

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В. И. ВЕРНАДСКОГО»
МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМЕНИ С. И. ГЕОРГИЕВСКОГО

КРЫМСКИЙ ЖУРНАЛ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

CRIMEAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL MEDICINE

2020, том 10, № 2

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

А. В. Кубышкин (главный редактор)
И. И. Фомочкина (заместитель главного редактора)
М. А. Плотникова (ответственный секретарь)
В. А. Белоглазов, К. А. Ефетов, А. М. Кацев

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Л. Дубаске (Вашингтон, США), *Е. В. Евстафьева* (Симферополь, Россия),
В. П. Завьялов (Турку, Финляндия), *И. Л. Кляритская* (Симферополь, Россия),
Я. Коки (Люблин, Польша), *Ю. Л. Криворутченко* (Симферополь, Россия),
А. В. Матвеев (Симферополь, Россия), *О. Матсуо* (Осакасама, Япония),
В. Ю. Михайличенко (Симферополь, Россия), *С. Н. Орлов* (Монреаль, Канада),
А. В. Петров (Симферополь, Россия), *А. Петросян* (Оаха, США),
М. Покорский (Ополе, Польша), *О. А. Притуло* (Симферополь, Россия),
А. Г. Резников (Киев, Украина), *И. Д. Сапегин* (Симферополь, Россия),
Г. М. Тарман (Инсбрук, Австрия), *Т. Трояновский* (Люблин, Польша),
С. Э. Шибанов (Симферополь, Россия), *Я. М. Шуба* (Киев, Украина),
А. Б. Хайтович (Симферополь, Россия)

На первой странице обложки — репродукция картины Роберта Тома «Трепанация в Древнем Перу»

АДРЕС РЕДАКЦИИ:
295051, бульвар Ленина, 5/7, г. Симферополь, ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского»
Медицинская академия имени С. И. Георгиевского
E-mail: nauka_3@ma.cfuv.ru

Журнал является правопреемником Трудов КГМУ, издающихся с 1935 г.

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций Российской Федерации. Свидетельство ПИ № ФС77-61787 от 18 мая 2015 г.

Индекс издания ISSN: 2224-6444 (печатная версия), 2244-6452 (online)

С 07 декабря 2015 года журнал включен в «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук».

В соответствии с распоряжением Минобрнауки России от 28 декабря 2018 года № 90-р, журнал считается включенным в Перечень ВАК по следующим научным специальностям и соответствующим им отраслям наук:

03.01.02 – Биофизика (медицинские науки); 03.01.03 – Молекулярная биология (биологические науки); 03.01.04 – Биохимия (медицинские науки); 03.01.07 – Молекулярная генетика (биологические науки); 03.01.08 – Биоинженерия (биологические науки); 03.01.09 – Математическая биология, биоинформатика (медицинские науки); 03.03.01 – Физиология (медицинские науки); 03.03.02 – Антропология (медицинские науки); 03.03.03 – Иммунология (медицинские науки); 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология (медицинские науки); 03.03.05 – Биология развития, эмбриология (медицинские науки); 03.03.06 – Нейробиология (медицинские науки); 14.03.01 – Анатомия человека (медицинские науки); 14.03.02 – Патологическая анатомия (медицинские науки); 14.03.03 – Патологическая физиология (медицинские науки); 14.03.05 – Судебная медицина (медицинские науки); 14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки); 14.03.07 – Химиотерапия и антибиотики (медицинские науки); 14.03.08 – Авиационная, космическая и морская медицина (медицинские науки); 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология (медицинские науки); 14.03.10 – Клиническая лабораторная диагностика (медицинские науки); 14.03.11 – Восстановительная медицина, спортивная медицина, лечебная физкультура, курортология и физиотерапия (медицинские науки).

Подписной индекс издания в каталоге Агентства «Роспечать» — 80124

Рекомендовано к печати ученым советом Медицинской академии имени С. И. Георгиевского (протокол № 5 от 28.05.2020)

УЧРЕДИТЕЛЬ:

ФГАОУ ВО «КРЫМСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В. И. ВЕРНАДСКОГО»
МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМЕНИ С. И. ГЕОРГИЕВСКОГО

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ORIGINAL ARTICLES

- Гусакова С. В., Гусакова В. С., Смаглий Л. В., Голованов Е. А., Чибисов Е. Е.,
Горянова А. М., Байков А. Н., Медведев М. А.**
ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ - КОТРАНСПОРТА В РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ.....6
- Gusakova S. V., Gusakova V. S., Smaglii L. V., Golovanov E. A., Chibisov E. E.,
Goryanova A. M., Baikov A. N., Medvedev M. A.**
ROLE OF Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ - COTRANSPORT IN REGULATION OF THE PULMONARY ARTERY TONE.....6
- Коган Е. А., Османов Ю. И., Щекин В. И., Демяшкин Г. А., Каем А. В.**
МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГИБРИДНОЙ ОПУХОЛИ
ПОЧКИ13
- Kogan E. A., Osmanov Y. I., Shchekin V. I., Demyashkin G. A., Kaem A. V.**
MORPHOLOGICAL FEATURES AND IMMUNOPHENOTYPIC ASPECTS OF HYBRID KIDNEY TUMOR.....13
- Мелконьянц Т. Г., Грушевская Ю. В., Егорова И. А., Быков И. М.,
Шестопапов А. В., Курзанов А. Н., Есауленко Е. Е.**
ВЛИЯНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ КОРРЕКЦИИ НА СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО
ГОМЕОСТАЗА У ЖЕНЩИН С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ МАЛОГО ТАЗА.....22
- Melkoniants T. G., Grushevskaya Yu. V., Egorova I. A., Bykov I. M., Shestopalov A. V.,
Kurzanov A. N., Esaulenko E. E.**
INFLUENCE OF ANTIOXIDANT CORRECTION ON THE CONDITION OF OXIDATIVE HOMEOSTASIS IN WOMEN
SUFFERING FROM PELVIS INFLAMMATORY DISEASES22
- Османов Ю. И., Коган Е. А., Демяшкин Г. А., Щекин В. И., Каем А. В.**
ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК В ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫХ
КАРЦИНОМАХ.....29
- Osmanov Y. I., Kogan E. A., Demyashkin G. A., Shchekin V. I., Kaem A. V.**
FEATURES OF EXPRESSION OF STEM CELL MARKERS IN RENAL CELL CARCINOMAS29
- Павлюченко И. И., Безрукова О. С., Зобенко В. Я., Есауленко Е. Е., Басов А. А.,
Сторожук А. П.**
СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ В
РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ ПРОТЕКАЮЩЕЙ БЕРЕМЕННОСТИ.....40
- Pavlyuchenko I. I., Bezrukova O. S., Zobenko V. Ya., Esaulenko E. E., Basov A. A.,
Storozhuk A. P.**
THE STATE OF ANTIOXIDANT SYSTEM AND CYTOKINE PROFILE AT DIFFERENT PERIODS OF A
PHYSIOLOGICALLY ONGOING PREGNANCY.....40
- Шаповалова Е. Ю., Демяшкин Г. А., Маланичев М. Ю., Погосян Д. А.,
Щекин В. И.**
ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА ИНТАКТНЫХ
КЕРАТИНОЦИТОВ ПРИ СИСТЕМНОМ ВОСПАЛЕНИИ.....48

Shapovalova Ye. Yu., Demyashkin G. A., Malanichrev M. Yu., Pogasyan D. A., Shchekin V. I.

IMMUNOPHENOTYPIC CHARACTERISTIC OF PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF INTACT KERATINOCYTES IN SEPSIS48

Шперлинг И. А., Шулепов А. В., Шперлинг Н. В., Юркевич Ю. В., Кузьмина О. Ю., Арутюнян А. А., Заргарова Н. И.

САНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЛОКАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КОМПРЕССИОННОЙ ТРАВМЕ МЯГКИХ ТКАНЕЙ53

Shperling I. A., Shulepov A. V., Shperling N. V., Yurkevich Y. V., Zargarova N. I., Kuzmina O. Yu., Arutyunyan A. A.

SANOGENETIC AND PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF LOCAL APPLICATION OF HYALURONIC ACID IN EXPERIMENTAL SOFT TISSUE COMPRESSION TRAUMA53

Яглова Н. В., Обернихин С. С., Яглов В. В.

ИЗМЕНЕНИЯ СЕКРЕТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ В МАСТОЦИТАХ КОЖИ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ СИСТЕМОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА.....61

Yaglova N. V., Obernikhin S. S., Yaglov V. V.

CHANGES IN SECRETION OF RAT SKIN MAST CELLS IN SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE61

ОБЗОРЫ

REVIEWS

Горбунов А. А., Сорокина Л. Е., Чегодарь Д. В., Кубышкин А. В., Фомочкина И. И.

ДИАГНОСТИКА COVID-19: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ В ОТРАСЛИ69

Gorbunov A. A., Sorokina L. E., Chegodar D. V., Kubishkin A. V., Fomochkina I. I.

COVID-19 DIAGNOSTICS: CURRENT STATE OF THE PROBLEM AND PROSPECTS IN THE BRANCH.....69

Курзанов А. Н., Быков И. М.

НЕЙРОМОДУЛЯТОРНАЯ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНАЯ СИСТЕМА TIP39-PTH2R78

Kurzanov A. N., Bykov I. M.

NEUROMODULATOR LIGAND-RECEPTOR SYSTEM TIP39 - PTH2R78

Тутаев К. Ю., Сtryгин А. В., Букатин М. В., Толкачев Б. Е., Морковин Е. И., Колобродова Н. А., Сtryгина А. О., Кузнецова О. Ю., Срослова Г. А., Доценко А. М., Лисина О. А., Кнышова Л. П.

СТЕХИОМЕТРИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ МЕТАБОЛИЗМА ЖИВОТНОЙ КЛЕТКИ: ПОНЯТИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ В БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ.....86

Tutaev K. Yu., Strygin A. V., Bukatin M. V., Tolkachev B. E., Morkovin E. I., Kolobrodova N. A., Strygina A. O., Kuznetsova O. Yu., Sroslova G. A., Docenko A. M., Lisina O. A., Knyshova L. P.

STOCHIOMETRIC MODELS OF ANIMAL CELL METABOLISM: CONCEPT AND APPLICATION IN BIOMEDICAL RESEARCH86

Шестопапов А. В., Шатова О. П., Комарова Е. Ф., Румянцев С. А.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СОПРЯЖЕНИЯ В СИСТЕМЕ «СУПЕРОРГАНИЗМА» (ХОЗЯИН – МИКРОБИОТА).....95

Shestopalov A. V., Shatova O. P., Komarova E. F., Romyantsev S. A.

FEATURES OF METABOLIC COUPLING IN THE «SUPERORGANISM» SYSTEM (HOST – MICROBIOTA)95

Штыгашева О. В., Агеева Е. С. АМБИВАЛЕНТНОСТЬ ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА.....	104
Shtygasheva O. V., Ageeva E. S. AMBIVALENCE OF CHRONIC INFLAMMATION IN THE MUSCULOUS STOMACH	104

ЮБИЛЕЙ

ANNIVERSARY

Фоминых Т. А., Куцевол Б. Л., Киселев В. В., Захарова А. Н., Уланов В. С., Саенко А. Г., Грицкевич О. Ю. ПРОФЕССОР АНАТОЛИЙ АНДРЕЕВИЧ БАБАНИН (К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ)	112
Fominykh T. A., Kutsevol B. L., Kisel'ev V. V., Zakharova A. N., Ulanov V. S., Saenko A. G., Gritskevich O. Yu. PROFESSOR ANATOLY ANDREEVICH BABANIN (THE 80TH ANNIVERSARY)	112

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ КОТРАНСПОРТА В РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИИ

Гусакова С. В.¹, Гусакова В. С.¹, Смаглий Л. В.¹, Голованов Е. А.¹, Чибисов Е. Е.¹,

Горянова А. М.¹, Байков А. Н.², Медведев М. А.²

¹Кафедра биофизики и функциональной диагностики, ²кафедра нормальной физиологии, ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, 634050, ул. Московский тракт 2, г. Томск, Россия

Для корреспонденции: Гусакова Светлана Валерьевна, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой биофизики и функциональной диагностики ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, e-mail: gusacova@yandex.ru

For correspondence: Svetlana V. Gusakova, MD, Head of Biophysics and Functional Diagnostics Department, Siberian State Medical University, e-mail: gusacova@yandex.ru

Information about authors:

Gusakova S. V., <https://orcid.org/0000-0001-5047-8668>

Gusakova V. S., <https://orcid.org/0000-0002-0635-6548>

Smaglii L. V., <https://orcid.org/0000-0002-5263-027X>

Golovanov E. A., <https://orcid.org/0000-0002-9383-237X>

Chibisov E. E., <https://orcid.org/0000-0001-7384-9134>

Goryanova A. M., <https://orcid.org/0000-0002-2856-7258>

Baikov A. N., <https://orcid.org/0000-0002-6321-7595>

Medvedev M. A., <https://orcid.org/0000-0002-5443-0271>

РЕЗЮМЕ

Цель. Исследовали сократительную активность сосудистых сегментов легочной артерии крысы с интактным эндотелием в неизоосмотических растворах и вклад Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ котранспорта (НКСС) в развитие сокращения.

Материал и методы. Влияние неизоосмотических растворов и блокатора НКСС на сократительную активность сосудистых сегментов исследовали с использованием четырехканальной механографической установки MyobathII и аппаратно-программного комплекса LAB-TRAX-4/16 (Германия). Гиперосмотическое сжатие вызвали добавлением в раствор Кребса 50-300 мМ сахарозы, гипоосмотическую среду создавали снижением концентрации NaCl с 70 мМ до 40 мМ. В качестве блокатора НКСС использовали буметанид. Амплитуду сократительных ответов оценивали в процентах от контрольного сокращения на гиперкалиевый раствор.

Результаты. Добавление 50-300 мМ сахарозы к инкубационному раствору Кребса вызывало дозозависимое развитие поддерживаемых сократительных ответов. Амплитуда гиперосмотической стрикции увеличивалась при ингибировании НКСС. Помещение сегментов в гипоосмотическую среду вызывало развитие транзиторных сократительных ответов, амплитуда которых снижалась в присутствии ингибитора НКСС.

Заключение. Помещение сегментов легочной артерии в гипер- и гипосмотическую среду приводит к развитию сократительных ответов, амплитуда которых зависит от активности НКСС.

Ключевые слова: легочная артерия, гладкомышечные клетки, Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ - котранспорт, объем клеток

ROLE OF Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ - COTRANSPORT IN REGULATION OF THE PULMONARY ARTERY TONE

Gusakova S. V.¹, Gusakova V. S.¹, Smaglii L. V.¹, Golovanov E. A.¹, Chibisov E. E.¹,
Goryanova A. M.¹, Baikov A. N.², Medvedev M. A.²

¹Biophysics and Functional Diagnostics Department, ²Normal Physiology Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

SUMMARY

Purpose. We studied the role of Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ cotransport (NKCC) in contractile activity of pulmonary artery segments with intact endothelium induced by incubation in nonisosmotic solutions.

Materials and methods. The influence of nonisosmotic solutions and blocker of NKCC on vascular segments mechanical tension was studied in isometric regime with organ bath technique performed with the 4-channel Myobath II and software complex LAB-TRAX-4/16 (Germany). Hyperosmotic shrinkage was induced by adding 50-300 mM sucrose to the Krebs solution, the hypoosmotic environment was created by reducing the concentration of NaCl from 70 mM to 40 mM. Bumetanide was used as an NKCC blocker. The amplitude of the contractile responses was evaluated as a percentage of the control contraction in highpotassium solution.

Results. The addition of 50-300 mM sucrose to the Krebs incubation solution caused a development of dose-dependent of sustained contractile responses. The amplitude of hyperosmotic striction increased with inhibition of

NKCC. Incubation of segments in hypoosmotic solution caused the development of transient contractile responses, the amplitude of which decreased in the presence of NKCC inhibitor.

Conclusion. Incubation of pulmonary artery vascular segments in hyper- and hypoosmotic solutions induces contractile responses, the amplitude of which depends on the NKCC activity.

Key words: pulmonary artery, smooth muscle cells, Na^+ , K^+ , 2Cl^- -cotransport, cell volume.

Развитие сердечно-сосудистых заболеваний связано с нарушением регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток (ГМК) сосудов. Среди патологий сердечно-сосудистой системы особое место занимает легочная гипертензия, сопровождающаяся стойким и прогрессирующим повышением сосудистого сопротивления. Одним из механизмов регуляции сосудистого тонуса является изменение клеточного объема. Показано, что при легочной гипертензии наблюдается набухание ГМК легочной артерии, сопровождающееся ремоделированием сосудов [1]. Регуляция объема клеток связана с механизмами перераспределения ионов, прежде всего Na^+ , K^+ и Cl^- , а также Ca^{2+} , ответственного за развитие констрикции вследствие сжатия или набухания клеток [2].

Ранние исследования показали, что гипоосмотическая среда вызывает сокращение артерий, сопровождающееся деполяризацией и увеличением $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вовлекающим активацию $\text{Ca}_v1.2$ каналов [3].

При осмотическом сжатии регуляторное увеличение объема клеток (Regulatory Volume Increase, RVI) связано с переносом в клетку Na^+ и K^+ посредством Na^+/H^+ антипорта и $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ антипорта, а также $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ котранспорта и Na^+/Cl^- котранспорта [4, 5, 6, 7]. При осмотическом набухании клеток регуляторное уменьшение объема (Regulatory Volume Decrease, RVD) опосредовано выходящим транспортом K^+ и Cl^- через K^+ и Cl^- каналы, K^+/Cl^- котранспорт, K^+/H^+ - обменник и $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменник [4; 5; 6]. Осмотическое набухание также сопровождается активацией объем-чувствительных анионных каналов выходящего выпрямления / объем-регулируемых ионных каналов [5; 8; 9]. Роль ионных транспортеров в регуляции объема показана для различных видов клеток: нейронов гиппокампа и мозжечка, симпатических нейронов, эритроцитов, гепатоцитов [7]. Объем-чувствительные механизмы регуляции тонуса сосудов в гладкомышечных клетках легочной артерии практически не изучены. Известно, что вазоконстрикторы, повышающие $[\text{Ca}^{2+}]_i$, активируют Na^+ , K^+ , 2Cl^- котранспорт (NKCC) в ГМК сосудов [10]. Ингибирование этого переносчика наблюдается под влиянием вазодилататоров. Сократительная активность гладкомышечных клеток регулируется эндотелием, который продуцирует вазоактивные вещества. В данной работе мы исследо-

вали роль NKCC в объем-зависимой регуляции сократительной активности ГМК легочной артерии с интактным эндотелием.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на кольцевых сегментах легочной артерии крыс-самцов линии Wistar с интактным эндотелием методом механографии, описанным ранее в [11]. Измерение механического напряжения (МН) сосудистых сегментов проводилось с использованием четырехканальной механографической установки MyobathII и аппаратно-программного обеспечения LAB-TRAX-4/16 (Германия). Для моделирования гиперосмотической стрикции в раствор Кребса добавляли непроницающий осмолит сахарозу (Sigma) в концентрации 50-300 мМ. Гипоосмотическую стрикцию получали помещением сегментов легочной артерии в модифицированный раствор Кребса, содержащий 40-70 мМ NaCl . Для исследования вклада Na^+ , K^+ , 2Cl^- - котранспорта (NKCC) в сократительную активность ГМК использовали ингибитор NKCC буметанид (Sigma). Амплитуду сократительных ответов рассчитывали в процентах от амплитуды сокращения, вызванного гиперкалиевым раствором Кребса, величину которого принимали за 100%. Данные представлены в виде «медиана \pm квартильный интервал». Достоверными считали различия при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование сократительной активности гладкомышечных сегментов легочной артерии, предсокращённых деполяризацией гладкомышечных клеток

Деполяризацию гладкомышечных клеток вызывали инкубацией сосудистых сегментов в гиперкалиевом растворе Кребса. Гиперкалиевый раствор получали эквимольным замещением NaCl на KCl . Эквимольное замещение 10- 60 мМ NaCl на KCl приводило к дозозависимому увеличению механического напряжения (Табл. 1). Амплитуду сократительных ответов на действие гиперкалиевого раствора в разных концентрациях рассчитывали в процентах от максимальной амплитуды сокращения, которая достигалась при действии гиперкалиевого раствора, содержащего 60 мМ KCl . Для дальнейших исследований был выбран гиперкалиевый раствор с эквимольным замещением NaCl на

KCl в концентрации 15 мМ, при котором наблюдался сократительный ответ, близкий к полумаксимальному.

Исследование сократительной активности сегментов легочной артерии крысы в неизоосмотических растворах.

Влияние гиперосмотической стрижки гладкомышечных клеток на сократительную активность сегментов легочной артерии.

Сократительную активность ГМК легочной артерии крысы в гиперосмотической среде изучали помещением сосудистых сегментов в модифицированный физиологический раствор

Кребса, содержащий 50 - 300 мМ сахарозы в качестве непроникающего осмолита. При увеличении концентрации сахарозы в растворе до 50 – 250 мМ наблюдалось статистически значимое увеличение сократительного ответа ($p < 0,05$, $n=8$). Использование растворов с более высокой концентрацией сахарозы не приводило к дополнительному увеличению амплитуды сократительного ответа (Табл. 2). В дальнейшем использовали раствор, содержащий 120 мМ сахарозы, при аппликации которого наблюдался сократительный ответ с амплитудой, близкой к полумаксимальной.

Таблица 1

Влияние гиперкалиевого раствора различной концентрации на сократительную активность легочной артерии

Эквиволярное замещение NaCl на KCl, мМ	Амплитуда сократительного ответа, %
10	24,5 (21,0; 26,9)*
15	61,5 (58,6; 63,7)*
20	77,2 (75,5; 78,5)*
30	93,4 (92,6; 94,1)*
40	96,8 (96,3; 97,6)*
50	98,1 (97,8; 98,3)

Примечание: Величины сокращений рассчитаны в процентах (%) от контрольного гиперкалиевого сокращения (60 мМ KCl). * - статистически значимое отличие от амплитуды сократительного ответа на 60 мМ KCl ($p < 0,05$, $n=8$)

Таблица 2

Влияние гиперосмотического раствора на сократительную активность сегментов легочной артерии

Концентрация сахарозы, мМ	Амплитуда сократительного ответа, %
50	13,1 (9,4; 17,1)
100	36,3 (30,7; 38,0)
120	57,6 (48,1; 64,6)
150	81,9 (78,4; 86,2)
200	91,2 (87,3; 93,6)
250	93,1 (91,4; 95,3)
300	90,0 (85,4; 94,7)

Примечание: Амплитуды сократительных ответов представлены в процентах (%) от контрольного гиперкалиевого сокращения (15 мМ KCl).

Исследование влияния гипоосмотической среды на сократительную активность гладкомышечных клеток легочной артерии крысы

Помещение сегментов в гипоосмотический раствор Кребса, содержащий 40 – 70 мМ NaCl, вызывало развитие транзиторных сократительных ответов. Максимальный сократительный ответ наблюдался при инкубации сегментов в растворе, содержащем 40 мМ NaCl ($n=8$, $p < 0,05$): амплитуда ответа составила 38,21(35,93;46,97)

% от контрольного гиперкалиевого сокращения (Табл. 3), длительность сокращения - 32,5 (30,0; 39,0) минуты.

Исследование роли Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ котранспорта в сокращении гладкомышечных клеток легочной артерии в гиперосмотической среде

Для исследования роли НКСС в гиперосмотическом сжатии клеток, сегменты легочной артерии предобрабатывали буметанидом в концентрации 10, 50 и 100 мкМ в течение 5,

Таблица 3

Влияние гипосмотического раствора на амплитуду и время транзиторного сократительного ответа сегментов легочной артерии крысы

Концентрация NaCl, mM	Амплитуда сократительного ответа, %
40	72,9 (63,6; 74,4)
50	56,4 (55,5; 57,3)
60	50,5 (48,6; 52,3)
70	45,0 (43,8; 46,1)

Примечание: Амплитуды сократительных ответов представлены в процентах (%) от контрольного гиперкалиевого сокращения (15 mM KCl).

15 и 30 минут, после чего вызывали стрикцию помещением сегментов в раствороор Кребса, содержащий 120 mM сахарозы. Предобработка сегментов с 10 мкМ буметанида в течение 15 и 30 мин (но не 5 минут) статистически значимо повышала амплитуду сократительного ответа, индуцированного гиперосмотической средой

(n=8, p<0,05). Буметанид в концентрации 50 и 100 мкМ повышал амплитуду гиперосмотически-индуцированного сократительного ответа не зависимо от времени предобработки. Максимальное повышение амплитуды наблюдалось при предобработке сегментов 100 мкМ буметанида в течение 30 минут (Табл. 4).

