакова С.П.¹, Уразова О.И.¹, Шипулин В.М.², Новицкий В.В.¹, Хардикова С.А.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Научно-исследовательский институт (НИИ) кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр (ТНИМЦ) Российской академии наук (РАН)
Россия, 634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – определить характер изменений цитокинового профиля крови при формировании системной воспалительной реакции (СВР) у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) с разными темпами развития заболевания после коронарного шунтирования с применением искусственного кровообращения (ИК).

Материал и методы. Обследованы больные с медленно прогрессирующей ИБС (20 человек) и быстро прогрессирующей ИБС (20 человек). У больных ИБС до операции и через 6 и 24 ч после оперативного вмешательства оценивали концентрацию цитокинов – интерлейкина (IL)-1 β , IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-8 и фактора некроза опухоли (TNF) α в плазме крови методом иммуноферментного анализа.

Результаты исследования показали, что до операции у больных ИБС обеих групп отмечалось повышение плазменной концентрации IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α и IL-1 α . При этом в случае медленного прогрессирования заболевания концентрация IL-4 в крови сохранялась в пределах нормы, в то время как при быстро развивающейся ИБС обнаруживалось максимально выраженное увеличение содержания провоспалительных (TNF- α , IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-1 α) цитокинов в крови и соотношения IL-1 α /IL-1 β . После коронарного шунтирования у больных ИБС с длительным анамнезом заболевания отмечалось увеличение содержания IL-1 β , IL-8, TNF- α , IL-1 α , IL-4 при нормализации концентрации IL-6 в крови; у пациентов с коротким периодом развития ИБС – рост концентрации IL-1 α , высокое содержание IL-6 при сохраняющемся без изменений уровне IL-1 β , IL-8, IL-4 и отрицательной динамике концентрации TNF- α в плазме крови.

Таким образом, при длительном течении ИБС выполнение операции в условиях ИК вызывает формирование СВР, свойственной острому воспалению, и координированный противовоспалительный ответ, а при коротком периоде коронарной болезни – СВР, характерную для хронического воспаления, и некоординированный противовоспалительный ответ.

Ключевые слова: цитокины, системная воспалительная реакция, ишемическая болезнь сердца, искусственное кровообращение.

✉ Чумакова Светлана Петровна, e-mail: Chumakova_S@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время хирургическое лечение ишемической болезни сердца (ИБС) с многососудистым поражением коронарного русла невозможно представить без применения искусственного кровообращения (ИК). При этом использование ИК рассматривается в качестве основной причины развития системной воспалительной реакции (СВР) у кардиохирургических пациентов в послеоперационном периоде. Подобный ответ организма на перфузию вызван контактом крови с чужеродными поверхностями экстракорпорального контура и активацией системы комплемента, травматизацией форменных элементов крови в турбулентном потоке, ишемией и реперфузией тканей, гипероксией и гипотермией, транслокацией эндотоксинов в кровь через ишемизированную стенку кишечника на фоне централизации кровотока, а также повреждением тканей операционного поля [1–4].

В совокупности эндотоксины, компоненты комплемента, прооксиданты и погибшие клетки запускают системный воспалительный ответ с высвобождением большого количества медиаторов, среди которых ведущую роль играют цитокины, индуцирующие дополнительный каскад гуморальных и клеточных реакций [1, 5–7]. Между тем СВР может протекать либо субклинически в виде «медиаторной бури», либо манифестировать в виде синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) [7]. Последний характеризуется сочетанием двух или более признаков из числа следующих: 1) температура тела более 38 °С или менее 36 °С; 2) частота сердечных сокращений более 90 ударов/мин; 3) частота дыхания более 20 в минуту или артериальная гипоксемия менее 32 мм рт. ст.; 4) лейкоцитоз более $12 \times 10^9/\text{л}$ или лейкопения менее $4 \times 10^9/\text{л}$, или наличие в лейкоцитарной формуле более 10% незрелых форм нейтрофилов. Однако существует мнение, что в кардиохирургии вышеуказанные критерии ССВО не отражают истинного состояния организма пациента в послеоперационном периоде и поэтому требуют уточнения [8].

Наиболее опасным осложнением ССВО является развитие полиорганной недостаточности вследствие распространенного повреждения сосудистого эндотелия лейкоцитами, активированными в кровотоке при действии цитокинов и других медиаторов воспаления [3, 7]. Данное обстоятельство в комплексе с современными возможностями антицитокиновой терапии демонстрирует актуальность получения достоверных знаний о закономерностях изменения цитокинового профиля крови у больных после опера-

ций с ИК. Наряду с этим анализ современной литературы обнаружил разногласие сведений о характере изменений цитокинопродукции после коронарного шунтирования. Сообщается как о повышении концентрации интерлейкина (IL)-1 β , IL-6, IL-8 и фактора некроза опухоли (TNF) α в раннем послеоперационном периоде, так и о снижении содержания указанных цитокинов в крови [1, 2, 4, 9]. Показана также (но не объяснена) зависимость кинетики TNF- α от его дооперационной концентрации в крови: при исходно высоких показателях уровня TNF- α наблюдается отрицательная динамика цитокина, при нормальном содержании до операции – положительная [9].

Таким образом, данные литературы о роли цитокинов в патогенезе постперфузионной СВР достаточно противоречивы, исходя из чего возникает предположение о существовании нескольких вариантов развития СВР, реализация одного из которых в данном конкретном случае может определяться особенностями дооперационного статуса пациента. Поскольку генез ИБС и атеросклероза в целом сопряжен с субклинической СВР (увеличение в крови концентрации С-реактивного белка, провоспалительных цитокинов и других медиаторов воспаления) [7, 10, 11], то не исключено, что темпы прогрессирования (или длительность) коронарной патологии может влиять на состояние иммунной системы до операции и характер реагирования организма во время ИК.

Цель исследования – определить характер изменений цитокинового профиля крови (IL-1 β , IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α) при формировании системной воспалительной реакции после коронарного шунтирования с применением искусственного кровообращения у больных ИБС в зависимости от продолжительности заболевания – с медленно и быстро прогрессирующей ИБС.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 40 больных (34 мужчины и 6 женщин) в возрасте 45–67 лет (средний возраст $(55,31 \pm 1,23)$ лет), страдающих ИБС и перенесших операцию коронарного шунтирования с использованием ИК. Реваскуляризация миокарда проводилась в условиях нормотермии и кристаллоидной кардиopleгии («Кустодиол», Германия) с применением аппаратов ИК роликового типа производства Gambro (Швеция) и одноразовых мембранных оксигенаторов Baxter (США). Критериями исключения из исследования считали проведение у пациентов продленного ИК, выполнение сочетанных операций и отказ от исследования.

Пациенты были распределены на две группы в зависимости от продолжительности ИБС с момента клинической верификации заболевания: с медленно прогрессирующей ИБС (20 человек, длительность ИБС более 5 лет) и с быстро прогрессирующей ИБС (20 человек, длительность заболевания 5 лет и менее). В общей популяции больных продолжительность ИБС варьировала от 8 мес до 17 лет. Больные двух групп сравнения были сопоставимыми по возрасту и полу,

функциональному классу стенокардии (III–IV), длительности ИК, продолжительности ишемии миокарда, характеру сопутствующей патологии и частоте случаев интраоперационного введения преднизолона (табл. 1). В контрольную группу вошли 16 практически здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту с группами больных ИБС, не страдающих патологией кардиоваскулярной системы, а также заболеваниями других систем органов в стадии обострения.

Т а б л и ц а 1

Клиническая характеристика больных ишемической болезнью сердца до и во время операции коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения			
Показатель		Пациенты с медленно прогрессирующей ИБС	Пациенты с быстро прогрессирующей ИБС
Количество больных		20	20
Возраст, лет ($M \pm m$)		56,13 \pm 1,71	53,36 \pm 2,61
Длительность заболевания, лет ($M \pm m$)		7,88 \pm 1,39	3,10 \pm 0,72 $p < 0,05$
Функциональный класс стенокардии, % (абс.)	II	5 (1)	10 (2)
	III	80 (16)	70 (14)
	IV	15 (3)	20 (4)
Недостаточность кровообращения (по NYHA), % (абс.)	I ст.	55 (11)	60 (12)
	II ст.	45 (9)	40 (8)
Гипертоническая болезнь, % (абс.)		95 (19)	100 (20)
Сахарный диабет 2-го типа, % (абс.)		15 (3)	15 (3)
Заболевания желудочно-кишечного тракта, % (абс.)		35 (7)	50 (10)
Заболевания легких, % (абс.)		20 (4)	20 (4)
Заболевания мочевыделительной системы, % (абс.)		15 (3)	20 (4)
Хроническая венозная недостаточность, % (абс.)		15 (3)	20 (4)
Длительность ИК, мин ($M \pm m$)		102,19 \pm 7,62	115,33 \pm 10,05
Длительность ишемии миокарда, мин ($M \pm m$)		61,06 \pm 4,65	64,22 \pm 6,81
Преднизолон во время операции, % (абс.)		35 (7)	30 (6)

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2: p – уровень статистической значимости различий между группами больных.

Материалом исследования служила гепаринизированная (50 Ед/мл) венозная кровь. В плазме крови определяли концентрацию цитокинов IL-1 β , IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-8 и TNF- α методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов для IL-4, IL-6, IL-8 и TNF- α (ООО «Протеиновый контур», Россия) и для IL-1 β , IL-1 α (ООО «Цитокин», Россия). Кроме того, вычисляли отношение содержания IL-1 α к концентрации IL-1 β в крови (соотношение IL-1 α /IL-1 β). У больных ИБС все исследования проводились непосредственно до операции, через 6 и 24 ч после ее завершения.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ Statistica 8.0. Для каждой выборки вычисляли M – среднее арифметическое и m – ошибку среднего. Для проверки гипотезы о нормальном законе распределения использовался тест Шапиро – Уилка. Про-

верку гипотезы о равенстве средневыборочных величин проводили с использованием t -критерия Стьюдента для зависимых и независимых выборок и непараметрических критериев Манна – Уитни (для независимых выборок) и Вилкоксона (для зависимых выборок). Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. В объединенной выборке больных рассчитывали коэффициент корреляция Спирмена, который считали статистически значимым при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ данных показал, что концентрация IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF- α в крови у больных ИБС в предоперационном периоде была повышенной вне зависимости от продолжительности коронарной болезни (табл. 2). Известно, что потенциаль-

ными триггерами секреции провоспалительных цитокинов и развития субклинической СВР при атеросклерозе являются циркулирующие иммунные комплексы «липопротеин – антитело», инфектогены (*Chlamydia pneumoniae*, цитомегаловирус, вирус простого герпеса), высокое напряжение сдвига в кровеносных сосудах и др. [10–12]. Кроме того, сердечная недостаточность, осложняющая течение ИБС, вызывают гипоксию многих тканей организма, в условиях которой некоторые клетки, включая кардиомиоциты, продуцируют провоспалительные цитокины [7].

Примечательно, что у пациентов с быстро прогрессирующей ИБС содержание TNF- α и

IL-6 в крови до операции превышало аналогичные показатели у лиц с медленно развивающимся заболеванием (табл. 2). Учитывая, что тяжесть стенокардии в сравниваемых группах пациентов была сопоставимой (в среднем III функциональный класс, см. табл. 1) при разной продолжительности болезни, то активность атерогенеза у них, очевидно, тоже отличалась. По всей видимости у больных с коротким периодом формирования коронарного атеросклероза интенсивность атеросклеротического процесса была более выраженной, чем и объясняется высокое содержание TNF- α и IL-6 в их крови (см. табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Содержание цитокинов в плазме крови у кардиохирургических пациентов с медленно и быстро прогрессирующей ишемической болезнью сердца, $M \pm m$							
Показатель	Здоровые доноры	Пациенты с медленно прогрессирующей ИБС			Пациенты с быстро прогрессирующей ИБС		
		до операции	через 6 ч	через 24 ч	до операции	через 6 ч	через 24 ч
IL-1 β , пкг/мл	15,16 \pm 1,77	77,25 \pm 11,71 $p_k < 0,001$	81,50 \pm 13,83 $p_k < 0,001$	110,25 \pm 18,17 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$	62,00 \pm 16,40 $p_k < 0,01$	69,25 \pm 16,15 $p_k < 0,001$	68,38 \pm 13,03 $p_k < 0,001$
IL-1 α , пкг/мл	22,70 \pm 3,27	223,82 \pm 68,85 $p_k < 0,01$	676,59 \pm 120,10 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,01$	418,05 \pm 82,40 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$	387,73 \pm 67,04 $p_k < 0,001$	1134,16 \pm 172,61 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,01$	484,45 \pm 58,83 $p_k < 0,001$ $p_2 < 0,05$
Соотношение IL-1 α /IL-1 β	1,84 \pm 0,37	2,18 \pm 0,61	10,50 \pm 3,52 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,01$	3,43 \pm 0,96 $p_2 < 0,05$	4,03 \pm 0,75 $p_k < 0,05$	14,20 \pm 4,37 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$	6,94 \pm 2,08 $p_k < 0,01$
IL-4, пкг/мл	5,18 \pm 1,08	15,11 \pm 4,46	71,61 \pm 22,11 $p_k < 0,05$	22,72 \pm 9,85	37,45 \pm 10,33 $p_k < 0,01$	26,42 \pm 8,86 $p_1 < 0,05$	31,73 \pm 12,34
IL-6, пкг/мл	7,40 \pm 1,48	39,47 \pm 10,91 $p_k < 0,01$	19,78 \pm 7,67	19,10 \pm 5,76 $p_1 < 0,05$	52,79 \pm 13,86 $p_k < 0,01$	65,70 \pm 15,30 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,01$	48,85 \pm 14,40 $p_k < 0,001$
IL-8, пкг/мл	12,13 \pm 1,57	28,25 \pm 5,16 $p_k < 0,01$	31,30 \pm 3,86 $p_k < 0,001$	41,80 \pm 5,44 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$	31,25 \pm 6,13 $p_k < 0,05$	25,25 \pm 3,93 $p_k < 0,01$	19,14 \pm 2,53 $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,01$
TNF- α , пкг/мл	13,06 \pm 2,47	76,07 \pm 18,37 $p_k < 0,01$	278,82 \pm 76,29 $p_k < 0,001$	194,40 \pm 66,58 $p_k < 0,001$	166,34 \pm 23,14 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$	102,46 \pm 18,95 $p_k < 0,001$	79,47 \pm 12,53 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$

Примечание. p_k – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров; p_1 – у больных ИБС до операции; p_2 – у больных ИБС через 6 ч после операции; p – между группами больных ИБС.

Показано, что плазменная концентрация TNF- α и IL-6 повышается уже на ранних этапах развития атеросклероза и нарастает по мере утяжеления процесса, но гиперсекреция провоспалительных цитокинов при сердечной патологии не сопровождается адекватным повышением продукции их функциональных антагонистов (IL-10, TGF- β) [7, 11]. Подобная закономерность, вероятнее всего, свойственна пролонгированному развитию заболевания, поскольку у больных, страдающих медленно прогрессирующей ИБС, профицит IL-1 β , IL-6, IL-8 и TNF- α до операции, действительно, сочетался с нормальным содержанием

IL-4 и умеренным увеличением концентрации IL-1 α в крови (см. табл. 2). При быстротечном развитии коронарного атеросклероза формируется иной цитокиновый профиль крови: у пациентов с быстрым развитием ИБС более выраженная СВР (по уровню TNF- α и IL-6 в крови) сочеталась с повышением плазменной концентрации IL-4 и IL-1 α (см. табл. 2). В данном случае высвобождение противовоспалительных цитокинов в кровь можно рассматривать как компенсаторную реакцию в ответ на чрезмерную продукцию провоспалительных TNF- α и IL-6. Между тем реализация данного механизма у пациентов с быстро прогрессирующей

ИБС, вероятно, характеризовалась низкой эффективностью, поскольку повышение концентрации TNF- α в крови было 12-кратным, а содержания IL-4 – только 7-кратным (см. табл. 2).

Учитывая способность IL-1ra блокировать рецепторы для IL-1 β [6, 7], для оценки суммарного эффекта этих медиаторов целесообразно рассчитывать соотношение IL-1ra/IL-1 β . Оказалось, что именно по этому показателю больные с медленно прогрессирующей ИБС и здоровые доноры были сопоставимыми; у пациентов с быстрым прогрессированием ИБС данный коэффициент превышал норму (см. табл. 2). Следовательно, значение соотношения IL-1ra/IL-1 β , близкое к двукратному, может служить признаком сбалансированности цитокиновой сети и, возможно, определяется различным аффинитетом рецептора к своим лигандам – IL-1ra и IL-1 β . Так, обнаружено поэтапное взаимодействие IL-1-рецептора с лигандами. В молекуле агониста IL-1 α и антагониста IL-1ra) выявлен общий сайт, который непосредственно взаимодействует с рецептором при первичном связывании, а дальнейший контакт требует наличия второго сайта, найденного у агонистов [6].

Интересно, что концентрация IL-1ra в крови и соотношение IL-1ra/IL-1 β у пациентов с ИБС в предперфузионном периоде не зависели от плазменного уровня IL-1 β , а положительно коррелировали с функциональным классом стенокардии ($r = 0,56$; $p < 0,01$ и $r = 0,52$; $p < 0,05$ соответственно), что может быть следствием усугубляющейся гипоксии миокарда. Последняя реализуется учащением приступов стенокардии и формирует стресс-реакцию, инициирующую продукцию белков острой фазы. Установлено, что С-реактивный белок в большей степени стимулирует наработку IL-1ra макрофагами, нежели провоспалительного IL-1 β . Кроме того, индукторами синтеза IL-1ra, помимо IL-1 α , являются TNF- α и IL-4 [6]. Поскольку у больных с быстро прогрессирующей ИБС регистрировался наибольший уровень TNF- α и IL-4 в крови до операции, то рост концентрации IL-1ra и величины IL-1ra/IL-1 β у данной категории пациентов вполне закономерен и подтверждается наличием прямой зависимости между уровнем TNF- α и соотношением IL-1ra/IL-1 β в крови ($r = 0,40$; $p < 0,05$).

После оперативного вмешательства у больных ИБС обеих групп исследования отмечались хронологически различные изменения концентрации цитокинов в крови: TNF- α , IL-4 и IL-1ra – уже через 6 ч, а IL-1 β и IL-6 – только через 24 ч после операции (см. табл. 2). Это связано с тем, что TNF- α по кинетике опережает IL-1 β , а для IL-6 характерна

еще более медленная динамика продукции [6, 7]. Между тем характер изменений цитокинового профиля крови у пациентов в первые послеоперационные сутки имел ярко выраженные особенности в зависимости от длительности основного заболевания. У пациентов с медленно прогрессирующей ИБС в первые сутки после операции отмечалось повышение содержания IL-1 β , IL-8, TNF- α , IL-4, IL-1ra и IL-1ra/IL-1 β и, напротив, нормализация концентрации IL-6 в крови (см. табл. 2).

Рост концентрации IL-1 β и TNF- α в крови после операции с ИК у больных данной группы вполне укладывается в понятие о СВР, индуцированной хирургическим вмешательством, и вызвано агрессивными факторами интраоперационного периода (активацией комплемента, травмой клеток крови, ишемией миокарда, эндотоксинемией), которые стимулируют наработку IL-1 β и TNF- α . Оба цитокина, особенно IL-1 β , опосредуют активацию синтеза IL-8 [1, 6, 7], что у больных с медленно прогрессирующей ИБС подтверждалось положительной корреляцией между концентрациями IL-1 β и IL-8 в крови через 6 и 24 ч после операции ($r = 0,64$; $p < 0,001$ и $r = 0,59$; $p < 0,001$ соответственно) и увеличением IL-8 после перфузии.

Ответной реакцией на повышение концентрации IL-1 β в крови при формировании СВР является избыточная секреция IL-1ra [7], основными продуцентами которого при активном воспалении являются нейтрофилы [6]. Важно отметить, что уровень IL-1ra и величина IL-1ra/IL-1 β в крови у пациентов через 24 ч после операции коррелировали с длительностью ИК ($r = 0,49$; $p < 0,05$ и $r = 0,60$; $p < 0,01$ соответственно) и временем ишемии миокарда ($r = 0,50$; $p < 0,05$ и $r = 0,61$; $p < 0,01$ соответственно), что позволяет думать о миокардиальном происхождении IL-1ra или его индукторов, в частности TNF- α . Так, профицит TNF- α в крови обнаруживается уже в момент реперфузии сердечной мышцы, а его максимум – сразу после завершения ИК [4]. Кроме того, опираясь на полученные нами данные, на обоих этапах постперфузионного периода у больных ИБС имела место прямая связь между концентрацией TNF- α и IL-4 в крови ($r = 0,42$; $p < 0,01$ через 6 ч и $r = 0,46$; $p < 0,01$ через 24 ч после операции), которую можно интерпретировать как способность TNF- α индуцировать синтез IL-4, в то время как по данным литературы IL-4, напротив, угнетает образование TNF- α , IL-1 β и IL-6 [6]. Вероятно, именно поэтому у больных с медленно прогрессирующей ИБС повышение содержания IL-4 в крови после операции сопровождалось снижением уровня IL-6 до нормы (см. табл. 2).

Очевидно, при адекватном иммунном ответе на хирургическую травму гиперсекреция TNF- α должна вызывать усиление синтеза IL-4, представляя собой связующее звено между про- и противовоспалительным началом и приводя цитокиновую сеть в равновесие. В целом цитокиновый фон с избытком IL-1 β , IL-8, TNF- α и без значимого повышения содержания IL-6 характерен для острого воспалительного процесса [6], что при системной активации лейкоцитов в кровотоке может вызвать повреждение эндотелия и, как следствие, полиорганную недостаточность. У пациентов с быстро прогрессирующей ИБС в первые сутки после операции цитокиновый профиль крови характеризовался сохранением исходно высоких концентраций IL-1 β и IL-8, снижением содержания TNF- α (не достигая нормы) и IL-4 (до нормы), более значимым, чем у больных с длительным течением ИБС, приростом уровней IL-1ra, IL-1ra/IL-1 β и IL-6 (см. табл. 2).

Отсутствие ожидаемой после ИК положительной динамики IL-1 β у этой категории больных при наличии триггеров СВР и сопоставимости параметров перфузии может обуславливаться дисбалансом внутриклеточных процессов генерации молекул системы IL-1 (IL-1 α , IL-1 β и IL-1ra). Регуляция образования последних осуществляется не только на уровне экспрессии гена *IL1*, но и за счет влияния IL-1-превращающего фермента, который относится к семейству сериновых протеаз и катализирует отщепление от транслоцированной последовательности белка сигнального мотива, позволяющего проходить ему через мембрану клетки. Таким образом, формируется внутриклеточный пул IL-1, который затем может быть экспрессирован на поверхности макрофага в виде IL-1 α — мембранной формы IL-1, либо секретирован в окружающую среду в виде IL-1 β или IL-1ra [6, 7].

Учитывая, что у больных с быстро прогрессирующей ИБС отсутствие изменений концентрации IL-1 β после операции сочеталось с 4-кратным увеличением содержания IL-1ra в крови, в то время как у пациентов в группе сравнения уровень IL-1 β повышался в ассоциации с 3-кратным увеличением концентрации IL-1ra (см. табл. 2), можно думать, что стабильность послеоперационного содержания IL-1 β может быть связана с внутриклеточным депонированием молекул IL-1 и (или) переориентацией синтетических процессов на генерацию IL-1ra.

Наряду с сохранением высокого содержания IL-1 β в крови после перфузии, уровень IL-8 у

больных с быстро прогрессирующей ИБС тоже варьировал в пределах дооперационных значений, очевидно, по причине обнаруженной нами положительной корреляции уровней IL-1 β и IL-8 в крови в этот период (см. выше). Более того, концентрация TNF- α в крови у этих пациентов после хирургического вмешательства даже снижалась, хотя и не достигала нормы. Уменьшение содержания данного медиатора в циркуляции при наличии его индукторов может быть вызвано гиперпродукцией растворимых рецепторов к TNF- α , которые служат «ловушками» цитокина [6]. Так, показана тенденция к снижению концентрации TNF- α в крови у пациентов через 48 ч после коронарного шунтирования с ИК на фоне реципрокного изменения количества растворимых рецепторов цитокина [9].

Очевидно, у пациентов с быстро прогрессирующей ИБС перед коронарным шунтированием цитокиновая сеть функционирует в более напряженном состоянии: плазменный уровень TNF- α был выше, чем в группе сравнения, а концентрация IL-4 в крови и соотношение IL-1ra/IL-1 β превышали норму (см. табл. 2). Вероятно, реактивность иммунной системы при быстротечном развитии коронарного атеросклероза отличается от таковой на фоне пролонгированного течения патологии. По всей видимости у пациентов с быстро прогрессирующей ИБС реваскуляризация миокарда в условиях ИК провоцирует более интенсивную стресс-реакцию, чем при медленном развитии заболевания.

Так, для больных ИБС с более тяжелым течением и коротким анамнезом заболевания установлено истощение надпочечникового аппарата (дефицит кортизола) и стресс-лимитирующих систем организма (антиоксидантной системы, пролактина) [13]. В условиях пониженного адаптационного потенциала организма мощный раздражитель может индуцировать срыв защитно-приспособительных механизмов и формирование неадекватных стрессору реакций.

К одним из центральных медиаторов стресса относится IL-6 [14], который у пациентов с быстро прогрессирующей ИБС становится ведущим провоспалительным цитокином в патогенезе послеоперационной СВР (см. табл. 2). Известно, что IL-6 способен угнетать продукцию IL-1 β и TNF- α , завершая процессы воспаления в очаге, а также стимулировать образование белков острой фазы и растворимых рецепторов для TNF- α [6, 9]. Подобный механизм мог быть причиной снижения в постперфузионном периоде свободной концентрации TNF- α у больных с быстро

прогрессирующей ИБС (см. табл. 2), детерминируя тем самым угнетение синтеза ИЛ-4, что подтверждается положительной корреляцией между содержанием этих цитокинов в плазме крови после ИК (см. выше). Кроме того, отсутствие заметного увеличения содержания ИЛ-4, сопоставимого с повышением плазменной концентрации провоспалительных цитокинов, у пациентов данной группы после коронарного шунтирования может отражать также дефицит клеток-продуцентов цитокина (Th2) и (или) их неспособность отвечать на развитие СВР (Т-клеточная анергия), что формирует иммунную недостаточность [2].

Отрицательная динамика ИЛ-4 в послеоперационном периоде, по всей видимости, обуславливает сохранение содержания ИЛ-6 в крови на высоком уровне, так как ИЛ-4 способен ингибировать синтез ИЛ-6 [6]. В целом гиперсекреция ИЛ-6 при несущественной динамике ИЛ-1 β и TNF- α формирует цитокиновый фон хронического воспаления, что в сочетании с избытком ИЛ-1 α может способствовать переходу СВР в синдром компенсаторного противовоспалительного ответа, опасный развитием инфекционных осложнений [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у больных ИБС до операции определяется субклиническая СВР (повышение содержания ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и TNF- α в крови), которая при медленном прогрессировании заболевания с умеренной активностью атерогенеза не компенсируется сопоставимым увеличением концентрации ИЛ-4. Быстрое развитие ИБС при более высокой активности атеросклеротического процесса сопровождается максимально выраженным повышением плазменной концентрации как провоспалительных медиаторов TNF- α и ИЛ-6, так и противовоспалительных цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-1 α , а также увеличением соотношения ИЛ-1 α /ИЛ-1 β . После коронарного шунтирования в условиях ИК у больных ИБС формируется постперфузионная СВР, которая у лиц с длительным анамнезом заболевания характеризуется медиаторным ответом, свойственным острому воспалению, и координированной противовоспалительной реакцией (повышением уровня ИЛ-1 α и ИЛ-4), а у пациентов с коротким периодом развития ИБС – цитокиновым фоном, характерным для хронического воспаления, и некоординированным противовоспалительным ответом (выраженное повышение концентрации ИЛ-1 α при снижении содержания ИЛ-4 сравнительно с периодом до операции).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы данной статьи заявляют об отсутствии финансовой поддержки при проведении исследований.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Проведенная работа соответствует этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. От лиц, участвующих в исследовании, получено информированное согласие. Исследование одобрено локальным этическим комитетом СибГМУ (протокол № 19 от 31.05.2014 г.).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Головкин А.С., Матвеева В.Г., Хуторная М.В., Понасенко А.В., Шукевич Д.А., Григорьев Е.В. Роль сывороточных цитокинов в патогенезе системного воспалительного ответа после аортокоронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения // Цитокины и воспаление. 2015; 14 (2): 48–55.
2. Golovkin A.S., Matveeva V.G., Khutornaya M.V., Ponasenko A.V., Shukevich D.L., Grigor'ev E.V. Rol' syvorotochnykh tsitokinov v patogeneze sistemnogo vospalitel'nogo otveta posle aortokoronarnogo shuntirovaniya v usloviyakh iskusstvennogo krovoobrashcheniya [The role of serum cytokines in the pathogenesis of systemic inflammatory response syndrome after on-pump coronary artery bypass grafting] // *Tsitokiny i vospalenie – Cytokines and Inflammation*. 2015; 14 (2): 48–55 (in Russian).
3. Justus G., Walker C., Rosenthal L.M., Berger F., Miera O., Schmitt K.R.L. Immunodepression after CPB: Cytokine dynamics and clinics after pediatric cardiac surgery – A prospective trial // *Cytokine*. 2017; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28411047> DOI: 10.1016/j.cyto.2017.03.017.
4. Sabzi F., Faraji R. Uncontrolled systemic inflammatory response syndrome by cardiopulmonary bypass // *West. Indian. Med. J.* 2016; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27617582> DOI: 10.7727/wimj.2015.389.
5. Шумаков В.И., Сускова В.С., Ермакова А.П., Людоговская С.П. Состояние иммунной системы у кардиохирургических больных при искусственном кровообращении // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2003; 3: 41–45.

- Shumakov V.I., Suskova V.S., Ermakova L.P., Lyudogovskaya S.P. Sostoyanie immunnogo sistema v kardiokhirurgicheskikh bol'nykh pri iskusstvennom krovoobrashchenii [The state of the immune system in cardiosurgical patients with cardiopulmonary bypass] // *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov – Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2003; 3: 41–45 (in Russian).
5. Новицкий В.В., Чумакова С.П., Шипулин В.М., Уразова О.И., Евтушенко О.М., Перевозчикова Т.В., Сулова Т.Е., Емельянова Т.В. Взаимосвязь цитокинов и факторов бактерицидности нейтрофилов у больных, оперированных в условиях искусственного кровообращения // *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2006; 6: 13–18.
 - Novitskiy V.V., Chumakova S.P., Shipulin V.M., Urazova O.I., Evtushenko O.M., Perevozchikova T.V., Suslova T.E., Emel'yanova T.V. Vzaimosvyaz' tsitokinov i faktorov bakteritsidnosti neytrofilov u bol'nykh, operirovannykh v usloviyakh iskusstvennogo krovoobrashcheniya [The interconnection between cytokines and the factors of bactericidal action of neutrophils in patients operated on under the conditions of cardiopulmonary bypass] // *Vestnik Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh Nauk – Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2006; 6: 13–18 (in Russian).
 6. Хаитов Р.М., Ярилин А.А., Пинегин Б.В. Иммунология. М.: ГОЭТАР-Медиа, 2011: 600.
 - Khaitov R.M., Yarilin A.A., Pinegin B.V. Immunologiya [Immunology]. M.: GOETAR-Media Publ., 2011: 600 (in Russian).
 7. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека // *Медицинский академический журнал*. 2013; 13(3): 18–41.
 - Simbirtsev A.S. Tsitokiny v patogeneze infektsionnykh i neinfektsionnykh zabolevaniy cheloveka [Cytokines in the pathogenesis of infectious and noninfectious human diseases] // *Meditsinskiy Akademicheskiy Zhurnal – Medical Academic Journal*. 2013; 13 (3): 18–41 (in Russian).
 8. Landis R.C. 20 years on: Is it time to redefine the systemic inflammatory response to cardiothoracic surgery? // *J. Extra Corpor. Technol*. 2015; 47 (1): 5–9.
 9. Добродеева Л.К., Миролюбова О.А., Лукина О.Ю., Чернов И.И., Шонбин А.Н., Голубев М.Ю. Изменения уровней цитокина фактора некроза опухолей альфа и его растворимого рецептора/антагониста после аортокоронарного шунтирования // *Медицинская иммунология*. 2004; 6: 573–577.
 - Dobrodeeva L.K., Miroyubova O.A., Lukina O.Yu., Chernov I.I., Shonbin A.N., Golubev M.Yu. Izmeneniya urovney tsitokina faktora nekroza opukholey al'fa i ego rastvorimogo retseptora/antagonista posle aortokoronarnogo shuntirovaniya [Changes in levels of tumor necrosis factor alpha and its soluble receptor/antagonist after coronary artery bypass graft surgery] // *Meditsinskaya Immunologiya – Medical Immunology*. 2004; 6: 573–577 (in Russian).
 10. Аршинов А.В., Маслова И.Г. Роль инфекции и воспаления в развитии атеросклероза (обзор литературы) // *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2011; 17(1): 35–41.
 - Arshinov A.V., Maslova I.G. Rol' infektsii i vospaleniya v razvitiy ateroskleroza (obzor literatury) [Role of the infection and inflammation in atherosclerosis development (literature review)] // *Angiologiya i Sosudistaya Khirurgiya – Angiology and Vascular Surgery*. 2011; 17(1): 35–41 (in Russian).
 11. Юрьева Э.А., Сухоруков В.С., Воздвиженская Е.С., Новикова Н.Н. Атеросклероз: гипотезы и теории // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2014; 59 (3): 6–16.
 - Yur'eva E.A., Sukhorukov V.S., Vozdvizhenskaya E.S., Novikova N.N. Ateroskleroza: gipotezy i teorii [Atherosclerosis: Hypotheses and theories] // *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii – Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*. 2014; 59 (3): 6–16 (in Russian).
 12. Титов В.Н. Становление патогенеза атеросклероза в филогенезе // *Клиническая медицина*. 2014; 92 (10): 5–14.
 - Titov V.N. Stanovlenie patogeneza ateroskleroza v filogeneze [Evolution of pathogenesis of atherosclerosis in phylogenesis] // *Klinicheskaya Meditsina – Clinical Medicine (Russian Journal)*. 2014; 92 (10): 5–14 (in Russian).
 13. Барбараш О.Л., Берген Е.И., Шабалина Л.В., Барбараш Н.А., Гуляева Е.Н. Феномен предоперационного стресса у больных ишемической болезнью сердца; оценка его клинической и прогностической значимости // *Терапевтический архив*. 1998; 70 (12): 31–35.
 - Barbarash O.L., Bergen E.I., Shabalina L.V., Barbarash N.A., Gulyaeva E.N. Fenomen predoperatsionnogo stressa u bol'nykh ishemicheskoy bolezn'yu serdtsa; otsenka ego klinicheskoy i prognosticheskoy znachimosti [The phenomenon of preoperative stress in patients with ischemic heart disease; Evaluation of its clinical and prognostic significance] // *Terapevticheskiy Arkhiv – Therapeutic Archive*. 1998; 70 (12): 31–35 (in Russian).
 14. Marsland A.L., Walsh C., Lockwood K., John-Henderson N.A. The effects of acute psychological stress on circulating and stimulated inflammatory markers: A systematic review and meta-analysis // *Brain. Behav. Immun*. 2017; 64: 208–219. DOI: 10.1016/j.bbi.2017.01.011.

Поступила в редакцию 14.07.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Чумакова Светлана Петровна, д-р мед. наук, доцент, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

Уразова Ольга Ивановна, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, профессор, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

Шипулин Владимир Митрофанович, д-р мед. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель отделения сердечно-сосудистой хирургии, НИИ кардиологии, ТНИМЦ РАН, г. Томск.

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, зав. кафедрой патофизиологии, СибГМУ, г. Томск.

Хардикова Светлана Анатольевна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой дерматовенерологии и косметологии, СибГМУ, г. Томск.

(✉) Чумакова Светлана Петровна, e-mail: Chumakova_S@mail.ru.

УДК 616.132.2-008.64-002:577.112

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-260-268

For citation: Chumakova S.P., Urazova O.I., Shipulin V.M., Novitsky V.V., Khardikova S.A. Cytokines as inducers of postperfusion systemic inflammatory reaction in cardiosurgical patients with different duration of coronary pathology. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 260–268.

Cytokines as inducers of postperfusion systemic inflammatory reaction in cardiosurgical patients with different duration of coronary pathology

Chumakova S.P.¹, Urazova O.I.¹, Shipulin V.M.², Novitsky V.V.¹, Khardikova S.A.¹

¹ Siberian State Medical University (SSMU)

2, Moscow Tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

² Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (TNRMC) of Russian Academy of Sciences (RAS)
111a, Str. Kievskaiy, Tomsk, 634012, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. The changes of blood cytokine profile in patients with ischemic heart disease (IHD) with different development rates and formation of systemic inflammatory response (SIR) after coronary artery bypass grafting by using cardiopulmonary bypass (CPB) are analyzed in this article.

Materials and methods. The patients with slowly progressive of IHD (20 patients) and rapidly progressive of IHD (20 patients) were examined. The concentration of interleukine (IL) 1 β , IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor (TNF) α in blood plasma were evaluated by ELISA at patients with IHD before surgery and at 6 and 24 h after surgery.

The results of the study showed that concentration of IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and IL-1ra in blood plasma increases in patients with IHD of both groups before surgery. The concentration of IL-4 in the blood saved in the normal range before the operation in the case of slow disease progression, but maximum increase in content of proinflammatory (TNF- α , IL-6) and anti-inflammatory (IL-4, IL-1ra) cytokines in the blood and the IL-1ra/IL-1 β ratio was detected in a rapidly developing of IHD. It was noticed that after coronary artery bypass grafting in patients with long history case of IHD the content of IL-1 β , IL-8, TNF- α , IL-1ra, IL-4 increased with a normalization of the IL-6 concentration in the blood; in patients with a short period of IHD increase of IL-1 concentration and high content of IL-6 are combined with remaining unchanged level of IL-1 β , IL-8, IL-4 and negative dynamics of the TNF- α concentration in the blood. Thus, the operation in the CPB in the case of IHD with prolonged course induces the formation of SIR, typical for acute inflammation, and coordinated anti-inflammatory response, and in the case of short period of coronary disease progress this operation causes SIR, characteristic for chronic inflammation, and uncoordinated anti-inflammatory response.

Key words: cytokines, systemic inflammatory reaction, ischemic heart disease, cardiopulmonary bypass.

Received July 14.2017

Accepted November 08.2017

Chumakova Svetlana P., DM, Associate Professor, Pathophysiology Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Urazova Olga I., DM, Professor, Corresponding Member of RAS, Pathophysiology Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Shipulin Vladimir M., DM, Professor, Head of the Department Cardiovascular Surgery, Cardiology Research Institute, TNRMC RAS Tomsk, Russian Federation.

Novitsky Vyacheslav V., DM, Professor, Academician of RAS, Head of the Pathophysiology Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Khardikova Svetlana A., DM, Professor, Head of the Department Dermatology and Cosmetology, SSMU, Tomsk, Russian Federation.

(✉) Chumakova Svetlana P., e-mail: Chumakova_S@mail.ru.

УДК 614.2:001.89

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-269–279

Для цитирования: Бедорева И.Ю., Шалыгина Л.С., Латуха О.А. Модель устойчивого развития научно-исследовательского учреждения здравоохранения, оказывающего высокотехнологичную медицинскую помощь. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 269–279.

Модель устойчивого развития научно-исследовательского учреждения здравоохранения, оказывающего высокотехнологичную медицинскую помощь

Бедорева И.Ю.^{1,2}, Шалыгина Л.С.^{1,2}, Латуха О.А.²

¹ Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии (ННИИТиО) им. Я.А. Цивьяна

Россия, 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

² Новосибирский государственный медицинский университет (НГМУ)

Россия, 630099 г. Новосибирск, Красный пр., 52

РЕЗЮМЕ

Проблема устойчивого развития актуальна абсолютно для всех видов предприятий и организаций. Достижение долгосрочного развития всегда было и остается одной из самых сложных задач, с которыми приходится сталкиваться организациям. Эффективным средством успешного решения этой задачи является реализация положений международных стандартов ИСО серии 9000.¹ В стандартах ИСО сконцентрирован мировой опыт по обеспечению устойчивого успеха организаций. Разработанные стандарты включают в себя все наиболее эффективное из того, что накоплено в этой области знаний и практической деятельности. Эти стандарты не только устранили технические барьеры в сотрудничестве, установили унифицированные подходы, но послужили ценным источником мирового опыта, готовых управленческих решений. Они стали практическим руководством для создания систем менеджмента устойчивого развития в организациях различных сфер деятельности.

Проблема и цель. В статье представлен авторский подход к проблеме устойчивого развития медицинской организации. Цель статьи – исследовать подходы к менеджменту устойчивого успеха организаций и описать модель устойчивого развития, применяемую в научно-исследовательском учреждении здравоохранения, оказывающего высокотехнологичную медицинскую помощь.

Методология. В исследовании применялись общенаучные методы эмпирического и теоретического познания, общелогические методы и приемы, а также методы системного анализа, сравнения, аналогии, обобщения, материалы собственного исследования развития медицинской организации.

Результаты. Впервые разработана методика комплексной оценки деятельности научно-исследовательского учреждения здравоохранения по ключевым и развернутым элементам системы управления, позволяющая установить уровень зрелости системы менеджмента учреждения, выявить ее сильные и слабые стороны, определить области для улучшений и инноваций, а также установить приоритеты для определения последовательности действий при внедрении процессов совершенствования.

¹ ГОСТ Р ИСО 9004-2010 Менеджмент для достижения устойчивого успеха организации. Подход на основе менеджмента качества. М.: Стандартинформ, 2011: 46.

✉ Латуха Ольга Александровна, e-mail: latucha@mail.ru.

Выявлены факторы, необходимые для использования в управлении организацией и являющиеся критичными для устойчивого успеха.

Заключение. Внедрение системы менеджмента качества и трансформация ее в систему менеджмента устойчивого развития позволили улучшить все основные показатели деятельности Новосибирского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна. Положительные итоги подтверждаются результатами самооценки системы менеджмента по ключевым элементам, что определяет уровень зрелости системы, а также ощутимое повышение данного уровня в период внедрения системы устойчивого развития со второго до четвертого уровня (расширенная система управления).

Ключевые слова: организация здравоохранения, ключевые показатели эффективности, устойчивое развитие, направленное на достижение цели управление, мониторинг, система менеджмента качества ИСО 9001; ИСО 9004.

ВВЕДЕНИЕ

Динамично развивающаяся отрасль здравоохранения меняет требования внешней среды, которая влияет на работу медицинских организаций. Часто руководителю сложно оценить, насколько те или иные воздействия внешней среды изменят устойчивость развития медицинской организации в долгосрочной перспективе [1–11].

Внедрение стандартов ИСО серии 9000 не является новым и для отраслей социальной сферы: здравоохранения, образования, науки и др. [12–13]. Уже накоплен опыт внедрения системы менеджмента качества стандарта ИСО 9001 в амбулаторно-поликлиническом звене [14–17], консультативно-диагностическом центре [18–19], стационаре [20–26], а также медицинских научно-исследовательских институтах различного профиля [27–29].

В последнее время концепция Всеобщего управления качеством (Total Quality Management, TQM) получила широкое распространение в различных отраслях и сферах общественного развития [30–36]. Расширенное применение этой модели позволило не только сформировать систему менеджмента качества организаций, но и начать реализацию системы устойчивого развития организации стандарта ISO 9004 [37–41].

Несмотря на отсутствие достаточного опыта практического внедрения стандарта ISO 9004 в здравоохранении, отдельные его элементы гармонично интегрируются с положениями стандарта ISO 9001 и являются, фактически, продолжением модели системы менеджмента качества, которая основывается на восьми принципах TQM. Отличия этих двух моделей заключаются в том, что в случае стандарта ISO 9001 требуется таким образом скоординировать деятельность по управлению организацией, чтобы достичь целей в области качества оказания медицинских услуг. В

случае стандарта ISO 9004 руководителям организации требуется таким образом расширить область применения принципов TQM с основных на вспомогательные процессы, чтобы достичь долгосрочных целей развития учреждения здравоохранения в сложной, предъявляющей требования и постоянно изменяющейся среде.