Таблица 4

Влияние буметанида на сократительную активность сосудистых сегментов легочной артерии крысы, предсокращенных гиперосмотическим раствором Кребса

Тестируемые растворы	Время предобработки, мин			
	5	15	30	
	Амплитуда сократительного ответа, %			
120 mM Сахарозы	57,6 (48,1; 64,6)	57,6 (48,1; 64,6)	57,6 (48,1; 64,6)	
+Буметанид, мкМ	10	51,5 (43,0; 60,1)	86,2 (82,2; 90,1)*	68,5 (68,0; 69,0)*
	50	93,0 (88,8; 97,1)*	129,3 (120,9; 137,7)*	104,8 (99,4; 110,1)*
	100	70,0 (66,7; 73,2)*	86,4 (78,3; 94,6)*	152,2 (136,6; 167,8)*

Примечание: Амплитуды сократительных ответов представлены в процентах (%) от контрольного гиперкалиевого сокращения (15 mM KCl), * - p<0,05, статистически значимые отличия от амплитуды сокращения на действие 120 mM сахарозы без буметанида.

Исследование роли НКСС в сократительной активности гладкомышечных клеток легочной артерии в гипосмотической среде

Исследование влияние ингибитора НКСС буметанида проводили на сегментах, инкубируемых в гипосмотическом растворе Кребса, содержащем 40 mM NaCl. Буметанид добавляли в концентрациях 10, 50, 100 мкМ и варьировали время предобработки от 5 до 30 мин. При использовании 5 мкМ буметанида и длительности предобработки 5 мин наблюдалось увеличение амплитуды гипосмотической стрикции. Увеличение концентрации буметанида и времени предобработки приводило к достоверному снижению амплитуды гипосмотической стрикции (табл. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Объем клеток – жестко регулируемый параметр. Изменение объема клеток связано с пере-

распределением воды между внутриклеточной и внеклеточной жидкостью, что может привести к изменению внутриклеточных концентраций ионов и нарушению функции клеток [12].

Регуляция объема клеток включает механизмы регуляторного увеличения и регуляторного уменьшения объема клеток [4, 10], ключевым звеном которых является НКСС [4, 10, 13]. В случае гладкомышечных клеток активация указанных механизмов сопровождается изменением их сократительной активности и, как следствие, тонуса сосуда. Известно, что гиперосмотическое сжатие клеток приводит к поддерживаемой активации НКСС [13]. В деэндотелизированных сегментах аорты крысы гиперосмотическое сжатие клеток сопровождалось развитием поддерживаемого сократительного ответа, амплитуда которого снижалась в присутствии ингибитора НКСС буметанида [13]. В исследованиях, проведенных ранее на деэндотелизированных сег-

Таблица 5

Влияние буметанида на амплитуду гипоосмотической стрикции гладкомышечных клеток легочной артерии крысы в растворе Кребса, содержащем 40 мМ NaCl

		Время предобработки буметанидом, мин		
		5	15	30
40 мМ NaCl, %	контроль	69,29 (62,20;74,40)	69,29 (62,20;74,40)	69,29 (62,20;74,40)
+буметанид, мкМ	10	80,13* (71,94;86,51)	53,96* (49,11;55,45)	48,56* (42,03;55,09)
	50	79,56 (65,57;82,12)	43,24* (35,05;51,42)	38,72* (35,03;42,42)
	100	61,40 (55,09;79,60)	48,96 (44,95;65,38)	32,97* (23,74;42,2)

Примечание: Амплитуды сократительных ответов представлены в процентах (%) от контрольного гиперкалиевого сокращения (15 мМ KCl), * - статистически значимое отличие от амплитуды 40NaCl в отсутствии буметанида ($p \leq 0,05$), $n=8$.

ментах легочной артерии крысы [11] были получены разнонаправленные эффекты буметанида, зависящие как от концентрации, так и длительности предобработки. Так, предобработка 50 мкМ буметанида в течение 30 минут приводила к снижению амплитуды сократительного ответа, тогда как меньшие концентрации, напротив, увеличивали её [11]. Механизм развития НКСС-опосредованного сокращения связан с увеличением $[Cl^-]_i$ до концентраций, превышающих равновесную, активации входящих Cl^- токов и деполяризации мембраны ГМК с последующей активацией Ca^{2+} каналов и входящих Ca^{2+} токов [10]. Исследование сегментов с интактным эндотелием показало увеличение амплитуды сокращения при ингибировании НКСС, что позволяет предположить влияние эндотелиальных факторов на работу этих переносчиков. Так, эндотелиальный констрикторный фактор эндотелин-1 активизирует механизмы повышения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} [14]. На ГМК легочной артерии крысы методом patch-clamp продемонстрировано, что эндотелин-1 стимулирует входящие Cl^- токи, способствующие деполяризации мембраны ГМК [15, 16]. Также, в исследованиях Voeseen E.I. показано усиление высвобождения эндотелина-1 при перфузии мозгового вещества почки гипертоническим раствором [17]. Можно предположить, что гиперосмотическое сжатие эндотелиальных клеток может приводить к высвобождению эндотелина-1 и последующей активации констрикторных сигнальных путей. Выявленные различия в действии буметанида на сократительные ответы сегментов ЛА в зависимости от эндотелиальных факторов неясны и требует дальнейшего изучения.

В сегментах легочной артерии, инкубируемых в гипоосмотической среде, буметанид

снижал амплитуду гипоосмотической стрикции как в сегментах с интактным эндотелием, так и деэндотелизированных (данные представлены в [11]), что свидетельствует об отсутствии значимого влияния эндотелиальных факторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменение осмолярности инкубационной среды ведет к сокращению гладкомышечных сегментов легочной артерии с интактным эндотелием. Снижением осмолярности среды приводит к развитию транзиторного сократительного ответа, тогда как в гиперосмотической среде наблюдается поддерживаемый сократительный ответ. Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ котранспорт является одним из основных регуляторов сократительной активности гладких мышц легочной артерии при изменении объема клеток. Ингибирование буметанид-чувствительного Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ котранспорта подавляет сократительные ответы сосудистых гладких мышц в условиях гипоосмотического набухания клеток, но усиливает в условиях гиперосмотического сжатия.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке РФФИ (18-44-703008, 18-44-700009, 18-315-00296) и администрации Томской области (договор № 18-10).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wehner F, Bondarava M, ter Veld F, Endl E, Nurnberger H.R, Li T. Hypertonicity-induced cation channels. Acta Physiol. 2006;187:21–25. doi:10.1111/j.1748-1716.2006.01561.x

2. Plettenberg S, Weiss E.C, Lemor R, Wehner F. Subunits alpha, beta and gamma of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) are functionally related to the hypertonicity-induced cation channel (HICC) in rat hepatocytes. *Pflugers Arch*. 2008;455:1089–1095. doi:10.1007/s00424-007-0355-7

3. Wijetunge S., Hughes A. D. Mechanism of Contraction of Rat Isolated Tail Arteries by Hypotonic Solutions. *Journal of Vascular Research* 2005;42(2):93–100. doi:10.1159/000083368

4. Hoffmann E.K, Simonsen L.O. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiological Reviews*. 1989;69:315–382. doi:10.1152/physrev.1989.69.2.315

5. Okada Y. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *American Journal of Physiology*. 1997;273:755–789. doi:10.1152/ajpcell.1997.273.3.C755

6. Baumgarten C.M., Feher J.J. Osmosis and the regulation of cell volume. In: Sperelakis N, editor. *Cell Physiology Source Book*. San Diego: Academic Press. 1998:253–292. doi:10.1016/B978-0-12-656970-4.50021-X

7. Okada Y., Maeno E., Shimizu T., Dezaki K., Wang J., Morishima S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol*. 2001;1;532(Pt 1):3–16. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0003g.x

8. Nilius B., Eggermont J., Voets T., Buyse G., Manolopoulos V., Droogmans G. Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 1997;68:69–119. doi:10.1016/s0079-6107(97)00021-7

9. Osei-Owusu J., Yang J., del Carmen Vitery M., Qiu Z. Molecular Biology and Physiology of Volume-Regulated Anion Channel (VRAC). *Curr Top Membr*. 2018;81:177–203. doi:10.1016/bs.ctm.2018.07.005

10. Orlov S.N., Koltsova S.V., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Dulin N.O. NKCC1 and NKCC2: The pathogenetic role of cation-chloride cotransporters in hypertension. *Genes Dis*. 2015;2(2):186–196. doi:10.1016/j.gendis.2015.02.007.

11. Гусакова С.В., Рыдченко В.С., Смаглый Л.В., Голованов Е.А., Чибисов Е.Е., Горянова А.М., Ковалев И.В., Орлов С.Н. Объем-зависимая регуляция сократительной активности гладкомышечных клеток сосудов малого круга кровообращения. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины* 2019;9(2):5–11.

12. Pedersen S.F., O'Donnell M.E., Anderson S.E., Cala P.M. Physiology and pathophysiology of Na⁺/H⁺ exchange and Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransport in the heart, brain, and blood. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;291:R1–R25. doi:10.1152/ajpregu.00782.2005

13. Anfinogenova Y.J., Baskakov M.B., Kovalev I.V., Kilin A.A., Dulin N.O., Orlov S.N. Cell-volume-dependent vascular smooth muscle contraction: role of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransport, intracellular Cl⁻ and L-type Ca²⁺

channels. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 2004;449:42–55. doi:10.1007/s00424-004-1316-z

14. Bouallegue A., Daou G.B., Srivastava A.K. Endothelin-1-induced Signaling Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells. *Curr Vasc Pharmacol*. 2007;5(1),45–52. doi:10.2174/157016107779317161

15. Salter K.J., Turner J.L., Albarwani S., Clapp L.H., Kozlowski R.Z. Ca²⁺-activated Cl⁻ And K⁺ Channels and Their Modulation by endothelin-1 in Rat Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Exp Physiol*. 1995;80(5):815–24. doi:10.1113/expphysiol.1995.sp003889

16. Salter K.J., Kozlowski R.Z. Endothelin Endothelin-Receptor Coupling to Potassium and Chloride Channels in Isolated Rat Pulmonary Arterial Myocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;279(2):1053–62

17. Boesen E.I., Pollock D.M. Cooperative role of ETA and ETB receptors in mediating the diuretic response to intramedullary hyperosmotic NaCl infusion. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;299(6):F1424–F1432. doi:10.1152/ajprenal.00015.2010.

REFERENCES

1. Wehner F, Bondarava M, ter Veld F, Endl E, Nurnberger H.R, Li T. Hypertonicity-induced cation channels. *Acta Physiol*. 2006;187:21–25. doi:10.1111/j.1748-1716.2006.01561.x

2. Plettenberg S, Weiss E.C, Lemor R, Wehner F. Subunits alpha, beta and gamma of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) are functionally related to the hypertonicity-induced cation channel (HICC) in rat hepatocytes. *Pflugers Arch*. 2008;455:1089–1095. doi:10.1007/s00424-007-0355-7

3. Wijetunge S., Hughes A. D. Mechanism of Contraction of Rat Isolated Tail Arteries by Hypotonic Solutions. *Journal of Vascular Research* 2005;42(2):93–100. doi:10.1159/000083368

4. Hoffmann E.K, Simonsen L.O. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiological Reviews*. 1989;69:315–382. doi:10.1152/physrev.1989.69.2.315

5. Okada Y. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *American Journal of Physiology*. 1997;273:755–789. doi:10.1152/ajpcell.1997.273.3.C755

6. Baumgarten C.M., Feher J.J. Osmosis and the regulation of cell volume. In: Sperelakis N, editor. *Cell Physiology Source Book*. San Diego: Academic Press. 1998:253–292. doi:10.1016/B978-0-12-656970-4.50021-X

7. Okada Y., Maeno E., Shimizu T., Dezaki K., Wang J., Morishima S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol*. 2001;1;532(Pt 1):3–16. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0003g.x

8. Nilius B., Eggermont J., Voets T., Buyse G., Manolopoulos V., Droogmans G. Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Progress*

- in Biophysics and Molecular Biology. 1997;68:69–119. doi:10.1016/s0079-6107(97)00021-7
9. Osei-Owusu J., Yang J., del Carmen Vitery M., Qiu Z. Molecular Biology and Physiology of Volume-Regulated Anion Channel (VRAC). *Curr Top Membr.* 2018;81:177–203. doi:10.1016/bs.ctm.2018.07.005
10. Orlov S.N., Koltsova S.V., Kapilevich L.V., Gusakova S.V., Dulin N.O. NKCC1 and NKCC2: The pathogenetic role of cation-chloride cotransporters in hypertension. *Genes Dis.* 2015;2(2):186-196. doi:10.1016/j.gendis.2015.02.007.
11. Gusakova S.V., Rydchenko V.S., Smaglii L.V., Golovanov E.A., Chibisov E.E., Goryanova A.M., Orlov S.N. Volume-dependent regulation of contractile activity of smooth muscle cells of pulmonary vessels. *Crimea Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2019;9(2):5-11. (In Russ).
12. Pedersen S.F., O'Donnell M.E., Anderson S.E., Cala P.M. Physiology and pathophysiology of Na⁺/H⁺ exchange and Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransport in the heart, brain, and blood. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;291:R1–R25. doi:10.1152/ajpregu.00782.2005
13. Anfinogenova Y.J., Baskakov M.B., Kovalev I.V., Kilin A.A., Dulin N.O., Orlov S.N. Cell-volume-dependent vascular smooth muscle contraction: role of Na⁺,K⁺, 2Cl⁻ cotransport, intracellular Cl⁻ and L-type Ca²⁺ channels. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 2004;449:42–55. doi:10.1007/s00424-004-1316-z
14. Bouallegue A., Daou G.B., Srivastava A.K. Endothelin-1-induced Signaling Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells. *Curr Vasc Pharmacol.* 2007;5(1),45-52. doi:10.2174/157016107779317161
15. Salter K.J., Turner J.L., Albarwani S., Clapp L.H., Kozlowski R.Z. Ca(2+)-activated Cl⁻ And K⁺ Channels and Their Modulation by endothelin-1 in Rat Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Exp Physiol.* 1995;80(5):815-24. doi:10.1113/expphysiol.1995.sp003889
16. Salter K.J., Kozlowski R.Z. Endothelin Endothelin-Receptor Coupling to Potassium and Chloride Channels in Isolated Rat Pulmonary Arterial Myocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;279(2):1053-62
17. Boesen E.I., Pollock D.M. Cooperative role of ETA and ETB receptors in mediating the diuretic response to intramedullary hyperosmotic NaCl infusion. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299(6):F1424–F1432. doi:10.1152/ajprenal.00015.2010.

УДК 616.62-006.6-073.

DOI: 10.37279/2224-6444-2020-10-2-13-21

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ИММУНОФЕНОТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГИБРИДНОЙ ОПУХОЛИ ПОЧКИ

Коган Е. А., Османов Ю. И., Щекин В. И., Демяшкин Г. А., Каем А. В.

ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). г. Москва, Россия.

Для корреспонденции: Османов Юсиф Исламович: кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии им. академика А. И. Струкова Первого МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), e-mail: osmanovyouseef@yandex.ru

For correspondence: Osmanov Y. I., PhD, Associate Professor of the Department of Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), e-mail: osmanovyouseef@yandex.ru

Information about authors:

Коган Е. А., <http://orcid.org/0000-0002-1107-3753>

Османов Ю. И., <http://orcid.org/0000-0002-7269-4190>

Shchekin V. I., <https://orcid.org/0000-0003-3763-7454>

Demyashkin G. A., <https://orcid.org/0000-0001-8447-2600>

Каем А. В., <https://orcid.org/0000-0003-2316-5185>

РЕЗЮМЕ

Гибридная онкоцитарная/хромофобная опухоль или онкоцитарная опухоль низкой степени злокачественности официально не включена в классификацию опухолей почки ВОЗ 2016 года, однако в литературе ряд авторов эту опухоль рассматривают как самостоятельная нозологическая единица. Ряд авторов описывают гибридную онкоцитарную/хромофобную опухоль состоящая исключительно из относительно мелких оксифильных клеток напоминающих как онкоциты так и клеток хромофобной ПКК одновременно. Разработка морфологических и иммуногистохимических критериев гибридной онкоцитарной/хромофобной опухоли является важным звеном в дифференциальном диагнозе почечно-клеточных карцином с онкоцитарной морфологией.

Целью исследования является сравнительный анализ морфологических, гистохимических, иммунофенотипических параметров онкоцитомы, хромофобной почечно-клеточной карциномы и гибридной онкоцитарной/хромофобной опухоли.

Материал и методы. Исследование выполнено на операционном материале от 162 пациентов, проходивших хирургическое лечение в Урологической клинике ПМГМУ им. И.М. Сеченова и Урологическом центре Научного клинического центра ОАО РЖД по поводу онкоцитомы почки и хромофобной почечно-клеточной карциномы в период с 2011 по 2017 гг. Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах по стандартному протоколу. Использовали антитела: EABA, Caveolin-1, MOC31, CyclinD1, CD10, CD117, EpCAM, CK7, DOG1, CAM5.2, CK19, E-Cadherin, Parvalbumin, KSC, PAX2, PAX8, S100A1 и MUC-1 («Cell Marque»).

Результаты. На основании проведенного морфологического и иммуногистохимического анализа из 162 опухолей в 61 (38%) случае выявлена онкоцитома, в 35 (22%) наблюдениях – классическая хромофобная почечно-клеточная карцинома, в 59 (36%) образцах – эозинофильная хромофобная почечно-клеточная карцинома и 7 (4%) случаях – гибридная онкоцитарная/хромофобная опухоль.

Заключение. В ряде случаев гибридная онкоцитарная/хромофобная опухоль может быть представлена исключительно из «гибридных» клеток с пограничными признаками онкоцитомы и эозинофильной хромофобной почечно-клеточной карциномы.

Ключевые слова: гибридная опухоль почки, мезенхимальные новообразования почки, иммуногистохимия.

MORPHOLOGICAL FEATURES AND IMMUNOPHENOTYPIC ASPECTS OF HYBRID KIDNEY TUMOR

Kogan E. A., Osmanov Y. I., Shchekin V. I., Demyashkin G. A., Kaem A. V.

I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

SUMMARY

A hybrid oncocyctic/chromophobic tumor or a low malignant oncocyctic tumor is not officially included in the classification of 2016 WHO kidney tumors, however, in the literature, some authors consider this tumor as an independent nosological unit. A number of authors describe a hybrid oncocyctic / chromophobic tumor consisting exclusively of relatively small oxyphilic cells resembling both oncocytes and chromophobic renal carcinoma cells at the same time. The development of morphological and immunohistochemical criteria for a hybrid oncocyctic / chromophobic tumor is an important link in the differential diagnosis of renal cell carcinomas with oncocyctic morphology.

The aim of the study is a comparative analysis of the morphological, histochemical, immunophenotypic parameters of oncocytoma, chromophobic renal cell carcinoma and hybrid oncocyctic / chromophobic tumor.

Materials and methods. The study was performed on operational material from 162 patients undergoing surgical treatment at the Urological Clinic I. M. Sechenov and the Urology Center of the Scientific Clinical Center (NCC) of Russian Railways for kidney oncocytoma and chromophobic renal cell carcinoma from 2011 to 2017. Immunohisto-

chemical studies were performed on paraffin sections according to the standard protocol. Antibodies used: EABA, Caveolin-1, MOC31, CyclinD1, CD10, CD117, EpCAM, CK7, DOG1, CAM5.2, CK19, E-Cadherin, Parvalbumin, KSC, PAX2, PAX8, S100A1 and MUC-1.

Results. Based on the performed morphological and immunohistochemical analysis of 162 tumors in 61 (38%) cases revealed oncocytoma, in 35 (22%) showed cases classical chromophobic renal cell carcinoma, in 59 (36%) samples eosinophilic chromophobic renal cell carcinoma and 7 (4%) cases had a hybrid oncocytic/ chromophobic tumor.

Conclusion. In some cases, a hybrid oncocytic / chromophobic tumor can be represented exclusively from "hybrid" cells with borderline signs of oncocytoma and eosinophilic chromophobic renal cell carcinoma.

Key words: hybrid kidney tumor, mesenchymal neoplasms of the kidney, immunohistochemistry.

Гибридная онкоцитарная/хромофобная опухоль (ГОХО) или онкоцитарная опухоль низкой степени злокачественности официально не включена в классификацию опухолей почки ВОЗ 2016 года, однако в литературе ряд авторов ГОХО рассматривают как самостоятельная нозологическая единица [1 – 4]. Она представляет собой редкую опухоль – составляет менее 1% всех опухолей почки. Среди пациентов преобладают мужчины, возрастной диапазон которых колеблется от 41 года до 68 лет (средний возраст – 56 лет). ГОХО может проявляться в трех различных клинических ситуациях: спорадической, ассоциированной с почечным онкоцитозом или у пациентов с синдромом Birt-Hogg-Dubé [5]. Клинико-инструментальные данные за злокачественность всегда отсутствуют, однако пациентам рекомендуется наблюдаться по той же схеме, которая используется при хромофобной ПКК. На светооптическом уровне ГОХО имеет бифазную морфологию: клетки с явной онкоцитарной дифференцировкой и кластеры соответствующие хромофобному раку. При иммуногистохимическом (ИГХ) исследовании в опухоли обнаруживается положительная экспрессия специфических маркеров хромофобной почечно-клеточной карциномы (ХПКК) и онкоцитомы. Интенсивность экспрессии специфических маркеров ХПКК и онкоцитомы зависит от преобладания того или иного компонента в опухолевой ткани [6 – 8]. Вместе с тем ряд авторов описывают ГОХО состоящая исключительно из относительно мелких оксифильных клеток напоминающих как онкоциты так и клеток хромофобной ПКК одновременно [9 – 11]. Таким образом, разработка морфологических и ИГХ-критериев ГОХО является важным звеном в дифференциальном диагнозе почечно-клеточных карцином с онкоцитарной морфологией.

Цель настоящего исследования: сравнительный анализ морфологических, гистохимических, иммунофенотипических параметров онкоцитомы, ХПКК и ГОХО.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования послужил архивный биопсийный материал от 162 случаев (93 мужчины и 69 женщин) в возрасте от 38 до 83 лет (сред-

ний возраст – 63 года), проходивших хирургическое лечение в Урологической клинике ПМГМУ им. И.М. Сеченова и Урологическом центре Научного Клинического Центра (НКЦ) ОАО РЖД по поводу онкоцитомы почки и ХПКК в период с 2011 г. по 2017 г.

Гистологическое исследование. Гистологические срезы толщиной 4 – 5 мкм окрашивали гематоксилином-эозином и коллоидном раствором железа по Моури. Стадия опухоли (pT) определяли согласно протоколу 8-го издания TNM-классификации опухолей мочевыделительной системы [12 – 13].

Иммуногистохимическое исследование. ИГХ-исследование проводилось на парафиновых срезах толщиной 4 – 5 мкм. Для монтирования парафиновых срезов использовали готовые предметные стекла с адгезивным покрытием (Poly-lisn Slides, Menzel GmbH&Co KG; Германия). Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Для «демаскировки» антигенов срезы инкубировали в течение 5 мин с 3 % H₂O₂, подвергали высокотемпературной обработке в цитратном буфере с pH 6,0 или 9,0 (для каждого антитела в соответствии с рекомендуемым протоколом) в микроволновой печи (2 раза по 5 мин при мощности 690 Вт с перерывом 2 мин). Инкубацию с первичными антителами проводили при комнатной температуре в течение 40 – 60 мин. В качестве вторичных антител использовали систему EnVision (“ДАКО Cytomation”, Дания). Срезы инкубировали в течение 20-40 мин (в соответствии с рекомендуемым протоколом). Для визуализации ИГХ-реакции использовали DAB+систему (“ДАКО Cytomation”, Дания). Срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали в канадский бальзам. В каждой серии препаратов был соответствующий позитивный и негативный контроль. Для каждого маркера учитывали топику положительной экспрессии в опухолевой клетке – ядерная, цитоплазматическая или мембранная. Список использованных антител приводится в табл. 1.