Система устойчивого развития организации позволяет повышать эффективность всех внутренних и внешних процессов, в том числе отвечающих за качество медицинской помощи. Данный подход в литературе исследован недостаточно, что и послужило предпосылкой исследования моделей, повышающих устойчивость развития медицинских организаций.

Цель исследования – изучить подходы к менеджменту устойчивого успеха организаций и описать авторскую модель устойчивого развития, применяемую в научно-исследовательском учреждении здравоохранения, оказывающим высокотехнологичную медицинскую помощь.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании применялись общенаучные методы эмпирического и теоретического познания, общелогические методы и приемы, методы системного анализа, сравнений и аналогий, обобщения и др., а также материалы собственного исследования. Применяемый в исследовании опрос проводили эксперты, получившие образование по устойчивому развитию организации, и занимающие руководящие должности. Оценка компетентности экспертов проводилась на основании совокупного индекса, предложенного директором Центра социального прогнозирования и маркетинга Ф.Э. Шегери. В группу экспертов были приглашены лица с уровнем компетенции выше среднего. Средний коэффициент компетентности эксперта составляет 0,89.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Новосибирский научно-исследовательский институт им. Я.А. Цивьяна широко известен своими исследованиями в области организационных изменений. В 2002 г. в его работу была внедрена система менеджмента качества, основанная на положениях стандарта ISO 9001, и показала свои результаты, опубликованные в предыдущих работах [42–43].

С 2012 г. в ННИИТиО проводится исследование устойчивости развития медицинской организации, в основу которой положена концепция «Устойчивого успеха» стандарта ISO 9004 и результаты предыдущих исследований¹. В рамках данной работы:

1. Впервые разработана методика комплексной оценки деятельности научно-исследовательского учреждения здравоохранения по ключевым и развернутым элементам системы управления, позволяющая установить уровень зрелости системы менеджмента учреждения, выявить ее сильные и слабые стороны, определить области для улучшений и инноваций, а также установить приоритеты для определения последовательности действий при внедрении процессов совершенствования.

Оценка представляет собой всесторонний и систематический анализ деятельности института и ее результатов по сравнению с выбранным эталоном, в качестве которого применяются требования стандарта ГОСТ Р ИСО 9004-2010 (ISO 9004:2009). Результаты оценки отдельных процессов учитываются при оценке института в целом и используются в качестве входных данных для

анализа со стороны руководства. Оценка проводится один раз в год путем опроса экспертов – владельцев процессов и руководителей высшего и среднего звена института, с использованием разработанных нами форм экспертных карт.

2. Впервые на примере ННИИТиО применена разработанная модель зрелости системы менеджмента организации. Зрелая организация функционирует результативно и эффективно и добивается устойчивого успеха (то есть решает поставленные задачи и добивается достижения долгосрочных целей). С целью обеспечения способности института функционировать результативно и эффективно, а также достигать устойчивого успеха, руководство института:

- понимает и удовлетворяет потребности и ожидания заинтересованных сторон;
- ведет мониторинг изменений в среде института;
- выявляет возможные области, требующие улучшения и инноваций;
- определяет и разворачивает стратегию и политику;
- устанавливает и структурирует цели;
- осуществляет менеджмент процессов и ресурсов;
- демонстрирует доверие к своим сотрудникам, что ведет к росту мотивации, приверженности и вовлеченности;
- устанавливает взаимовыгодные отношения с поставщиками и другими партнерами.

Инструментарий оценки предполагает пять уровней зрелости системы менеджмента организации. Общая характеристика уровней зрелости системы менеджмента приведена в табл. 1.

Т а б л и ц а 1

Классификация уровней зрелости		
№	Наименование уровня	Общая характеристика уровня
1	Базовый уровень системы менеджмента	Система менеджмента имеет функциональную направленность и основана на процедурах. Планирование несистематическое. Реализуются краткосрочные цели и задачи. Ресурсы распределяются случайным образом. Несистематический менеджмент процессов. Сбор данных для анализа – от случая к случаю. При обнаружении несоответствий проводится коррекция. Достижение результатов носит случайный характер
2	Система менеджмента качества (СМК) соответствует требованиям ИСО 9001	СМК основана на процессном подходе. Определяются потребности и ожидания потребителей, оценивается их удовлетворенность. Политика преобразуется в цели и задачи для различных уровней с учетом запросов потребителей и законодательных требований. Внедрен процесс планирования ресурсов. Определены ключевые процессы, осуществляется их менеджмент. Проводится регулярный анализ результативности процессов. Планируются корректирующие действия с целью предотвращения повторения проблем

¹ ГОСТ Р ИСО 9004-2010 Менеджмент для достижения устойчивого успеха организации. Подход на основе менеджмента качества. М.: Стандартинформ, 2011: 46.

№	Наименование уровня	Общая характеристика уровня
3	Зрелая система менеджмента	Система управления основана на восьми принципах менеджмента качества. Потребности и ожидания потребителей, персонала и заинтересованных сторон анализируются и удовлетворяются (когда это практически возможно). Планирование охватывает и долгосрочные цели с учетом меняющихся внешних тенденций. Оценивается ход работ по достижению стратегических целей, принимаются соответствующие меры. Проводится периодический анализ пригодности ресурсов, инфраструктуры, производственной среды и процессов с учетом долгосрочных целей. Персоналу определены четкие задачи, разработана система повышения квалификации. Периодически проводятся оценки рисков. Анализируются результативность и эффективность процессов, проводятся мероприятия по повышению их эффективности, процессы дают прогнозируемые результаты. Отмечается последовательное повышение эффективности за последние несколько лет
4	Расширенная система менеджмента	Эффективная система менеджмента с включением других аспектов, обеспечивающая маневренность и совершенствование. Потребности и ожидания заинтересованных сторон служат основой для принятия решений. Процессы направлены на удовлетворение потребностей конкретных заинтересованных сторон. Ключевые показатели увязаны со стратегией и используются для мониторинга. Разработаны планы по снижению рисков. Существует постоянно совершенствуемая культура обучения и совместного использования знаний. Последовательные, позитивные, прогнозируемые результаты с устойчивыми тенденциями. Организация ориентирована на постоянное совершенствование
5	Наилучшая практика	Система менеджмента обеспечивает полное развертывание политики организации. Достигнутые показатели выше средних по отрасли в течение длительного времени. Улучшения и инновации осуществляются на всех уровнях

В результате анализа данных, полученных при проведении стартовой оценки по ключевым и детализированным элементам системы менеджмента, установлен второй уровень зрелости системы менеджмента ННИИТиО, то есть система менеджмента качества полностью соответствует требованиям стандарта ИСО 9001 в представленной модели.

3. Выявлены факторы, необходимые для использования при управлении организацией и являющиеся критичными для устойчивого успеха, такие как:

- наличие установленных измеримых целей организации, а также установленных ключевых показателей деятельности, направленных на достижение целей организации;
- наличие установленных требований к ключевым и вспомогательным процессам организации;
- наличие системы сбора информации и анализа потребностей потребителей, персонала и других заинтересованных сторон, использование результатов анализа при планировании реконструкции процессов организации;
- периодический анализ пригодности ресурсов, инфраструктуры, производственной среды и процессов с учетом долгосрочных целей;
- определение ответственности и полномочий персонала, постановка персоналу четких задач, разработка показателей результативности деятельности персонала и на их основе разработка системы мотивации, создание системы повышения квалификации и обучения персонала;

- внедрение системы непрерывного улучшения, основанной на сборе и анализе информации о функционировании процессов, их эффективности и возможных рисках, планировании и внедрении корректирующих и предупреждающих действий с обязательной оценкой их результативности;

- наличие системы оценки степени достижения целей организации и применения процессов улучшений

4. Разработаны направления для улучшения системы менеджмента ННИИТиО для повышения уровня зрелости системы менеджмента, чем тот, который получен при проведении экспертной оценки. Включают:

- изучение и анализ потребностей и ожиданий всех заинтересованных сторон на постоянной основе;
- внедрение процессов риск-менеджмента на постоянной основе, планирование действий для снижения всех выявленных рисков;
- внедрение структурированного процесса выработки стратегии, политики и целей с учетом потребностей всех заинтересованных сторон, а также потенциальных угроз, возможностей и рисков;
- определение измеримых целей для каждого процесса, согласующихся со стратегией, разработка системы мониторинга и оценки ключевых показателей результативности, с целью достижения запланированных результатов;
- создание системы мотивации на выполнение поставленных целей и задач;

– разработка и внедрение процессов совершенствования, результаты которых направлены на повышение эффективности деятельности организации;

– систематическая оценка результативности и эффективности инновационных процессов, разработка планов предупреждающих действий для минимизации рисков, связанных с инновационной деятельностью;

– формирование системы обучения, включающей компетентность отдельных работников и компетентность организации в целом, служащей основой процессов улучшений и инноваций.

На основе результатов анализа деятельности научно-исследовательского учреждения здравоохранения, оказывающего высокотехнологичную медицинскую помощь с учетом современных подходов к менеджменту и лучших российских и

зарубежных практик, адаптированных к деятельности в области здравоохранения, разработана модель системы управления устойчивым развитием научно-исследовательского учреждения здравоохранения, основанная на принципах всеобщего управления качеством (рис.). Данная модель представляет собой установленное взаимодействие макропроцессов системы управления – как внутренних (управление устойчивым развитием; управление ключевыми процессами – процессом оказания медицинской помощи, научно-исследовательским и образовательным процессами; менеджмент ресурсов; ресурсное обеспечение; ключевой процесс – процесс оказания медицинской помощи), так и внешних (связь с органами управления здравоохранения, поставщиками, потребителями, с другими медицинскими организациями).

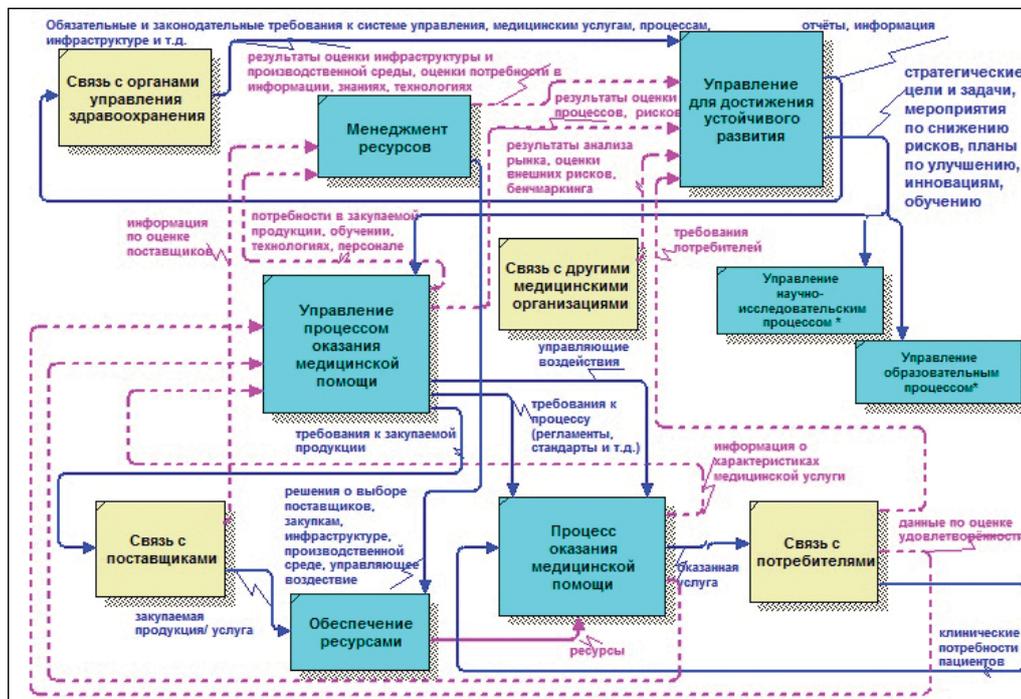


Рисунок. Модель системы управления устойчивым развитием научно-исследовательского учреждения здравоохранения
 Figure. Model of the system for managing the sustainable development of a health research

Нами проведена декомпозиция всех макропроцессов, входящих в состав данной модели, до уровня процессов, подпроцессов, этапов и, где необходимо, операций процессов. На все ключевые и обеспечивающие процессы были разработаны регламенты (порядки осуществления деятельности), в которых определены необходимые для осуществления деятельности входные данные, документация, регламентирующая процесс, ответственные за осуществление различных функций процесса, требования к результатам

процесса, временные параметры и подробный порядок действий при осуществлении каждого этапа процесса, вплоть до пошагового описания. Установлена ответственность за все операции процессов и параметры оценки процесса. В настоящее время в институте функционирует около 150 внутренних документов различного уровня, устанавливающих требования к процессам организации.

Процессный и системный подходы к управлению являются ключевыми принципами

разработанной нами системы управления устойчивым развитием научно-исследовательского учреждения здравоохранения. На основании эксперимента по внедрению модели устойчивого развития в федеральном научно-исследовательском учреждении, оказывающем высокотехнологическую медицинскую помощь в области

травматологии, ортопедии и нейрохирургии, проведена оценка ее эффективности. Оценка эффективности модели проводили эксперты, прошедшие обучение по вопросам устойчивого развития, которые ежегодно в течение пяти лет (2012–2016 гг.) оценивали работу ННИИТиО по ключевым и развернутым элементам системы (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Оценка эффективности применения модели устойчивого развития в научно-исследовательском учреждении здравоохранения, оказывающем высокотехнологическую медицинскую помощь, балл

Период	Уровень зрелости организации	Уровень зрелости ключевых элементов					
		Менеджмент для достижения устойчивого успеха организации	Стратегия и политика	Менеджмент ресурсов	Менеджмент процессов	Мониторинг, измерение, анализ и изучение	Улучшение, инновации и обучение
2012	II	3,00	2,67	2,88	3	2,67	3,00
2013	II	3,50	3,01	3,00	3,5	2,83	3,00
2014	III	3,75	3,17	3,63	4	3,55	3,93
2015	III	4,00	3,44	4,00	5	4,26	4,10
2016	IV	4,15	4,00	4,37	5	4,73	4,50
Максимальное значение показателя	V	5	5	5	5	5	5

В результате применения авторской модели управления ключевые элементы «Менеджмент для достижения устойчивого успеха организации», «Стратегия и политика», «Менеджмент ресурсов», «Мониторинг, измерение, анализ и изучение», «Улучшение, инновации и обучение» достигли четвертого уровня зрелости, а «Менеджмент процессов» может быть рекомендован как лучшая практика (пятый уровень зрелости) благодаря долгосрочному успешному внедрению системы менеджмента качества.

Кроме того, эффективность модели подтверждается улучшением основных показателей деятельности института. Так, положительная динамика наблюдается при оценке удовлетворенности потребителей. Наблюдается значительное повышение удовлетворенности пациентов организацией консультативного приема, услуг диагностики, медицинской помощи в стационаре и питанием, а также стабилизация этих показателей в последние годы (90–95% по различным разделам).

Отмечается также устойчивая тенденция к снижению количества выявленных при внутренних аудитах несоответствий в процессах, по которым проводятся соответствующие корректирующие действия с последующей оценкой их эффективности. Достигнутый показатель результативности проводимых корректирующих действий составил 85%.

Положительные результаты применения представленных подходов подтверждаются также улучшением основных показателей деятельности института (количество пролеченных больных увеличилось более чем в два раза).

ВЫВОДЫ

Таким образом, внедрение системы менеджмента качества, постоянное ее поддержание в течение 15 лет, а также трансформация ее в систему менеджмента устойчивого развития позволили улучшить все основные показатели деятельности ННИИТиО. Положительные итоги подтверждаются результатами самооценки системы менеджмента по ключевым элементам, то есть определению уровня зрелости системы и ощутимое повышение данного уровня в период внедрения системы устойчивого развития со второго до четвертого уровня (расширенная система управления).

Разработанная система оценки позволяет руководителю:

- проверять правильность принимаемых решений для реализации концепции устойчивого развития организации;
- своевременно выявлять зоны риска снижения темпов устойчивости развития медицинской организации;
- прогнозировать эффект от внедрения организационных улучшений и инноваций;

– определять приоритеты оптимизации внутренних процессов медицинской организации в зависимости от их влияния на долгосрочную стратегию развития;

– дает возможность оценки устойчивости отдельных элементов системы.

Для менеджеров медицинской организации важно понимать, что сертификация по стандарту ИСО 9001-2008 не является конечным звеном развития системы управления, стандарт ИСО 9004-2010 позволяет более широко охватить ключевые бизнес-процессы, постоянно их совершенствовать, организовывать персонал для слаженной командной работы, что, в свою очередь, приведет к долгосрочному устойчивому развитию.

Данные материалы являются результатами V международного форума «Инновации в медицине: Индустрия 4.0. Медицинская техносфера» и III международного форума «Общественное здоровье: организация, менеджмент, право – перспективы развития», мероприятий-спутников форума технологического развития «Технопром-2017».

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Alharbi T.S.J., Ekman I., Olsson L.-E., Dudas K., Carlström E. Organizational culture and the implementation of person centered care: Results from a change process in Swedish hospital care // *Health Policy*. 2012; 108 (2–3): 294–301. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healthpol.2012.09.003>.
- Ang D., McKenney M., Norwood S., Kurek S., Kimbrell B., Liu H., Ziglar M., Hurst J. Benchmarking statewide trauma mortality using Agency for Healthcare Research and Quality's patient safety indicators // *Journal of Surgical Research*. 2015; 198: 34–40. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2015.05.053>.
- Antoniou C., Barcelo J., Breen M., Bullejos M., Casas J., Cipriani E., Ciuffo B., Djukic T., Hoogendoorn S., Marzano V., Montero L., Nigro M., Perarnau J., Punzo V., Toledo T., van Lint H. Towards a generic benchmarking platform for origin–destination flows estimation/updates algorithms: Design, demonstration and validation // *Transportation Research Part C: Emerging Technologies*. 2016; 66: 79–98. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trc.2015.08.009>.
- Aslan I., Çınar O., Özen Ü. Developing Strategies for the Future of Healthcare in Turkey by Benchmarking and SWOT Analysis // *Procedia – Social and Behavioral Sciences*. 2014; 150: 230–240. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbspro.2014.09.043>.
- Ceric A., D'Alessandro S., Soutar G., Johnson L. Using blueprinting and benchmarking to identify marketing resources that help co-create customer value // *Journal of Business Research*. 2016; 69: 5653–5661. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbusres.2016.03.073>.
- Slack C.W., Slack W.V. The United Countries of America: Benchmarking the Quality of US Health Care // *Mayo Clinic Proceedings*. 2011; 86: 788–790. DOI: <http://dx.doi.org/10.4065/mcp.2011.0311>.
- Veillard J., McKeag A.M., Tipper B., Krylova O., Reason B. Methods to stimulate national and sub-national benchmarking through international health system performance comparisons: A Canadian approach // *Health Policy*. 2013; 112: 141–147. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healthpol.2013.03.015>.
- Берри А., Селтман К. Практика управления Mayo Clinic. Уроки лучшей в мире сервисной организации; пер. с англ. А. Козлова. М.: Манн, Иванов и Фербер; Эксмо, 2013: 384.
- Berry L.L., Seltman K.D. Praktika upravleniya Mayo Clinic. Uroki luchshei v mire servisnoi organizatsii [Management Lessons from Mayo Clinic: Inside One of the World's Most Admired Service Organizations]; per. s angl. A. Kozlova. M.: Mann, Ivanov i Ferber Publ.; Eksmo Publ., 2013; 384 (in Russian).
- Латуха О.А. Проблема эффективности управления качеством в медицинской организации: международный аспект // *Вестник Новосибирского государственного педагогического университета*. 2017; (1): 230–245.
- Latuha O.A. The problem of quality management effectiveness within healthcare organizations: an international aspect [The problem of quality management effectiveness within healthcare organizations: an international aspect] // *Novosibirsk State Pedagogical University Bulletin – Novosibirsk State Pedagogical University Bulletin*. 2017; 1: 230–245 (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.15293/2226-3365.1701.16>.
- Мурашко М.А., Шарикадзе Д.Т., Кондратьев Ю.А. Современные подходы к качеству медицинской помощи // *ОРГЗДРАВ: новости, мнения, обучение*. 2016; 2 (4): 37–42.
- Murashko M.A., Sharikadze D.T., Kondrat'ev Yu.A. Sovremennye podkhody k kachestvu meditsinskoj pomoshchi [Modern approaches to quality medical care] // *ORG-ZDRAV: novosti, mneniya, obuchenie*. 2016; 2 (4): 37–42 (in Russian).
- Ракич С., Стевич С., Мартинович Д., Джудурович А. Важность обучения менеджеров при внедрении стандартов качества и безопасности в медицинские организации: опыт Республики Сербской // *Вестник Росздравнадзора*. 2015; (3): 39–43.
- Rakich S., Stevich S., Martinovich D., Dzhudurovich A. Vazhnost' obucheniya menedzherov pri vnedrenii standartov kachestva i bezopasnosti v meditsinskie organizatsii: opyt Respubliki Serbskoi [The importance of training managers in the implementation of standards of quality and safety in medical offices: experience of the Republic Srpska] // *Vestnik Roszdravnadzora*. 2015; 3: 39–43 (in Russian).
- Бедорева И.Ю., Садовой М.А., Пелеганчук В.А., Стрыгин А.В., Добров П.С. Внедрение системы управления качеством медицинской помощи в федеральном

- учреждении здравоохранения // *Здравоохранение Российской Федерации*. 2008; (5): 10–13.
- Bedoreva I.Yu., Sadovoi M.A., Peleganchuk V.A., Strygin A.V., Dobrov P.S. Vnedrenie sistemy upravleniya kachestvom meditsinskoj pomoshchi v federal'nom uchrezhdenii zdравookhraneniya [Introduction of a medical aid quality control system in a federal health care facility] // *Zdravookhranenie Rossijskoj Federatsii – Public Health of the Russian Federation*. 2008; 5: 10–13 (in Russian).
13. Садовой М.А., Бедорева И.Ю. Применение идеологии международных стандартов ИСО серии 9000 в создании системы управления качеством медицинской помощи // *Медицинское право*. 2008; (1): 34–35.
- Sadovoi M.A., Bedoreva I.Yu. Primenenie ideologii mezhdunarodnykh standartov ISO serii 9000 v sozdanii sistemy upravleniya kachestvom meditsinskoj pomoshchi [The application of the ideology of international standards ISO series 9000 in the creation of the quality management system of medical care] // *Meditsinskoe pravo*. 2008; 1: 34–35 (in Russian).
14. Alzhrani A.I., Alzhrani A., Alfarraj O. An integrated model of technology and total quality management for public health sector organizations // *Journal of Medical Imaging and Health Informatics*. 2016; 6 (6): 1435–1439. DOI: <http://dx.doi.org/10.1166/jmih.2016.1827>.
15. Мухтасарова Т.Р., Погонин А.В., Тяжелников А.А., Колосов Л.Л. Внедрение системы менеджмента качества в амбулаторно-поликлиническом объединении (пилотный проект в условиях новой организационной формы) // *Вестник Росздравнадзора*. 2013; (4): 43–46.
- Mukhtasarova T.R., Pogonin A.V., Tyazhel'nikov A.A., Kolosov L.L. Vnedrenie sistemy menedzhmenta kachestva v ambulatorno-poliklinicheskom ob"edinenii (pilotnyi proekt v usloviyakh novoi organizatsionnoi formy) [Introduction of system of quality management in outpatient Association (a pilot project in the context of new organizational forms)] // *Vestnik Roszdravnadzora*. 2013; 4: 43–46 (in Russian).
16. Гусева С.Л., Горохова И.В. Роль системы управления качеством в повышении удовлетворенности потребителей и улучшении показателей деятельности многопрофильной поликлиники // *Управление качеством в здравоохранении*. 2014; (3): 38–42.
- Guseva S.L., Gorokhova I.V. Rol' sistemy upravleniya kachestvom v povyshenii udovletvorennosti potrebitelei i uluchshenii pokazatelei deyatelnosti mnogoprofil'noi polikliniki [The role of the quality management system to increase customer satisfaction and improve performance of multi-field health clinic] // *Upravlenie kachestvom v zdравookhranении*. 2014; 3: 38–42 (in Russian).
17. Матыцин Н. О., Баранов А. И. Использование современных подходов к менеджменту качества для создания системы управления качеством медицинской помощи // *Вестник Росздравнадзора*. 2015; (3): 44–49.
- Matytsin N.O., Baranov A.I. Ispol'zovanie sovremennykh podkhodov k menedzhmentu kachestva dlya sozdaniya sistemy upravleniya kachestvom meditsinskoj pomoshchi [Use of modern approaches to quality management for creating a quality management system for medical care] // *Vestnik Roszdravnadzora*. 2015; 3: 44–49.
18. Nuti S., Seghieri C. Is variation management included in regional healthcare governance systems? Some proposals from Italy // *Health Policy*. 2014; 114 (1): 71–78. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healthpol.2013.08.003>.
19. Князюк Н.Ф., Кицул И.С. Методология построения интегрированной системы менеджмента медицинских организаций. М.: Издательский дом «Менеджер здравоохранения», 2013: 312.
- Knyazyuk N.F., Kitsul I.S. Metodologiya postroeniya integrirovannoi sistemy menedzhmenta meditsinskikh organizatsii [The methodology of the integrated management system of healthcare organizations]. М.: Izdatel'skii dom Menedzher zdравookhraneniya Publ., 2013: 312 (in Russian).
20. Barocas D.A., Kulahalli C.S., Ehrenfeld J.M., Kapu A.N., Penson D.F., You C., Weavind L., Dmochowski R. Benchmarking the use of a rapid response team by surgical services at a tertiary care hospital // *Journal of the american college of surgeons*. 2013; 218: 66–72. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2013.09.011>.
21. Goldman E., Dudley A. United States rural hospital quality in the Hospital Compare database – Accounting for hospital characteristics // *Health Policy*. 2008; 1: 112–127. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healthpol.2008.02.002>.
22. Латуха О.А. Технология бенчмаркинга как фактор устойчивого развития медицинской организации // *Вестник Новосибирского государственного педагогического университета*. 2016; (5): 218–231.
- Latuha O.A. Benchmarking technology as a factor of sustainable development of healthcare organizations [Benchmarking technology as a factor of sustainable development of healthcare organizations] // *Novosibirsk State Pedagogical University Bulletin – Novosibirsk State Pedagogical University Bulletin*. 2016; 5: 218–231 (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.15293/2226-3365.1605.16>.
23. Лудупова Е.Ю., Денисова М.А. Обеспечение безопасности медицинской помощи в многопрофильном стационаре через внедрение системы менеджмента качества // *Здравоохранение*. 2015; (3): 78–85.
- Ludupova E.Yu., Denisova M.A. Obespechenie bezopasnosti meditsinskoj pomoshchi v mnogoprofil'nom stacionare cherez vnedrenie sistemy menedzhmenta kachestva [Security medical assistance in a multidisciplinary hospital through the implementation of quality management system] // *Zdravookhranenie*. 2015; 3: 78–85 (in Russian).
24. Лудупова Е.Ю., Денисова М.А., Дугарова Р.В. Применение методики проектного управления при внедрении системы менеджмента качества в многопрофильном стационаре // *Здравоохранение*. 2015; (9): 74–81.
- Ludupova E.Yu., Denisova M.A., Dugarova R.V. Primenenie metodiki proektnogo upravleniya pri vnedrenii sistemy

- menedzhmenta kachestva v mnogoprofil'nom stacionare [The application of the methods of project management in the implementation of the quality management system in a multidisciplinary hospital] // *Zdravookbraniye*. 2015; 9: 74–81 (in Russian).
25. Wardhani V., Utarini A., van Dijk J. P., Post D., Groothoff J. W. Determinants of quality management systems implementation in hospitals // *Health Policy*. 2009; 89 (3): 239–251. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healthpol.2008.06.008>.
26. Лудупова Е.Ю., Денисова М.А. Внутренний аудит как один из инструментов управления медицинской организацией // *Вестник Росздравнадзора*. 2014; (6): 9–11.
- Ludupova E.Yu., Denisova M.A. Vnutrennii audit kak odin iz instrumentov upravleniya meditsinskoj organizatsiei [Internal audit as a tool for the management of medical organization] // *Vestnik Roszdravnadzora*. 2014; 6: 9–11 (in Russian).
27. Артамонова Г.В., Костомарова Т.С., Крючков Д.В., Черкасс Н.В. Результативность системы менеджмента качества НИИ КПССЗ СО РАМН в 2012 году. Политика в области качества и стратегические цели 2013 года // *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2013; (2): 51–57.
- Artamonova G.V., Kostomarova T.S., Kryuchkov D.V., Cherkass N.V. Rezul'tativnost' sistemy menedzhmenta kachestva NII KPSSZ SO RAMN v 2012 godu. Politika v oblas-ti kachestva i strategicheskie tseli 2013 goda [The result of the quality management system in NII KPSSZ SO the RAN in 2012. Policy in the field of quality and strategic objective 2013] // *Комплексные проблемы сердечно-сосудистыkh zabolevanii*. 2013; (2): 51–57 (in Russian).
28. Бедорева И.Ю., Садовой М.А., Стрыгин А.В., Садовая Т.Н., Добров П.С. Результаты внедрения менеджмента качества в федеральном учреждении здравоохранения Сибирский научный медицинский журнал. 2008; 28 (4): 89–97.
- Bedoreva I.Yu., Sadovoi M.A., Strygin A.V., Sadovaya T.N., Dobrov P.S. Rezul'taty vnedreniya menedzhmenta kachestva v federal'nom uchrezhdenii zdravookhraneniya [The results of implementing quality management in a Federal institution of health] // *Sibirskii nauchnyi meditsinskii zburnal*. 2008; 28 (4): 89–97 (in Russian).
29. Бедорева И.Ю., Фомичев Н.Г., Садовой М.А., Самарина В.Ю. Роль принципов всеобщего менеджмента качества в управлении федеральным учреждением здравоохранения // *Хирургия позвоночника*. 2006; (4): 75–83.
- Bedoreva I.Yu., Fomichev N.G., Sadovoi M.A., Samarina V.Yu. Rol' printsipov vseobshchego menedzhmenta kachestva v upravlenii federal'nym uchrezhdeniem zdravookhraneniya [Requirements in Administration of Federal Health Institution] // *Khirurgiya pozvonochnika – Journal of Spine Surgery*. 2006; (4): 75–83 (in Russian).
30. Adjei E., Mensah M. Adopting total quality management to enhance service delivery in medical records Exploring the case of the Korle-Bu Teaching Hospital in Ghana // *Records Management Journal*. 2016; 26 (2): P. 140–169. DOI: <http://dx.doi.org/10.1108/RMJ-01-2015-0009>.
31. Ingason H.T. Best Project Management Practices in the Implementation of an ISO 9001 Quality Management System // *Procedia – Social and Behavioral Sciences*. 2015; 194: 192–200. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbspro.2015.06.133>.
32. Jakkala L., Miraj M. On the role of clinical total quality management in clinical research and health care // *Bio-science biotechnology research communications*. 2015; 8 (2): 133–137. WOS: 000367190400007.
33. Jarrett J.E. Total quality management (TQM) movement in public health // *International Journal of Quality & Reliability Management*. 2016; 33 (1): 25–41. DOI: <http://dx.doi.org/10.1108/IJQRM-12-2013-0193>.
34. Tari J.J., Sabater V. Quality tools and techniques: Are they necessary for quality management? // *International Journal of Production Economics*. 2004; 92 (3): 267–280. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpe.2003.10.018>.
35. Van der Wees P.J., Nijhuis-van der Sanden M.W. G., van Ginneken E., Ayanian J.Z., Schneider E.C., Westert G.P. Governing healthcare through performance measurement in Massachusetts and the Netherlands // *Health Policy*. 2014; 116 (1): 18–26. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healthpol.2013.09.009>.
36. Van Schoten S., de Blok C., Spreeuwenberg P., Groenewegen P., Wagner C. The EFQM Model as a framework for total quality management in healthcare Results of a longitudinal quantitative study // *International Journal of Operations & Production Management*. 2016; 36 (8): 901–922. DOI: <http://dx.doi.org/10.1108/IJOPM-03-2015-0139>.
37. Jankalová M. Conceptions Based on Definition of Business Factors of Successfulness for the Support of Reaching the Excellence of Enterprise Subjects // *Procedia - Social and Behavioral Sciences*. 2013; 81: 531–535. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbspro.2013.06.472>.
38. Бедорева И.Ю., Шалыгина Л.С., Казаков Р.А., Соколов С.В., Латуха О.А., Гусев А.Ф. Основные пути решения проблем кадровой политики в концепции устойчивого развития медицинской организации // *Современные проблемы науки и образования*. 2016; (6): 33.
- Bedoreva I.Yu., Shalygina L.S., Kazakov R.A., Sokolov S.V., Latukha O.A., Gusev A.F. Osnovnye puti resheniya problem kadrovoy politiki v kontseptsii ustoichivogo razvitiya meditsinskoj organizatsii [Solving the problems concerning staff policy in the concept of sustainable development of medical organization today] // *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016; (6): 33 (in Russian).
39. Латуха О.А., Бедорева И.Ю., Шалыгина Л.С. От системы менеджмента качества к менеджменту устойчивого развития медицинской организации Медицина и образование в Сибири. 2015; (3): 109.
- Latukha O.A., Bedoreva I.Yu., Shalygina L.S. Ot sistemy menedzhmenta kachestva k menedzhmentu ustoichivogo

- razvitiya meditsinskoj organizatsii [From quality management system to the sustainable development management of medical organization] // *Meditsina i obrazovanie v Sibiri*. 2015; 3: 109 (in Russian).
40. Садовой М.А., Бедорева И.Ю., Головки Е.А., Шальгина Л.С., Комисарова Т.В., Гусев А.Ф. Подходы к созданию системы устойчивого развития в научно-исследовательском учреждении здравоохранения травматолого-ортопедического профиля // *Хирургия позвоночника*. 2012; (1): 89–97.
- Sadovoi M.A., Bedoreva I.Yu., Golovko E.A., Shalygina L.S., Komisarova T.V., Gusev A.F. Podkhody k sozdaniyu sistemy ustoichivogo razvitiya v nauchno-issledovatel'skom uchrezhdenii zdravookhraneniya travmatologo-ortopedicheskogo profilya [Approaches to Formation of Sustainable Development System in a Public Health Research Institution Specialized in Traumatology and Orthopaedics] // *Khirurgiya pozvonochnika – Journal of Spine Surgery*. 2012; 1: 89–97 (in Russian).
41. Шальгина Л.С., Садовой М.А., Финченко Е.А., Бедорева И.Ю. Стандартизация как основа обеспечения качественной высокотехнологичной медицинской помощи для устойчивого развития медицинской организации // *Сибирское медицинское обозрение*. 2013; 6 (84): 87–91.
- Shalygina L.S., Sadovoi M.A., Finchenko E. ., Bedoreva I.Yu. Standartizatsiya kak osnova obespecheniya kachestven-
- noi vysokotekhnologichnoi meditsinskoj pomoshchi dlya ustoichivogo razvitiya meditsinskoj organizatsii [Standardization as a basis for quality hightech health care for the stable development of medical organization] // *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie*. 2013; 6: 87–91 (in Russian).
42. Бедорева И.Ю. Внутренний аудит – инструмент управления процессом оказания специализированной медицинской помощи // *Хирургия позвоночника*. 2008; (2): 80–87.
- Bedoreva I.Yu. Vnutrennii audit – instrument upravleniya protsessom okazaniya spetsi-alizirovannoi meditsinskoj pomoshchi [Internal audit as a process management tool for providing specialized medical care] // *Khirurgiya pozvonochnika – Journal of Spine Surgery*. 2008; (2): 80–87 (in Russian).
43. Бедорева И.Ю., Садовая Т.Н., Стрыгин А.В., Стрыгина Т.А. Применение процессного подхода в системе управления качеством медицинской помощи // *Хирургия позвоночника*. 2007; (4): 62–72.
- Bedoreva I.Yu., Sadovaya T.N., Strygin A.V., Strygina T.A. Primenenie protsessnogo podkhoda v sisteme upravleniya kachestvom meditsinskoj pomoshchi [Application of Process Approach in a System of Medical Assistance Quality Management] // *Khirurgiya pozvonochnika – Journal of Spine Surgery*. 2007; 4: 62–72 (in Russian).

Поступила в редакцию 05.09.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Бедорева Ирина Юрьевна, д-р мед. наук, зам. гл. врача по качеству, ННИИТиО им. Я.Л. Цивьяна; профессор, кафедра организации здравоохранения и общественного здоровья, НГМУ, г. Новосибирск.

Шальгина Лада Станиславовна, канд. мед. наук, зам. директора по организационно-методической работе, ННИИТиО им. Я.Л. Цивьяна; доцент, кафедра организации здравоохранения и общественного здоровья, НГМУ, г. Новосибирск.

Латуха Ольга Александровна, канд. экон. наук, доцент, кафедра организации здравоохранения и общественного здоровья, НГМУ, г. Новосибирск.

(✉) Латуха Ольга Александровна, e-mail: latucha@mail.ru.

УДК 614.2:001.89

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-269–279

For citation: Bedoreva I.Yu., Shalygina L.S., Latukha O.A. A model of sustainable development of scientific research health institutions, providing high-tech medical care. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 269–279.

A model of sustainable development of scientific research health institutions, providing high-tech medical care

Bedoreva I.Yu.^{1,2}, Shalygina L.S.^{1,2}, Latukha O.A.²

¹ *Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics (NRITO)*
17, Frunze Str., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

² *Novosibirsk State Medical University (NSMU)*
52, Krasnyi Av., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

ABSTRACT

The issue of sustainability is relevant for all types of businesses and organizations. Long-term development has always been and remains one of the most difficult tasks faced by organizations. The implementation the provisions of international standards ISO series 9000 has proven to be effective. The ISO standards are concentrated on the global experience for sustainable success of organizations. The standards incorporated all the rational that has been accumulated in this field of knowledge and practice. These standards not only eliminate technical barriers in collaboration and have established standardized approaches, but also serve as a valuable source of international experience and ready management solutions. They became a practical guide for the creation of management systems for sustainable development in organizations of different spheres of activity.

Problem and purpose. The article presents the author's approach to the problem of sustainable development health of the organization. The purpose of this article is to examine the approaches to management for sustainable success of organizations and to describe a model of sustainable development applied in research healthcare institutions providing high-tech medical care.

Methodology. The study used general scientific methods of empirical and theoretical knowledge, general logical methods and techniques and methods of system analysis, comparison, analogy, generalization, the materials research for the development of medical organizations.

The main results of our work are to first develop the technique of complex estimation of activity of the scientific-research institutions of health and deploy key elements of the management system that allows the level of maturity of the management system of the institution to be set in order to identify its strengths and weaknesses, and to identify areas for improvements and innovation, and to set priorities for determining the sequence of action when implementing process improvement. Factors required for use in the management of the organization are critical to sustainable success.

Conclusion. The authors observed that the implementation of the quality management system, continuous its maintenance for 15 years, and its transformation in the management system of sustainable development has improved all key performance indicators of the Novosibirsk NRITO. Positive results are confirmed by the results of self-evaluation management system for key elements, i.e. the determination of the level of maturity and tangible improvement at this level during the period of implementation of the system of sustainable development from the second to level 4 (advanced control system).

Key words: healthcare organization, key performance indicators (KPI), sustainable development, key success, management by objectives, monitoring, quality management system ISO 9001; ISO 9004.

Received September 05.2017

Accepted November 08.2017

Bedoreva Irina Yu., DM, Deputy Chief Physician on Quality, NRITO; Professor of Public Health Department of Advanced Training, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation.

Shalygina Lada S., PhD, Deputy Director for Organizational and Methodological Work, NRITO; Associate Professor, Department of Public Health and Public Health, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation.

Latukha Olga A., PhD, Associate Professor, Public Health Department of Advanced Training, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) **Latukha Olga A.**, e-mail: latucha@mail.ru.

УДК 614.253.1/.6(571.1/.5)

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-280–286

Для цитирования: Финченко Е.А., Шалыгина Л.С., Садовой М.А., Мамонова Е.В., Шалыгина А.В. Некоторые аспекты кадрового обеспечения здравоохранения в Сибирском федеральном округе. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 280–286.

Некоторые аспекты кадрового обеспечения здравоохранения в Сибирском федеральном округе

Финченко Е.А.¹, Шалыгина Л.С.^{1,2}, Садовой М.А.^{1,2}, Мамонова Е.В.³, Шалыгина А.В.²

¹ Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии (ННИИТиО)
им. Я.А. Цивьяна

Россия, 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

² Новосибирский государственный медицинский университет (НГМУ)

Россия, 630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

³ АО «Инновационный медико-технологический центр (Медицинский технопарк)»

Россия, 630091, г. Новосибирск, Фрунзе, 19а

РЕЗЮМЕ

Введение. Одним из основных национальных постулатов, в том числе и отечественного здравоохранения, считается тезис о том, что кадры решают всё. Вместе с тем в последние годы кадровому обеспечению здравоохранения в научных исследованиях уделяется недостаточно внимания.

Материал и методы. Проведен анализ данных, предоставленных органами управления здравоохранением регионов Сибирского федерального округа (СФО) для подготовки материалов на заседание Координационного совета по здравоохранению Межрегиональной ассоциации «Сибирское соглашение».

Результаты. В целом по СФО показатель обеспеченности населения физическими лицами врачей составляет 36,9 на 10 тыс. населения, что несколько ниже среднероссийского показателя (37,2), показатель обеспеченности населения врачами по занятым должностям – 56,6 на 10 тыс. населения. В большинстве регионов коэффициент совместительства превышает среднероссийский показатель (1,4). В целом по СФО обеспеченность населения врачами в амбулаторно-поликлинической помощи всего на 17,2% больше, чем в стационарной помощи. Укомплектованность врачами достаточно высокая (90,4%), но в значительной мере она достигнута за счет высокого показателя совместительства (1,5). Укомплектованность врачами в амбулаторно-поликлинической помощи на 4,7% ниже, чем в стационарной помощи. При этом более высокая укомплектованность врачами в стационарной помощи обусловлена в значительной мере совместительством (коэффициент совместительства 1,7 и 1,4 соответственно).

Укомплектованность участковыми врачами достаточно высокая и составляет 93,7% при очень низком уровне совместительства (1,1). Укомплектованность врачами-специалистами по СФО также достаточно высокая (89,8%), при этом в значительной мере она достигнута за счет высокого показателя совместительства (1,5). По СФО обеспеченность населения средним медицинским персоналом составляет 124,7 на 10 тыс. населения. Обеспеченность населения средним медицинским персоналом в амбулаторно-поликлинической и стационарной помощи практически одинаковы (56,7 и 56,9 на 10 тыс. населения соответственно). Укомплектованность средним медицинским персоналом достаточно высокая (93,7%), в

✉ Финченко Евгений Александрович, e-mail: EFinchenko@niito.ru.

определенной мере она достигнута за счет совместительства (1,3). При этом укомплектованность средним медицинским персоналом в амбулаторно-поликлинической помощи на 3,6% ниже, чем в стационарной при практически одинаковом уровне совместительства (1,2 и 1,3 соответственно).

Укомплектованность медицинскими сестрами по СФО достаточно высокая (94,4%), в определенной мере она также достигнута за счет совместительства (1,3). При этом укомплектованность средним медицинским персоналом в амбулаторно-поликлинической помощи на 3,6% ниже, чем в стационарной при практически одинаковом уровне совместительства (1,2 и 1,3 соответственно).

В целом по СФО на одного врача клинических специальностей приходится 2,5 занятых должностей медицинской сестры. В стационарной помощи число медицинских сестер на одного врача составляет 3,6, а в амбулаторно-поликлинической – 1,9.

Обсуждение. Представляется более целесообразным говорить не об абсолютном дефиците кадров, а об относительном, который в значительной мере обусловлен диспропорциями в расстановке и использовании кадров.