Для оценки ИГХ-реакции подсчитывали количество антиген-положительных клеток в 10 полях зрения микроскопа (x400), затем определяли уровень реакции по формуле: оценка экс-

Таблица 1

Панель использованных в исследовании антител

Антитела	Клон	Производитель	Разведение	Источник
EABA	ab64212	Abcam	1:200	Mouse
Cyclin D1	P2D11F11	Novocastra	1:50	”
CD10	56C6	Novocastra	RTU	”
CD117	T595	Novocastra	RTU	”
Caveol.1	ab18199	Abcam	1:200	Rabbit
Parvalbumin	2E11	Cell Marque	RTU	Mouse
EpCAM	VU1D9	Novocastra	1:200	”
KSC	MRQ33	Cell Marque	1:50	”
PAX2	EP235	Cell Marque	RTU	Rabbit
PAX8	EP298	Cell Marque	RTU	”
CK7	RN7.	Novocastra	RTU	Mouse
DOG1	K9	Novocastra	RTU	”
CAM5.2	CAM5.2	Novocastra	1:50	”
MOC31	MOC31	Dako	1:200	”
S100A1	EO184	Cell Marque	1:100	Rabbit
CK19	B170	Novocastra	RTU	Mouse
E-Cadh.	36B5	Novocastra	RTU	”
MUC-1	MRQ-17	Cell Marque	RTU	”

Примечание: RTU- готовые к применению.

прессии маркера = число антиген-положительных клеток в 10 полях зрения микроскопа x100/общее количество клеток. ИГХ-реакцию оценивали как негативную - 0 (менее 0,1% окрашенных клеток), слабо-позитивную – 1 (10% окрашенных клеток и менее), умеренно-позитивную – 2 (11 – 49% окрашенных клеток), сильно-позитивную – 3 (50 – 89% окрашенных клеток) и выраженно-позитивную – 4 (90% окрашенных клеток и более) [14].

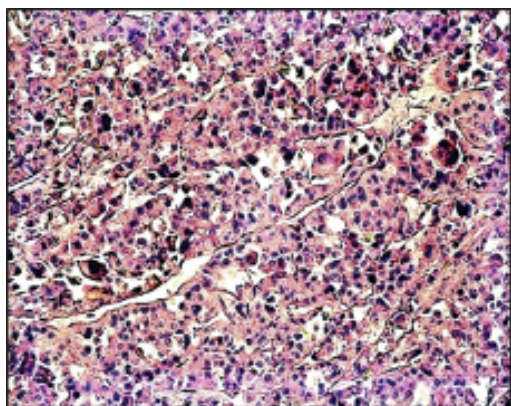
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Онкоцитомы. В 61 (21%) наблюдении опухолевая ткань без капсулы и представлена гнездовидными, альвеолярными и/или тубулярными скоплениями округлых и/или полигональных клеток с обильной оксифильной цитоплазмой и мономорфными ядрами с центрально расположенным ядрышком. Экстрацеллюлярный матрикс во всех случаях был миксоматозным и/или гиалинизированным. В 4 онкоцитомах обнаружены фокусы морфологического проявления «атипии» в виде двуядерных клеток и дегенеративно измененных клеток с полиморфными гиперхромными ядрами, в 7 наблюдениях – ареалы инфильтрации онкоцитов в жировую клетчатку, а в 4 образцах – признаки сосудистой инвазии. (рис. 1а, рис. 1б и рис. 1в).

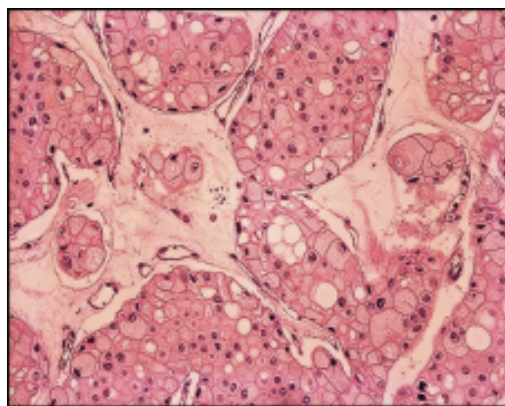
При окраске по Моури в большинстве случаев выявлена отрицательная реакция на коллоидное железо. Только в 8 образцах в цитоплазме клеток определялось слабое пылевидное отложение, в 3 наблюдениях в отдельных фокусах было отмечено слабое окрашивание апикальных поверхно-

стей онкоцитов преимущественно в тубулярных структурах. При ИГХ-исследовании во всех случаях обнаружена позитивная коэкспрессия KSC, DOG-1, E-Cadherin с преобладанием реакции в сильно-позитивном диапазоне. Положительная коэкспрессия EABA и S100A1 выявлена также во всех наблюдениях с преобладанием реакции в умеренно-позитивном диапазоне. Экспрессия Cyclin D1, CAM5.2, CK19, PAX2, PAX8, Parvalbumin и MUC-1 варьировала в широком диапазоне. В большинстве случаев определялась отрицательная реакция на MOC-31 (n=49; 80%), а позитивная экспрессия EpCAM, CD10 и Caveolin-1 обнаружена в 14, 15 и 2 онкоцитомах соответственно лишь в единичных опухолевых клетках. В CD117-положительных случаях (n=52; 85 %) экспрессия маркера преобладала в сильно-позитивном диапазоне (табл. 2).

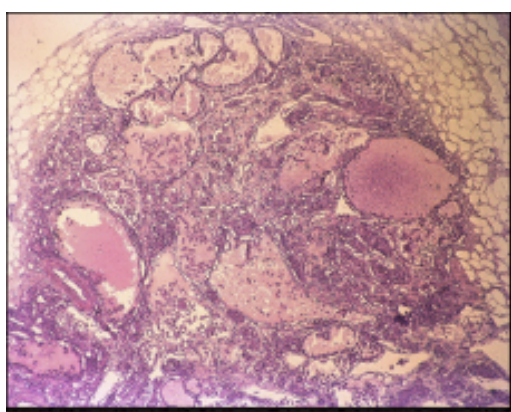
Классическая ХПКК (КХПКК). В 35 (22 %) случаях опухоль почки округлой формы, дольчатого вида, светло-коричневого цвета микроскопически была представлена солидными и тубуло-кистозными структурами крупных полигональных хромофобных клеток со светлой цитоплазмой и клетками с небольшим перинуклеарным гало, слабо-оксифильной, «хлопьевидной» цитоплазмой. В отдельных зонах в опухолевой популяции встречались относительно более мелкие клетки со слабо-зернистой эозинофильной цитоплазмой. В строме преобладали сосуды среднего калибра. В 1 наблюдении опухоль формировала псевдососочковые структуры. При окраске по Моури во всех случаях в боль-



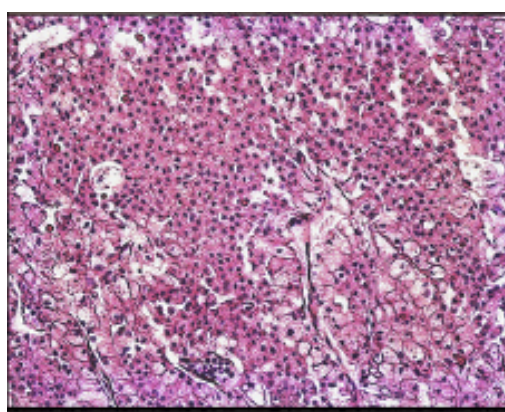
1а



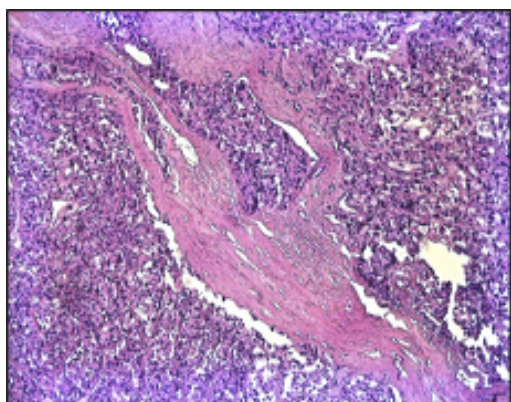
1г



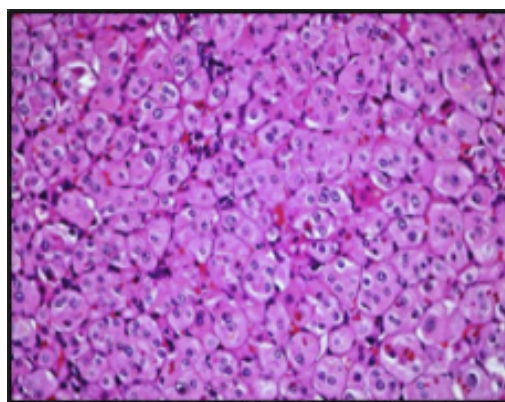
1б



1д



1в



1е

Рис. 1. Морфологические особенности и иммунофенотипические аспекты гибридной опухоли почки. А – Онкоцитома почки с признаками дегенеративной атипии, увел. $\times 100$. Б – Онкоцитома с инфильтрацией жировую капсулу почки, увел. $\times 40$. В – Онкоцитома почки с сосудистой инвазией, увел. $\times 100$. Г – Эозинофильная хромофобная почечно-клеточная карцинома типичного строения, увел. $\times 200$. Д – Гибридная онкоцитарная/хромофобная опухоль. На фоне скопления хромофобных клеток определяются кластеры с онкоцитарной дифференцировкой, увел. $\times 200$. Е – Гибридная онкоцитарная/хромофобная опухоль. Опухоль представлена клетками имеющие пограничные признаки онкоцитомы и эозинофильной хромофобной почечно-клеточной карциномы, увел. $\times 200$.

Таблица 2

Иммунопрофиль онкоцитомы, хромофобной почечно-клеточной карциномы и гибридной онкоцитарной/хромофобной опухоли

Диагноз	Антитела								
	EABA	Сус.D1	CD10	CD117	Caveol.1	Parvalb.	EpCAM	KSC	PAX2
КО	0/0	0/11	0/34	0/7	0/45	0/24	0/36	0/0	0/21
	1/“	1/2	1/12	1/0	1/1	1/3	1/10	1/“	1/9
	2/36	2/17	2/0	2/11	2/0	2/11	2/0	2/9	2/16
	3/10	3/16	3/“	3/25	3/”	3/8	3/“	3/27	3/0
	4/0	4/1	4/“	4/3	4/”	4/0	4/”	4/10	4/”
Всего	46	46	46	46	46	46	46	46	46
ОА	0/0	0/4	0/12	0/2	0/14	0/7	0/11	0/0	0/8
	1/”	1/0	1/3	1/0	1/1	1/2	1/4	1/”	1/3
	2/12	2/6	2/0	2/4	2/0	2/4	2/0	2/3	2/4
	3/3	3/5	3/“	3/8	3/”	3/2	3/“	3/8	3/0
	4/0	4/0	4/“	4/1	4/”	4/0	4/”	4/4	4/”
Всего	15	15	15	15	15	15	15	15	15
КХПКК	0/33	0/32	0/23	0/4	0/0	0/0	0/0	0/0	0/19
	1/2	1/3	1/5	1/2	1/”	1/”	1/”	1/”	1/5
	2/0	2/0	2/7	2/3	2/17	2/6	2/”	2/9	2/4
	3/”	3/”	3/0	3/12	3/16	3/24	3/19	3/13	3/6
	4/”	4/”	4/”	4/14	4/2	4/5	4/16	4/13	4/1
Всего	35	35	35	35	35	35	35	35	35
ЭХПКК	0/55	0/50	0/35	0/9	0/0	0/0	0/0	0/0	0/41
	1/4	1/9	1/9	1/2	1/“	1/”	1/”	1/”	1/0
	2/0	2/0	2/15	2/9	2/24	2/7	2/”	2/18	2/12
	3/“	3/“	3/0	3/29	3/27	3/33	3/12	3/25	3/6
	4/”	4/”	4/”	4/10	4/8	4/19	4/37	4/16	4/0
Всего	59	59	59	59	59	59	59	59	59
ГОХО	0/2	0/2	0/6	0/2	0/2	0/2	0/0	0/0	0/2
	1/”	1/”	1/1	1/0	1/0	1/0	1/”	1/”	1/2
	2/5	2/4	2/0	2/”	2/5	2/2	2/5	2/”	2/3
	3/0	3/1	3/“	3/4	3/0	3/3	3/2	3/4	3/0
	4/”	4/0	4/”	4/1	4/”	4/0	4/”	4/3	4/”
Всего	7	7	7	7	7	7	7	7	7

шинстве опухолевых клеток обнаружена выраженная цитоплазматическая реакция на коллоидное железо. В 34 случаях диаметр опухоли не превышал 4 см (pT1), а в 1 образце стадия соответствовала pT2. При ИГХ-исследовании во всех случаях в клетках преобладала сильно- и выраженно-позитивная коэкспрессия СК7, EpCAM, Caveolin-1, MOC-31, MUC-1, DOG-1, E-Cadherin, KSC и Parvalbumin. Реакция на СК19, CAM5.2, CD10, PAX2 и PAX8 варьировала в широком диапазоне. Кроме CAM5.2, в вышеуказанных маркерах преобладала негативная экспрессия. В CD117-позитивных случаях (n=29; 83%) экспрессия маркера преобладала в сильно- и выраженно-позитивной диапазонах. В 2, 3 и 3 КХПКК лишь единичные опухолевые клетки положительно реагировали на EABA, Cyclin D1 и S100A1 соответственно.

Эозинофильная ХПКК (ЭХПКК). В 59 (36 %) случаях опухоль была представлена в виде разрастания солидных полей с участками тубулокистозных структур. В 2 (1%) случаях из них были выявлены фокусы папиллярного роста. Опухолевая ткань состояла из оксифильных клеток с гиперхромными ядрами, которые имели неровные контуры. Визуализировались единичные бинуклеарные онкоцитарные клетки (рис. 1г). При окраске по Моури во всех случаях в преобладающем большинстве опухолевых клеток обнаружена выраженная цитоплазматическая реакция на коллоидное железо (рис. 2а).

В большинстве наблюдений (n=53; 90%) выявлена стадия pT1, а остальные соответствовали стадии pT2. При ИГХ-исследовании в опухолевых клетках преобладала сильно- и выраженно-положительная коэкспрессия Caveolin-1,

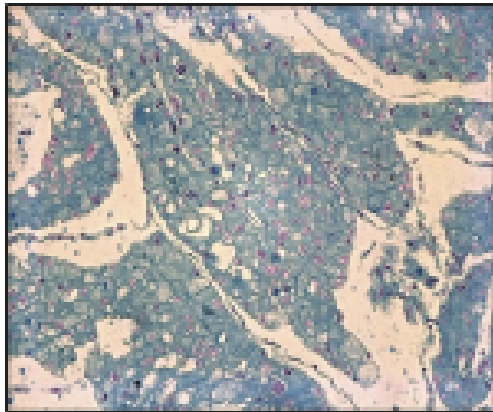
Продолжение табл. 2

Диагноз	Антитела								
	PAX8	СК7	DOG1	CAM 5.2	МОС31	S100A1	СК19	E-Cadh.	MUC-1
КО	0/ 21	0/ 43	0/ 0	0/ 10	0/ 34	0/ 0	0/ 18	0/ 0	0/ 21
	1/ 3	1/ 3	1/ ”	1/ 8	1/ 0	1/ “	1/ 3	1/ “	1/ 3
	2/ 11	2/ 0	2/ 6	2/ 10	2/ 5	2/ 35	2/ 6	2/ 11	2/ 17
	3/ 9	3/ ”	3/ 27	3/ 18	3/ 7	3/ 11	3/ 15	3/ 27	3/ 5
	4/ 2	4/ ”	4/ 13	4/ 0	4/ 0	4/ 0	4/ 4	4/ 8	4/ 0
Всего	46	46	46	46	46	46	46	46	46
ОА	0/ 7	0/ 14	0/ 0	0/ 4	0/ 12	0/ 0	0/ 6	0/ 0	0/ 9
	1/ 0	1/ 1	1/ ”	1/ 0	1/ 3	1/ “	1/ 0	1/ “	1/ 2
	2/ 1	2/ 0	2/ 1	2/ 5	2/ 0	2/ 12	2/ 4	2/ 2	2/ 3
	3/ 7	3/ ”	3/ 11	3/ 6	3/ “	3/ 3	3/ 5	3/ 8	3/ 1
	4/ 0	4/ ”	4/ 3	4/ 0	4/ “	4/ 0	4/ 0	4/ 5	4/ 0
Всего	15	15	15	15	15	15	15	15	15
КХПКК	0/18	0/0	0/0	0/7	0/0	0/32	0/21	0/0	0/0
	1/3	1/”	1/”	1/5	1/”	1/3	1/3	1/”	1/”
	2/7	2/”	2/”	2/10	2/7	2/0	2/4	2/8	2/9
	3/7	3/17	3/26	3/12	3/22	3/”	3/5	3/14	3/13
	4/0	4/18	4/9	4/1	4/6	4/”	4/3	4/13	4/13
Всего	35	35	35	35	35	35	35	35	35
ЭХПКК	0/ 26	0/ 0	0/ 0	0/ 13	0/ 0	0/ 55	0/ 37	0/ 0	0/ 0
	1/ 11	1/ 8	1/ 3	1/ 10	1/ “	1/ 4	1/ 0	1/ ”	1/ “
	2/ 5	2/44	2/ 32	2/ 17	2/ 9	2/ 0	2/ 6	2/ 16	2/ 20
	3/ 15	3/ 7	3/ 24	3/ 16	3/ 29	3/ “	3/ 13	3/ 31	3/ 27
	4/ 2	4/ 0	4/ 0	4/ 3	4/ 21	4/ ”	4/ 3	4/ 12	4/ 12
Всего	59	59	59	59	59	59	59	59	59
ГОХО	0/ 2	0/ 0	0/ 0	0/ 0	0/ 0	0/ 2	0/ 2	0/ 0	0/ 0
	1/ 0	1/ 0	1/ ”	1/ 1	1/ ”	1/ ”	1/ 0	1/ ”	1/ ”
	2/ 5	2/ 5	2/ ”	2/ 2	2/ ”	2/ 5	2/ 3	2/ ”	2/ 5
	3/ 0	3/ 0	3/ 5	3/ 3	3/ 5	3/ 0	3/ 2	3/ 5	3/ 2
	4/ ”	4/ 2	4/ 2	4/ 1	4/ 2	4/ ”	4/ 0	4/ 2	4/ 0
Всего	7	7	7	7	7	7	7	7	7

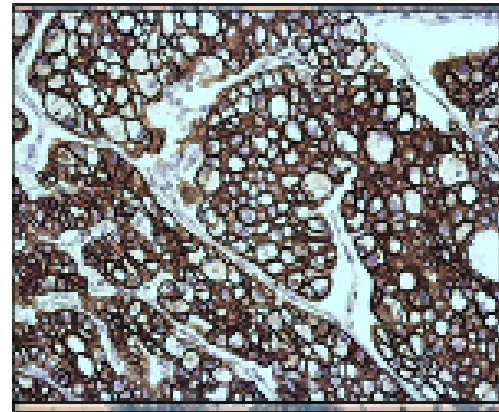
Примечания: КО – классическая онкоцитома; ОА – онкоцитома с атипией; КХПКК – классическая хромофобная почечно-клеточная карцинома; ЭХПКК – эозинофильная хромофобная почечно-клеточная карцинома; ГОХО – гибридная онкоцитарная/хромофобная опухоль. В числителе – выраженность экспрессии; в знаменателе – количество случаев.

Parvalbumin, EpCAM, E-Cadherin, KSC, DOG-1, МОС31 и MUC-1, а реакция с PAX2, PAX8, CAM 5.2, СК19 и CD10 варьировала в широком диапазоне. Кроме CAM5.2, в вышеуказанных маркерах преобладала негативная экспрессия. В CD117-положительных случаях (n=48;81%) экспрессия маркера преобладала в сильно- и выраженно-положительной диапозонах. У 7 пациентов обнаружена сильно-положительная экспрессия СК7. В то же время, в 44 случаях экспрессия маркера соответствовала умеренно-положительному диапазону, а в 8 наблюдениях была определена очаговая реакция. В 4, 9 и 4 ЭХПКК лишь единичные опухолевые клетки положительно реагировали на EABA, Cyclin D1 и S100A1 соответственно.

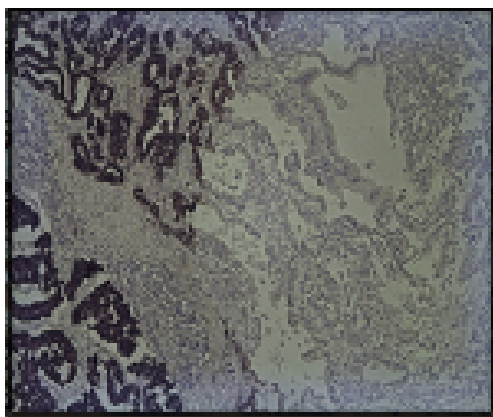
Гибридная онкоцитарная/хромофобная опухоль (ГОХО). В нашем исследовании в 5 (3 %) случаях опухолевая ткань в разных соотношениях состояла из 2 типов клеток: на фоне гнезд или солидных полей классической онкоцитомы визуализировались ареалы разрастания ХПКК (рис.1 д). В 2 случаях из них карциноматозной компонент был представлен характерными клетками ЭХПКК, а в 1 наблюдении – КХПКК. В 2 образцах в карциноматозном компоненте были обнаружены характерные участки роста обоих вариантов ХПКК. При окраске по Моури в зонах роста ХПКК в цитоплазме клеток обнаружено интенсивное окрашивание коллоидного железа. В то же время, в онкоцитарном компоненте



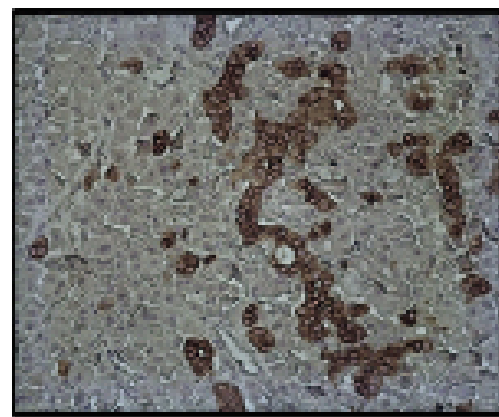
2а



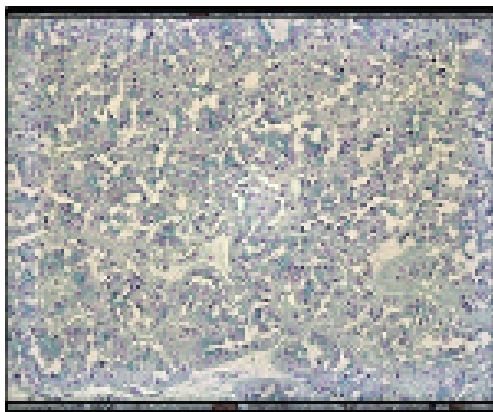
2б



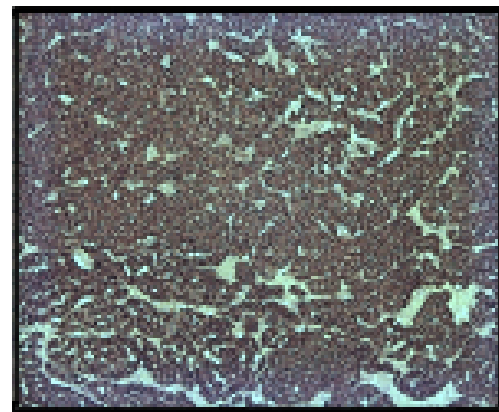
2в



2г



2д



2е

Рис. 2. Морфологические особенности и иммунофенотипические аспекты гибридной опухоли почки. А – Позитивное окрашивание коллоидного железа в цитоплазме клеток хромофобной почечно-клеточной карциномы. Окраска по Моури, увел. $\times 200$. Б – Диффузная цитоплазматическая и мембранная экспрессия EpCAM в клетках хромофобной почечно-клеточной карциномы, увел. $\times 200$. В – Экспрессия CK7 в карциноматозном компоненте гибридной опухоли. Негативная реакция на маркер в онкоцитарном компоненте, увел. $\times 100$. Г – Экспрессия S100A1 в онкоцитарном компоненте гибридной опухоли. Негативная реакция на маркер в карциноматозном компоненте, увел. $\times 200$. Д – Диффузное позитивное окрашивание коллоидного железа на апикальной поверхности клеток гибридной опухоли. Окраска по Моури, увел. $\times 100$. Е – Диффузная цитоплазматическая экспрессия CK7 в гибридной опухоли, увел. $\times 100$.