Заключение. По регионам наибольшее число отклонений от средних значений по СФО выявлено по следующим параметрам: квалификация врачей; обеспеченность средним медицинским персоналом; обеспеченность врачами, в том числе врачами-специалистами и укомплектованность врачами. В кадровом обеспечении во всех регионах СФО отмечается приоритет стационарной помощи над амбулаторно-поликлинической. Достаточно высокая укомплектованность кадрами в значительной мере обусловлена высоким уровнем совместительства, особенно врачей-специалистов. Практически во всех регионах СФО отмечается недостаточно высокий уровень квалификации врачей и среднего медицинского персонала. Во всех регионах СФО отмечается значительный дефицит медицинских сестер при достаточно высоком уровне обеспеченности средним медицинским персоналом в целом.

Ключевые слова: обеспеченность здравоохранения кадрами, Сибирский федеральный округ.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из основных национальных постулатов, в том числе и отечественного здравоохранения, считается тезис о том, что кадры решают всё. На современном этапе здравоохранение рискует попасть в ситуацию, когда врачи, медицинские сестры и фельдшеры будут не в состоянии предоставлять в полном объеме необходимые виды и объемы медицинской помощи населению. Адекватная современным условиям система отбора, подготовки, переподготовки, распределения и перераспределения медицинских кадров является одним из самых важных условий обеспечения населения качественной и доступной медицинской помощью. Проблемы организации и реализации кадровой политики здравоохранения исследованы достаточно поверхностно и нуждаются в более глубоком изучении. Вместе с тем в последние годы кадровому обеспечению здравоохранения в научных исследованиях уделяется недостаточно внимания [1–11].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Чтобы оценить ситуацию с обеспечением кадрами в субъектах Российской Федерации, вхо-

дящих в состав Сибирского федерального округа (СФО), проведен сравнительный анализ данных, предоставленных органами управления здравоохранением для подготовки материалов на заседание Координационного совета по здравоохранению Межрегиональной ассоциации «Сибирское соглашение» «Кадровое обеспечение системы здравоохранения: проблемы и перспективы» (г. Томск, 2 ноября 2016 г.).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенный анализ показал, что в пяти регионах СФО абсолютное число врачей более чем в два раза превышает число врачей в остальных семи регионах. В целом по СФО показатель обеспеченности населения физическими лицами врачей составляет 36,9 на 10 тыс. населения, что несколько ниже среднероссийского показателя (37,2). В Республике Хакасия этот показатель значительно ниже, чем в среднем по СФО и России.

В отличие от медицинских вузов, которые готовят врачей – физических лиц, министерства здравоохранения должны в большей степени интересоваться показателями обеспеченности населения врачами по занятым должностям. И здесь имеются большие отличия как по регионам, так и СФО

в целом. Так, показатель обеспеченности населения врачами по занятым должностям составляет 56,6 на 10 тыс. населения. При этом необходимо отметить, что в республиках Бурятия и Хакасия этот показатель значительно ниже, чем в среднем по СФО.

В Томской области, республиках Алтай, Бурятия и Тыва доля врачей, имеющих высшую и первую квалификационные категории, значительно ниже средних значений по СФО.

В Томской области в целом по амбулаторно-поликлинической и стационарной помощи показатель укомплектованности врачами значительно ниже средних значений по регионам СФО (43,3%). В большинстве регионов коэффициент совместительства превышает среднероссийский показатель (1,4). В Алтайском крае, Иркутской и Кемеровской областях коэффициент совместительства врачей значительно превышает средние значения по регионам СФО (1,5). В Алтайском крае и Кемеровской области по стационарной помощи этот показатель значительно превышает средние значения по регионам СФО.

В Алтайском и Забайкальском краях укомплектованность участковыми врачами существенно ниже, чем в среднем по СФО (93,7%). В Кемеровской области коэффициент совместительства участковых врачей значительно превышает средние значения показателя по СФО (1,1).

В Томской области укомплектованность врачами-специалистами по амбулаторно-поликлинической и стационарной помощи значительно ниже средних значений по СФО (89,8%). В Алтайском крае, Томской, Кемеровской и Иркутской областях по амбулаторно-поликлинической и стационарной помощи коэффициент совместительства врачей-специалистов значительно превышает средние значения по СФО (1,7).

В Томской области по амбулаторно-поликлинической и стационарной помощи укомплектованность врачами клинических специальностей значительно ниже средних значений по СФО (90,6%). В Иркутской области в целом коэффициент совместительства врачей клинических специальностей значительно превышает средние значения показателя по СФО (1,5). В Кемеровской и Иркутской областях по амбулаторно-поликлинической помощи этот показатель значительно превышает средние значения по СФО. В Алтайском крае, Кемеровской области и Республике Тыва по стационарной помощи показатель превышает средние значения по СФО.

В республиках Хакасия, Бурятия, Томской, Новосибирской областях и Забайкальском крае

в целом обеспеченность средним медицинским персоналом значительно ниже средних значения показателя по СФО (124,7). В Новосибирской области по стационарной помощи этот показатель значительно ниже средних значений по СФО.

В республиках Алтай, Тыва, Хакасия и Иркутской области в целом доля среднего медицинского персонала, имеющего высшую и первую квалификационные категории, значительно ниже средних значений по СФО (46,6).

В Томской области в целом по амбулаторно-поликлинической и стационарной помощи укомплектованность средним медицинским персоналом значительно ниже средних значений по СФО. В Иркутской и Кемеровской областях в целом коэффициент совместительства среднего медицинского персонала значительно превышает средние значения показателя по СФО (1,3). В Иркутской области по амбулаторно-поликлинической помощи этот показатель значительно превышает средние значения по СФО. В Алтайском крае, Иркутской, Кемеровской и Томской областях по стационарной помощи показатель значительно превышает средние значения по СФО.

В Томской области в целом по амбулаторно-поликлинической и стационарной помощи укомплектованность медицинскими сестрами ниже средних значений по СФО (94,4%).

В Кемеровской области в целом коэффициент совместительства медицинских сестер значительно превышает средние значения показателя по СФО (1,3). В Алтайском крае, Иркутской и Кемеровской областях по стационарной помощи этот показатель значительно превышает средние значения по СФО.

Отдельно следует остановиться на показателе обеспеченности врачей медицинскими сестрами. В Новосибирской и Томской областях в целом число медицинских сестер на одного врача клинических специальностей значительно ниже средних значений показателя по СФО (2,5). В Томской, Омской, Новосибирской и Кемеровской областях по амбулаторно-поликлинической помощи этот показатель значительно ниже средних значений по СФО.

Необходимо отметить, что в целом по СФО обеспеченность населения врачами в амбулаторно-поликлинической помощи всего на 17,2% больше, чем в стационарной помощи. На наш взгляд, такое соотношение является не вполне адекватным и говорить в настоящее время о приоритете амбулаторно-поликлинической помощи не представляется возможным. Укомплектованность врачами достаточно высокая (90,4%), но в зна-

чительной мере она достигнута за счет высокого показателя совместительства (1,5). Укомплектованность врачами в амбулаторно-поликлинической помощи на 4,7% ниже, чем в стационарной помощи. При этом более высокая укомплектованность врачами в стационарной помощи обусловлена в значительной мере совместительством (коэффициент совместительства 1,7 и 1,4 соответственно).

Необходимо отметить, что укомплектованность участковыми врачами достаточно высокая и составляет 93,7% при очень низком уровне совместительства (1,1). Укомплектованность врачами-специалистами по СФО также достаточно высокая (89,8%), при этом в значительной мере она достигнута за счет высокого показателя совместительства (1,5). Укомплектованность врачами в амбулаторно-поликлинической помощи на 4,7% ниже, чем в стационарной помощи. При этом более высокая укомплектованность врачами в стационарной помощи обусловлена в значительной мере совместительством (коэффициент совместительства 1,7 и 1,4 соответственно).

По СФО обеспеченность населения средним медицинским персоналом составляет 124,7 на 10 тыс. населения. Обеспеченность населения средним медицинским персоналом в амбулаторно-поликлинической и стационарной помощи практически одинаковы (56,7 и 56,9 на 10 тыс. населения соответственно), что, на наш взгляд, является достаточно адекватным. Укомплектованность средним медицинским персоналом достаточно высокая (93,7%), в определенной мере она достигнута за счет совместительства (1,3). При этом укомплектованность средним медицинским персоналом в амбулаторно-поликлинической помощи на 3,6% ниже, чем в стационарной при практически одинаковом уровне совместительства (1,2 и 1,3 соответственно).

Укомплектованность медицинскими сестрами по СФО достаточно высокая (94,4%), в определенной мере она также достигнута за счет совместительства (1,3). При этом укомплектованность средним медицинским персоналом в амбулаторно-поликлинической помощи на 3,6% ниже, чем в стационарной при практически одинаковом уровне совместительства (1,2 и 1,3 соответственно).

В целом по СФО на одного врача клинических специальностей приходится 2,5 занятых должностей медицинской сестры. В стационарной помощи число медицинских сестер на одного врача составляет 3,6, а в амбулаторно-поликлинической – 1,9. На наш взгляд, соотношение врачебного и сестринского персонала является неадекватным.

Так в странах Запада на одного врача в общих врачебных практиках приходится 2–3, а в стационаре 7–8 медицинских сестер.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проблема дефицита кадров в здравоохранении на самом деле существует, однако суть несколько иная, нежели обычно подразумевается, когда заходит речь о кадровом обеспечении. Представляется более целесообразным говорить не об абсолютном дефиците кадров, а об относительном, который в значительной мере обусловлен диспропорциями в расстановке и использовании кадров.

Комплексная оценка обеспеченности медицинским персоналом с анализом отклонений от средних значений по СФО, структурным анализом и интегральной оценкой позволила получить следующие выводы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По регионам наибольшее число отклонений от средних значений по СФО выявлено по следующим параметрам: квалификация врачей; обеспеченность средним медицинским персоналом; обеспеченность врачами, в том числе врачами-специалистами и укомплектованность врачами. В кадровом обеспечении во всех регионах СФО отмечается приоритет стационарной помощи над амбулаторно-поликлинической. Достаточно высокая укомплектованность кадрами в значительной мере обусловлена высоким уровнем совместительства, особенно врачей-специалистов. Практически во всех регионах СФО отмечается недостаточно высокий уровень квалификации врачей и среднего медицинского персонала. Во всех регионах СФО отмечается значительный дефицит медицинских сестер при достаточно высоком уровне обеспеченности средним медицинским персоналом в целом.

Данные материалы являются результатами V международного форума «Инновации в медицине: Индустрия 4.0. Медицинская техносфера» и III международного форума «Общественное здоровье: организация, менеджмент, право – перспективы развития», мероприятий-спутников форума технологического развития «Технопром-2017».

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Алленов А.М., Никифоров С.А. Ресурсы здравоохранения Курганской области: медицинские кадры // *Уральский медицинский журнал*. 2015; 3 (126): 92–96.

- Allenov A.M., Nikiforov S.A. Resursy zdravooohranenija Kurganskoy oblasti: medicinskie kadry [Health resources of the Kurgan Region: medical personnel] // *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal – The Urals Medical Journal*. 2015; 3 (126): 92–96 (in Russian).
2. Алленов А.М., Медведская Д.Р. Оценка обеспечения врачами региональных систем здравоохранения РФ // *Уральский медицинский журнал*. 2015; 9 (132): 14–18.
- Allenov A.M., Medvedskaya D.R. Ocenka obespechenija vrachami regional'nyh sistem zdravooohranenija RF [Evaluation of providing doctors with regional health systems of the Russian Federation] // *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal – The Urals Medical Journal*. 2015; 9 (132): 14–18 (in Russian).
3. Башкуева Е.Ю. Государственная политика в области кадрового обеспечения системы здравоохранения Республики Бурятия // *Вестник Бурятского государственного университета*. 2015; S2: 176–179.
- Bashkueva E.Yu. Gosudarstvennaja politika v oblasti kadrovogo obespechenija sistemy zdravooohranenija Respubliki Burjatija [The state policy in the field of personnel supply of the public health system of the Republic of Buryatia] // *Vestnik Buryatskogo gosudarstvennogo universiteta – Bulletin of the Buryat State University*. 2015; S2: 176–179 (in Russian).
4. Каспрук Л.И., Снасапова Д.М., Жакупова Г.Т. Кадровое обеспечение как фактор влияния на качество оказания первичной медико-санитарной помощи населению (на примере Оренбургской области) // *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 5: 310.
- Kaspruk L.I., Snasapova D.M., Zhakupova G.T. Kadrovoe obespechenie kak faktor vlijaniya na kachestvo okazaniya pervichnoj mediko-sanitarnoj pomoshhi naseleniju (na primere Orenburgskoj oblasti) [Staffing as a factor of influence on the quality of providing primary health care to the population (by the example of the orenburg Region)] // *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya – Modern Problems of Science and Education*. 2015; 5: 310 (in Russian).
5. Государственная кадровая политика в сфере здравоохранении; под общ. ред. Костина А.А., Пономаренко Б.Т. М.: Международный издательский центр «Этносоциум», 2015: 96.
- Gosudarstvennaja kadrovaja politika v sfere zdravooohranenii. [State personnel policy in the health sector]; ed. Kostina A.A., Ponomarenko B.T. M.: International Publishing Center “Ethnosociety”, 2015: 96 (in Russian).
6. Кучковой В.В. Прогнозирование потребности в кадровых ресурсах медицинских учреждений // *Экономика строительства и городского хозяйства*. 2016; 12 (4): 185–190.
- Kuchkova V.V. Prognozirovaniye potrebnosti v kadrovyyh resursah medicinskih uchrezhdenij [Forecasting the need for human resources of medical institutions] // *Ekonomika stroitel'stva i gorodskogo khozyaystva – Economics of Construction and Urban Economy*. 2016; 12 (4): 185–190 (in Russian).
7. Маликова Л.М., Петросов С.Н., Учайкин Ю.Н., Финогенов В.В. Матчина О.И., Баянова Н.А., Смирнова С.А. Анализ показателей кадровых ресурсов амбулаторно-поликлинической службы Оренбургской области // *Современные проблемы науки и образования*. 2016; 3: 74.
- Malikova L.M., Petrosov S.N., Uchaikin Yu.N., Finogenov V.V. Matchina O.I., Bayanova N.A., Smirnova S.A. Analiz pokazatelej kadrovyyh resursov ambulatorno-poliklinicheskoy sluzhby Orenburgskoj oblasti [Analysis of human resources of the outpatient clinic service of the Orenburg region] // *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya – Modern Problems of Science and Education*. 2016; 3: 74 (in Russian).
8. Обоснование мероприятий по оптимизации управления кадровым потенциалом в сфере общественного здоровья и здравоохранения // *Вестник КГМА им. И.К. Ахунбаева*. 2016; 5: 43–48.
- Obosnovaniye meroprijatij po optimizacii upravleniya kadrovym potencialom v sfere obshhestvennogo zdorov'ya i zdravooohranenija [Justification of measures to optimize the management of human resources in the field of public health and public health] // *Vestnik KGMA im. I.K. Akbunbaeva – Bulletin of KSMA them. I.K. Akbunbaeva*. 2016; 5: 43–48 (in Russian).
9. Снегирева Ю.Ю., Зудин А.Б. Кадровое обеспечение процессов реформирования системы здравоохранения // *Ученые записки Российской Академии предпринимательства*. 2016; 46: 259–265.
- Snegireva Yu.Yu., Zudin A.B. Kadrovoe obespechenie processov reformirovaniya sistemy zdravooohranenija [Staffing of the processes of reforming the health system] // *Uchenyye zapiski Rossiyskoy Akademii predprinimatel'stva – Scientific Notes of the Russian Academy of Entrepreneurship*. 2016; 46: 259–265 (in Russian).
10. Хурцилава О.Г., Лучкевич В.С., Авдеева М.В., Логунов Д.А. Обеспеченность населения врачами первичного звена здравоохранения: факты, тенденции и прогнозы // *Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования*. 2015; 7 (3): 66–72.
- Khurtsilava O.G., Luchkevich V.S., Avdeeva M.V., Logunov D.L. Obespechennost' naselenija vrachami pervichnogo zvena zdravooohranenija: fakty, tendencii i prognozy [Provision of the population with primary care physicians: facts, trends and forecasts] // *Vestnik Sankt-Peterburgskoy meditsinskoy akademii poslediplomnogo obrazovaniya – Bulletin of the St. Petersburg Medical Academy of Postgraduate Education*. 2015; 7 (3): 66–72 (in Russian).
11. Шейман И.М., Шевский В.И. Кадровая политика в здравоохранении: сравнительный анализ российской и международной практики // *Вопросы государственного и муниципального управления*. 2015; 1: 143–167.
- Sheiman I.M., Shevsky V.I. Kadrovaja politika v zdravooohrane-nii: sravnitel'nyy analiz rossijskoy i mezhdunarodnoj praktiki [Personnel policy in health care: a com-

parative analysis of russian and international practice] // *Voprosy gosudarstvennogo i munitsipal'nogo upravleni-*

ya – Issues of State and Municipal Management. 2015; 1: 143–167 (in Russian).

Поступила в редакцию 22.08.2017
Утверждена к печати 08.11.2017

Финченко Евгений Александрович, д-р мед. наук, гл. науч. сотрудник, научно-организационный отдел, ННИИТиО им. Я.Л. Цивьяна, г. Новосибирск.

Шалыгина Лада Станиславовна, канд. мед. наук, зам. директора по организационно-методической работе, ННИИТиО им. Я.Л. Цивьяна; доцент, кафедра организации здравоохранения и общественного здоровья, НГМУ, г. Новосибирск.

Садовой Михаил Анатольевич, д-р мед. наук, профессор, директор, ННИИТиО им. Я.Л. Цивьяна; зав. кафедрой организации здравоохранения и общественного здоровья, НГМУ, г. Новосибирск.

Мамонова Екатерина Владимировна, канд. экон. наук, генеральный директор, АО «Инновационный медико-технологический центр (Медицинский технопарк)», г. Новосибирск.

Шалыгина Анастасия Вячеславовна, студент 6-го курса, лечебный факультет, НГМУ, г. Новосибирск.

✉ **Финченко Евгений Александрович**, e-mail: EFinchenko@niito.ru.

УДК 614.253.1/.6(571.1/.5)

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-280–286

For citation: Finchenko E.A., Shalygina L.S., M.A. Sadovoj M.A., Mamonova E.V., Shalygina A.V. Some aspects of human resources health in Siberian Federal District. *Bulletin of Siberian Medicine. 2017; 16 (4): 280–286.*

Some aspects of human resources health in Siberian Federal District

Finchenko E.A.¹, Shalygina L.S.^{1,2}, M.A. Sadovoj M.A.^{1,2}, Mamonova E.V.³, Shalygina A.V.²

¹ *Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics (NRITO)*
17, Frunze Str., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

² *Novosibirsk State Medical University (NSMU)*
52, Krasnyi Av., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

³ *Innovative Medical and Technological Center (Medical Technopark)*
19a, Frunze Str., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. One of the main national postulates, including domestic health care, is the thesis that the cadres decide everything. At the same time, in recent years, insufficient attention has been paid to human resources for health in scientific research.

Materials and methods. An analysis of the data provided by the health authorities of the regions of the Siberian Federal District (SFO) for the preparation of materials for the meeting of the Coordination Council on Health of the Interregional Association “Siberian Agreement”.

Results. In general, according to the SFD, the index of the population’s supply of physical persons to physicians is 36,9 per 10 thousand of population, which is somewhat lower than the average Russian indicator (37,2). In general, according to the SFD, the indicator of the population’s availability of doctors for the occupied positions is 56,6 per 10 thousand of the population. In most regions, the part-time ratio exceeds the Russian average (1,4).

In general, in the SFD, the provision of the population with doctors in outpatient care is only 17,2% higher than in inpatient care. The staffing level is quite high (90,4%), but to a large extent it was achieved due to a high level of part-time (1,5). The staffing of doctors in outpatient care is 4,7% lower than in inpatient care. At the same time, the higher staffing of physicians in inpatient care is largely due to part-time work (a factor of 1,7 and 1,4 respectively).

Staffing by district doctors is quite high and amounts to 93,7% with a very low level of intercourse (1,1). The staffing of the specialists in the SFO is also quite high (89,8%), while it was largely achieved due to the high level of part-time (1,5). The staffing of doctors in outpatient care is 4,7% lower than in inpatient care. At the same time, the higher staffing of physicians in inpatient care is largely due to part-time work (a factor of 1,7 and 1,4 respectively).

According to the SFD, the provision of the population with average medical personnel is 124,7 per 10 thousand of the population. The provision of the population with medium-level medical personnel in outpatient and inpatient care is almost the same (56,7 and 56,9 per 10 thousand of the population, respectively). The staffing level of the average medical personnel is quite high (93,7%), to a certain extent, it was achieved through intercourse (1,3). At the same time, the average medical staff in outpatient care is 3,6% lower than in a stationary clinic with practically the same level of part-time (1,2 and 1,3 respectively)

The staffing of nurses in the SFO is quite high (94,4%), to a certain extent, it has also been achieved through part-time work (1,3). At the same time, the average medical staff in outpatient-polyclinic care is 3,6% lower than in the stationary one with practically the same level of part-time (1,2 and 1,3 respectively). In general, according to the SFO, there are 2,5 employed nurses for one doctor of clinical specialties. In inpatient care, the number of nurses per doctor is 3,6, and in the outpatient clinic – 1,9.

Discussion. It seems more expedient to talk not about the absolute shortage of personnel, but about the relative, which, to a large extent, is caused by disproportions in the placement and use of personnel.

Conclusion. By regions, the greatest number of deviations from the mean values for the SFO was revealed by the following parameters: qualification of doctors; Provision by medium-sized medical personnel; Availability of doctors, including medical specialists and staffing of doctors. In staffing in all regions of the SFO, priority is given to inpatient care over outpatient and outpatient care. The adequately high staffing is largely due to the high level of part-time, especially medical specialists. Practically in all regions of the SFD there is not enough high level of qualification of doctors and nurses. In all regions of the SFO, there is a significant shortage of nurses with a sufficiently high level of provision with average medical personnel in general.

Key words: provision of health care personnel, Siberian Federal District.

Received August 22.2017
Accepted November 08.2017

Finchenko Evgeny A., DM, Chief Researcher, Officer of the Scientific and Organizational Department, NRITO, Novosibirsk, Russian Federation.

Shalygina Lada S., PhD, Deputy Director for Organizational and Methodological Work, NRITO; Associate Professor, Department of Public Health and Public Health, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation.

Sadovoy Mikhail A., DM, Professor, Director of the NRITO; Head of the Department of Public Health and Public Health, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation.

Mamonova Ekaterina V., PhD, General Director of the Innovative Medical and Technological Center (Medical Technopark), Novosibirsk, Russian Federation.

Shalygina Anastasia V., 6th year Student, Faculty of Medicine, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) **Finchenko Evgeny A.**, e-mail: EFinchenko@niito.ru.

УДК 614.212:005.7

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-287–293

Для цитирования: Финченко Е.А., Шарапов И.В., Ивановский О.И., Садовой М.А., Шалыгина Л.С. Некоторые результаты экспертной оценки проблем организации амбулаторно-поликлинической помощи. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (4): 287–293.

Некоторые результаты экспертной оценки проблем организации амбулаторно-поликлинической помощи

Финченко Е.А.¹, Шарапов И.В.², Ивановский О.И.², Садовой М.А.^{1,2}, Шалыгина Л.С.^{1,2}

¹ Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии (ННИИТиО) им. Я.А. Цивьяна

Россия, 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

² Новосибирский государственный медицинский университет (НГМУ)

Россия, 630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

РЕЗЮМЕ

Введение. Практика здравоохранения свидетельствует, что необходимо более тщательно выделять ту незначительную часть населения, которая, как правило, использует основную часть ресурсов здравоохранения.

Материал и методы. Экспертная оценка проблем организации, перспектив развития и основных направлений оптимизации амбулаторно-поликлинической помощи (АПП) проводилась среди руководителей органов управления здравоохранением, государственных амбулаторно-поликлинических учреждений (АПУ) и главных специалистов области (111 экспертов). В ходе исследования собраны и обработаны 111 экспертных карт оценки организации оказания АПП в территориальных поликлиниках (ТП) (по 45 параметрам).

Результаты. В настоящее время за состоянием здоровья населения следят: сами граждане – 23,1%; участковые врачи ТП – 7,9%, врачи-специалисты ТП – 1,2%, не следит никто – 67,8%. В то же время, по мнению экспертов, следить за здоровьем граждан должны сами граждане – 81,3% и участковые врачи – 18,7%. При ухудшении состояния здоровья или обострении заболевания пациенты чаще всего обращаются к участковому врачу – 84,1%; среднему медицинскому работнику, работающему на участке, – 2,7% и врачу-специалисту ТП – 13,2%. В то же время, по мнению экспертов, при ухудшении состояния здоровья или обострении заболевания пациенты чаще всего должны обращаться к участковому врачу – 88,3% и среднему медицинскому работнику, работающему на участке, – 11,7%.

Доля необоснованных посещений составляет: участкового врача в ТП – 28,1%, вызовов на дом – 56,4%, врачей-специалистов ТП – 37,3%. Таким образом, по оценкам экспертов, доля необоснованных посещений участковых врачей составляет 28,1%, вызовов участкового врача на дом – 56,4%, а врачей-специалистов – 37,3%, что свидетельствует о низком уровне организации работы ТП. Доля посещений пациентами участковых врачей, которые могли быть решены на доврачебном приеме составляет 24,7%, посредством консультации по телефону – 24,5%. Таким образом, доля посещений участковых врачей, которые могли быть решены на доврачебном приеме и посредством консультации по телефону, составляет 49,2%. Доля посещений пациентами врачей-специалистов ТП, которые могли быть решены посредством консультации по телефону между участковым врачом и врачами-специалистами, составляет 11,2% пациентов, по телефону врачами-специалистами – 12,4%. Таким образом, доля посещений врачей-специалистов ТП,

✉ Финченко Евгений Александрович, e-mail: EFinchenko@niito.ru.

которые могли быть решены посредством консультации по телефону между участковым врачом и врачами-специалистами и консультаций пациентов по телефону врачами-специалистами ТП, составляет почти четверть всех посещений (23,6%).

Обсуждение. Полученные данные в определенной мере согласуются с результатами ряда авторов, занимающихся оптимизацией АПП в ТП в части необоснованности посещений в ТП, возможности передачи части функций первичного общего врачебного приема специально подготовленному среднему медицинскому персоналу, использования телефонных консультаций пациентов и между врачами и т.д.

Заключение. Результаты экспертной оценки организации оказания АПП в ТП позволили определить некоторые подходы к оптимизации оказания АПП в ТП. Прежде всего, это оптимизация работы участковых врачей; перенос определенной части функций, выполняемых участковыми врачами, на участковых медицинских сестер и фельдшеров; развитие системы консультирования пациентов и участковых врачей врачами-специалистами ТП и других медицинских организаций.

Ключевые слова: поликлиническая помощь, территориальная поликлиника, оптимизация.

ВВЕДЕНИЕ

Практика здравоохранения свидетельствует, что необходимо более тщательно выделять ту незначительную часть населения, которая, как правило, использует основную часть ресурсов здравоохранения. В связи с этим важное место в управлении здравоохранением заняли служба управления объемами медицинской помощи этой группе населения и последовательное развитие возможностей участкового врача и врача общей практики в отношении большей части населения, нуждающейся лишь в общей врачебной помощи, при сохранении всех возможностей получения этим врачом необходимой для пациента консультативной помощи [1–6].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспертная оценка проблем организации, перспектив развития и основных направлений оптимизации амбулаторно-поликлинической помощи (АПП) проводилась среди руководителей органов управления здравоохранением, государственных амбулаторно-поликлинических учреждений (АПУ) и главных специалистов области (111 экспертов). Подбор экспертов проведен по стандартной методике. В ходе исследования собраны и обработаны 111 экспертных карт оценки организации оказания АПП в территориальных поликлиниках (по 45 параметрам). Оценка проводилась с использованием градации ответов в процентах и в баллах по пятибалльной шкале (5 баллов – очень высокая оценка, 4 балла – высокая оценка, 3 балла – средняя оценка, 2 балла – низкая оценка, 1 балл – очень низкая оценка).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспертная оценка проблем и перспектив организации АПП в территориальных поликлиниках (ТП) позволила получить следующие результаты. В настоящее время за состоянием здоровья населения следят: сами граждане – 23,1%; участковые врачи ТП – 7,9%, врачи-специалисты ТП – 1,2%, не следит никто – 67,8%. В то же время, по мнению экспертов, следить за здоровьем граждан должны сами граждане – 81,3% и участковые врачи – 18,7%.

При ухудшении состояния здоровья или обострении заболевания пациенты чаще всего обращаются к участковому врачу – 84,1%; среднему медицинскому работнику, работающему на участке, – 2,7% и врачу-специалисту ТП – 13,2%. В то же время, по мнению экспертов, при ухудшении состояния здоровья или обострении заболевания пациенты чаще всего должны обращаться к участковому врачу – 88,3% и среднему медицинскому работнику, работающему на участке, – 11,7%.

Соответствие работы ТП ожиданиям населения в полной мере экспертами оценено как 4,3%, не в полной мере – 59,2% и не соответствует – 36,5%. Не соответствует ожиданиям населения работа ТП в следующих аспектах: диагностика заболеваний – 2,4 балла по пятибалльной шкале, лечение заболеваний – 2,6, консультации по лечению заболеваний – 3,4, контроль за состоянием здоровья – 1,3, консультации по ведению здорового образа жизни – 4,4, профилактические мероприятия – 4,2 балла. Таким образом, в наибольшей степени работа ТП не соответствует ожиданиям населения в консультациях по лечению заболеваний и ведению здорового образа жизни, а также профилактических мероприятиях.

Соответствие работы доврачебного приема ожиданиям населения в полной мере экспертами оценено как 13,3%, не в полной мере – 45,4%, не соответствует – 41,3%. Не соответствует ожиданиям населения работа доврачебного приема в следующих аспектах: низкий уровень доступности для работающего населения – 26,7%, низкий уровень качества медицинской помощи – 55,0%, низкий этический уровень – 18,3%, низкий уровень организации оказания медицинской помощи – 64,3% (на 100 опрошенных).

Соответствие работы участковых врачей ожиданиям населения в полной мере экспертами оценено как 16,7%, не в полной мере – 51,6%, не соответствует – 31,7%. Не соответствует ожиданиям населения работа участковых врачей в следующих аспектах: низкий уровень доступности для работающего населения – 11,7%; низкий уровень качества медицинской помощи – 23,2%; низкий этический уровень – 24,7%; низкий уровень организации оказания медицинской помощи – 67,8% (на 100 опрошенных).

Соответствие работы врачей-специалистов ТП ожиданиям населения в полной мере экспертами оценено как 18,3%, не в полной мере – 64,3%, не соответствует – 17,4%. Не соответствует ожиданиям населения работа врачей-специалистов ТП в следующих аспектах: низкий уровень доступности для работающего населения – 73,2% низкий уровень качества медицинской помощи – 18,7%; низкий этический уровень – 8,7%; низкий уровень организации оказания медицинской помощи – 47,3% (на 100 опрошенных).

По мнению экспертов, работа специалистов ТП в наибольшей степени заключается в следующих аспектах:

- медицинского персонала, осуществляющего доврачебный прием: диагностика заболеваний – 1,2 балла; лечение заболеваний – 1,3; рекомендации по лечению заболеваний – 2,4; контроль за состоянием здоровья – 2,1; рекомендации по профилактике заболеваний – 4,2; рекомендации по ведению здорового образа жизни – 4,5 балла;

- персонала, самостоятельно осуществляющего доврачебный прием (фельдшеров): диагностика заболеваний – 4,6; лечение заболеваний – 4,8; рекомендации по лечению заболеваний – 4,9; контроль за состоянием здоровья – 3,7; рекомендации по профилактике заболеваний – 4,2; рекомендации по ведению здорового образа жизни – 4,5 балла;

- участковых врачей: диагностика заболеваний – 4,3; лечение заболеваний – 4,8; рекомендации по лечению заболеваний – 4,9; контроль

за состоянием здоровья – 2,1; рекомендации по профилактике заболеваний – 4,8; рекомендации по ведению здорового образа жизни – 3,7 балла;

- врачей-специалистов ТП: диагностика заболеваний – 4,7; лечение заболеваний – 4,1; рекомендации по лечению заболеваний – 4,9; контроль за состоянием здоровья – 1,1; рекомендации по профилактике заболеваний – 2,2; рекомендации по ведению здорового образа жизни – 1,5 балла.

Таким образом, главными аспектами работы специалистов ТП являются:

- медицинского персонала, осуществляющего доврачебный прием: рекомендации по профилактике заболеваний и ведению здорового образа жизни;

- персонала, самостоятельно осуществляющего доврачебный прием (фельдшеров): диагностика заболеваний и лечение заболеваний, рекомендации по лечению заболеваний, рекомендации по профилактике заболеваний и ведению здорового образа жизни;

- участковых врачей: диагностика и лечение заболеваний, рекомендации по лечению заболеваний и рекомендации по профилактике заболеваний;

- врачей-специалистов ТП: диагностика и лечение заболеваний, рекомендации по лечению заболеваний.

Доля необоснованных посещений составляет: участкового врача в ТП – 28,1%, вызовов на дом – 56,4%, врачей-специалистов ТП – 37,3%. Таким образом, по оценкам экспертов, доля необоснованных посещений участковых врачей составляет 28,1%, вызовов участкового врача на дом – 56,4%, а врачей-специалистов – 37,3%, что свидетельствует о низком уровне организации работы ТП.

Доля посещений пациентами участковых врачей, которые могли быть решены на доврачебном приеме составляет 24,7%, посредством консультации по телефону – 24,5%. Таким образом, доля посещений участковых врачей, которые могли быть решены на доврачебном приеме и посредством консультации по телефону, составляет 49,2%.

Доля посещений пациентами врачей-специалистов ТП, которые могли быть решены посредством консультации по телефону между участковым врачом и врачами-специалистами, составляет 11,2%, пациентов по телефону врачами-специалистами – 12,4%. Таким образом, доля посещений врачей-специалистов ТП, которые могли быть решены посредством консультации по телефону между участковым врачом и врачами-специалистами и консультаций пациентов по телефону

врачами-специалистами ТП, составляет почти четверть всех посещений (23,6%).

По оценкам экспертов, степень, в которой АПП обеспечена медицинским персоналом (от необходимого уровня), составляет: доврачебная помощь – 23,3%, общая врачебная – 25,9%, специализированная – 73,8%, лечебно-диагностическая помощь – 81,2%. То есть наиболее обеспеченной кадровыми ресурсами является лечебно-диагностическая и специализированная помощь, а наименее – доврачебная и общая врачебная помощь.

Степень, в которой квалификация медицинского персонала соответствует необходимому уровню при оказании АПП (от необходимого уровня), составляет: доврачебная помощь – 41,7%, общая врачебная – 51,8%, специализированная – 63,2%, лечебно-диагностическая помощь – 56,7%.

Степень, в которой АПП обеспечена материально-техническими ресурсами (от необходимого уровня): доврачебная помощь – 41,7%, общая врачебная – 46,3%, специализированная – 48,2%, лечебно-диагностическая помощь – 61,4%. То есть наиболее обеспеченной материально-техническими ресурсами является лечебно-диагностическая и специализированная помощь, а наименее – доврачебная и общая врачебная помощь.

По оценкам экспертов, степень, в которой населению оказывается АПП достаточного качества (от необходимого уровня), составляет: доврачебная помощь – 35,1%, общая врачебная – 41,7%, специализированная – 46,7%, лечебно-диагностическая помощь – 49,8%. Таким образом, населению оказывается АПП достаточного качества следующих видов – лечебно-диагностическая и специализированная, а наименее – доврачебная и общая врачебная помощь.

Востребованность АПП экспертами определена следующим образом: доврачебная помощь – 1,2%, общая врачебная – 6,3%, специализированная – 68,3%, лечебно-диагностическая помощь – 73,3%. Таким образом, населением наиболее востребованы лечебно-диагностическая и специализированная помощь, а наименее – доврачебная и общая врачебная помощь.

Эффективность существующей организации АПП экспертами оценена следующим образом: доврачебная помощь – 1,9 балла, общая врачебная – 2,3, специализированная – 2,8, лечебно-диагностическая помощь – 3,7 балла.

Таким образом, наиболее высоко оценена эффективность организации лечебно-диагностической и специализированной помощи, а наименее – доврачебной и общей врачебной помощи.

Целесообразность реорганизации видов АПП экспертами оценена следующим образом: доврачебная помощь – 4,8 балла, общая врачебная – 4,7, специализированная – 3,7, лечебно-диагностическая помощь – 2,6 балла. Таким образом, более всего в реорганизации нуждаются доврачебная и общая врачебная помощь, а менее всего – лечебно-диагностическая и специализированная помощь.

По мнению экспертов, работа участкового врача в наибольшей степени заключается в следующих аспектах: диагностика заболеваний – 4,5 балла, лечение заболеваний – 4,9, рекомендации по лечению заболеваний – 4,8, контроль за состоянием здоровья – 2,7, рекомендации по профилактике заболеваний – 4,2, рекомендации по ведению здорового образа жизни – 4,6 балла. Таким образом, основными направлениями работы ВОП являются лечение заболеваний, рекомендации по лечению заболеваний и ведению здорового образа жизни.

Вероятность сценариев развития АПП в ближайшей перспективе, по оценкам экспертов, выглядит следующим образом: в основном все останется без изменений – 83,3%, сокращение специализации и увеличение интеграции в участковой службе – 1,7%, развитие института общей врачебной практики – 7,5%.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные в определенной мере согласуются с результатами ряда авторов, занимающихся оптимизацией АПП в ТП в части необоснованности посещений в ТП, возможности передачи части функций первичного общего врачебного приема специально подготовленному среднему медицинскому персоналу, использования телефонных консультаций пациентов и между врачами и т.д.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты экспертной оценки организации оказания АПП в ТП позволили определить некоторые подходы к оптимизации оказания АПП в ТП. Прежде всего, это оптимизация работы участковых врачей; перенос определенной части функций, выполняемых участковыми врачами, на участковых медицинских сестер и фельдшеров; развитие системы консультирования пациентов и участковых врачей врачами-специалистами ТП и других медицинских организаций.

Данные материалы являются результатами V международного форума «Инновации в меди-

цине: Индустрия 4.0. Медицинская техносфера» и III международного форума «Общественное здоровье: организация, менеджмент, право – перспективы развития», мероприятий-спутников форума технологического развития «Технопром-2017».

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Артюхов И.П., Смердин С.В., Лысов А.Е. Изучение удовлетворенности взрослых пациентов первичной медико-санитарной помощью // *Сибирское медицинское обозрение*. 2011; 68 (2): 96–99.
2. Artyukhov I.P., Smerdin S.V., Lysov A.E. Izuchenie udovletvorennosti vzroslykh pacientov pervichnoy mediko-sanitarnoy pomoshh'ju [Studying the satisfaction of adult patients with primary health care] // *Sibirskoye meditsinskoye obozreniye – Siberian Medical Review*. 2011; 68 (2): 96–99 (in Russian).
3. Шипова В.М., Воронцов Т.Н. Динамика гарантированного объема медицинской помощи при социально значимых заболеваниях // *Бюллетень Национального научно-исследовательского института общественно-го здоровья*. 2012; 2: 40.
4. Shipov V.M., Vorontsov T.N. Dinamika garantirovannogo ob'ema medicinskoj pomoshhi pri social'no znachimykh zabolevaniyah [Dynamics of the guaranteed volume of medical care for socially significant diseases] // *Byulleten' Natsional'nogo nauchno-issledovatel'skogo instituta obschbestvennogo zdorov'ya – Bulletin of the National Research Institute of Public Health*. 2012; (2): 40 (in Russian).
5. Щепин В.О. Структурно-функциональный анализ посещений населением Российской Федерации врачей амбулаторно-поликлинических учреждений // *Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины*. 2011; 3: 11–14.
6. Schepin V.O., [On the issue of staffing outpatient clinics in the Russian Federation] Strukturno-funkcional'nyj analiz poseshhenij naseleniem rossijskoj federacii vrachej ambulatorno-poliklinicheskikh uchrezhdenij [Structurally functional analysis of visits by the population of the Russian Federation to doctors of outpatient clinics] // *Problemy sotsial'noy gigiyeny, zdavookhraneniya i istorii meditsiny – Problems of Social Hygiene, Health and History of Medicine*. 2011; (3): 11–14 (in Russian).
7. Щепин В.О., Миргородская О.В. К вопросу о кадровом обеспечении амбулаторно-поликлинических учреждений Российской Федерации // *Бюллетень национального научно-исследовательского института общественного здоровья*. 2012; 6: 174–178.
8. Schepin V.O., Mirgorodskaya O.V. K voprosu o kadrovom obespechenii ambulatorno-poliklinicheskikh uchrezhdenij Rossijskoj Federacii [On the issue of staffing outpatient clinics in the Russian Federation] // *Byulleten' natsional'nogo nauchno-issledovatel'skogo instituta obschbestvennogo zdorov'ya – Bulletin of the National Research Institute of Public Health*. 2012; (6): 174–178 (in Russian).
9. Щепин В.О., Миргородская О.В. Структурный анализ сети учреждений амбулаторно-поликлинической помощи в Российской Федерации // *Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины*. 2012; 6: 26–31.
10. Schepin V.O., Mirgorodskaya O.V. Strukturnyj analiz seti uchrezhdenij ambulatorno-poliklinicheskoy pomoshhi v Rossijskoj Federacii [Structural analysis of the network of outpatient clinics in the Russian Federation] // *Problemy sotsial'noy gigiyeny, zdavookhraneniya i istorii meditsiny – Problems of Social Hygiene, Health and History of Medicine*. 2012; (6): 26–31 (in Russian).
11. Щепин В.О., Миргородская О.В. Объем и структура амбулаторно-поликлинических посещений у врачей в Российской Федерации в 2009–2011 гг. // *Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины*. 2013; 3: 9–14.
12. Schepin V.O., Mirgorodskaya O.V. Ob'em i struktura ambulatorno-poliklinicheskikh poseshhenij u vrachej v Rossijskoj Federacii v 2009–2011 gg. [The volume and structure of ambulatory polyclinic visits to physicians in the Russian Federation in 2009–2011] // *Problemy sotsial'noy gigiyeny, zdavookhraneniya i istorii meditsiny – Problems of Social Hygiene, Health and History of Medicine*. 2013; (3): 9–14 (in Russian).

Поступила в редакцию 31.08.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Финченко Евгений Александрович, д-р мед. наук, гл. науч. сотрудник, научно-организационный отдел, ННИИТиО им. Я.А. Цивьяна, г. Новосибирск.

Шарапов Игорь Васильевич, ассистент, кафедра организации здравоохранения и общественного здоровья, НГМУ, г. Новосибирск.

Иванинский Олег Иванович, канд. мед. наук, доцент, кафедра организации здравоохранения и общественного здоровья, НГМУ, г. Новосибирск.

Садовой Михаил Анатольевич, д-р мед. наук, профессор, директор, ННИИТиО им. Я.А. Цивьяна, зав. кафедрой организации здравоохранения и общественного здоровья, НГМУ, г. Новосибирск.

Шалыгина Лада Станиславовна, канд. мед. наук, зам. директора по организационно-методической работе, ННИИТиО им. Я.А. Цивьяна; доцент, кафедра организации здравоохранения и общественного здоровья, НГМУ, г. Новосибирск.

(✉) Финченко Евгений Александрович, e-mail: EFinchenko@niito.ru.

УДК 614.212:005.7

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-287-293

For citation: Finchenko E.A., Sharapov I.V., Ivaninskiy O.I., Sadovoj M.A., Shalygina L.S. Results of expert evaluation of problems of organization of ambulatory-polyclinic assistance. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (4): 287–293.