опухоли визуализация коллоидного железа не наблюдалась. Во всех наблюдениях стадия опухоли соответствовала pT1. При иммунофенотипировании определена зональная экспрессия маркерных антигенов онкоцитомы и ХПКК (рис. 2в и рис. 2г). Положительная экспрессия CD117 обнаружена во всех случаях в сильно- и выраженно-позитивной диапозонах. Из них в 3 ГОХО позитивная реакция на маркер выявлена в обоих компонентах, а по 1 случаю в онкоцитарном и карциноматозном компонентах соответственно. В 2 (1 %) наблюдениях опухоль микроскопически была представлена относительно мелкими клетками, с эозинофильной цитоплазмой по клеточной характеристике которые, имели пограничные признаки между онкоцитомой и ЭХПКК (рис. 1е). При гистохимической реакции с использованием окраски по Моури на апикальной поверхности большинства опухолевых клеток визуализировалось позитивное окрашивание коллоидного железа (рис. 2д). В обоих случаях стадия опухоли оценена как pT1. При ИГХ-исследовании в образцах на фоне негативной реакции с CD117 выявлена выраженно-положительная экспрессия СК7 (рис. 2е). Наряду с этим, в опухолевых клетках обнаружена умеренно- и сильно-позитивная коэкспрессия МОС-31, ЕрСАМ, E-cadherin и PAX8. Таким образом, на основании морфоиммуногистохимической картины обе опухоли также были верифицированы как ГОХО.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный морфологический анализ показывает, что большинство ГОХО микроскопически представлены участками роста классической онкоцитомы и ХПКК с позитивным окрашиванием коллоидного железа в цитоплазме раковых клеток. Наряду с этим, в ряде случаев ГОХО может быть представлена исключительно из «гибридных» клеток с пограничными признаками онкоцитомы и ЭХПКК. В этом варианте ГОХО обнаруживается положительное окрашивание коллоидного железа на апикальной поверхности опухолевых клеток. Иммунофенотип ГОХО имеет ряд особенностей. Так, нами было установлено, что для ГОХО с характерными морфологическими признаками онкоцитомы и ХПКК свойственна коэкспрессия маркерных антигенов обоих компонентов, а для ГОХО состоящая исключительно из пограничных клеток – CD117-негативный и выраженный СК7-позитивный иммунопрофиль. Позитивная экспрессия СК7 обнаруживается в обоих вариантах ХПКК. Вместе с тем, в отличие от ЭХПКК для КХПКК характерна более высокая частота и выраженность экспрессии данного маркера.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Guanghai L, Yatong L et al. Renal hybrid oncocytic/chromophobe tumor associated with multiple schwannomas. *J Medicine (Baltimore)*. 2017;96(48):e8939. doi: 10.1097/MD.0000000000008939.
2. Delongchamps NB, Galmiche L et al. Hybrid tumour 'oncocytoma-chromophobe renal cell carcinoma' of the kidney: a report of seven sporadic cases. *BJU Int*. 2009;103(10):1381-4. doi:10.1111/j.1464-410X.2008.08263.x.
3. Nicolas B. D, Louise G et al. Hybrid tumour 'oncocytoma chromophobe renal cell carcinoma' of the kidney: a report of seven sporadic cases. *BJU International*. 2009; 103(10):1381-1384. doi:10.1111/j.1464-410X.2008.08263.x.
4. Luca R, Giuseppe B et al. Diagnostic accuracy for hybrid oncocytic/chromophobe renal cell tumors by exploiting an immunohistochemical and histochemical combined panel. *J Diagnosis*. 2017;4(2):109-110. doi:10.1515/dx-2017-0003.
5. Kuroda N, Furuya M et al. Review of renal tumors associated with Birt-Hogg-Dubé syndrome with focus on clinical and pathobiological aspects. *Pol J Pathol*. 2014 Jun;65(2):93-9.
6. Hes O, Petersson F, Kuroda N et al. Renal hybrid oncocytic/chromophobe tumors - a review. *Send to Histol Histopathol*. 2013 Oct;28(10):1257-64. doi:10.14670/HH-28.1257.
7. Waldert M, Klatt T, Haitel A et al. Hybrid renal cell carcinomas containing histopathologic features of chromophobe renal cell carcinomas and oncocytomas have excellent oncologic outcomes. *Send to Eur Urol*. 2010 Apr;57(4):661-5. doi:10.1016/j.eururo.2009.05.009.
8. Gawlik-jakubczak T, Matuszewski M. Hybrid Oncocytic/Chromophobe Renal Cell Carcinoma. *J Clin Case Rep*. 2018; 8(10):1186. doi:10.4172/2165-7920.10001186.
9. Sara E. W, Sean R. W. Modern Pathologic Diagnosis of Renal Oncocytoma. *J Kidney Cancer VHL* 2017;4(4):1-12. doi:10.15586/jkcvhl.2017.96.
10. Oleksandr N. K, Merce J et al. Diagnostic Approach to Eosinophilic Renal Neoplasms. *Arch Pathol Lab Med*. 2014;13 (11):153-1541. doi:10.5858/arpa.2013-0653-RA.
11. Trpkov K, Has O. New and emerging renal entities: a perspective post-WHO 2016 classification. *Histopathology* 2019;74:31-59. doi:10.1111/his.13727.
12. Gladell P.P, Walter M.S, Donna E.H et al. Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic Cancers. *J Eup Urol*. 2018;73(4):560-569. doi.org/10.1016/j.eururo.2017.12.018.

13. Williamson SR, Taneja K et al. Renal cell carcinoma staging: pitfalls, challenges, and updates. *Histopathology*. 2019 Jan;74(1):18-30. doi:10.1111/his.13743.

14. Rajcani J, Kajo K, Adamkov M et al. Immunohistochemical characterization of urothelial carcinoma. *Bratisl Lek Listy*. 2013;114(8):431-438. PMID: 23944616.

ВЛИЯНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ КОРРЕКЦИИ НА СОСТОЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗА У ЖЕНЩИН С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ МАЛОГО ТАЗА

Мелконьянц Т. Г.¹, Грушевская Ю. В.¹, Егорова И. А.², Быков И. М.¹, Шестопалов А. В.³,

Курзанов А. Н.¹, Есауленко Е. Е.¹

¹ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России (ФГБОУ ВО КубГМУ), 350063, ул. Седина 4, Краснодар, Россия

²Клиника ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, 350063, ул. Седина 4, Краснодар, Россия

³ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России (ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России), 117997, ул. Саморы Машела 1, ГСП-7, Москва, Россия

Для корреспонденции: Егорова Инна Анатольевна, кандидат медицинских наук, заведующая клинко-диагностической лабораторией клиники ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, E-mail:inna5200@yandex.ru

For correspondence: Egorova I. A., PhD, Head of the clinic-diagnostic laboratory of the clinic of Kuban State Medical University, e-mail: inna5200@yandex.ru

Information about authors:

Melkonians T. G., <http://orcid.org/0000-0001-7390-8202>

Grushevskaya Yu. V., <https://orcid.org/0000-0002-4489-3512>

Egorova I. A., <http://orcid.org/0000-0003-4115-392X>

Bykov I. M., <http://orcid.org/0000-0002-1787-0040>

Shestopalov A. V., <https://orcid.org/0000-0002-1428-7706>

Kurzanov A. N., <https://orcid.org/0000-0002-0566-256X>

Esaulevko E. E., <https://orcid.org/0000-0002-9386-8049>

РЕЗЮМЕ

Цель. Оценка эффективности проведения антиоксидантной коррекции окислительных нарушений у женщин с воспалительными заболеваниями органов малого таза.

Материалы и методы. Исследование проведено с участием 154 испытуемых женщин, разделенных на группы: контрольная группа (n=30), группы больных с сочетанным течением хронической воспалительной болезни матки с хроническим сальпингитом и оофоритом в фазе обострения (n=120). Больные 2-й группы получали стандартное лечение, больные 3-й группы дополнительно к стандартной терапии получали токоферол и ретинол, больным 4-й группы вводили тиосульфат натрия, а испытуемые лица 5-й группы получали одновременно три антиоксиданта. Наблюдение велось в течение 2-х недель, в начале лечения и в конце наблюдения забирали кровь и ротовую жидкость. В биожидкостях определяли общую антиоксидантную активность и содержание продуктов окислительных модификаций биомолекул (ТБК-реактивные продукты).

Результаты. Проведенные исследования показали наличие у больных женщин с воспалительными заболеваниями органов малого таза дисбаланса окислительного гомеостаза, характеризующегося сниженной на 21-22% общей антиоксидантной активностью плазмы крови и увеличенным в 1,7-2,0 раза содержанием ТБК-реактивных продуктов эритроцитарной взвеси и ротовой жидкости. Введение токоферола, ретинола или тиосульфата натрия сопровождалось приблизительно одинаковой по выраженности нормализацией прооксидантно-антиоксидантного баланса – увеличением общей АОА на системном уровне и снижением содержания ТБК-реактивных продуктов в крови и ротовой жидкости до уровней соответствующих показателей группы практически здоровых испытуемых женщин.

Заключение. Полученные данные показали необходимость коррекции дисбаланса прооксидантно-антиоксидантной системы, а оценка эффективности коррекции с использованием липофильных токоферола и ретинола, гидрофильного тиосульфата натрия или их комбинированного использования продемонстрировала высокую эффективность любой из использованных схем.

Ключевые слова: эндометрит, сальпингоофорит, антиоксидантная терапия, окислительный стресс.

INFLUENCE OF ANTIOXIDANT CORRECTION ON THE CONDITION OF OXIDATIVE HOMEOSTASIS IN WOMEN SUFFERING FROM PELVIS INFLAMMATORY DISEASES

Melkonians T. G.¹, Grushevskaya Yu. V.¹, Egorova I. A.², Bykov I. M.¹, Shestopalov A. V.³, Kurzanov A. N.¹, Esaulevko E. E.¹

¹Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

²Clinic of the Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

³Dmitry Rogachev National Research Center of pediatric hematology, oncology and immunology, Moscow, Russia

SUMMARY

Aim. The effectiveness of antioxidant correction of oxidative disturbances in women suffering from inflammatory diseases of the small pelvis was evaluated.

Materials and methods. The study was performed on 154 women divided into groups: the control group (n=30), the group composed of the patients suffering from the complex course of chronic inflammatory uterine disease with salpingitis and oophoritis in their exacerbation phase (n=120). The patients of the 2nd group underwent standardized course of treatment, while the patients of the 3rd group received tocopherol and retinol in addition to the standardized therapy, the patients of the 4th group were injected with the sodium thiosulfate, and the patients of the 5th group received all three antioxidants at the same time. The study lasted 2 weeks, at the beginning and in the end blood and oral liquid were sampled. In the body liquids the general antioxidative activity and the content of oxidative modifications of biomolecules were determined (TBA-reactive substances).

Results. The performed study demonstrated the presence of imbalance in oxidative homeostasis in women suffering from inflammatory diseases of the small pelvis which was characterized by the general antioxidant activity of the blood plasma decreased by 30% and the content of TBA-reactive substances in erythrocytic meal and oral liquid increased by 45%. The injections of tocopherol, retinol and thiosulfate were accompanied by the similarly expressed stabilization of the prooxidant-oxidative balance including the increase in the general antioxidant activity at the systemic level and the decrease in the content of TBA-reactive substances in blood and oral liquid down to the proper indices of the group composed of apparently healthy female test patients.

Conclusion. The received data demonstrated the necessity of correction for the imbalance of prooxidant-oxidative system while the evaluation of the correction by means of the lipophilic tocopherol and retinol, hydrophilic sodium thiosulfate or their combined usage revealed the high effectiveness of each of the used treatment profiles.

Key words: endometritis, salpingoophoritis, antioxidant therapy, oxidative stress.

Интенсификация свободнорадикальных процессов при воспалительных процессах является одним из ключевых факторов прогрессирования и постепенной хронизации многих заболеваний. Важной проблемой современной гинекологической практики являются воспалительные заболевания органов малого таза – эндометрит, сальпингит и оофорит. Данные заболевания имеют склонность к быстрой хронизации и развитию осложнений, включающих бесплодие, поэтому представляют серьезную медико-социальную проблему [1-6]. Перспективным способом коррекции метаболических нарушений, потенциально способным обеспечить адекватный контроль над воспалительными процессами в женских репродуктивных органах, является антиоксидантная терапия [7-10]. Использование антиоксидантов находит широкое применение в экспериментальных исследованиях, в которых демонстрирует высокую эффективность, между тем результаты использования большинства антиоксидантов показывают неоднозначные результаты в клинической практике. Проведение такой терапии требует обоснования, включающего подтверждение наличия дисбаланса прооксидантно-антиоксидантной системы у конкретного больного и выявление определенных патобиохимических звеньев, нацеленное воздействие на которые наиболее эффективно [11; 12]. Последнее оправдано ввиду сложности взаимоотношений компонентов антиоксидантной системы между собой и прооксидантами, селективное развитие окислительных повреждений преимущественно в каком-то одном компартменте клетки, например, в биологических мембранах или митохондриях. Нередко в работах указывается на развитие окислительного

стресса на системном или локальном уровнях, например в ротовой жидкости или репродуктивном тракте [13; 14]. В таких случаях наиболее эффективной может оказаться местная терапия. В любом случае проведению антиоксидантной коррекции, на наш взгляд должно предшествовать тщательное обоснование возможности и целесообразности.

Цель данной работы – оценка эффективности проведения антиоксидантной коррекции окислительных нарушений у женщин с воспалительными заболеваниями органов малого таза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено с участием 154 испытуемых женщин, разделенных на группы: контрольная группа (30 относительно здоровых испытуемых женщин), группы (группы 2-5) больных с сочетанным течением хронической воспалительной болезни матки с хроническим сальпингитом и оофоритом в фазе обострения (n=120). Больные 2-й группы (n=30) получали стандартное лечение, включающее антибиотики, противогрибковые средства, нестероидные противовоспалительные средства и санацию влагалища. Больные 3-й группы (n=30) дополнительно к стандартной терапии получали токоферол (0,1 г/сутки) и ретинол (0,055 г/сутки), больные 4-й группы (n=30) вводили тиосульфат натрия (10 мл 30%-го раствора в/в ежедневно), а больные 5-й группы (n=30) получали одновременно все три антиоксиданта. Наблюдение велось в течение 2-х недель, в начале лечения и в конце наблюдения забирали цельную венозную кровь и нестимулированную ротовую жидкость для проведения лабораторных исследований. В отмытой эритроцитарной взвеси определяли со-

держание продуктов окислительных поврежденных биомолекул по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-реактивные продукты) [15], в плазме крови определяли уровень общей антиоксидантной активности амперометрическим способом использованием анализатора «Яуза ААА-01» (ОАО НПО «Химвавтоматика», Россия). Значение антиоксидантной активности выражали в ммоль/л аскорбиновой кислоты, принятой за стандарт, показатель которой был определен в аналогичных опытным образцам условиях [16].

Исследование было проведено в строгом соответствии с этическими положениями, обозначенными в Федеральном законе Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» и Хельсинкской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (Форгалеза, 2013), а также было рассмотрено и одобрено на заседании независимого этического комитета (протокол № 81 от 11.10.2019 г.).

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с использованием программы StatPlus (AnalystSoft Inc., USA). Определение нормальности распределения показателей проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка. Оценку значимости отличий между соответствующими параметрами больных разных групп проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни, между параметрами одних и тех же больных до и после лечения – с помощью критерия Уилкоксона. Выбор непараметрических методов был обусловлен, прежде всего, сравнительно небольшими объемами выборок и несоответствием распределения полученных показателей закону нормального распределения.

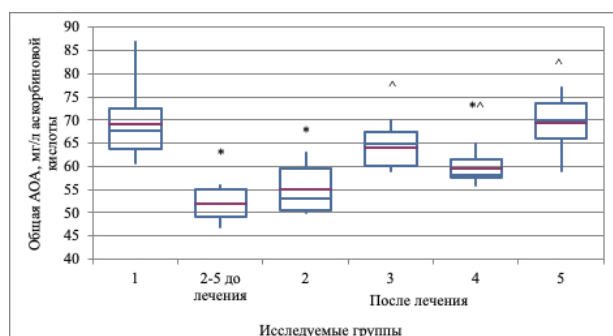


Рис. 1. Общая антиоксидантная активность плазмы крови больных воспалительными заболеваниями органов малого таза

Примечание: * – статистически значимые отличия от показателя 1-й (контрольной) группы; ^ – статистически значимые отличия от показателя 2-й группы;

Статистически значимыми считали различия при уровне $p < 0,05$. Полученные данные в статье представлены в виде медианы и квартилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование показателей общей антиоксидантной активности плазмы крови больных воспалительными заболеваниями органов малого таза показало сниженные ее значения у больных 2-й группы на 21-22%, как до, так и после проведения терапии по стандартной схеме (рис. 1). Ведение в схему комплексной терапии витаминов А и Е способствовало значительному увеличению рассматриваемого показателя (на 25%) до уровня контрольных значений. Введение тиосульфата натрия также способствовало статистически значимому росту общей антиоксидантной активности, но в меньшей степени (на 12%). В ротовой жидкости уровень анализируемого показателя у больных с воспалительными заболеваниями органов малого таза до и после терапии на первый взгляд казался сниженным, однако статистически значимых отличий от контрольных значений не было выявлено ни у одной из опытных групп (рис. 2).

Оценка выраженности окислительных повреждений по накоплению в биологических жидкостях ТБК-реактивных продуктов подтвердила ожидаемо высокий уровень свободно-радикальных процессов у больных хронической воспалительной болезнью матки с хроническим сальпингитом и оофоритом. Так в эритроцитарной взвеси больных 2-й группы на момент поступления в стационар уровень тиобарбитурового числа превышал контрольные значения на 73% (рис. 3). Проведение консервативной терапии по стандартной схеме не способство-

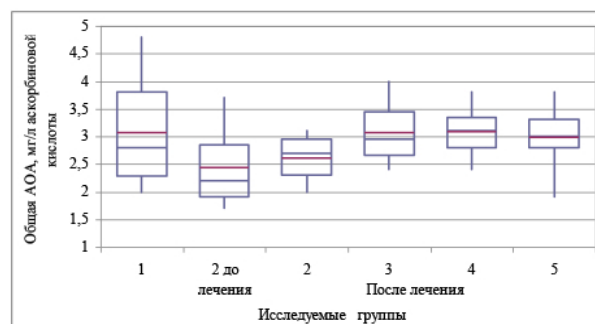


Рис. 2. Общая антиоксидантная активность ротовой жидкости больных воспалительными заболеваниями органов малого таза

Примечание: * – статистически значимые отличия от показателя 1-й (контрольной) группы; ^ – статистически значимые отличия от показателя 2-й группы;

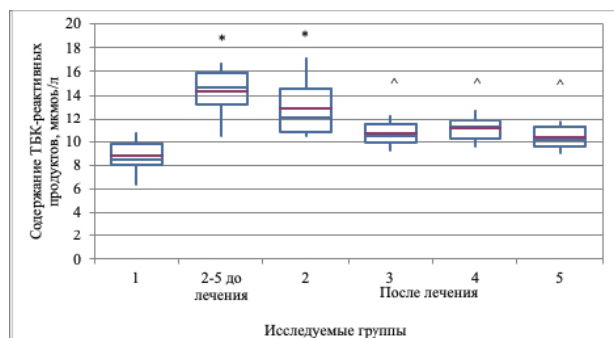


Рис. 3. Интенсивность окислительных процессов в крови больных воспалительными заболеваниями органов малого таза

Примечание: * – статистически значимые отличия от показателя 1-й (контрольной) группы; ^ – статистически значимые отличия от показателя 2-й группы;

вало каким-либо статистически значимым изменениям образования и накопления продуктов окислительных модификаций биомолекул. В тоже время введение средств антиоксидантной направленности существенно снижало интенсивность свободнорадикальных процессов, вне зависимости от вида терапии – использование токоферола и ретинола, тиосульфата натрия или комбинированная терапия всеми тремя средствами. У испытуемых лиц 3-5-й подгрупп уровень ТБК-реактивных продуктов был снижен на 22-28% относительно соответствующего значения показателя до начала терапии.

Изменения содержания ТБК-реактивных продуктов в ротовой жидкости (рис. 4) были практически идентичны изменениям, зарегистрированным в крови: увеличенное в 2,0 раза содержание ТБК-реактивных продуктов у больных 2-й группы на этапе до лечения, сохраняющееся высоким после проведения терапии по традиционной схеме, снижение уровня окислительных повреждений на фоне антиоксидантной коррекции. Так в ротовой жидкости больных, получавших ретинол, токоферол и тиосульфат натрия уровень анализируемого показателя был снижен на 26-36% относительно исходных значений до лечения. Интересным замечанием является то, что данный показатель в процессе терапии изменялся в отличие от общей антиоксидантной активности ротовой жидкости.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы полагаем, что основные отличия общей антиоксидантной активности плазмы крови на фоне введения различных средств антиоксидантной направленности могут быть связаны с фармакокинетическими свойствами используе-

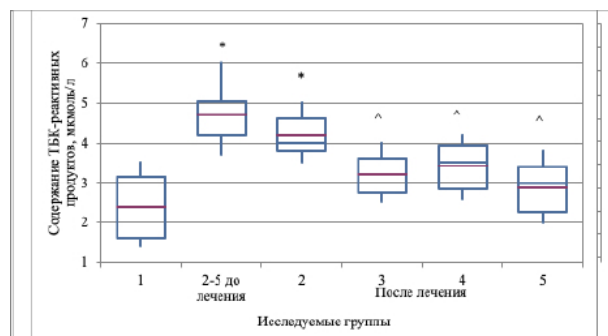


Рис. 4. Интенсивность окислительных процессов в ротовой жидкости больных воспалительными заболеваниями органов малого таза

Примечание: * – статистически значимые отличия от показателя 1-й (контрольной) группы; ^ – статистически значимые отличия от показателя 2-й группы;

мых средств антиоксидантной направленности действия. Открытые данные (официальные инструкции по применению) о времени достижения максимальной концентрации токоферола (около 4 часов) свидетельствуют о высокой длительности его накопления и циркуляции в крови, что связано с липофильными свойствами. Кроме того токоферол и ретинол активно депонируются во всех тканях [17]. В тоже время для тиосульфата натрия период полувыведения составляет от 20 до 180 минут в зависимости от вводимой дозы [18]. Таким образом, видимое увеличение рассматриваемого показателя плазмы крови у больных 3-й группы может быть обусловлено циркуляцией в крови самих экзогенных антиоксидантов, а увеличение общей антиоксидантной активности плазмы крови больных 4-й группы в большей степени отражает метаболические эффекты тиосульфата, связанные с восстановлением тиолсодержащих соединений плазмы крови, противовоспалительными эффектами и как следствие снижением выраженности окислительного стресса. Высокая эффективность использования тиолового антиоксиданта тиотриазолина для коррекции окислительного гомеостаза и воспалительного процесса у больных сальпингоофоритом показана ранее в работе Г. Гречканева и соавторов [19]. В некоторой степени можно считать рассмотренные серусодержащие препараты близкими по направленности действия, а широкое использование антиоксидантных средств данной группы и высокая их активность может быть обусловлена ведущим значением эндогенных тиолов, в частности глутатиона, в поддержании клеточного редокс гомеостаза.

Несмотря на то, что в настоящее время широко обсуждается использование ротовой жидко-

сти в неинвазивной лабораторной диагностике, особенно для оценки таких интегральных параметров, как общая антиоксидантная активность [13; 14; 20], в данном случае мы не можем рекомендовать оценку рассматриваемого показателя. Вероятно, что хроническое локальное течение воспалительного процесса в женском репродуктивном тракте отражается на системном уровне изменениями показателей системы неспецифической резистентности организма, в частности антиоксидантной активности плазмы крови, однако данные изменения нивелируются после прохождения очередного барьера (в данном случае гематосаливарного) на пути, не связанной ни анатомически, ни функционально с основным патологическим очагом, ротовой полости. Также интересным наблюдением является отсутствие изменений в группах, получавших антиоксиданты, что указывает на отсутствие значимых накоплений исследуемых веществ в ротовой жидкости.

Отсутствие особенностей влияния разных антиоксидантных средств на накопление продуктов окислительных модификаций биомолекул может быть обусловлено тем, что снижение уровня ТБК-реактивных продуктов является результатом комплексного однонаправленного влияния используемых средств на состояние прооксидантно-антиоксидантного баланса в разных средах. Несмотря на разницу в фармакокинетических параметрах, особенности механизмов действия и локализации эффектов конечный результат применения рассматриваемых средств, оцениваемый по такому интегральному показателю, как уровень продуктов окислительных модификаций биомолекул, приблизительно одинаков. Снижение уровня ТБК-реактивных продуктов в ротовой жидкости позволяет свидетельствовать все же о распространенности патологического процесса на системном уровне с вовлечением различных органов и тканей, в том числе анатомио-функционально не связанных с женским репродуктивным трактом. При этом оценка уровня ТБК-реактивных продуктов потенциально может использоваться для неинвазивного мониторинга эффективности терапии больных хронической воспалительной болезнью матки, хроническим сальпингитом и оофоритом. Таким образом, данный маркер является более чувствительным, чем общая антиоксидантная активность.