Results of expert evaluation of problems of organization of ambulatory-polyclinic assistance

Finchenko E.A.¹, Sharapov I.V.², Ivaninskiy O.I.², Sadovoj M.A.^{1,2}, Shalygina L.S.^{1,2}

¹ *Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics (NRITO)*
17, Frunze Str., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

² *Novosibirsk State Medical University (NSMU)*
52, Krasnyi Av., Novosibirsk, 630091, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. An important role in health care management was taken by the service of managing the volume of medical care for this population group and the progressive development of the opportunities of the district doctor and GP for most of the population which requires only general medical assistance while maintaining all the possibilities for the consultant to get this patient's advice.

Materials and methods. An expert assessment of the organization's problems, prospects for development and the main directions for optimizing the outpatient care were conducted among the heads of health authorities, state outpatient clinics and the oblast's top specialists (111 experts).

Results. An expert assessment of the problems and perspectives of the organization of out-patient and poly-clinic care in the territorial polyclinics obtained the following results. At present, the health of the population is monitored by: citizens themselves – 23,1%; District doctors – 7,9%, medical specialists – 1,2%, no one follows – 67,8%. At the same time, according to experts, citizens themselves should monitor citizens' health – 81,3% and district doctors – 18,7%. With a deterioration in health status or an exacerbation of the disease, patients most often turn to: the district doctor – 84,1%; The average medical worker working on the site – 2,7% and the specialist doctor – 13,2%. At the same time, according to experts, patients with worsening health or exacerbation of the disease most often need to contact the local doctor – 88,3% and the average medical worker working on the site – 11,7%.

The share of unreasonable visits is: a district doctor – 28,1%, house calls – 56,4%, doctors-specialists – 37,3%. Thus, according to experts' estimates, the share of unjustified visits of district doctors is 28,1%, of the doctor's call at home – 56,4%, and of specialist doctors – 37,3%, which indicates a low level of organization of work of polyclinics. The proportion of visits by patients to district doctors that could be resolved: on pre-hospital admission, is 24,7%, by telephone consultation, is 24,5%. Thus, the share of visits to district doctors, which could be resolved at a pre-hospital reception and by telephone consultation, is almost half (49,2%).

The proportion of visits by patients to medical specialists that could be resolved by telephone consultation: between the district doctor and medical specialists is 11,2%, the number of patients by telephone by medical specialists is 12,4%. Thus, the share of visits by specialist doctors, which could be resolved by telephone consultation between the district doctor and specialist doctors and patient consultations by telephone by specialist doctors, is almost a quarter of all visits (23,6%).

Discussion. The data obtained are in some ways consistent with the results of a number of authors who are optimizing outpatient care in terms of the unreasonableness of visits, the possibility of transferring part of the functions of primary general medical reception to specially trained middle medical personnel, using telephone consultations between patients and between doctors, etc.

Conclusion. The results of the expert assessment of the organization of outpatient care helped to identify some approaches to optimizing its delivery in the territorial polyclinics. This is optimization of the work of

district doctors; Transfer of a certain part of the functions performed by district doctors to district nurses and paramedics; The development of a system for counseling patients and district doctors by medical specialists of polyclinics and other medical organizations.

Key words: outpatient and polyclinic care, territorial polyclinic, optimization.

Received August 31.2017
Accepted November 08.2017

Finchenko Evgeny A., DM, Chief Researcher, Officer of the Scientific and Organizational Department, NRITO, Novosibirsk, Russian Federation.

Sharapov Igor V., Assistant, Department of Public Health and Public Health, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation.

Ivaninsky Oleg I., PhD, Associate Professor, Department of Public Health and Public Health, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation.

Sadovoy Mikhail A., DM, Professor, Director of the NRITO, Head of the Department of Public Health and Public Health, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation.

Shalygina Lada S., PhD, Deputy Director for Organizational and Methodological Work, NRITO; Associate Professor, Department of Public Health and Public Health, NSMU, Novosibirsk, Russian Federation.

(✉) **Finchenko Evgeny A.**, e-mail: EFinchenko@niito.ru.



Указатель статей и кратких сообщений, опубликованных
в журнале «Бюллетень сибирской медицины» за 2017 г.

№ 1

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Аранович А.М., Тушина Н.В., Киреева Е.А., Гофман Ф.Ф.

Комплексная оценка лечения пациентов с последствиями гематогенного остеомиелита методом интрамедуллярного напряженного армирования

Величко С.А., Слонимская Е.М., Фролова И.Г., Бухарин Д.Г., Дорошенко А.В.

Способ прогнозирования «малых» форм рака молочной железы на фоне фиброзно-кистозной болезни

Дьякова Е.Ю., Капилевич Л.В., Захарова А.Н., Кабачкова А.В., Кириченко Т.А., Орлов С.Н.

Содержание эндотелиальной синтазы оксида азота в плазме после физических нагрузок различного характера

Завалий А.А., Кубышкин А.В., Жукова А.А.

Динамика показателей неспецифических протеиназ и их ингибиторов при лечении больных острым гнойным риносинуситом мукоактивными препаратами

Зыкова М.В., Трофимова Е.С., Кривошеков С.В., Лигачёва А.А., Данилец М.Г., Логвинова Л.А., Жолобова Г.А., Прищепова О.Ф., Юсубов М.С., Белоусов М.В.

Спектральные параметры и биологическая активность высокомолекулярных соединений гуминовой природы

Лычева Н.А., Шахматов И.И., Киселев В.И.

Влияние среды охлаждения на состояние системы гемостаза у крыс

Никифоров А.А., Фурса Н.С., Кривошеков С.В., Куркин В.А., Белоусов М.В.

Сравнительное исследование веществ первичного обмена ряски малой (*Lemna minor* L.), ряски тройчатой (*Lemna trisulca* L.) и многокоренника обыкновенного (*Spirodella polyrrhiza* L. Schleid.)

Осипенко А.Н., Плотникова Т.М., Чернышева Г.А., Смолякова В.И.

Механизмы нейропротективного действия *n*-тирозолов в условиях тотальной транзиторной ишемии-реперфузии головного мозга

Перфильев В.Ю., Зверев Я.Ф., Жариков А.Ю., Лукьяненко Д.Ю., Лысенко И.В., Атабаева О.Ш.

Успешное применение дапаглитозина для профилактики и лечения экспериментального уратного нефролитиаза

Сарнадский В.Н., Михайловский М.В., Садовая Т.Н., Орлова Т.Н., Кузнецов С.Б.

Распространенность структурального сколиоза среди школьников Новосибирска по данным компьютерной оптической топографии

Солдатова О.В., Кубышкин А.В., Ушаков А.В., Гордиенко А.И., Фомочкина И.И., Гагарина А.А.

Динамика уровня провоспалительных цитокинов при различных вариантах течения острого инфаркта миокарда

Фомина С.В., Завадовская В.Д., Чурин А.А., Юсубов М.С.

Экспериментальная апробация нового эхоконтрастного препарата на основе гексафторида серы в диагностике очаговых образований печени воспалительного генеза

ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ

Дунаевская С.С., Винник Ю.С.

Развитие эндотелиальной дисфункции при облитерирующем атеросклерозе сосудов нижних конечностей и маркеры прогнозирования течения заболевания

Запускалов И.В., Горбунова Е.А., Кривошеина О.И.

Современные принципы профилактики анофтальмического синдрома: способы формирования опорно-двигательной культуры, виды орбитальных имплантатов

Ивченко А.О., Шведов А.Н., Ивченко О.А.

Сосудистые протезы, используемые при реконструктивных операциях на магистральных артериях нижних конечностей

Прохоренко Т.С., Зима А.П., Саприна Т.В., Мусина Н.Н., Шахманова Н.С., Новицкий В.В.

К вопросу о дифференциальной диагностике анемического синдрома у беременных

Садовой М.А., Кобякова О.С., Деев И.А., Куликов Е.С., Табакаев Н.А., Тюфиллин Д.С., Воробьева О.О.

Удовлетворенность качеством медицинской помощи: «всем не угодишь» или «пациент всегда прав»?

Тепляков А.Т., Калюжин В.В., Калюжина Е.В., Черногорюк Г.Э., Рачковский М.И., Беспалова И.Д., Терентьева Н.Н., Лившиц И.К., Соловцов М.А., Чернявская Г.М.

Патология периферического кровообращения при хронической сердечной недостаточности

СЛУЧАЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

Вторушин С.В., Гребенюк О.В., Алифирова В.М., Христенко К.Ю., Васильченко Д.В., Валикова Т.А., Рязанцева А.А.

Клинико-морфологический анализ случая летального исхода пациента с болезнью Бинсвангера

ЛИЦО НОМЕРА

Некфиров С.А.

Член-корреспондент РАН Ольга Ивановна Уразова

ЮБИЛЕИ

Надежда Архиповна Бражникова (К 80-летию со дня рождения)

№ 2

ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ

Авдеев С.Н.

Неинвазивная вентиляция легких у больных ХОБЛ, госпитализированных в стационар

Балаболкин И.И., Булгакова В.А., Пинелис В.Г., Тюменцева Е.С.

Фармакогенетика и индивидуализированный подход к терапии бронхиальной астмы

Курбачева О.М., Амантурлиева М.Е.

Роль барьерной функции слизистых оболочек при аллергических заболеваниях и при сублингвальной аллерген-специфической иммунотерапии

Чуященко Е.В., Завадовская В.Д., Агеева Т.С., Просекина Н.М., Перова Т.Б.

Ультразвуковое исследование легких при пневмонии

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ СЕМИНАР

Карнаушкина М.А., Малявин А.Г., Дворецкий Л.И., Яковлев С.В., Бабак С.Л., Федосенко С.В., Суворова М.П., Разгуляева Н.Ф., Арутюнова А.Б.

Проект протокола ведения больных нозокомиальной пневмонией у взрослых в условиях стационара

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Астафьева Н.Г., Кобзев Д.Ю., Стрилец Г.Н., Гамова И.В., Перфилова И.А., Удовиченко Е.Н.

Психологические дисфункции у женщин с бронхиальной астмой

Буланова А.А., Аксененко А.Э., Бобровникова А.С., Дудко Г.В., Слизевич Д.С., Букреева Е.Б., Штисман М.Н., Тютфин И.И.

Исследование реакции системы гемостаза на тканевую гипоксию у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких

Венгерович Н.Г., Юдин М.А., Никифоров А.С., Сагалов Г.С., Рузанова Э.А., Шперлинг Н.В., Венгеровский А.И., Шперлинг И.А., Макачев А.С.

Влияние комбинации фентанила и дексметомидина на функции внешнего дыхания при острой кровопотере

Вершинина М.В., Нечаева Г.И., Хоменя А.А., Исаева А.С., Ратынская И.А., Анайко И.Д., Фофанова О.А.

Значение медицинской реабилитации при бронхолегочном синдроме у больных с дисплазией соединительной ткани

Есимова И.Е., Уразова О.И., Новицкий В.В.

Роль нарушений рецептор-опосредованной активации Т-клеток в патогенезе иммунологической недостаточности при туберкулезе легких

Кириллова Н.А., Невская К.В., Петров В.А., Дорофеева Ю.Б., Федосенко С.В., Куликов Е.С.

Роль компонентов микробиоты в модификации иммунного ответа при отдельных вариантах течения хронической обструктивной болезни легких

Колмогоров В.Г., Молодкин И.В., Коновалов В.К., Шайдук А.М., Останин С.А., Леонов С.А., Борисенко О.В., Федосеев М.А., Модикалова Ю.С.

Особенности динамической оценки контуров шаровидных образований легких при мультиспиральной компьютерной томографии

Некрасов Э.В., Приходько А.Г., Перельман Ю.М.

Секреторно-экссудативная реакция слизистой носа на воздействие холодного воздуха у больных бронхиальной астмой

Пигозов А.Б., Приходько А.Г., Зиновьев С.В., Бороздин Е.А., Ушакова Е.В., Макарова Г.А., Перельман Ю.М.

Особенности бронхиального воспаления у больных астмой с гиперреактивностью дыхательных путей на холодовой и осмотические триггеры

Просекова Е.В., Ситдикова Т.С., Долгополов М.С., Турянская А.И., Сабынич В.А., Забелина Н.Р.

Иммунные механизмы реализации вирус-индуцированного и аллерген-индуцированного фенотипов бронхиальной астмы у детей

СЛУЧАЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

Камалтынова Е.М., Кривошеков Е.В., Янулович О.С., Кавардакова Е.С.

Пластический бронхит, ассоциированный с корригированным пороком сердца у ребенка

Филинчук О.В., Елисеева Л.В., Денисова О.А., Степанова Е.П., Голубчиков П.Н.

Генерализованный туберкулез при системной красной волчанке на фоне пульс-терапии метилпреднизолоном: трудности диагностики и лечения

Фролова И.Г., Величко С.А., Гольдберг А.В., Тузиков С.А., Миллер С.В., Родионов Е.О., Ефтеев А.А., Бондарь Л.Н., Перельмутер В.М.

Пулмональный Лангергансоподобный гистиоцитоз легких: клиническое наблюдение в стадии раннего поражения

ЮБИЛЕИ

Людмила Павловна Назаренко (К 70-летию со дня рождения)

Валерий Павлович Пузырёв (К 70-летию со дня рождения)

№ 3

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Адекенов С.М., Данилец М.Г., Ивасенко С.А., Никифоров А.А., Кривошеков С.В., Лизачёва А.А., Трофимова Е.С., Шерстобоев Е.Ю., Жданов В.В., Белоусов М.В.

Фенольные соединения этанольных извлечений *Lemna minor* L., *Lemna trisulca* L. и *Lemna polyrrhiza* L. Schleid. и их иммуномодулирующая активность

Байтингер Н.Н., Варакута Е.Ю., Мустафина Л.Р., Коняева А.Д., Логвинов С.В., Плотников М.Б., Герасимов А.В., Потапов А.В.

Эффективность применения *n*-тирозола для стимулирования регенерации слизистой оболочки губы при экспериментальном стоматите

Брагина О.Д., Лафькина М.С., Стасюк Е.С., Чернов В.И., Юсубов М.С., Скуридин В.С., Деев С.М., Зелъчан Р.В., Булдаков М.А., Подрезова Е.В., Белоусов М.В.

Разработка высокоспецифичного радиохимического соединения на основе меченых ^{99m}Tc рекомбинантных адресных молекул для визуализации клеток с гиперэкспрессией Her-2/neu

Заднирянный И.В., Третьякова О.С., Кубышкин А.В., Сатаева Т.П.

Эффективность применения концентрата полифенолов винограда «Фэнокор» при гипоксическом повреждении миокарда

Горохова А.С., Григорьян А.Ю., Бежин А.И., Панкрушева Т.А., Суковатых Б.С., Жиляева Л.В., Мишина Е.С., Кобзарева Е.В.

Применение иммобилизованной формы бензалкония хлорида и метронидазола в лечении гнойных ран

Гудилина Н.А., Иванова Э.С., Сибиряков А.В., Мехоношина Н.В., Ростова Н.Б., Файзрахманов Р.А.

Использование кластерного анализа при разработке подходов по выбору и назначению схем лечения ВИЧ-инфицированными пациентами

Иванова В.В., Мильто И.В., Суходоло И.В., Дзюман А.Н.

Моделирование гипертрофии больших слюнных желез у неполовозрелых крыс: морфометрическая и гистохимическая характеристика эпителиоцитов

Иванова С.А., Алифирова В.М., Жукова И.А., Тигунцев В.В., Пожидаев И.В., Османова Д.З., Федоренко О.Ю., Фрейдин М.Б., Миронова Ю.С., Жукова Н.Г., Бохан Н.А., Лунен А.Дж.М.

Ассоциация полиморфизмов гена *COMT* с болезнью Паркинсона

Кулеш А.А., Дробаха В.Е., Куклина Е.М., Шестаков В.В.

Амилоид-бета 40 как биомаркер когнитивных нарушений в остром периоде ишемического инсульта

Латышев О.Ю., Санникова Е.С., Самсонова Л.Н., Киселёва Е.В., Окминян Г.Ф., Дондуп О.М., Касаткина Э.П.

Нарушение формирования пола 45,X/46,XY: клинико-лабораторная характеристика пациентов

Никифорова Т.А., Доронин Б.М., Песков С.А., Марущак А.А.

Значимость показателей цитокинового статуса в оценке клинического течения геморрагической трансформации ишемического инсульта

Рогова О.С., Самсонова Л.Н., Окминян Г.Ф., Киселева Е.В., Латышев О.Ю., Касаткина Э.П., Пыков М.И., Окулов А.Б., Мишаков К.К.

Исходы оперативного лечения патологии щитовидной железы у детей

Скальский С.В., Соколова Т.Ф., Сычев Д.А., Турок Н.Е.

Влияние верапамила на формирование спаек при асептическом воспалении брюшины

Тепляков А.Т., Шилов С.Н., Попова А.А., Гракова Е.В., Березикова Е.Н., Неупокоева М.Н., Молоков А.В., Копьева К.В., Калюжин В.В.

Состояние сердечно-сосудистой системы у больных с антрациклиновой кардиомиопатией

Трус Д.А., Тихоновская О.А., О कोरोков А.О., Мустафина Л.Р., Тимофеева О.С., Логвинов С.В., Герасимов А.В., Варакута Е.Ю., Потапов А.В., Суханова Г.А., Куценко И.Г.

Моделирование функциональных кист яичников путем введения фолликулостимулирующего гормона

Фанаскова Е.В., Груздева О.В., Акбашева О.Е., Тютрин И.И., Пенская Т.Ю., Учасова Е.Г., Дылева Ю.А., Барбараш О.А.

Возможность применения метода низкочастотной пьезотромбоэластографии для оценки гемостатического потенциала крови при операциях коронарного шунтирования на фоне длительной аспириротерапии

Хабаров Д.В., Сюткина И.П., Королева Е.Г., Смагин А.А., Кочеткова М.В., Демура А.Ю.

Динамика маркеров стресс-реакции при эмболизации маточных артерий

ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ

Идигов А.М., Гудков А.В., Семичев Е.В., Бушланов П.С.

От первого сосудистого шва к реконструктивно-восстановительной хирургии при патологии сосудов почек

Сенаторова О.В., Храмова Е.Б., Кузнецов В.А., Сергейчик О.И.

Клинико-метаболические эффекты применения аминифосфонатов у детей при нарушениях сердечного ритма

Уфимцева М.А., Бочкарев Ю.М., Лесная О.Д., Береснева Т.А.

Псевдоксантома эластическая: обзор литературы и описание клинических случаев

Шейно И.Н., Ижевский П.В., Липенгольц А.А., Кулаков В.Н., Вагнер А.Р., Сухих Е.С., Вафлячев В.А.

Разработка бинарных технологий лучевой терапии злокачественных новообразований: состояние и проблемы

СЛУЧАЙ ИЗ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

Федосеева И.Ф., Попонникова Т.В., Галиева Г.Ю., Илясова О.В.

Клинические наблюдения поздней младенческой и юношеской форм болезни Ниманна – Пика, тип С

Королева Е.С., Алифирова В.М., Рязанцева А.А., Коцавцева Ю.И.

Паранеопластическая мозжечковая дегенерация у пациента с антителами anti-Yo и аденокарциномой простаты

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ СЕМИНАР

Кожевников А.Н., Поздеева Н.А., Конев М.А., Маричева О.Н., Афоничев К.А., Новик Г.А.

Рентгенодиагностика хронического олигоартрита у детей

ПАМЯТЬ

Памяти профессора И.В. Запускалова (1957–2016)

Памяти профессора И.Д. Евтушенко

№ 4

ОБЗОРЫ И ЛЕКЦИИ

Гаврилов Ю.В., Деревцова К.З., Корнева Е.А.

Орексинергическая система мозга и патогенетические основы нарушений цикла «сон – бодрствование» при нарколепсии

Колесникова Л.И., Даренская М.А., Колесников С.И.

Свободнорадикальное окисление: взгляд патофизиолога

Насырова Р.Ф., Толмачев М.Ю., Сычев Д.А., Яхин К.К., Незнанов Н.Г.

Механизмы развития антипсихотик-индуцированных метаболических нарушений: фармакогенетический аспект

Понюмарчук О.О., Максимов Г.В., Орлов С.Н.

Регуляция объема клеток эпителия в норме и при патологии

Чердынцева Н.В., Митрофанова И.В., Булдаков М.А., Стахеева М.Н., Патьшиева М.Р., Завьялова М.В.,

Кжышковска Ю.Г.

Макрофаги и опухолевая прогрессия: на пути к макрофаг-специфичной терапии

Шкурутий В.А., Ким Л.Б., Ковнер А.В., Черданцева Л.А.

Соединительная ткань и проблемы ее патологических состояний

Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Зеленин Н.В., Аюшинова Н.И.

Воздействие на митогенактивируемые протеинкиназы как новое направление регуляции роста соединительной ткани

Ошков Б.Г.

Клетки иммунной системы и регуляция регенерации

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л., Черных А.И., Салмина А.Б.

Влияние инсулинорезистентности на нарушение метаболизма глюкозы в миндалинах головного мозга при экспериментальной болезни Альцгеймера

Дворниченко М.В., Сизикова А.Е., Сафина Т.В., Пащикова Е.Н., Шербинко М.С., Хлусов И.А., Новицкий В.В.

Клеточно-молекулярный скрининг дисплазии соединительной ткани у подростков-спортсменов (пилотное исследование)

Дмитриев Ю.В., Минасян С.М., Байрашева В.К., Демченко Е.А., Галагудза М.М.

Прямое сравнение кардиопротективных свойств ингибиторов некроптоза на модели глобальной ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы

Иванов В.В., Шахристова Е.В., Степовая Е.А., Литвяков Н.В., Перекуча Н.А., Носарева О.Л., Фёдорова Т.С.,

Новицкий В.В.

Окислительный стресс в патогенезе сахарного диабета 1 типа: роль ксантинооксидазы адипоцитов

Кинит Д.Н., Мадонов П.Г., Шерстобоев Е.Ю., Данилец М.Г., Трофимова Е.С., Лигачева А.А., Дыгай А.М.

Иммунотоксические эффекты интерферона α -2b, модифицированного иммобилизацией с помощью технологии электронно-лучевого синтеза

Колесникова О.П., Гойман Е.В., Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Козлов В.А.

Ранние маркеры фенотипической гетерогенности системной красной волчанки в экспериментальной модели

Колобовникова Ю.В., Дмитриева А.И., Янкович К.И., Васильева О.А., Пурлик И.Л., Новицкий В.В., Уразова О.И.,

Хардикова С.А.

Галектин-1-опосредованная экспрессия белков-регуляторов клеточного цикла и ростовых факторов при раке желудка

Коненков В.И., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Климонтов В.В., Тяг Н.В., Черных В.В., Черных Д.В., Еремина А.В., Трунов А.Н.

Комбинации полиморфизмов в регуляторных участках генов цитокинов ассоциированы с диабетической ретинопатией у больных сахарным диабетом 2 типа

Кублинский К.С., Уразова О.И., Евтушенко И.Д., Куценко И.Г., Ковалева А.С.

Связь аллельного полиморфизма генов ангиогенных факторов с развитием генитального эндометриоза, его клиническими проявлениями и эффективностью лечения

Курочкина Ю.Д., Тихонова М.А., Тыфинова Т.В., Леплина О.Ю., Сизиков А.Э., Сулутьян А.Э., Коненкова Л.П., Чумасова О.А., Останин А.А., Черных Е.Р.

Характеристика дендритных клеток у больных ревматоидным артритом с различным типом медикаментозной терапии

Литвинова Л.С., Тодосенко Н.М., Хазиахматова О.Г., Малинина И.П., Юрова К.А.

Клеточные реакции CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов на дексаметазон в норме и при ревматоидном артрите в системе *in vitro*

Пахомова А.В., Першина О.В., Крутин В.А., Ермолаева Л.А., Ермакова Н.Н., Кудряшова А.И., Дыгай А.М., Пан Э.С., Рыбалкина О.Ю., Скурихин Е.Г.

Роль стволовых и прогениторных клеток в регенерации поджелудочной железы и семенников при метаболических нарушениях

Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Семенова Л.Ю.

Экспрессия NLRP3 инфламмасом церебрального эндотелия при воспалении вирусного генеза *in vitro*

Салмина А.Б., Бойцова Е.Б., Моргунов А.В., Панина Ю.А., Горина Я.В., Писарева Н.В., Нода М., Кутищева И.А., Мартынова Г.П.

Иммунопатогенез формирования атопических заболеваний

Цыганов М.М., Дерюшева И.В., Гарбуков Е.Ю., Ибрагимова М.К., Казанцева П.В., Бычков В.А., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В.

Явление потери гетерозиготности в опухолевой ткани молочной железы: связь с экспрессией генов монорезистентности

Чумакова С.П., Уразова О.И., Шипулин В.М., Новицкий В.В., Хардинова С.А.

Цитокины как индукторы постперфузионной системной воспалительной реакции у кардиохирургических больных с различной продолжительностью коронарной патологии

ЭКОНОМИКА И УПРАВЛЕНИЕ В ЗДРАВООХРАНЕНИИ

Бедорева И.Ю., Шалыгина Л.С., Латуха О.А.

Модель устойчивого развития научно-исследовательского учреждения здравоохранения, оказывающего высокотехнологическую медицинскую помощь

Финченко Е.А., Шалыгина Л.С., Садовой М.А., Мамонова Е.В., Шалыгина А.В.

Некоторые аспекты кадрового обеспечения здравоохранения в Сибирском федеральном округе

Финченко Е.А., Шапаров И.В., Иванинский О.И., Садовой М.А., Шалыгина Л.С.

Некоторые результаты экспертной оценки проблем организации амбулаторно-поликлинической помощи

А

Авдеев С.Н., 2
 Агеева Т.С., 2
 Адекенов С.М., 3
 Акбашева О.Е., 3
 Аксененко А.Э., 2
 Алифирова В.М., 1, 3
 Амантурлиева М.Е., 2
 Анайко И.Д., 2
 Аранович А.М., 1
 Арутюнова А.Б., 2
 Астафьева Н.Г., 2
 Атабаева О.Ш., 1
 Афоничев К.А., 3
 Аюшинова Н.И., 4

Б

Бабак С.А., 2
 Байрашева В.К., 4
 Байтингер Н.Н., 3
 Балаболкин И.И., 2
 Барбараш О.А., 3
 Бедорева И.Ю., 4
 Бежин А.И., 3
 Белоусов М.В., 1, 3
 Березикова Е.Н., 3
 Береснева Т.А., 3
 Беспалова И.Д., 1
 Бобровникова А.С., 2
 Бойцова Е.Б., 4
 Бондарь Л.Н., 2
 Борисенко О.В., 2
 Бородин Е.А., 2
 Бохан Н.А., 3
 Бочкарев Ю.М., 3
 Брагина О.Д., 3
 Букреева Е.Б., 2
 Буланова А.А., 2
 Булгакова В.А., 2
 Булдаков М.А., 3, 4
 Бухарин Д.Г., 1
 Бушланов П.С., 3
 Бычков В.А., 4

В

Вагнер А.Р., 3
 Валикова Т.А., 1
 Варакута Е.Ю., 3
 Варлачев В.А., 3
 Васильева О.А., 4
 Васильченко Д.В., 1
 Величко С.А., 1, 2
 Венгерович Н.Г., 2
 Венгеровский А.И., 2
 Вершинина М.В., 2
 Винник Ю.С., 1
 Воробьева О.О., 1
 Вторушин С.В., 1

Г

Гаврилов Ю.В., 4
 Гаврилова Е.Д., 4

Гагарина А.А., 1
 Галагудза М.М., 4
 Галиева Г.Ю., 3
 Гамова И.В., 2
 Гарбуков Е.Ю., 4
 Герасимов А.В., 3
 Гойман Е.В., 4
 Голубчиков П.Н., 2
 Гольдберг А.В., 2
 Горбунова Е.А., 1
 Гордиенко А.И., 1
 Горина Я.В., 4
 Горохова А.С., 3
 Гофман Ф.Ф., 1
 Гракова Е.В., 3
 Гребенюк О.В., 1
 Григорьян А.Ю., 3
 Груздева О.В., 3
 Гудилина Н.А., 3
 Гудков А.В., 3

Д

Данилец М.Г., 1, 3, 4
 Даренская М.А., 4
 Дворецкий Л.И., 2
 Дворниченко М.В., 4
 Деев И.А., 1
 Деев С.М., 3
 Демура А.Ю., 3
 Демченко Е.А., 4
 Демченко Е.Н., 4
 Денисова О.А., 2
 Деревцова К.З., 4
 Дерюшева И.В., 4
 Дзюман А.Н., 3
 Дмитриев Ю.В., 4
 Дмитриева А.И., 4
 Долгополов М.С., 2
 Дондуп О.М., 3
 Доронин Б.М., 3
 Дорофеева Ю.Б., 2
 Дорошенко А.В., 1
 Дробаха В.Е., 3
 Дудко Г.В., 2
 Дунаевская С.С., 1
 Дыгай А.М., 4
 Дылева Ю.А., 3
 Дьякова Е.Ю., 1

Е

Евтушенко И.Д., 4
 Елисеева Л.В., 2
 Еремина А.В., 4
 Ермакова Н.Н., 4
 Ермолаева Л.А., 4
 Есимова И.Е., 2
 Ефтеев Л.А., 2

Ж

Жариков А.Ю., 1
 Жданов В.В., 3

Жиляева Л.В., 3
 Жолобова Г.А., 1
 Жукова А.А., 1
 Жукова И.А., 3
 Жукова Н.Г., 3

З

Забелина Н.Р., 2
 Завадовская В.Д., 1
 Завадовская В.Д., 2
 Завалий А.А., 1
 Завьялова М.В., 4
 Заднипрный И.В., 3
 Запускалов И.В., 1
 Захарова А.Н., 1
 Зверев Я.Ф., 1
 Зеленин Н.В., 4
 Зельчан Р.В., 3
 Зима А.П., 1
 Зиновьев С.В., 2
 Зыкова М.В., 1

И

Ибрагимов М.К., 4
 Иванинский О.И., 4
 Иванов В.В., 3, 4
 Иванова С.А., 3
 Иванова Э.С., 3
 Ивасенко С.А., 3
 Ивченко А.О., 1
 Ивченко О.А., 1
 Идигов А.М., 3
 Ижевский П.В., 3
 Исаева О.В., 3
 Исаева А.С., 2

К

Кабачкова А.В., 1
 Кавардакова Е.С., 2
 Казанцева П.В., 4
 Казимирский А.Н., 4
 Калюжин В.В., 1, 3
 Калюжина Е.В., 1
 Камалтынова Е.М., 2
 Капилевич Л.В., 1
 Карнаушкина М.А., 2
 Касаткина Э.П., 3
 Касаткина Э.П., 3
 Кжышковска Ю.Г., 4
 Ким Л.Б., 4
 Киншт Д.Н., 4
 Киреева Е.А., 1
 Кириллова Н.А., 2
 Кироненко Т.А., 1
 Киселев В.И., 1
 Киселева Е.В., 3
 Климонтов В.В., 4
 Кобзарева Е.В., 3
 Кобзев Д.Ю., 2
 Кобякова О.С., 1
 Ковалева А.С., 4
 Ковнер А.В., 4
 Кожевников А.Н., 3

Козлов В.А., 4
 Колесников С.И., 4
 Колесникова Л.И., 4
 Колесникова О.П., 4
 Колмогоров В.Г., 2
 Колобовникова Ю.В., 4
 Комлева Ю.К., 4
 Конев М.А., 3
 Коненков В.И., 4
 Коненкова Л.П., 4
 Коновалов В.К., 2
 Коняева А.Д., 3
 Копьева К.В., 3
 Корнева Е.А., 4
 Королёва Е.Г., 3
 Королёва Е.С., 3
 Кочеткова М.В., 3
 Кошачева Ю.И., 3
 Кривошеина О.И., 1
 Кривошеков Е.В., 2
 Кривошеков С.В., 1, 3
 Крупин В.А., 4
 Кублинский К.С., 4
 Кубышкин А.В., 1, 3
 Кудряшова А.И., 4
 Кузнецов В.А., 3
 Кузнецов С.Б., 1
 Кукулина Е.М., 3
 Кулаков В.Н., 3
 Кулеш А.А., 3
 Куликов Е.С., 1, 2
 Курбачева О.М., 2
 Куркин В.А., 1
 Курочкина Ю.Д., 4
 Кутищева И.А., 4
 Куценко И.Г., 3, 4

Л

Ларькина М.С., 3
 Латуха О.А., 4
 Латышев О.Ю., 3
 Леонов С.Л., 2
 Леплина О.Ю., 4
 Лесная О.Д., 3
 Лившиц И.К., 1
 Лигачёва А.А., 1, 3, 4
 Липенгольц А.А., 3
 Литвинова Л.С., 4
 Литвяков Н.В., 4
 Логвинов С.В., 3
 Логвинов С.В., 3
 Логвинова Л.А., 1
 Лопатина О.Л., 4
 Лукьяненко Д.Ю., 1
 Лунен А.Дж.М., 3
 Лысенко И.В., 1
 Лычева Н.А., 1

М

Мадонов П.Г., 4
 Макарова Г.А., 2

Макачев А.С., 2
Максимов Г.В., 4
Малинина И.П., 4
Малыгин А.Г., 2
Мамонова Е.В., 4
Маричева О.Н., 3
Мартьянова Г.П., 4
Марущак А.А., 3
Мехоношина Н.В., 3
Миллер С.В., 2
Мильто И.В., 3
Минасян С.М., 4
Мираков К.К., 3
Миронова Ю.С., 3
Митрофанова И.В., 4
Михайловский М.В., 1
Мишина Е.С., 3
Модалова Ю.С., 2
Молодкин И.В., 2
Молоков А.В., 3
Моргун А.В., 4
Мусина Н.Н., 1
Мустафина А.Р., 3
Мустафина А.Р., 3

Н

Насырова Р.Ф., 4
Невская К.В., 2
Незнамов Н.Г., 4
Некрасов Э.В., 2
Некрылов С.А., 1
Неупокоева М.Н., 3
Нечаева Г.И., 2
Никифоров А.С., 2
Никифоров А.А., 1, 3
Никифорова Т.А., 3
Новик Г.А., 3
Новицкий В.В., 1, 2, 4
Нода М., 4
Носарева О.А., 4

О

Окминян Г.Ф., 3
Окороков А.О., 3
Окулов А.Б., 3
Орлов С.Н., 1, 4
Орлова Т.Н., 1
Осипенко А.Н., 1
Османова Д.З., 3
Останин А.А., 4
Останин С.А., 2

П

Пан Э.С., 4
Панина Ю.А., 4
Панкрушева Т.А., 3
Патышева М.Р., 4
Пахомова А.В., 4
Пашкова Е.Н., 4
Пенская Т.Ю., 3
Перекуча Н.А., 4
Перельман Ю.М., 2
Перельмутер В.М., 2
Перова Т.Б., 2
Перфилова И.А., 2

Перфильев В.Ю., 1
Першина О.В., 4
Песков С.А., 3
Петров В.А., 2
Пинелис В.Г., 2
Пирогов А.Б., 2
Писарева Н.В., 4
Плотников М.Б., 3
Плотникова Т.М., 1
Подрезова Е.В., 3
Пожидаев И.В., 3
Поздеева Н.А., 3
Пономарчук О.О., 4
Попова А.А., 3
Попонникова Т.В., 3
Порядин Г.В., 4
Потапов А.В., 3
Приходько А.Г., 2
Прищепова О.Ф., 1
Прокофьев В.Ф., 4
Просекина Н.М., 2
Просекова Е.В., 2
Прохоренко Т.С., 1
Пурлик И.А., 4
Пыков М.И., 3

Р

Разгуляева Н.Ф., 2
Ратынская И.А., 2
Рачковский М.И., 1
Рогова О.С., 3
Родионов Е.О., 2
Ростова Н.Б., 3
Рузанова Э.А., 2
Рыбалкина О.Ю., 4
Рязанцева А.А., 1, 3

С

Сабыныч В.А., 2
Сагалов Г.С., 2
Садовая Т.Н., 1
Садовой М.А., 1, 4
Салмасы Ж.М., 4
Салмина А.Б., 4
Самсонова Л.Н., 3
Санникова Е.С., 3
Саприна Т.В., 1, 4
Сарнадский В.Н., 1
Сатаева Т.П., 3
Семенова Л.Ю., 4
Семичев Е.В., 3
Сенаторова О.В., 3
Сергейчик О.И., 3
Сибиряков А.В., 3
Сизиков А.Э., 4
Сизикова А.Е., 4
Ситдикова Т.С., 2
Скальский С.В., 3
Скуридин В.С., 3
Скурихин Е.Г., 4
Слизевич Д.С., 2
Слонимская Е.М., 1
Слонимская Е.М., 4
Смагин А.А., 3
Смолякова В.И., 1

Соколова Т.Ф., 3
Солдатова О.В., 1
Соловцов М.А., 1
Стасюк Е.С., 3
Стахеева М.Н., 4
Степанова Е.П., 2
Степовая Е.А., 4
Стрилец Г.Н., 2
Суворова М.П., 2
Суковатых Б.С., 3
Сулутьян А.Э., 4
Суханова Г.А., 3
Сухих Е.С., 3
Суходоло И.В., 3
Сычев Д.А., 3, 4
Сюткина И.П., 3

Т

Табакеев Н.А., 1
Тепляков А.Т., 1, 3
Терентьева Н.Н., 1
Тигунцев В.В., 3
Тимофеева О.С., 3
Тихонова М.А., 4
Тихоновская О.А., 3
Тодосенко Н.М., 4
Толмачев М.Ю., 4
Третьякова О.С., 3
Трофимова Е.С., 1, 3, 4
Трунов А.Н., 4
Трус Д.А., 3
Тузинов С.А., 2
Турок Н.Е., 3
Турильская А.И., 2
Тушина Н.В., 1
Тыринова Т.В., 4
Тюменцева Е.С., 2
Тютрин И.И., 2, 3
Тюфиллин Д.С., 1
Тян Н.В., 4

У

Удовиченко Е.Н., 2
Уразова О.И., 2, 4
Уфимцева М.А., 3
Учасова Е.Г., 3
Ушаков А.В., 1
Ушакова Е.В., 2

Ф

Файзрахманов Р.А., 3
Фанаскова Е.В., 3
Федоренко О.Ю., 3
Фёдорова Т.С., 4
Федосеев М.А., 2
Федосеева И.Ф., 3
Федосенко С.В., 2
Филинчук О.В., 2
Финченко Е.А., 4
Фомина С.В., 1
Фомочкина И.И., 1
Фороносова О.А., 2
Фрейдлин М.Б., 3
Фролова И.Г., 1, 2
Фурса Н.С., 1

Х

Хабаров Д.В., 3
Хазиахматова О.Г., 4
Хардикова С.А., 4
Хлусов И.А., 4
Хоменья А.А., 2
Храмова Е.Б., 3
Христенко К.Ю., 1

Ц

Цыганов М.М., 4

Ч

Черданцева Л.А., 4
Чердынцева Н.В., 4
Чернов В.И., 3
Черногорюк Г.Э., 1
Черных А.И., 4
Черных В.В., 4
Черных Д.В., 4
Черных Е.Р., 4
Чернышева Г.А., 1
Чернявская Г.М., 1
Чумакова С.П., 4
Чумасова О.А., 4
Чурин А.А., 1
Чуяшенко Е.В., 2

Ш

Шайдук А.М., 2
Шалыгина А.В., 4
Шалыгина Л.С., 4
Шарапов И.В., 4
Шахманова Н.С., 1
Шахматов И.И., 1
Шахристова Е.В., 4
Шведов А.Н., 1
Шевченко А.В., 4
Шейно И.Н., 3
Шерстобоев Е.Ю., 3, 4
Шестаков В.В., 3
Шилов С.Н., 3
Шипулин В.М., 4
Шкурулий В.А., 4
Шперлинг И.А., 2
Шперлинг Н.В., 2
Шписман М.Н., 2
Шурыгин М.Г., 4
Шурыгина И.А., 4

Щ

Щербинко М.С., 4

Ю

Юдин М.А., 2
Юрова К.А., 4
Юсубов М.С., 1, 3
Юшков Б.Г., 4

Я

Яковлев С.В., 2
Янкович К.И., 4
Янулович О.С., 2
Яхин К.К., 4

Учебник «Патофизиология» . 5-е издание



Настоящее издание является фундаментально переработанным и дополненным вариантом учебников «Патологическая физиология» под редакцией А.Д. Адо и В.В. Новицкого (Томск, 1994), «Патофизиология» под редакцией В.В. Новицкого и Е.Д. Гольдберга (Томск, 2001, 2006), «Патофизиология» под редакцией В.В. Новицкого, Е.Д. Гольдберга, О.И. Уразовой (Томск, 2009), в создании которых принимали участие известные ученые и педагоги России и стран СНГ — представители московской, томской, казанской, харьковской и тбилисской научных школ патофизиологов.

Пересмотрен порядок глав и разделов, существенно обновлено их содержание в соответствии с современными тенденциями развития медико-биологической науки, фундаментальной и клинической медицины. Для облегчения усвоения материала приведены резюме, отражающие ключевые положения соответствующих разделов дисциплины.

Особое внимание уделено иллюстративному материалу. Разработаны новые таблицы и оригинальные цветные схемы, обобщающие и конкретизирующие наиболее важные вопросы этиологии, патогенеза и причинно-следственные взаимосвязи, лежащие в основе возникновения, развития и исхода заболеваний.

Для студентов медицинских вузов (всех факультетов).

bulletin.tomsk.ru

Начальная страница Mozilla... | Бюллетень сибирской ме... | bulletin.tomsk.ru/jour/index

Научно-практический рецензируемый журнал
БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ
Byulleten' sibirskoi meditsiny

ISSN: 1682-0363 (Print)
ISSN: 1819-3684 (Online)

Логин: _____
Пароль: _____
Запомнить меня Ввод

главная о журнале зарегистрироваться поиск свежий номер архив новости авторам архив 2002-2011

Поиск: Все

Листать:
• по выпускам
• по авторам
• по заглавиям

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ
BULLETIN OF SIBIRIAN MEDICINE

Научно-практический рецензируемый журнал
«Бюллетень сибирской медицины» является регулярным рецензируемым печатным изданием, отражающим результаты научных исследований, ориентированных на разработку передовых медицинских технологий.

Научно-практический рецензируемый журнал «Бюллетень сибирской медицины / Bulletin of Siberian Medicine» издается Сибирским государственным медицинским университетом с 2001 г.

Главный редактор — академик РАН В.В. Новицкий.

Журнал зарегистрирован в Министерстве Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций.

Свидетельство ПИ № 77-7366 от 26.03.2001 г.
ISSN 1682-0363

Журнал включен в Перечень периодических научных и научно-технических изданий, выпускаемых в РФ, в которых рекомендуется публикация основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (Перечень ВАК, редакция 01.12.2015).

Индексация:
• РИНЦ (RSCI, Science Index)
• КиберЛинка
• DIRECTORY OF OPEN ACCESS JOURNALS
• WoS (ESCI) с 2016 года.

Продолжая традиции первых медицинских журналов, на страницах «Бюллетеня сибирской медицины» публикуются лекции и обзоры ведущих специалистов по проблемам охраны здоровья, материалы оригинальных исследований в области экспериментальной и клинической медицины, материалы биографического и историко-медицинского характера. Регулярно выходят специальные тематические выпуски журнала.

Редакционная коллегия приглашает к сотрудничеству всех, кто заинтересован в развитии медицинской науки и практики.

ОТПРАВИТЬ РУКОПИСЬ

Главный редактор
Новицкий Вячеслав Викторович

OPEN ACCESS

Облако тегов:
адаптация артериальная гипертония бронхиальная астма воспаление гипоксия ДСТП история медицины ишемическая болезнь сердца магнитно-резонансная томография метаболический синдром ожирение окислительный стресс подростки сезонный атипичный сахарный диабет 1-го типа сахарный диабет 2-го типа спортсмены туберкулез тазовые дисфункции артериальная obstructive болезнь легких цитоплазма

Atom

14:28 10.01.2017

ISSN 1682-0363 (print)

ISSN 1819-3684 (on-line)

БЮЛЛЕТЕНЬ СИБИРСКОЙ МЕДИЦИНЫ

2017. Т. 16. № 4. 1–300

Подписной индекс 46319