Таким образом, были определены изменения прооксидантно-антиоксидантного баланса, характеризующие развитие окислительного стресса на системном и местном уровнях, что актуализирует поиск способов антиоксидантной коррекции. Использование для этих целей

токоферола, ретинола или тиосульфата натрия в течение всего 2-х недель позволяет достичь приблизительно одинаковых по эффективности результатов, сопровождающихся нормализацией прооксидантно-антиоксидантного баланса – увеличением общей антиоксидантной активности на системном уровне и снижением содержания ТБК-реактивных продуктов в крови и ротовой жидкости до уровней соответствующих показателей группы практически здоровых испытуемых женщин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные показали необходимость коррекции дисбаланса прооксидантно-антиоксидантной системы, не нормализующегося самостоятельно в ходе проведения традиционной терапии без антиоксидантов. Оценка эффективности коррекции с использованием липофильных токоферола и ретинола, гидрофильного тиосульфата натрия или их комбинированного использования продемонстрировала высокую эффективность любой из использованных схем.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА

1. Городецкая О.С., Чандра-Д'Мелло Р. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная система защиты у больных хроническим неспецифическим эндометритом. *Современные технологии в медицине*. 2011;2:150-151.
2. Золоева И.А., Кабулова И.В., Цаллагова Л.В. Эффективность использования локальной терапии при хроническом эндометрите. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2016;3:62-67.
3. Brunham R.C., Gottlieb S.L., Paavonen J. Pelvic inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 2015;372(21):2039-2048. doi:10.1056/NEJMra1411426.
4. Czeyda-Pommersheim F., Kalb B., Costello J., Liao J., Meshksar A., Arif Tiwari H., Martin D. MRI in pelvic inflammatory disease: a pictorial review. *AbdomRadiol (NY)*. 2017;42(3):935-950. doi: 10.1007/s00261-016-1004-4.
5. Donnez J., Binda M.M., Donnez O., Dolmans M.M. Oxidative stress in the pelvic cavity and its role in the pathogenesis of endometriosis. *Fertil. Steril.* 2016;106(5):1011-1017. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.1075.
6. Revzin M.V., Mathur M., Dave H.B., Macer M.L., Spektor M. Pelvic inflammatory disease: multimodality imaging approach with clinical-pathologic correlation. *Radiographics*. 2016;36(5):1579-1596. doi: 10.1148/rg.2016150202.
7. Быков И.М., Попов К.А., Егорова И.А., Сторожук А.П. Оценка показателей тиолового метаболизма

плазмы крови больных воспалительными заболеваниями органов малого таза при проведении антиоксидантной коррекции. Медицинский вестник Северного Кавказа. 2018;13(2):402-406. doi: 10.14300/mnnc.2018.13062.

8. Чурикова М.С., Гречканев Г.О. Коррекция перекисного стресса как важный элемент патогенетического лечения воспалительных заболеваний органов малого таза. Российский вестник акушера-гинеколога. 2013;13(5):8-11.

9. Kong D., Fu P., Zhang Q., Ma X., Jiang P. Protective effects of Asiatic acid against pelvic inflammatory disease in rats. *Exp. Ther. Med.* 2019;17(6): 4687-4692. doi: 10.3892/etm.2019.7498.

10. Tsompos C., Panoulis C., Tauoutouzas K., Zetaografos G., Papalois A. The effect of the antioxidant drug «U-74389G» on oophoritis during ischemia reperfusion injury in rats. *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.* 2014;13(2):103-107.

11. Быков И.М., Попов К.А., Цымбалюк И.Ю., Джимаков С.С., Шашков Д.И., Малышко В.В., Барышев М.Г. Метаболическая коррекция экспериментального аллоксанового диабета средствами антиоксидантной направленности. *Вопросы питания.* 2017;86(3):68-76.

12. Alamdari D.H., Aghasizadeh-Sharbat M., Mohadjerani M., Ferns G.A., Avan A. Prooxidant-antioxidant balance and antioxidant properties of thujaorientalis L: a potential therapeutic approach for diabetes mellitus. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2018;11(2):109-112. doi: 10.2174/1874467210666170404112211.

13. Basov A.A., Akopova V.A., Bykov I.M. Changing the parameters of prooxidant-antioxidant system in blood and oral fluid of patients with ischemic heart disease and type 2 diabetes mellitus. *International Journal on Immunorehabilitation.* 2013;15(2):84-86.

14. Peluso I., Raguzzini A. Salivary and urinary total antioxidant capacity as biomarkers of oxidative stress in humans. *Patholog. Res. Int.* 2016;2016:5480267. doi: 10.1155/2016/5480267.

15. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. Справочник. М.: МЕДпресс-информ, 2004. 920 с.

16. Басов А.А., Быков И.М. Изменение антиоксидантного потенциала крови экспериментальных животных при нутриционной коррекции окислительного стресса. *Вопросы питания.* 2013;82(6):75-81.

17. Сергеев А.В., Ананьев В.С., Капитанов А.Б., Коростылев С.А., Букреев Ю.М., Власенкова Н.К., Просалкова И.Р., Решетникова В.В., Шубина И.Ж. Фармакокинетика каротиноидов и каротинсодержащих препаратов. *Russian Journal of Biotherapy.* 2017;16(3):92-106. doi: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-92-101.

18. Жоров Г.А., Рубченков П.Н., Захарова Л.Л., Обрывин В.Н. Применение натрия тиосульфата в медицине и ветеринарии в качестве полифункционального препарата (обзор литературы). *Ветеринария, зоотехния и биотехнология.* 2015;6:68-76.

19. Гречканев Г., Мотовилова Т., Гаревская Ю., Чурикова М., Бойченко Т., Никишов Н. Антиоксидантная терапия – важнейший компонент патогенетического лечения воспалительных заболеваний. *Врач.* 2015;3:54-58.

20. Каминская Л.А. Перспективы изучения биохимических показателей ротовой жидкости в лабораторной диагностике. *Российская стоматология.* 2010;3(3):36-42.

REFERENCES

1. Gorodetskaya O.S., Chandra D'Mello R. Lipid peroxidation and antioxidant protective system in patients with chronic nonspecific endometritis. *Sovremennye tehnologii v medicine.* 2011;2:150-151. (In Russ).

2. Zoloeva I.A., Kabulova I.V., Tsallagova L.V. Efficiency used of local therapy for chronic endometritis. *Kuban Scientific Medical Bulletin.* 2016;3:62-67. (In Russ).

3. Brunham R.C., Gottlieb S.L., Paavonen J. Pelvic inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 2015;372(21):2039-2048. doi: 10.1056/NEJMra1411426.

4. Czeyda-Pommersheim F., Kalb B., Costello J., Liao J., Meshksar A., Arif Tiwari H., Martin D. MRI in pelvic inflammatory disease: a pictorial review. *Abdom. Radiol (NY).* 2017;42(3):935-950. doi: 10.1007/s00261-016-1004-4.

5. Donnez J., Binda M.M., Donnez O., Dolmans M.M. Oxidative stress in the pelvic cavity and its role in the pathogenesis of endometriosis. *Fertil. Steril.* 2016;106(5):1011-1017. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.1075.

6. Revzin M.V., Mathur M., Dave H.B., Macer M.L., Spektor M. Pelvic inflammatory disease: multimodality imaging approach with clinical-pathologic correlation. *Radiographics.* 2016;36(5):1579-1596. doi: 10.1148/rgr.2016150202.

7. Bykov I.M., Popov K.A., Egorova I.A., Storozhuk A.P. Assessment of indicators of the thiol metabolism of blood plasma of patients with inflammatory diseases of the small pelvis organs at antioxidant correction. *Medical news of the North Caucasus.* 2018;13(2):402-406. doi: 10.14300/mnnc.2018.13062. (In Russ).

8. Churikova M.S., Grechkanev G.O. Peroxide stress correction as an important component of pathogenetic treatment for inflammatory diseases of small pelvic organs. *Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist = Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa.* 2013;13(5): 8-11. (In Russ).

9. Kong D., Fu P., Zhang Q., Ma X., Jiang P. Protective effects of Asiatic acid against pelvic inflammatory disease in rats. *Exp. Ther. Med.* 2019;17(6): 4687-4692. doi: 10.3892/etm.2019.7498.

10. Tsompos C., Panoulis C., Tauoutouzas K., Zetaografos G., Papalois A. The effect of the antioxidant drug «U-74389G» on oophoritis during ischemia reperfusion injury in rats. *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.* 2014;13(2):103-107.

11. Bykov I.M., Popov K.A., Tsymbalyuk I.Yu., Dzhimak S.S., Shashkov D.I., Malysheko V.V., Baryshev

- M.G. The metabolic correction of the experimental alloxan diabetes by means of the antioxidant remedies. *Voprosy pitaniya*. 2017;86(3):68-76. (In Russ).
12. Alamdari D.H., Aghasizadeh-Sharbat M., Mohadjerani M., Ferns G.A., Avan A. Prooxidant-antioxidant balance and antioxidant properties of *thujaorientalis* L: a potential therapeutic approach for diabetes mellitus. *Curr. Mol. Pharmacol*. 2018;11(2):109-112. doi: 10.2174/1874467210666170404112211.
13. Basov A.A., Akopova V.A., Bykov I.M. Changing the parameters of prooxidant-antioxidant system in blood and oral fluid of patients with ischemic heart disease and type 2 diabetes mellitus. *International Journal on Immunorehabilitation*. 2013;15(2):84-86.
14. Peluso I., Raguzzini A. Salivary and urinary total antioxidant capacity as biomarkers of oxidative stress in humans. *Patholog. Res. Int*. 2016;2016:5480267. doi: 10.1155/2016/5480267.
15. Kamyshnikov V.S. Handbook of clinical and biochemical studies and laboratory diagnostics. Moscow: MEDpress-inform; 2004 (In Russ).
16. Basov A.A., Bykov I.M. Change of blood antioxidant capacity of experimental animals during nutritional correction under oxidative stress. *Voprosy pitaniya*. 2013;82(6):75-81. (In Russ).
17. Sergeev A.V., Anan'ev V.S., Kapitanov A.B., Korostelev S.A., Bukreev Yu.M., Vlasenkova N.K., Prosalkova I.R., Reshetnikova V.V., Shubina I.Zh. Pharmacokinetics of carotenoids and carotene containing compounds. *Russian Journal of Biotherapy*. 2017;16(3):92-106. doi: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-92-101. (In Russ).
18. Zhorov G.A., Rubchenkov P.N., Zacharova L.L., Obryvin V.N. The use of sodium thiosulfate in human and veterinary medicine as a multifunctional substance (a review of the literature). *Veterinariya, Zootekhnika i Biotekhnologiya*. 2015;6:68-76. (In Russ).
19. Grechkanov G., Motovilova T., Garevskaya Yu., Churikova M., Boichenko T., Nikishov N. Antioxidant therapy is the most important component of pathogenetic treatment for inflammatory diseases. *Vrach (The Doctor)*. 2015;3:54-58. (In Russ).
20. Kaminskaia L.A. Prospects for the study of biochemical characteristics of oral fluid for laboratory diagnosis. *Russian Stomatology*. 2010;3(3):36-42. (In Russ).

УДК: 616.62-006.6-073.

DOI: 10.37279/2224-6444-2020-10-2-29-39

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРОВ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫХ КАРЦИНОМАХ

Османов Ю. И., Коган Е. А., Демьяшкин Г. А., Щекин В. И., Каем А. В.

ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). г. Москва, Россия.

Для корреспонденции: Османов Юсиф Исламович: кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии им. академика А. И. Струкова Первого МГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), e-mail: osmanovyouseef@yandex.ru

For correspondence: Osmanov Y. I., PhD, Associate Professor of the Department of Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), e-mail: osmanovyouseef@yandex.ru

Information about authors:

Osmanov Y. I., <http://orcid.org/0000-0002-7269-4190>

Kogan E. A., <http://orcid.org/0000-0002-1107-3753>

Shchekin V. I., <https://orcid.org/0000-0003-3763-7454>

Demyashkin G. A., <https://orcid.org/0000-0001-8447-2600>

Kaem A. V., <https://orcid.org/0000-0003-2316-5185>

РЕЗЮМЕ

Интенсивные исследования последних десятилетий были посвящены на выявление популяции раковых стволовых клеток среди эпителиальных клеток почечных канальцев. На сегодняшний день, в поисках потенциальных раковых стволовых клеток почечно-клеточной карциномы был исследован широкий спектр генов, участвующих в молекулярном патогенезе почечно-клеточной карциномы. Среди них можно выделить ALDH1, CD133, CXCR4, CD24, CD82 и SOX2.

Цель исследования: провести сравнительную оценку экспрессии стволовых маркеров ALDH1, CD133, CXCR4, CD24, CD82 и SOX2 в гистологических вариантах почечно-клеточной карциномы и определение их прогностической значимости.

Материал и методы. Исследование выполнено на операционном материале от 225 пациентов с почечно-клеточной карциномой. В качестве группы сравнения изучали биоптаты от 46 пациентов с онкоцитомой почки. Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах по стандартному протоколу. Использовали антитела: ALDH1, CD82, CD133, CXCR4, SOX2 («Abcam») и CD24 («Invitrogen»). Для выявления различий между сравниваемыми группами использовали непараметрический критерий согласия Пирсона (χ^2).

Результаты. Экспрессия ALDH1 была обнаружена в 103 (45,8%) наблюдениях, CXCR4- в 105 (46,7%) случаях. Позитивная реакция на CD24 имела место в 98 (43,6%) образцах, SOX2- в 106 (47,1%) опухолях. Среди вариантов почечно-клеточной карциномы наиболее часто экспрессия CD133 наблюдается в светлоклеточной папиллярной почечно-клеточной карциноме. Более высокая частота экспрессии CD82 наблюдается в хромофобной почечно-клеточной карциноме.

Заключение. В зависимости от гистологического варианта почечно-клеточной карциномы выявлены достоверные ассоциации между экспрессиями маркеров стволовых клеток и клиническими параметрами.

Ключевые слова: почечно-клеточная карцинома, раковая стволовая клетка.

FEATURES OF EXPRESSION OF STEM CELL MARKERS IN RENAL CELL CARCINOMAS

Osmanov Y. I., Kogan E. A., Demyashkin G. A., Shchekin V. I., Kaem A. V.

I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

SUMMARY

Intensive studies of recent decades have been devoted to identifying a population of cancer stem cells among the renal tubule epithelial cells. To date, a broad spectrum of genes involved in the molecular pathogenesis of renal cell carcinoma has been investigated in search of potential cancer stem cells of renal cell carcinoma. Among them, ALDH1, CD133, CXCR4, CD24, CD82 and SOX2 can be distinguished.

The aim of the study was to comparative characteristics of stem marker expression – ALDH1A1, CXCR4, CD24, CD82, CD133 and SOX2 in histological variants of renal cell carcinoma and determination of their prognostic significance.

Subject and method. The study was performed on surgical material from 225 patients with renal cell carcinoma. As a comparison group, biopsy samples from 46 patients with renal oncocytoma were studied. Immunohistochemical staining for the detection of antigens in the paraffin-embedded slices was made using the antibodies to ALDH1, CD82, CD133, CXCR4, SOX2 («Abcam») and CD24 («Invitrogen»). To identify differences between the compared groups, the nonparametric Pearson's criterion (χ^2) were employed.

Results. Expression of ALDH1 was detected in 103 (45.8%) cases, CXCR4 in 105 (46.7%) cases. A positive reaction to CD24 occurred in 98 (43.6%) samples, SOX2 in 106 (47.1%) tumors. Among the variants of renal cell carcinoma, CD133 expression is most often observed in clear cell papillary renal cell carcinoma. A higher expression rate of CD82 is observed in chromophobic renal cell carcinoma.

Conclusion. Reliable associations between stem cell marker expressions and clinical parameters were revealed depending on the histological variant of renal cell carcinoma.

Key words: renal cell carcinoma, cancer stem cells.

Благодаря последним достижениям в области молекулярной биологии стало возможным значительно повысить эффективность противоопухолевых препаратов. Одним из главных причин прогресса в лечении онкологических заболеваний является моделирование и разработка целевой доставки биоактивных молекул, демонстрирующих селективную активность против раковых стволовых клеток (РСК). На сегодняшний день, в поисках потенциальных РСК почечно-клеточной карциномы (ПКК) был исследован широкий спектр генов, участвующих в молекулярном патогенезе ПКК [1; 2; 3; 4]. ПКК представляет собой гетерогенную группу опухолей, однако, несмотря на морфологическое разнообразие, все гистологические варианты ПКК развиваются из эпителия почечных канальцев и имеют общий гистогенез. Интенсивные исследования последних десятилетий были посвящены на выявление популяции РСК среди эпителиальных клеток почечных канальцев. Результаты многочисленных работ показывают, что РСК ПКК экспрессируют гены тех же поверхностных маркеров (ПМ), что и соматические стволовые клетки почечных канальцев. Среди них можно выделить адгезивного белка CD133 и рецептора цитокинов CXCR4 [5; 6; 7]. Вместе с тем, наличие положительной экспрессии вышеуказанных ПМ, по мнению некоторых исследователей не является надежным показателем принадлежности опухолевой клетки к РСК [8; 9; 10; 11]. Установлено, что в условиях регуляции генов на эпигенетическом уровне, а также под действием противоопухолевых агентов и мутационных процессов профиль ПМ меняется. В связи с чем, в настоящий момент ведутся активные поиски наиболее специфических белков с целью определения РСК в опухолевой популяции. Потенциальными кандидатами для решения этой задачи могут являться фермент ALDH1; фактор транскрипции SOX2; активатор сигнальных путей CD24; и белок мембранного микродомена CD82 [12; 13; 14; 15].

Цель исследования: сравнительная оценка экспрессии стволовых маркеров – ALDH1, CXCR4, CD24, CD82, CD133 и SOX2 в гистологических вариантах ПКК и определение их прогностической значимости.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клинические данные. Объектом исследования послужил архивный биопсийный материал от 225 больных (129 мужчин и 96 женщин) в возрасте от 17 до 89 лет (средний возраст 59 лет), проходивших хирургическое лечение в Урологической клинике ПМГМУ им. И.М. Сеченова и Урологическом центре Научного Кли-

нического Центра (НКЦ) ОАО РЖД по поводу рака почки в период с 2011 г. по 2017 г. В качестве группы сравнения изучали биоптаты от 46 пациентов с онкоцитомой почки.

Гистологическое исследование. Степень злокачественности ПКК (G) оценивали по четырехуровневой системе градации согласно классификации ВОЗ/ISUP 2016 года. Для оценки степени ядерной градации хромофобного рака использовали трехуровневую систему по G.Paner. Стадию опухоли (pT1 – T4) определяли согласно протоколу 8-го издания TNM-классификации почечно-клеточного рака [16; 17; 18].

Иммуногистохимическое исследование (ИГХ). Серийные срезы толщиной 5 мкм депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Для монтирования парафиновых срезов использовали готовые предметные стекла с адгезивным покрытием (Polyllisin Slides, Menzel GmbH&Co KG; Германия). Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Для “демаскировки” антигенов срезы инкубировали в течение 5 мин с 3 % H₂O₂, подвергали высокотемпературной обработке в цитратном буфере с pH 6,0 или 9,0 (для каждого антитела в соответствии с рекомендуемым протоколом) в микроволновой печи (2 раза по 5 мин при мощности 690 Вт с перерывом 2 мин). Инкубацию с первичными антителами проводили при комнатной температуре в течение 40 – 60 мин. В качестве вторичных антител использовали систему EnVision (“DAKO Cytomation”, Дания). Срезы инкубировали в течение 20-40 мин (в соответствии с рекомендуемым протоколом). Для визуализации ИГХ-реакции использовали DAB+систему (“DAKO Cytomation”, Дания). Срезы докрашивали гематоксилином Майера и заключали в канадский бальзам. В каждой серии препаратов был соответствующий позитивный и негативный контроль. Для каждого маркера учитывали топику положительной экспрессии в опухолевой клетке- ядерная, цитоплазматическая или мембранная. Список использованных антител приводится в табл. 1.

Выраженность экспрессии маркеров оценивали полуколичественным методом: 0 баллов — отсутствие экспрессии; 1 балл — положительная экспрессия до 25 % клеток опухоли; 2 балла — положительная экспрессия от 25 до 50 % клеток опухоли; 3 балла — положительная экспрессия от 50 % до 75 % клеток опухоли; 4 балла- положительная экспрессия более 75% клеток опухоли. При наличии от 0 до 2 баллов ИГХ-реакцию считали отрицательной или слабой, а выше 2-х баллов сильной или выраженной по Z. Zeng и соавт. с изменениями [19; 20].

Таблица 1

Панель использованных в исследовании антител

Антитела	Клон	Производитель	Разведение	Источник
ALDH1	EP1933Y	Abcam	RTU	Mouse
CD24	SN3b	Invitrogen	1:50	-
CD82	ab66400	Abcam	1:80	-
CD133	ab19898	Abcam	1:200	Rabbit
CXCR4	ab1670	Abcam	1:150	Mouse
SOX2	ab97959	Abcam	1:1000	-

Обозначение. RTU – готовые к применению.

Статическая обработка данных выполнена на персональном компьютере с помощью электронных таблиц Microsoft Excel и пакета прикладных программ Statistica for Windows v. 7.0, “StatSoft Inc.” (США).

Для выявления различий между сравниваемыми группами использовали непараметрический критерий согласия Пирсона (χ^2). Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все 235 новообразования были распределены в соответствии с гистологическим вариантом. Из них по 60 (25,5%) случаев были верифицированы как светлоклеточная почечно-клеточная карцинома (СПКК), папиллярная ПКК (ППКК) и хромофобная ПКК (ХПКК) соответственно. Все остальные гистологические формы ($n=55$; 23,4%) были объединены в группе “другие варианты ПКК”. Из них 10 (4,3 %) образцов были верифицированы как MiTF-ассоциированная ПКК; по 9 (3,8 %) наблюдений - карцинома из собирательных трубочек (КСТ) и ПКК, ассоциированная приобретенной кистозной болезнью почки (ПККАПКБП); 8 (3,4 %) случаев - неклассифицируемая ПКК; 5 (2,1 %) образцов - светлоклеточная папиллярная ПКК (СППКК); 4 (1,7 %) случая-тубулокистозная ПКК (ТППКК); 3 (1,3 %) образца-медуллярная карцинома (МК); по 2 (0,9 %) опухоли-сукцинатдегидрогеназа дефицитная ПКК (СДГД ПКК), фумаратгидратаза дефицитная ПКК (ФГД ПКК) и муцинозная тубулярная и веретенноклеточная ПКК (МТВПКК); 1 (0,4 %) случай как фолликулярная карцинома почки (ФКП). Основные клиничко-морфологические параметры опухолей обобщены в таблице 2.

Сильная или выраженная цитоплазматическая и/или мембранная экспрессия ALDH1 была обнаружена в 102 (43,4%) наблюдениях. Наиболее часто сильную экспрессию маркера выявляли при СПКК (53,3%), относительно реже при ППКК (43,3%), ХПКК (35,0%) и других вариантах ПКК (41,8 %). При анализе возможной взаимосвязи

между экспрессией ALDH1 и клиничко-морфологическими параметрами ПКК установлено, что гистологическая структура опухоли, а также возраст и пол не влияет на экспрессию маркера ($p > 0,05$). В то же время обнаружена статически значимая связь между степенью выраженности экспрессии ALDH1 и размером новообразования, стадией и ядерной градацией опухоли ($p < 0,05$). Так, было определено, что в ПКК по мере увеличения размера, стадии и ядерной градации опухоли процент положительно прореагировавших клеток на ALDH1 возрастает (рис.1).

Сильная или выраженная цитоплазматическая и мембранная и/или ядерная экспрессия CXCR4 была выявлена в 117 (49,8%) случаях. Наиболее часто сильную экспрессию CXCR4 определили при СПКК (63,3%), относительно реже при ППКК (48,3%), ХПКК (40,0%) и других вариантах ПКК (47,3 %) (рис.2).

При сравнительном анализе между экспрессией маркера и гистологическими вариантами ПКК, а также возрастом и полом были получены статистически не значимые результаты (табл.3).

Вместе с тем обнаружена статически значимая связь между степенью выраженности экспрессии маркера и размером новообразования, стадией и ядерной градацией опухоли (табл.4).

Установлено, что в ПКК по мере увеличения размера, стадии и ядерной градации опухоли процент положительно прореагировавших клеток на CXCR4 возрастает ($p < 0,05$).

Сильная или выраженная цитоплазматическая экспрессия CD24 обнаружена в 97 (41,3%) наблюдениях. Относительно часто сильную или выраженную экспрессию маркера выявляли при ППКК (48,3%), реже при СПКК (40,0%), ХПКК (43,3%) и других вариантах ПКК (32,7%). При анализе возможной взаимосвязи между экспрессией CD24 и клиничко-морфологическими параметрами ПКК установлено, что гистологическая структура и размер опухоли, а также возраст и пол не влияет на экспрессию маркера ($p > 0,05$). Между тем определено, что в ПКК по мере уве-

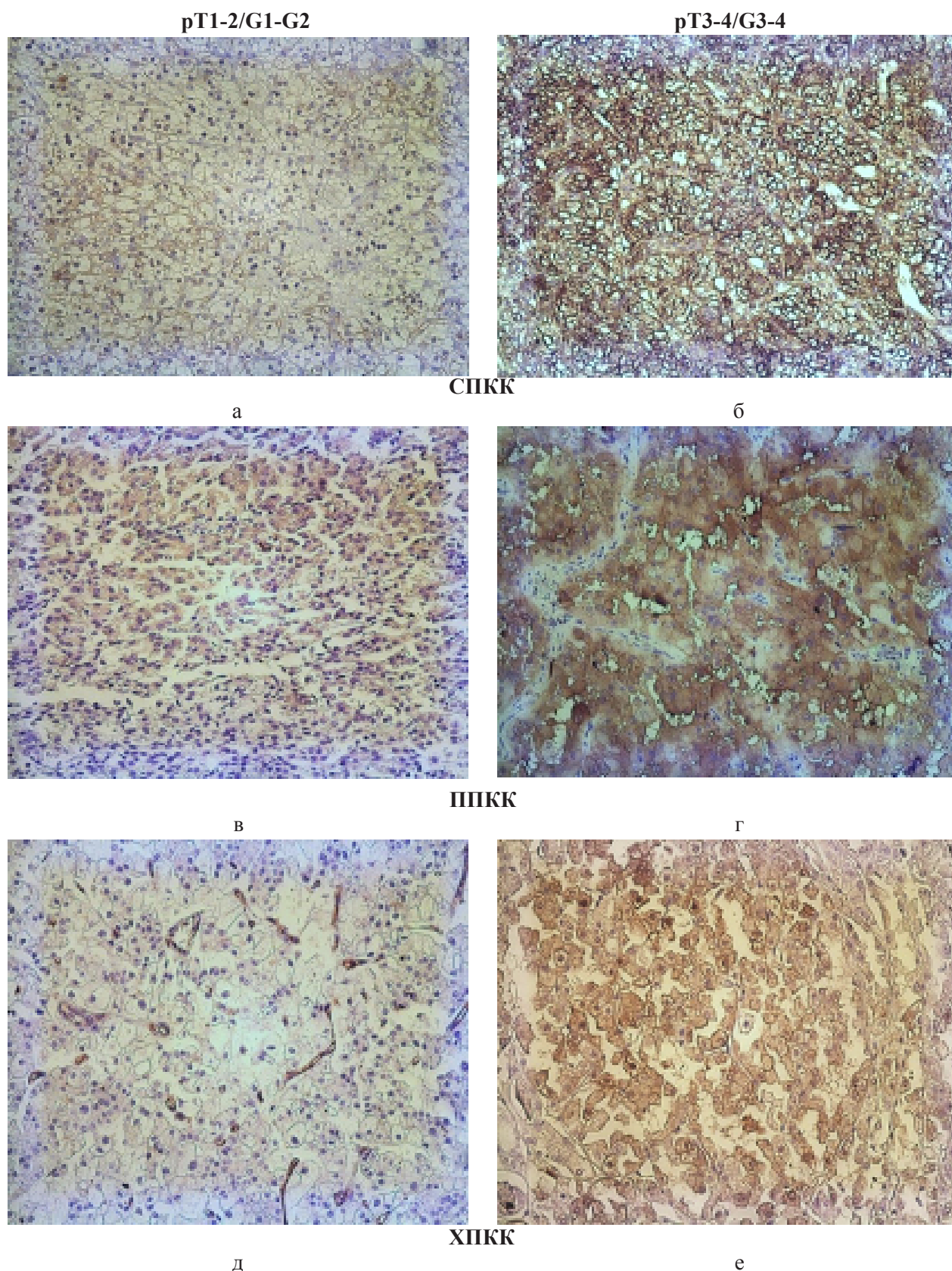


Рис. 1. Выраженность экспрессии ALDH1 в СПКК, ППКК и ХПКК в зависимости от степени ядерной градации и размера опухоли. А – экспрессия ALDH1 в СПКК с ядерной градацией G1 – 2 в стадиях рТ1-2, ув. x200. Б – экспрессия ALDH1 в СПКК с ядерной градацией G3 – 4 в стадиях рТ3 – 4, ув. x200. В – экспрессия ALDH1 в ППКК с ядерной градацией G1 – 2 в стадиях рТ1 – 2, ув. x200. Г – экспрессия ALDH1 в ППКК с ядерной градацией G3 – 4 в стадиях рТ3 – 4, ув. x200. Д – экспрессия ALDH1 в ХПКК с ядерной градацией G1 в стадиях рТ1 – 2, ув. x200. Е – экспрессия ALDH1 в ХПКК с ядерной градацией G2 – 3 и рТ3 – 4, ув. x200.

Таблица 2

Распределение случаев в зависимости от их гистологического строения и клинических параметров

		n (%)
		235 (100%)
Пол	Муж.	134 (57,0%)
	Жен.	101 (43,0%)
Возраст	≤59	86 (36,6%)
	>59	149 (64,4%)
Гистологический вариант	Светлоклеточная ПКК	60 (25,5 %)
	Папиллярная ПКК	60 (25,5 %)
	Хромофобная ПКК	60 (25,5 %)
	MiTF-ассоциированная ПКК	10 (4,3 %)
	ПКК ассоциированная приобретенной кистозной болезнью	9 (3,8 %)
	Карцинома из собирательных трубочек	9 (3,8 %)
	Неклассифицируемая ПКК	8 (3,4 %)
	Светлоклеточная папиллярная ПКК	5 (2,1%)
	Тубулокистозная ПКК	4 (1,7 %)
	Медуллярная карцинома	3 (1,3%)
	Сукцинатдегидрогеназа-дефицитная ПКК	2 (0,9%)
	Фумарат-гидратаза-дефицитная ПКК	2 (0,9%)
	Муцинозная тубулярная и веретенноклеточная ПКК	2 (0,9%)
	Фолликулярная карцинома	1 (0,4%)
Размер опухоли	≤ 4 см	78 (33,2%)
	> 4 см	157 (66,8%)
Стадия	pT1-pT2	167 (71,1%)
	pT3-pT4	68 (28,9%)
Ядерная градация	G1 – G2	112 (47,7%)
	G3 – G4	123 (52,3%)

личения стадии и ядерной градации опухоли процент положительно прореагировавших клеток на CD24 возрастает ($p < 0,05$).

Выраженная мембранная экспрессия CD133 обнаружена во всех 5 (100%) СППКК (рис.3).

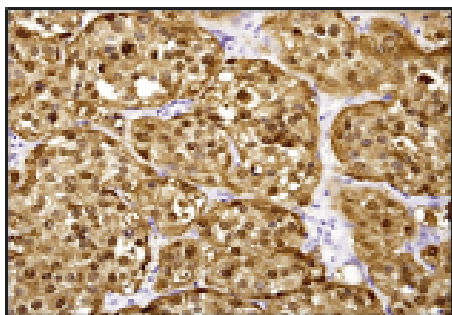


Рис. 2. Сильная цитоплазматическая и ядерная экспрессия CXCR4 в СППКК увел. х400

Сильная мембранная или цитоплазматическая экспрессия маркера была обнаружена при СППКК (46,7%), намного реже при ППКК 1-го типа (25,0%), и ХПКК (8,3%). Между тем среди остальных вариантов ПКК сильная мембранная

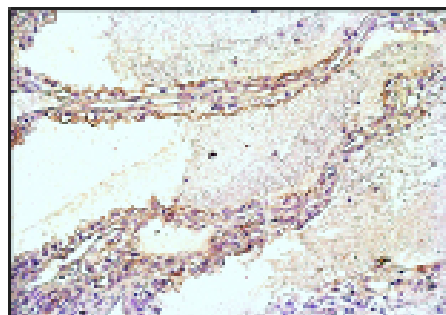


Рис. 3. Сильная мембранная экспрессия CD133 в СППКК, увел. х200

Таблица 3

Связь между экспрессиями ALDH1, CXCR4 и гистологическими вариантами ПКК

Морфология	ALDH1		χ^2 р	CXCR4		χ^2 р
	отрицательная или слабая экспрессия	сильная или выраженная экспрессия		отрицательная или слабая экспрессия	сильная или выраженная экспрессия	
	n (%)			n (%)		
СПКК	28 (46,7 %)	32 (53,3 %)	4,190 р>0,05	22 (36,7 %)	38 (63,3 %)	6,893 р>0,05
ППКК	34 (56,7 %)	26 (43,3 %)		31 (51,7 %)	29 (48,3 %)	
ХПКК	39 (65,0 %)	21 (35,0 %)		36 (60,0 %)	24 (40,0 %)	
другие ПКК	32 (58,2 %)	23 (41,8 %)		29 (52,7%)	26 (47,3%)	

Обозначения. СПКК – светлоклеточная ПКК; ППКК – папиллярная ПКК; ХПКК – хромофобная ПКК.

Таблица 4

Связь между экспрессиями ALDH1, CXCR4 и клинко-морфологическими параметрами ПКК

		n (%)	ALDH1		χ^2 р	CXCR4		χ^2 р
			отрицательная или слабая экспрессия	сильная или выраженная экспрессия		отрицательная или слабая экспрессия	сильная или выраженная экспрессия	
Пол	Муж.	134 57,0%	73 31,0 %	61 26,0 %	0,569 р=0,451	66 28,1 %	68 28,9 %	0,115 р=0,735
	Жен.	101 43,0%	60 25,5 %	41 17,5 %		52 22,1 %	49 20,9 %	
Возраст	≤59	86 36,6%	47 20,0 %	39 6,6 %	0,209 р=0,648	48 20,4 %	38 16,2 %	1,702 р=0,193
	>59	149 63,4%	86 36,6 %	63 26,8 %		70 29,8 %	79 33,6 %	
Размер опухоли	≤ 4см	78 33,2%	57 24,3 %	21 8,9 %	12,910 р<0,05	58 24,7 %	20 8,5 %	27,229 р<0,05
	> 4см	157 66,8%	76 32,3 %	81 34,5 %		60 25,5 %	97 41,3 %	
Стадия	рТ1-рТ2	167 71,0%	105 44,7 %	62 26,3 %	9,261 р<0,05	101 43,0 %	66 28,0 %	24,332 р<0,05
	рТ3-рТ4	68 29,0%	28 12,0 %	40 17,0 %		17 7,2 %	51 21,7 %	
Ядерная градация	G1-G2	112 47,7%	75 1,9%	37 15,7 %	9,365 р<0,05	81 34,5 %	31 13,2 %	41,838 р<0,05
	G3-G4	123 52,3%	58 24,7 %	65 27,7 %		37 15,7 %	86 36,6 %	

Таблица 5

Связь между экспрессиями CD24, CD133 и гистологическими вариантами ПКК

Морфология	CD24		χ^2 р	CD133		χ^2 р
	отрицательная или слабая экспрессия	сильная или выраженная экспрессия		отрицательная или слабая экспрессия	сильная или выраженная экспрессия	
	n (%)			n (%)		
СПКК	36 (60,0%)	24 (40,0%)	3,036 р>0,05	32 (53,3%)	28 (46,7%)	24,573 р<0,05
ППКК	31 (51,7%)	29 (48,3%)		45 (75,0%)	15 (25,0%)	
ХПКК	34 (56,7%)	26 (43,3%)		55 (91,7 %)	5 (8,3 %)	
другие ПКК	37 (67,3%)	18 (32,7%)		44 (80,0 %)	11 (20,0 %)	

Таблица 6

Связь между экспрессиями CD24, CD133 и клинико-морфологическими параметрами ПКК.

		n (%)	CD24		χ^2 p	CD133		χ^2 p
			отрицательная или слабая экспрессия	сильная или выраженная экспрессия		отрицательная или слабая экспрессия	сильная или выраженная экспрессия	
Пол	Муж.	134 57,0%	78 33,2 %	56 23,8 %	0,034 p=0,854	95 40,4 %	39 16,6 %	2,651 p=0,104
	Жен.	101 43,0%	60 25,5 %	41 17,5 %		81 34,5 %	20 8,5 %	
Возраст	≤59	86 36,6%	50 21,3 %	36 15,3 %	0,019 p=0,891	66 28,1 %	20 8,5 %	0,247 p=0,620
	>59	149 63,4%	88 37,4 %	61 26,0 %		110 46,8 %	39 16,6 %	
Размер опухоли	≤ 4 см	78 33,2%	49 20,9 %	29 12,3 %	0,809 p=0,369	57 24,3 %	21 8,9 %	0,205 p=0,651
	> 4 см	157 66,8%	89 37,9 %	68 28,9 %		119 50,6 %	38 16,2 %	
Стадия	pT1- pT2	167 71,0%	106 45,0 %	61 26,0 %	5,371 p<0,05	123 52,3 %	44 18,7 %	0,473 p=0,492
	pT3- pT4	68 29,0%	32 13,6 %	36 15,3 %		53 22,6 %	15 6,4 %	
Ядерная градация	G1-G2	112 47,7%	81 34,5 %	31 13,2 %	16,324 p<0,05	70 29,8 %	42 17,9 %	17,480 p<0,05
	G3-G4	123 52,3%	57 24,3 %	66 28,0 %		106 45,1 %	17 7,2 %	

экспрессия CD133 маркера обнаружена во всех 5 СППКК (рис.4).

Таким образом, при оценке взаимосвязи между экспрессией CD133 и вариантами ПКК установлено, что гистологическая структура опухоли влияет на экспрессию маркера (табл.5).

Сравнительный анализ возможных ассоциаций между экспрессией CD133 и клинико-морфологическими параметрами ПКК выявил достоверную связь между выраженностью экспрессии и ядерной градацией ПКК ($p<0,05$). Установлено, что сильная экспрессия CD133 характерна для ПКК с низкой степенью ядерной градации (табл.6).

Следует отметить, что в зависимости от гистологического строения ПКК, экспрессия CD133

имеет ряд особенностей. Так, среди СППКК сильная мембранная и цитоплазматическая экспрессия маркера была обнаружена в опухолях микро-и/или макрокистозного строения с низкой ядерной градацией, тогда как в СППКК с высокой ядерной градацией аналогичная выраженность реакции наблюдалась только в цитоплазме опухолевых клеток (рис.5).

В то же время во всех саркоматоидных ПКК была определена отрицательная экспрессия CD133 в саркоматоидном компоненте. Сильная или выраженная мембранная экспрессия CD82 определена в большинстве ХПКК (76,7%) классического и эозинофильно-клеточного вариантов, намного реже при СППКК (35,0%), ППКК 2-го типа (11,7%) и других вариантах ПКК (14,5%) (рис. 6).

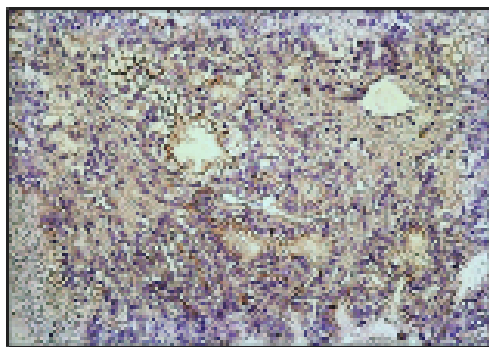


Рис. 5. Сильная мембранная экспрессия CD133 в СППКК с низкой ядерной градацией микрокистозного строения, увел. x200

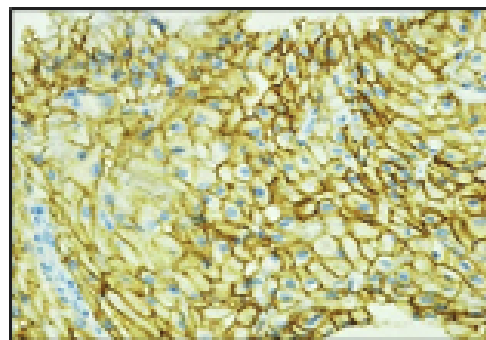


Рис. 6. Сильная мембранная экспрессия CD82 в ХПКК, увел. x400

Таблица 7

Связь между экспрессиями CD82, SOX2 и гистологическими вариантами ПКК

Морфология	CD82		χ^2 р	SOX2		χ^2 р
	отрица- тельная или слабая экспрессия	сильная или выраженная экспрессия		отрица- тельная или слабая экспрессия	сильная или выраженная экспрессия	
	n (%)			n (%)		
СПКК	39 (65,0%)	21 (35,0%)	11,345 р<0,05	41 (68,3%)	19 (31,7%)	1,079 р=0,783
ППКК	53 (88,3%)	7 (11,7%)		43 (71,7%)	17 (28,3%)	
ХПКК	14 (23,3%)	46 (76,7%)		46 (76,7%)	14 (23,3%)	
другие ПКК	47 (85,5%)	8 (14,5%)		40 (72,7%)	15 (27,3%)	

Таблица 8

Связь между экспрессиями CD82, SOX2 и клиничко-морфологическими параметрами ПКК.

		n (%)	CD82		χ^2 р	SOX2		χ^2 р
			отрица- тельная или слабая экспрессия	сильная или выраженная экспрессия		отрица- тельная или слабая экспрессия	сильная или выраженная экспрессия	
Пол	Муж.	134 57,0%	84 35,7 %	50 21,3 %	0,804 р=0,371	94 40,0 %	40 17,0%	0,748 р=0,388
	Жен.	101 43,0%	69 29,4 %	32 13,6 %		76 32,3 %	25 10,6 %	
Возраст	≤59	86 36,6%	55 23,4 %	31 13,2 %	0,07 р=0,779	64 27,2 %	22 9,4 %	0,293 р=0,589
	>59	149 63,4%	98 41,7 %	51 21,7 %		106 45,1 %	43 18,3 %	
Размер опухоли	≤ 4 см	78 33,2%	43 18,3 %	35 14,9 %	5,117 р<0,05	61 26,0 %	17 7,2 %	2,007 р=0,157
	> 4 см	157 66,8%	110 46,8 %	47 20,0 %		109 46,4 %	48 20,4 %	
Стадия	pT1- pT2	167 71,0%	93 39,5 %	74 31,5 %	22,532 р<0,05	128 54,5 %	39 16,6 %	5,349 р<0,05
	pT3- pT4	68 29,0%	60 25,5 %	8 3,4 %		42 17,9 %	26 11,1 %	
Ядерная града- ция	G1-G2	112 47,7%	49 20,9%	63 26,8 %	42,960 р<0,05	86 36,6 %	26 11,1 %	2,113 р=0,147
	G3-G4	123 52,3%	104 44,3 %	19 8,0 %		84 35,7 %	39 16,6 %	

Таким образом, при оценке взаимосвязи между экспрессией CD82 и вариантами ПКК установлено статистически значимая достоверная связь ($p<0,05$). В качестве сравнения мы также изучили характер экспрессии в 46 классических онкоцитомах почки. Следует отметить, что только в 4 (8,7%) онкоцитомах была обнаружена очаговая положительная экспрессия CD82. Во всех остальных наблюдениях реакция на маркер была негативной (рис. 7).

Сравнительный анализ возможных ассоциаций между экспрессией CD82 и клиничко-морфологическими параметрами ПКК выявил достоверную связь с размером, стадией и ядерной градацией опухоли ($p<0,05$). Установлено, что в ПКК по мере увеличения стадии и ядерной градации опухоли процент положительно про-

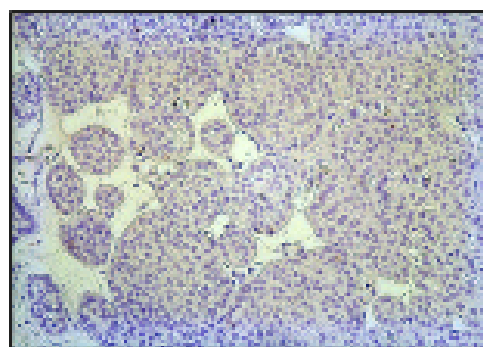


Рис. 7. Негативная реакция на CD82 в онкоцитоме, увел. x200

реагировавших клеток на CD82 уменьшается. Сильная или выраженная ядерная экспрессия SOX2 обнаружена в 65 (27,7%) наблюдениях. Среди опухолей сильная экспрессия SOX2 была определена при СПКК (31,7%), ППКК (28,3%), ХПКК (23,3%) и других вариантах ПКК (27,3%) (табл. 7).

При сравнительном анализе между экспрессией маркера и гистологическими вариантами ПКК, а также размером опухоли, степенью ядерной градации, возрастом и полом были получены статистически не значимые результаты ($p > 0,05$). В то же время, обнаружена достоверная связь между экспрессией маркера и стадией опухоли ($p < 0,05$). Так, было определено, что в ПКК в стадиях pT3-pT4 более половины случаев обнаруживается сильная ядерная экспрессия SOX2 (табл. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ

Наше исследование показало, что частота, выраженность и топика позитивной экспрессии исследуемых маркеров отличается при гистологических вариантах ПКК. Полученные результаты позволяют утверждать, что характер экспрессии стволовых маркеров в разных гистогенетических формах отражает особенности молекулярно-биологических путей лежащих на основе их эволюционирования.

При анализе возможной взаимосвязи между экспрессиями ALDH1, CXCR4 и клинко-морфологическими параметрами ПКК были получены статистически значимые результаты. Определено, что независимо от гистологического варианта ПКК по мере увеличения размера, стадии и ядерной градации опухоли процент положительно прореагировавших клеток на ALDH1 и CXCR4 возрастает.

Наши результаты согласуются с литературными данными. Так, A. Hassan и соавт. в независимости от гистологического варианта ПКК обнаружили положительную корреляционную связь между выраженностью экспрессии ALDH1, со стадией опухоли и степенью ядерной градации [18]. Статистически значимые связи между экспрессией ALDH1, размером опухоли и степенью клеточной анаплазии были описаны в ранее проведенных исследованиях [4; 5; 6; 7].

При анализе возможной взаимосвязи между экспрессией CD24 и клинко-морфологическими параметрами ПКК была определена положительная корреляционная связь между выраженностью реакции, стадией опухоли и степенью ядерной градации. В работах H. Lee с соавт. экспрессия CD24 в СПКК ассоциировалась со стадией и степенью ядерной градации. D. Arık с соавт. на примере 108 СПКК, 12 ППКК и 13

ХПКК показали, что интенсивность экспрессии CD24 коррелирует со стадией и рецидивом опухоли [2; 20]. Точный механизм связи CD24 в ПКК со свойствами РСК неизвестен. На наш взгляд в агрессивных формах ПКК повышение интенсивности экспрессии маркера связано с активизацией различного гликозилирования в опухолевых клетках. В ходе экспериментов удалось выяснить, что в условиях различного гликозилирования взаимодействие CD24 с разными лигандами приводит к разным функциям, включая пролиферацию, адгезию, роллинг по эндотелию, инвазию и миграцию опухолевых клеток.

При анализе возможной взаимосвязи между экспрессией CD82 и гистологическими вариантами ПКК было определено, что в подавляющем большинстве случаев оба варианта ХПКК в сильно- и выраженно позитивном диапазоне экспрессируют CD82. Слабая или отрицательная экспрессия маркера в ХПКК наблюдалась лишь в 23%. При оценке экспрессии CD82 в онкоцитоммах исследованные в качестве группы сравнения только в 9 % наблюдениях визуализировалась слабая экспрессия [6; 9]. Между тем среди других вариантов ПКК была определена отрицательная корреляционная связь между выраженностью экспрессии CD82, стадией опухоли и степенью ядерной градации. Так, было установлено, что среди CD82-положительных случаев преобладают опухоли с низкими степенями ядерной градации в стадиях pT1-pT2. Отрицательная корреляция между экспрессией CD82, размером опухоли и степенью клеточной анаплазии в ПКК [14; 17]. В ряде работ полученные данные показывают, что в агрессивных опухолях значительное снижение или отсутствие экспрессии CD82 обусловлено активизацией сигнальных путей контролируемые взаимодействия с-Met и членами семейства EGFR [20].

При анализе возможной взаимосвязи между экспрессией CD133 и гистологическими вариантами ПКК во всех СППКК наблюдалась сильная экспрессия маркера. По частоте положительной экспрессии следующую позицию заняла СПКК. При этом сильная или выраженная реакция на CD133 визуализировалась менее 50% СПКК. Дифференциально-диагностическая значимость CD133 на большой выборке образцов СППКК и СПКК описана в ранее проведенных исследованиях [17, 19]. Намного реже позитивная экспрессия маркера была определена в остальных гистологических вариантах. Среди них самая низкая частота положительной экспрессии CD133 выявлена в ХПКК. Между тем во всех ППКК 2-го типа, а также в саркоматоидном компоненте всех саркоматоидных ПКК наблюдалась отрицательная реакция на маркер. Важ-

но отметить, что среди CD133-положительных опухолей отмечалась отрицательная корреляционная связь между выраженностью экспрессии и степенью ядерной градации. Тенденцию к усилению уровня экспрессии CD133 по мере уменьшения степени ядерной градации опухоли доказана на примере 240 СПКК. Кроме того, при изучении особенностей экспрессии маркера отмечалось изменение локализации белка в клетках СПКК при разных ее гистологических формах. Так, было установлено, что среди CD133-позитивных СПКК сильная мембранная и цитоплазматическая экспрессия обнаруживается в опухолях микро-и/или макрокистозного строения с низкой ядерной градацией. Вместе с тем в СПКК с высокой ядерной градацией аналогичная выраженность реакции наблюдалась лишь в цитоплазме опухолевых клеток.

При анализе возможной взаимосвязи между экспрессией SOX-2 и клинико-морфологическими параметрами ПКК достоверная связь была определена лишь со стадией опухоли. Было обнаружено, что более половины SOX-2-положительных ПКК соответствуют стадиям pT3 и pT4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При сравнительном анализе возможных ассоциаций между экспрессией ALDH1, CXCR4 и клинико-морфологическими параметрами ПКК выявлена достоверная связь маркера с размером, стадией и ядерной градацией опухоли. Установлено, что по мере увеличения размера, стадии и ядерной градации опухоли процент положительно прореагировавших клеток на ALDH1 и CXCR4 возрастает. Аналогичная картина наблюдалась при сравнительном анализе экспрессии CD24 со стадией и ядерной градацией ПКК. Между экспрессией SOX2 и со стадией опухоли обнаружена значимая прямая связь. Было установлено, что более половины ПКК в стадиях pT3-pT4 экспрессировали SOX2 в сильном диапазоне. В нашем исследовании во всех СПКК обнаружена сильная мембранная экспрессия маркера. В СПКК экспрессия CD133 также имеет ряд особенностей. Установлено, что среди CD133-позитивных СПКК сильная мембранная и цитоплазматическая экспрессия маркера была обнаружена в опухолях микро-и/или макрокистозного строения с низкой ядерной градацией, а в СПКК с высокой ядерной градацией аналогичная выраженность реакции наблюдалась только в цитоплазме опухолевых клеток. Во всех саркоматоидных ПКК в саркоматоидном компоненте была выявлена отрицательная экспрессия CD133. В ПКК по мере увеличения размера, стадии и ядерной градации опу-

холи процент положительно прореагировавших клеток на CD82 уменьшается ($p < 0,05$). Среди вариантов ПКК наиболее часто сильная экспрессия маркера наблюдается в ХПКК. При сравнительном анализе экспрессии CD82 в ХПКК и онкоцитоме установлено, что для онкоцитомы характерна отрицательная или слабая реакция на CD82. Полученные результаты позволяют использовать CD82 в качестве дифференциально-диагностического маркера между эозинофильно-клеточным вариантом ХПКК и онкоцитомой.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Reuben C, Andrew K. S, Helen D. B. Characterization of Cancer Stem Cells in Renal Clear Cell Carcinoma. *Journal of Stem Cell and Regenerative Biology*. 2019;5(1):6-17. doi: 10.15436/2471-0598.19.2462.
2. Damian M., Lukasz S., Cezary S. Biology of renal tumour cancer stem cells applied in medicine. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2015;19(1A):A44-A51. doi:10.5114/wo.2014.47128.
3. Claudia C. and Holger M. Biomarker discovery for renal cancer stem cells. *J Path: Clin Res* January 2018;(4):3-18. doi:10.1002/cjp2.91.
4. Claudia C., Tomas H, Cédric P. Detecting circulating tumor DNA in renal cancer: An open challenge. *Experimental and Molecular Pathology*. 2017;102:255-26. doi: 10.1016/j.yexmp.2017.02.009.
5. Kevin J. Z, Satyum R. P, Nava S. D. Diagnostic Values of a Progenitor Cell Marker CD133 Expression in Various Types of Adenocarcinoma. *J Mol Biomark Diagn*. 2016;7:5. doi: 10.4172/2155-9929.1000299.
6. Crescenzo D., Luca C., Luigi P. Differential role of CD133 and CXCR4 in renal cell carcinoma. 2010; *Cell Cycle* 9(22):4492-4500. doi:4161/cc.9.22.13680.
7. Thomas C. W, Claudine G., Stefan B. Strong Expression of Chemokine Receptor CXCR4 by Renal Cell Carcinoma Correlates with Advanced Disease. *Journal of Oncology*. 2008;1-6. doi:10.1155/2008/626340.
8. Bruno S., Bussolati B., Grange C. CD133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis. *Am J Pathol*. 2006;169:2223-35. doi:10.2353/ajpath.2006.060498.
9. Kyugeun K., Hyojin I., Jae YR. High-level expression of stem cell marker CD133 in clear cell renal cell carcinoma with favorable prognosis. 2011; *Oncology Letters* 2:1095-1100. doi:10.3892/ol.2011.368.
10. Wang L, Yang B., Yang Q. Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by renal cell carcinoma cells correlates with metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2009;26:1049-54. doi 10.1007/s10585-009-9294-3.
11. Karen L. R, Robert M. S, Robert A. F. Chemokines as therapeutic targets in renal cell carcinoma. *Expert*

Rev Anticancer Ther. 2008;8(6):887–893. doi: 10.1586/14737140.8.6.887.

12. Ahmed M. H, Ban J. Q, Zaidoon A. Immunohistochemical Expression of Aldehyde Dehydrogenase 1 (ALDH1) in Renal Cell Carcinomas. Iraqi JMS. 2017; 15(2):206-213. doi: 10.22578/IJMS.15.2.14.

13. Lee H. J, Kim D. I, Kwak C. Expression of CD24 in clear cell renal cell carcinoma and its prognostic significance. Urology. 2008 Sep;72(3):603-7. doi: 10.1016/j.urology.2008.01.061.

14. Ibrahim H., Sayed A., Murad M. Immunohistochemical Expression of Napsin A, CD82 and Cyclin D1 in Some Renal Tumors. The Egyptian Journal of Hospital Medicine. 2018; 71(7):3616-3621. doi: 10.12816/0047683.

15. Weijie G., Beihe W., Fangning W. SOX2 and SOX12 are predictive of prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. Oncol Lett. 2018; 15(4): 4564–4570. doi: 10.3892/ol.2018.7828.

16. Ning L, Weidong G., Feng Q. Does the Fuhrman or World Health Organization/ International Society of Urological Pathology Grading System Apply to the Xp11.2

Translocation Renal Cell Carcinoma? The American Journal of Pathology. 2018;188(4): 929-936. doi. org/10.1016/j.ajpath.2017.12.018.

17. Tsu-Feng L., Wun-Rong L., Marcelo C. Compare Fuhrman Nuclear and Chromophobe Tumor Grade on Chromophobe RCC. Open Med (Wars). 2019;14:336–342. doi: 10.1515/med-2019-0032.

18. Williamson S. R, Taneja K., Cheng L. Renal cell carcinoma staging: pitfalls, challenges, and updates. Histopathology. 2019 Jan;74(1):18-30. doi: 10.1111/his.13743.

19. Zeng Z., Ren J., O'Neil M. Impact of stem cell marker expression on recurrence of TACE-treated hepatocellular carcinoma post liver transplantation. BMC Cancer. 2012;7 (12):584. doi: 10.1186/1471-2407-12-584.

20. Walaa G., Bahaa B. G, Abeer S. F Immunohistochemical Study of Cancer Stem Cells and Angiogenic Markers in Renal Cell Carcinoma, Clinicopathologic Correlation. The Egyptian Journal of Hospital Medicine. 2019;74(8):1748-1758. doi: 10.12816/EJHM.2019.28581.

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ И ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ КРОВИ В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ ПРОТЕКАЮЩЕЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Павлюченко И. И.¹, Безрукова О. С.¹, Зобенко В. Я.², Есауленко Е. Е.³, Басов А. А.³,

Сторожук А. П.³

¹Кафедра биологии с курсом медицинской генетики, ²кафедра общественного здоровья, здравоохранения и истории медицины, ³кафедра фундаментальной и клинической биохимии, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 350063, ул. Седина, 4, Краснодар, Россия

Для корреспонденции: Есауленко Елена Евгеньевна, доктор биологических наук, профессор кафедры фундаментальной и клинической биохимии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: esaulenkoe@bk.ru

For correspondence: Elena E. Esaulenko, MD, Professor of the Department of Fundamental and Clinical Biochemistry Kuban State Medical University, e-mail: esaulenkoe@bk.ru

Information about authors:

Pavlyuchenko I. I., <https://orcid.org/0000-0001-7080-7641>

Bezrukova O. S., <https://orcid.org/0000-0002-3810-3203>

Zobenko V. Ya., <https://orcid.org/0000-0002-2561-8136>

Esaulenko E. E., <https://orcid.org/0000-0002-9386-8049>

Basov A. A., <http://orcid.org/0000-0002-2262-4549>

Storozhuk A. P., <https://orcid.org/0000-0002-4936-0141>

РЕЗЮМЕ

Беременность сопровождается физиологически обусловленными адаптационно-приспособительными изменениями, необходимыми для нормальной жизнедеятельности беременной, а также роста и развития плода. С наступлением беременности отмечаются структурно-функциональные перестройки во всех системах жизнеобеспечения организма беременной, в т.ч. в иммунной и антиоксидантной системах. При нормальном течении беременности цитокиновый баланс организма смещается в сторону превалирования иммуносупрессорных Th-2 цитокинов (IL-4, IL-10, TGF- β). Нарушение адекватной перестройки цитокинового баланса может служить причиной осложненного течения беременности. Отмечается, что высокий фон Th1-цитокинов может существенно влиять на течение беременности, и цитокины являются чувствительными маркерами спонтанного прерывания беременности у женщин.

В ходе беременности происходит активация метаболических процессов, усиление энергетического обмена, инициация процессов тканевого дыхания. Нарушения в работе митохондриальной дыхательной цепи, изменения гемодинамики и оксигенации тканей индуцируют процессы образования активных форм кислорода (АФК) и, зачастую, являются причиной нарушения окислительного гомеостаза и формирования состояния, характеризующегося как оксидативный стресс (ОС). Это требует активации антиоксидантной системы и дополнительного количества антиоксидантов для восстановления баланса в системе про-/антиоксиданты.

Необходимо отметить, что в различные сроки беременности изменения баланса в системе про-/антиоксиданты и про-/противовоспалительные цитокины носят индивидуальный характер, а пределы физиологических сдвигов при нормально протекающей беременности отдельных показателей этих систем изучены недостаточно глубоко.

Ключевые слова: беременность, цитокины, антиоксиданты, активные формы кислорода.

THE STATE OF ANTIOXIDANT SYSTEM AND CYTOKINE PROFILE AT DIFFERENT PERIODS OF A PHYSIOLOGICALLY ONGOING PREGNANCY

Pavlyuchenko I. I.¹, Bezrukova O. S.¹, Zobenko V. Ya.², Esaulenko E. E.³, Basov A. A.³, Storozhuk A. P.³

¹Department of biology with a course in medical genetics, ²Department of public health, health care and history of medicine, ³Department of fundamental and clinical biochemistry, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

SUMMARY

Pregnancy is accompanied by physiologically adaptive changes necessary for the normal vital functioning of pregnant woman and for the growth and development of the fetus. During pregnancy, structural and functional changes in all body systems begin, including in the immune and antioxidant systems. In the normal course of pregnancy, the cytokine balance shifts toward the immunosuppressive Th-2 cytokines (IL-4, IL-10, TGF- β). Violation of an adequate restructuring cytokine balance can cause complications during pregnancy. It was noted that high levels of Th1 cytokines can significantly affect the course of pregnancy and that cytokines are sensitive markers of spontaneous abortion in women.

Activation of metabolic processes, increased energy metabolism, the initiation of tissue respiration occurs in pregnancy. Disruptions in the functioning of the mitochondrial respiratory chain, changes in hemodynamics and tissue oxygenation induce the formation of reactive oxygen species (ROS) that often cause a violation of oxidative homeostasis and the formation of oxidative stress (OS). This requires activation of the antioxidant system and an additional amount of antioxidants to restore balance in the pro/antioxidant system.

It should be noted that at different stages of pregnancy imbalance of pro/antioxidants and pro/anti-inflammatory cytokines systems are individual and the limits of physiological changes during normal pregnancy of particular indicators of these systems are poorly understood.

Key words: pregnancy, cytokines, antioxidants, reactive oxygen species.

Беременность сопровождается физиологически обусловленными адаптационно-приспособительными изменениями, необходимыми для нормальной жизнедеятельности беременной, а также роста и развития плода. С наступлением беременности отмечаются структурно-функциональные перестройки во всех системах жизнеобеспечения организма беременной, в т.ч. и в иммунной системе, которые ассоциируются со вторичными (транзиторными), или физиологическими (естественными) иммунодефицитами.

Беременность является уникальным с точки зрения трансплантационной иммунологии феноменом «мирного сосуществования» материнского организма и полуаллогенного плода [1]. Важная роль в этом отводится регуляторам гомеостаза – цитокинам. Продукция и уровень цитокинов у беременных связаны с их секрецией трофобластическими и лимфомиелоидными клетками. По мнению ряда авторов, согласно теории иммунотрофизма, успешность пролонгирования беременности зависит от баланса про- и противовоспалительных цитокинов [2].

Установлено, что при нормальном течении беременности цитокиновый баланс смещается в сторону иммуносупрессорных Th-2 цитокинов (IL-4, IL-10, TGF- β), ингибирующих реакции клеточного иммунитета и стимулирующих стероидогенез (прогестерон, хорионический гонадотропин человека (ХГ)) и выработку блокирующих антител [3]. Важная роль в поддержании нормального течения беременности отводится IL-10, который может экспрессироваться в плацентарных ворсинках трофобласта. Кроме того, маточные NK-клетки, моноциты и Tregs в децидуальной ткани также являются его продуцентами [4]. IL-10 играет существенную роль в направлении дифференциации Th-0 в Th-2 фенотип, оказывает ингибирующий эффект на продукцию простагландинов и цитокинов макрофагами. IL-10 на клетках трофобласта усиливает экспрессию HLA-G молекул, необходимых для успешной имплантации эмбриона и поддержания активности Th-2 клеток.

Нарушение адекватной перестройки цитокинового баланса может служить причиной осложненного течения беременности. Отмечается, что высокий фон Th1-цитокинов может существен-

но влиять на течение беременности. Цитокины являются чувствительными маркерами спонтанного прерывания беременности у женщин. Многие авторы считают, что доминирование активности Th1-цитокинов в I триместре приводит к преждевременному прерыванию беременности; а в более поздние сроки - связывают с развитием гестоза [5].

В ходе беременности происходит активация метаболических процессов, усиление энергетического обмена, активация процессов тканевого дыхания. Избыточная нагрузка на компоненты митохондриальной дыхательной цепи, изменения гемодинамики и оксигенации тканей индуцируют процессы образования активных форм кислорода (АФК). Повышенный уровень АФК является причиной нарушения окислительного гомеостаза и формирования состояния, характеризующегося как оксидативный стресс (ОС), который характерен для многих физиологических и патологических состояний [7, 8]. Это требует активации антиоксидантной системы и дополнительного количества антиоксидантов для восстановления баланса в системе про- /антиоксиданты.

Развитие ОС приводит к таким осложнениям беременности, как преждевременные роды, преждевременный разрыв плодных оболочек, преэклампсия, плацентарная недостаточность, синдром задержки роста плода, врожденные пороки развития плода, железодефицитная анемия [9, 10]. Однако избыточная активация системы антиоксидантной защиты (АОЗ) также неблагоприятна, т.к. АФК играют много очень важных физиологических функций [11; 12].

Гомеостаз организма во время физиологических перестроек поддерживается взаимозависимым изменением работы всех систем организма. Существует тесная взаимосвязь между иммунной и антиоксидантной системами организма, что выражается в индивидуальной экспрессии ферментов системы АОЗ и про- /противовоспалительных цитокинов. Цитокины, воздействуя на специфические клетки, имеющие к ним рецепторы, активируют их и индуцируют образование АФК (дыхательный взрыв в нейтрофилах). Бесконтрольное образование АФК является угрозой развития ОС. Повышенная

активность компонентов системы АОЗ может нивелировать физиологические функции АФК, а недостаточная активность антиоксидантной системы является причиной ОС, что связано с формированием порочных патологических кругов.

Несмотря на многочисленные исследования в области взаимного функционирования иммунной и антиоксидантной систем и их отдельных составляющих, исчерпывающих данных о динамических изменениях в этих системах в ходе нормально протекающей беременности нет. Также остаются вопросы по выявлению наиболее значимых маркеров, отражающих грань между физиологическими и патологическими перестройками в организме беременных в различные сроки течения беременности. Показатели состояния системы АОЗ и цитокинового баланса могут быть полезны и важны в этом направлении.

Цель исследования – провести сравнительные исследования основных показателей системы АОЗ, про- и противовоспалительных цитокинов крови в различные сроки физиологически протекающей беременности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Характеристика обследованных групп

В исследование были включены 45 условно здоровых беременных, состоявших на учете по беременности в женской консультации, средний возраст группы составил (26,2±2,4) лет. Критериями исключения являлись наличие у пациенток хронических заболеваний, например, гипертонической болезни, сахарного диабета, почечной или сердечной патологии, аномалий развития репродуктивной системы, наличие генетических и анатомических дефектов развития плода. Изучение показателей системы АОЗ и цитокинов проводилось в различные trimestры беременности. Контрольную группу составили условно здоровые волонтеры женского пола сопоставимого возраста (25,3±3,2) лет с беременными (n=34, p=0,946 по критерию Уитни-Манни).

Лабораторный этап исследования

Для оценки состояния системы АОЗ у наблюдаемых пациенток изучалась общая антиоксидантная активность (ОАА) и уровень фермента первой линии антиоксидантной защиты – супероксиддисмутазы (СОД) сыворотки крови. Также было проведено исследование активности ферментов 1-й и 2-й линий системы АОЗ крови СОД и каталазы (КАТ), так как не всегда содержание фермента соответствует его активности, на которую влияют многие факторы.

Для определения ОАА плазмы крови использовали стандартные наборы реактивов NX 2331,

2332, компании «Randox». Измерения проводили на автоматическом биохимическом анализаторе “Super Z”. Общий антиоксидантный статус крови, как и организма в целом, соответствует содержанию ферментных и неферментных факторов системы АОЗ.

Для определения активности СОД в крови использовали методику [13] в модификации [14]. Метод основан на способности СОД ингибировать реакцию аутоокисления кверцетина в связи с тем, что одним из промежуточных продуктов этой реакции является супероксидный анион-радикал. Результаты активности СОД гемолизата эритроцитов выражали в единицах активности (усл. ед. акт.), соответствующих степени ингибирования реакции за единицу времени.

Активность КАТ исследовали в гемолизате эритроцитов по методу [15] в модификации [14]. Метод основан на определении скорости утилизации перекиси водорода в реакционной смеси, в которую вносится биологический материал, содержащий фермент. Об интенсивности утилизации перекиси водорода судили по скорости снижения экстинкции при длине волны 260 нм, на которой перекись водорода имеет максимум поглощения и выражали в единицах активности (усл. ед. акт.).

Количественную оценку содержания СОД в сыворотке крови проводили методом твердофазного ИФА с использованием наборов реактивов ООО «Цитокин» (Россия), который отражает общий уровень данного фермента в сыворотке крови в период исследования.

Для оценки состояния баланса в цитокиновом звене иммунной системы изучались показатели про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови (IL-6, IL-8, IL-10, TNF alpha) методом твердофазного ИФА. В исследованиях использовались стандартные наборы реактивов для проведения твердофазного ИФА фирмы “Вектор БЕСТ” (Россия).

Статистический анализ

При работе с данными применяли методы описательной статистики. Определяли точечные оценки среднего (M), стандартного отклонения (SD). Проверку на нормальность значений показателей в выборках делали графически и с помощью критерия Шапиро-Уилка. Сравнение распределения значений показателей осуществляли с помощью дисперсионного анализа Краскела-Уоллиса для фактора времени. Парное сравнение независимых выборок (контроль и основная группа) проводили с помощью критерия Манна-Уитни, зависимых выборок (основная группа в различные trimestры) проводили с помощью критерия Вилкоксона. За критический уровень достоверности принимали уровень $p \leq 0,05$. Для

количественных показателей применяли нормировку значений параметров, принимая за единицу или за 100% значение соответствующего показателя контрольной группы. Использовали программу Excel (MS-2010), встроенный в Excel «Пакет анализа», надстройку к Excel Atte Stat, версия 12.0.5, программу Statistica, v. 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенных исследований выявлены особенности изменения отдельных показателей иммунной и антиоксидантной защитно-регуляторных систем в различные триместры нормально протекающей беременности, которые в целом можно характеризовать как адаптивно-приспособительные (таблица 1,2; рис.1,2), так как при патологически протекающей беременности отмечаются более выраженные сдвиги изучаемых показателей.

На основании анализа полученных данных необходимо отметить повышение уровня всех изучаемых показателей крови у беременных при физиологическом течении беременности. Средние показатели про- и противовоспалительных цитокинов (IL-6, TNF alpha и IL-8, IL-10) в большинстве случаев статистически значимо отличались от значений аналогичных показателей контрольной группы (таблица 1; рис. 1), но динамический ряд в зависимости от сроков наблюдения для различных показателей был индивидуальным.

Так уровень IL-6 в 1-м триместре беременности был повышен относительно этого показателя контрольной группы (условно здоровые небеременные женщины репродуктивного возраста) в среднем на 8,1%, во 2-м триместре на 63,8% и в 3-м триместре на 36,2% (таблица 1; рис.1).

Таблица 1
Средние значения показателей IL-6, TNF alpha, IL-8 и IL-10 в различные сроки наблюдения (M±SD) в основной и контрольной группах

Сроки наблюдения	Показатели			
	IL-6 (пг/мл)	TNF alpha (пг/мл)	IL-8 (пг/мл)	IL-10(пг/мл)
Контроль (n=34)	3,09±0,42	3,13±1,54	2,34±0,47	6,34±1,79
1-й трим (n=45)#	3,34±0,58 [^]	4,01±0,88 [^]	2,78±0,90 [^]	6,93±0,92 [^]
2-й трим (n=45)#	5,06±2,93* [^]	4,05±1,20 [^]	4,16±4,01* [^]	7,06±0,95 [^]
3-й трим (n=45)#	4,21±1,42* [^]	3,30±1,34* [^]	3,02±0,85 [^]	7,43±0,82* [^]

Примечание: [^] –статистические значимые отличия значений показателей по сравнению с показателями контрольной группы по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$); * –статистические значимые отличия значений показателей от предыдущего срока наблюдения основной группы по критерию Вилкоксона ($p < 0,05$); # –статистические значимые отличия значений всех показателей (кроме IL-10, $p = 0,06$) в основной группе для фактора времени по критерию Краскела-Уоллиса.

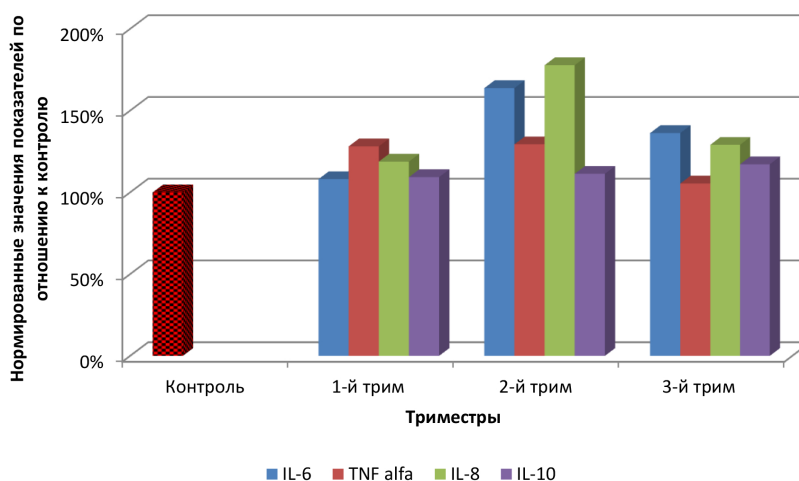


Рис. 1. Нормированные значения различных показателей цитокинов по отношению к контролю в различные сроки беременности

Как видно из таблицы 1 и рисунка 1, наибольшего значения уровень IL-6 достиг во 2-м триместре беременности, а в 3-м триместре произошло некоторое его снижение, хотя этот показатель оставался существенно выше контроля и значения показателя 1-го триместра.

Известно, что избыточная продукция IL-6 может вызывать повреждение тканей вследствие аутоиммунных реакций, например, повреждение суставов, активировать остеокласты, что связано с нарушением структуры костной ткани. Эти процессы опасны как для беременной, так и для плода.

Изменения уровня IL-8, который относится к хемокинам (провоспалительным Th1-цитокинам), имели аналогичный динамический характер, как и у IL-6 в различные сроки беременности (таблица 1; рис.1).

В 1-м триместре беременности средние показатели уровня данного цитокина были выше значений в контрольной группе на 18,8%, во 2-м триместре на 77,8%, т.е. практически в 2 раза превышая показатель группы контроля, а в 3-м триместре беременности уровень IL-8 несколько снижался и оставался выше показателя контроля на 29,1% ($p < 0,05$).

Характер изменений TNF alpha, основного провоспалительного Th1 цитокина в ходе беременности был несколько иным, чем у других изучаемых провоспалительных цитокинов (таблица 1; рис.1). Повышение средних значений TNF alpha имело менее выраженный характер относительно показателей контрольной группы во все сроки беременности, но носило статистически значимый характер. Наибольшее повышение уровня данного цитокина отмечено в 1-м триместре беременности. В этот период его значения превышали показатели контрольной группы на 28,1%. В дальнейшем происходило постепенное снижение уровня TNF alpha. Во 2-м триместре он был выше показателя контроля только на 22,7%, а в 3-м триместре его значения практически не отличались от показателей контрольной группы (повышение составляло всего 5,4%).

Проведенными исследованиями установлено, что средние значения противовоспалительного Th2 цитокина IL-10 у наблюдаемых беременных статистически значимо отличались от аналогичных значений показателей контрольной группы (таблица 1; рис. 1). При этом динамический ряд изменений по срокам беременности имел свои особенности. В 1-м триместре средние значения IL-10 превышали данные контрольной группы на 9,2%, во 2-м триместре на 11,2% и в 3-м на 17,1% ($p < 0,05$).

Необходимо также отметить, что установленное значимое повышение средних показателей для изучаемых цитокинов в различные сроки беременности имеет место по отношению к показателям контрольной группы небеременных женщин сравнимого возраста. Относительно референтных значений, описанных в наборах для исследования, изменения практически всех показателей укладываются в их пределы (референтные уровни: IL-6 – 0-10 пг/мл, IL-8 – 0-10 пг/мл, IL-10 – 0-31 пг/мл, TNF alpha – 0-6 пг/мл), что подтверждает процесс физиологически протекающей беременности и адаптацию организма беременной к изменяющимся условиям функционирования, в т.ч. и иммунной системы.

При оценке состояния системы АОЗ у беременных в различные сроки отмечены существенные изменения по отношению к данным контрольной группы. Для показателя ОАА крови характерна динамика изменений, отражающая стимуляцию адаптационных ресурсов организма в ходе беременности (таблица 2; рис. 2). В 1-м триместре значения показателя ОАА, отражающего общую емкость антиоксидантных резервов организма, статистически значимо выше значений контрольной группы в среднем на 12,3%, во 2-м триместре на 20,0% и в 3-м триместре на 33,0%. При этом необходимо отметить, что повышение уровня ОАА имело не высокую, но статистически значимую разницу как по отношению к показателям контрольной группы ОАА, так и между триместрами.

Для показателя уровня СОД и ее активности в различные сроки беременности необходимо отметить более существенные изменения в сторону повышения их средних значений, в сравнении с ОАА (таблица 2; рис. 2). Так, в 1-м триместре средние значения уровня СОД, измеренные методом ИФА, в плазме крови были статистически значимо выше значений контрольной группы на 11,3%, при этом активность СОД эритроцитов была выше на 17%. Во 2-м триместре беременности отмечен значительный рост показателей СОД (содержание и активность) и относительно контроля, и относительно показателей 1-го триместра. Средние значения показателя уровня СОД достигают двукратного увеличения, а ее активность повышается на 63% относительно контрольных значений. В 3-м триместре уровень СОД остается практически неизменным по отношению ко 2-му триместру, а активность СОД несколько снижается и остается повышенной по отношению к контролю на 48%. При этом повышение показателей СОД во 2-м и 3-м триместре носит статистически значимый характер по отношению к показателям 1-го триместра ($p < 0,05$).

Таблица 2

Средние показатели состояния системы АОЗ крови женщин (M±SD) в различные сроки беременности

Сроки наблюдения	Показатели			
	ОАА (усл. ед.)	СОД (пг/мл)	СОД (усл. ед. акт.)	КАТ (усл. ед. акт.)
Контроль (n=34)	1,53±0,38	350,55±20,41	2,36±0,66	1,48±0,69
1-й трим (n=45)#	1,72±0,25 [^]	390,21±285,89 [^]	2,76±0,59 [^]	2,08±0,88 [^]
2-й трим (n=45)#	1,84±0,29* [^]	701,01±373,33* [^]	3,84±0,98* [^]	2,71±0,59* [^]
3-й трим (n=45)#	2,03±0,31* [^]	687,82±326,96 [^]	3,49±0,76* [^]	3,15±0,76* [^]

Примечание: [^] – статистические значимые отличия значений показателей от контрольной группы по критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$); * – статистические значимые отличия значений показателей от предыдущего срока наблюдения основной группы по критерию Вилкоксона ($p < 0,05$); # – статистические значимые отличия значений всех показателей в основной группе для фактора времени по критерию Краскела-Уоллиса.

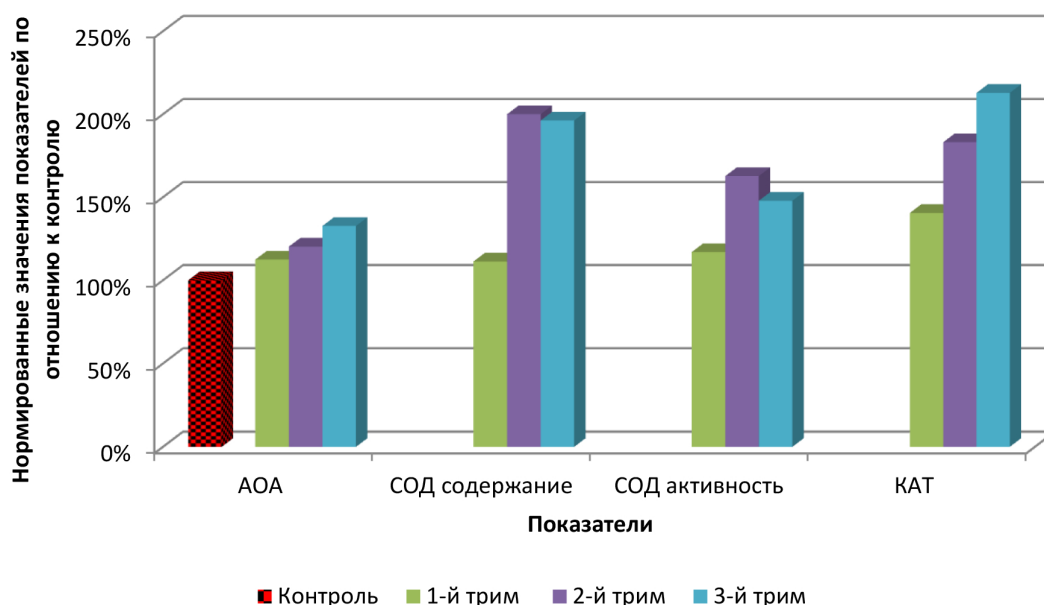


Рис. 2 Нормированные значения отдельных показателей системы АОЗ крови по отношению к контролю в различные сроки беременности

Активность фермента 2-й линии системы АОЗ – КАТ также увеличивается в ходе беременности, причем повышение отмечается во все наблюдаемые сроки беременности. Активность КАТ повышается на 29, 69 и 96% в 1-й, 2-й и 3-й триместры беременности соответственно относительно показателей контрольной группы, эти изменения носят статистически значимый характер.

ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе данных по содержанию и активности ферментов системы АОЗ необходимо отметить не строго равнозначные изменения

количественных и качественных показателей. Так установлено, что уровень фермента СОД в плазме крови превышает динамику изменений показателя супероксиддисмутазной активности эритроцитов. Это может отражать тот факт, что данный антиоксидантный фермент обладает полиморфизмом. Изменения уровня и активности разных изоформ СОД в крови носят индивидуальный характер, что необходимо учитывать при определении антиоксидантной активности крови и сравнительных выводах при различных исследованиях.

При этом максимальные отличия IL-10 у беременных в сравнении с группой контроля име-

ли место в поздние сроки беременности, что может быть так же связано с вкладом плода в продукцию цитокина IL-10. В этот период беременности его значения статистически значимо отличались не только от контрольных показателей, но и от показателей предшествующего периода наблюдения у беременных. В целом повышение уровня IL-10 во время беременности все же было менее выраженным, чем повышение уровня провоспалительных цитокинов, что можно рассматривать как угрозу развития цитокинового дисбаланса.

Таким образом, проведенными исследованиями установлена активация систем иммунной и антиоксидантной защиты, которые в целом носят адаптационный характер. Повышение уровня всех изучаемых цитокинов во время беременности в большинстве случаев имеет статистически значимый характер по отношению к показателям контрольной группы не беременных женщин сопоставимого возраста с основной группой наблюдения, при этом повышение уровня провоспалительных цитокинов превалирует над повышением уровня противовоспалительных цитокинов.

Показатели системы АОЗ изменяются в сторону увеличения, при этом повышение активности ферментов преобладает над повышением уровня общей антиоксидантной активности крови, что может свидетельствовать об инициации процессов свободно-радикального окисления, увеличении продукции АФК и дополнительного расходования на эти процессы неферментных и ферментных компонентов системы АОЗ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Во время физиологически протекающей беременности происходит планомерная перестройка защитных и регуляторных систем организма, в результате чего показатели цитокиново-антиоксидантного статуса превалируют над аналогичными показателями группы условно здоровых небеременных женщин во все периоды наблюдения.

Необходимо отметить наиболее выраженную активацию во время беременности антиоксидантных показателей, при этом есть особенность, что в первую очередь происходит индукция синтеза ферментов антиоксидантной защиты и, прежде всего, фермента первой линии системы АОЗ – СОД, защищающего организм беременной и плода от токсического действия супероксидного радикала, наиболее агрессивного представителя АФК. На фоне повышения уровня СОД возрастает активность КАТ, необходимой для обезвреживания перекиси водорода, которая в значительных количествах образуется

под воздействием СОД. Ценным является сохранение баланса в работе этих компонентов системы АОЗ, т.к. при многих патологических состояниях в условиях ОС наблюдается их дисбаланс.

Общая антиоксидантная активность плазмы крови повышается незначительно, что важно для поддержания необходимого уровня АФК в организме, которые выполняют много значимых физиологических функций, в т.ч. это продукция энергии и биологически активных веществ, защита от токсикантов эндогенной и экзогенной природы и др. Цитокиновый фон крови беременных также меняется, но менее значимо. Эти изменения носят контролируемый характер, т.к. в целом сохраняется баланс про- и противовоспалительных цитокинов и их изменения не выходят при физиологически протекающей беременности за пределы референтных значений нормы, указанных в наборах для ИФА. Исследования цитокинового и антиоксидантного баланса важны для дополнительного биохимического мониторинга течения беременности.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moffett A., Loke Y. W. The immunological paradox of pregnancy: a reappraisal. *Placenta*. 2004;25(1):1-8. doi:10.1016/S0143-4004(03)00167-X.
2. Wegmann T. G., Lin H., Guilbert L. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship – is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol. Today*. 1993;14(7):353-356. doi:10.1016/0167-5699(93)90235-D.
3. Нефедова Д. Д., Линде В. А., Левкович М. А. Иммунологические аспекты беременности. *Медицинский вестник Юга России*. 2013;4:16-21.
4. Thaxton J. E., Sharma S. Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy. *Am.J. Reprod. Immunol.* 2010;63(6):482-491. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00810.x.
5. Клигуненко Е. Н., Волков А. О. Соотношение про- и противовоспалительных цитокинов у беременных в третьем триместре. *Медицина неотложных состояний*. 2013;6(53):162-164.
6. Прохоренко Т. С., Зима А. П., Саприна Т. В., Новицкий В. В., Тодосенко Н. М., Литвинова Л. С. Цитокиновый статус беременных с метаболическими нарушениями. *Медицинская иммунология*. 2017;19(3):301-306. doi:10.15789/1563-0625-2017-3-301-306.
7. Павлюченко И.И. Окислительный стресс, его мониторинг и критерии оценки антиокислительной активности лекарственных препаратов и БАД: автореф. дис.... д-ра мед. наук. – Ростов-на-Дону; 2005.

8. Павлюченко И. И., Дыдышко Е. И., Охременко О.С. Сравнительный анализ показателей системы антиоксидантной защиты у пациентов с гипотиреозом и ХОБЛ. Кубанский научный медицинский вестник. 2017;24(5):59-62.

9. Bahinipati J., Mohapatra P.C. Ischemia modified albumin as a marker of oxidative stress in normal pregnancy. *J. ClinDiagnRes.* 2016;10(9):15-17. doi: 10.7860/JCDR/2016/21609.8454.

10. Duhig K., Chappell L. C., Shennan A. H. Oxidative stress in pregnancy and reproduction. *ObstetMed.* 2016;9(3):113-116. doi:10.1177/1753495X16648495.

11. Kumar V., Sharma A. Neutrophils: cinderella of innate immune system. *Int.Immunopharmacol.* 2010;10(11):1325-1334. doi:10.1016/j.intimp.2010.08.012.

12. Кормош Н. Г. Физиологическая роль активных форм кислорода на клеточном уровне и организма в целом – взгляд клинициста. Ч. 2. Российский биотерапевтический журнал. 2012;11(1):85-90.

13. Костюк В. А., Потапович А. И., Ковалева Ж. И. Простой и чувствительный метод определения супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. *Вопросы медицинской химии.* 1990;36(2):88-91.

14. Луговая И. А., Быков М.И., Моргоев А.Э., Гайворонская Т. В., Басов А. А., Федосов С. Р., Павлюченко И. И. Активность ферментов антирадикальной защиты в эритроцитах и раневом отделяемом у больных с осложненным течением сахарного диабета. *Открытое образование.* 2006;3:425-427.

15. Королюк М. А., Иванов Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. П. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело.* 1988;1:16-19.

REFERENCES

1. Moffett A., Loke Y. W. The immunological paradox of pregnancy: a reappraisal. *Placenta.* 2004;25(1):1-8. doi:10.1016/S0143-4004(03)00167-X.

2. Wegmann T. G., Lin H., Guilbert L. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship – is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol. Today.* 1993;14(7):353-356. doi:10.1016/0167-5699(93)90235-D.

3. Nefedova D. D., Linde V. A., Levkovich M. A. Immunological aspects of pregnancy. *Meditsinskij vestnik Uga Rossii.* 2013;4:16-21.(In Russ).

4. Thaxton J. E., Sharma S. Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy. *Am.J. Reprod.*

Immunol. 2010;63(6):482-491. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00810.x.

5. Kligunenko Ye. N., Volkov A. O. Correlation of pro and antiinflammatory cytokines in pregnant women in the third trimester. *Medicina neotloznych sostoanij.* 2013;6(53):162-164.(In Russ).

6. Prokhorenko T. S., Zima A. P., Saprina T. V., Novitskiy V. V., Todosenko N. M., Litvinova L. S. Cytokine profile in pregnant women with metabolic disorders. *Medical Immunology (Russia).* 2017;19(3):301-306. doi:10.15789/1563-0625-2017-3-301-306. (In Russ).

7. Pavlyuchenko I.I. Oxidative stress, monitoring, and evaluation criteria antioxidant activity of drugs and dietary supplements: the dissertation author's Doctor of Medicine. Rostovon-Don; 2005.. (In Russ).

8. Pavlyuchenko I. I., Dydysko E. I. Okhremenko O.S. Comparative analysis of indicators of the antioxidant defense system in patients with hypothyroidism and COPD. *Kuban Scientific Medical Bulletin.* 2017;24(5):59-62. (In Russ).

9. Bahinipati J., Mohapatra P. C. Ischemia modified albumin as a marker of oxidative stress in normal pregnancy. *J.ClinDiagnRes.* 2016;10(9):15-17. doi: 10.7860/JCDR/2016/21609.8454.

10. Duhig K., Chappell L. C., Shennan A.H. Oxidative stress in pregnancy and reproduction. *ObstetMed.* 2016;9(3):113-116. doi:10.1177/1753495X16648495.

11. Kumar V., Sharma A. Neutrophils: cinderella of innate immune system. *Int.Immunopharmacol.* 2010;10(11):1325-1334. doi:10.1016/j.intimp.2010.08.012.

12. Kormosh N.G. Physiological role of reactive oxygen at the cellular level and the entire organism - look clinicians. Part 2. *RussianJournal of Biotherapy.* 2012;11(1):85-90.(In Russ).

13. Kostiuk V. A., Potapovich A. I., Kovaleva Zh. V. A simple and sensitive method of determination of superoxide dismutase activity based on the reaction of quercetin oxidation. *Vopr Med Khim.* 1990;36(2):88-91. (In Russ).

14. Lugovaja I. A., Bykov M. I., Morgoev A. E., Gayvoronskaya T. V., Basov A. A., Fedosov S. R., Pavljuchenko I. I. The activity of antiradical defense enzymes in red blood cells and wound discharge in patients with complicated diabetes mellitus. *Otkrytoe obrazovanie.* 2006;3:425-427. (In Russ).

15. Koroliuk M. A., Ivanova L. I., Maïorova I. G., Tokarev V. E. A method of determining catalase activity. *LabDelo.* 1988;1:16-19. (In Russ).

ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА ИНТАКТНЫХ КЕРАТИНОЦИТОВ ПРИ СИСТЕМНОМ ВОСПАЛЕНИИ

Шаповалова Е. Ю.¹, Демьяшкин Г. А.², Маланичев М. Ю.^{1,3}, Погосян Д. А.^{1,3}, Щекин В. И.²

¹Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия.

³Клиника пластической хирургии и косметологии «Фрау Клиник», Москва, Россия.

Для корреспонденции: Демьяшкин Григорий Александрович, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии им. академика А. И. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), e-mail: dr.dga@mail.ru

For correspondence: Grigory A. Demyashkin, PhD, Associate Professor of the Department of Pathology of the I.M. Sechenov First MSMU (Sechenov University), e-mail: dr.dga@mail.ru

Information about authors:

Shapovalova Ye. Yu., <http://orcid.org/0000-0003-2544-7696>

Demyashkin G. A., <https://orcid.org/0000-0001-8447-2600>

Malanichrev M. Yu., <https://orcid.org/0000-0003-3043-2739>

Pogasyan D. A., <https://orcid.org/0000-0003-3304-0968>

Shchekin V. I., <https://orcid.org/0000-0003-3763-7454>

РЕЗЮМЕ

В ответ на инфицирование патогенными микробами в организме возникает серьезное системное воспаление, часто приводящее к смерти. Несбалансированные системные иммунные ответы могут привести к накоплению лейкоцитов, диссеминированной внутрисосудистой коагуляции и микроциркуляторной дисфункции с последующим апоптозом и некрозом клеток, а также к развитию синдрома полиорганной недостаточности. Разрушение барьера видимо может приводить к нарушению пролиферации и апоптоза кератиноцитов.

Целью исследования оценка внутриклеточных белков-регуляторов жизненного цикла кератиноцитов интактного эпидермиса при системном воспалении.

Материал и методы. Исследование выполнено на 40 архивных парафиновых блоках фрагментов кожи в двух группах: I группа (n=30) – умерших пациентов с установленным диагнозом тяжелой бактериальной сепсис; II группа (n=10) – умерших по причинам, не связанным с инфекционным заболеванием (контроль). Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартному протоколу, с использованием антител к Ki-67, caspase 3, Bcl-2 и p53.

Результаты. В клетках эпидермиса пациентов в условии системного воспаления наблюдается следующая экспрессия изученных маркеров: caspase-3 – 39,4±1,2%; p53 – 18,4±0,7%; Ki-67 – 15,2± 4,1%; Bcl-2 – 4,2±1,2%.

Заключение. В условиях системного воспаления в эпидермисе отмечается дисбаланс пролиферативно-апоптотической активности кератиноцитов в сторону снижения их митотического деления и активации апоптоза, приводящего к гибели клеток.

Ключевые слова: эпидермис, системное воспаление, пролиферация, апоптоз.

IMMUNOPHENOTYPIC CHARACTERISTIC OF PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF INTACT KERATINOCYTES IN SEPSIS

Shapovalova Ye. Yu.¹, Demyashkin G. A.², Malanichrev M. Yu.^{1,3}, Pogasyan D. A.^{1,3}, Shchekin V. I.²

¹Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia.

³Clinic of Plastic Surgery and Cosmetology «Frau Clinics», Moscow, Russia

SUMMARY

In response to infection by pathogenic microbes, a serious systemic inflammation occurs in the body, often leading to death. Unbalanced systemic immune responses can lead to the accumulation of leukocytes, disseminated intravascular coagulation and microcirculatory dysfunction, followed by apoptosis and cell necrosis, as well as the development of multiple organ failure syndrome. The destruction of the barrier can apparently lead to a violation of the proliferation and apoptosis of keratinocytes.

The aim of the study was to evaluate intracellular protein-regulators of the life cycle of keratinocytes of the intact epidermis in case of systemic inflammation.

Material and methods. The study was performed on 40 archival paraffin blocks of skin fragments in two groups: group I (n = 30) - deceased patients with a diagnosis of severe bacterial sepsis; Group II (n = 10) – dead for reasons not related to an infectious disease (control). Immunohistochemical studies were performed according to a standard protocol using antibodies to Ki-67, caspase 3, Bcl-2 and p53.

Results. In the cells of the epidermis of patients in the condition of systemic inflammation, the following expression of the studied markers is observed: caspase-3 – $39.4 \pm 1.2\%$; p53 – $18.4 \pm 0.7\%$; Ki-67 – $15.2 \pm 4.1\%$; Bcl-2 – $4.2 \pm 1.2\%$.

Conclusion Under conditions of systemic inflammation in the epidermis, there is an imbalance in the proliferative-apoptotic activity of keratinocytes in the direction of reducing their mitotic division and activation of apoptosis, leading to cell death.

Key words: epidermis, systemic inflammation, proliferation, apoptosis.

В ответ на инфицирование патогенными микробами в организме может возникнуть тяжелое системное воспаление, часто приводящее к смерти. Во время начальной фазы системной воспалительной реакции наблюдается активная индукция провоспалительных цитокинов, хемокинов и других медиаторов или напротив – иммуносупрессивное состояние, которое характеризуется уменьшением количества иммунореактивных клеток [1].

Несбалансированные системные иммунные ответы могут привести к накоплению лейкоцитов, диссеминированной внутрисосудистой коагуляции и микроциркуляторной дисфункции с последующим апоптозом и некрозом клеток, а также к развитию синдрома полиорганной недостаточности [2]. Однако механизмы, регулирующие про- и противовоспалительные реакции в ответ на тяжелое инфицирование остаются малоизученными, особенно недостаточно информации о возможных изменениях в коже и ее производных.

Роговой слой эпидермиса образован нерастворимыми белками и липидами, обеспечивающих противомикробный барьер. Кератиноциты экспрессируют ряд молекул, обладающих иммунными свойствами – распознавание и уничтожение микроорганизмов [3]. Очевидно, что кожа является источником продукции эффекторных молекул, поскольку многие белки с бактерицидными или бактериостатическими свойствами конститутивно или индуцибельно экспрессируются в эпидермисе, например TLR-рецепторы [4]. Разрушение барьера видимо может приводить к нарушению пролиферации и апоптоза кератиноцитов. Тем не менее, остается не ясным, все ли гены, обычно связанные с активацией кератиноцитов, будут демонстрировать повышенные уровни экспрессии при системном воспалении.

Поскольку провоспалительные и иммуносупрессорные реакции при сепсисе приводят к пролиферативно-апоптотическому дисбалансу необходимо переосмыслить значение белков регуляторов, таких как Ki-67 и каспаз, а также про- и антиапоптотических маркеров (p53 и Bcl-2). Поэтому целесообразно пересмотреть и обновить существующие взгляды на роль белков регуляторов жизненного цикла при сепсисе

с точки зрения воспаления, клеточной пролиферации и апоптоза, а также повреждения органа. Каспазы, а также их проапоптотические аналоги продуцируются в неактивных формах в неделящихся клетках, посредством образования цитозольных комплексов, помогая процессингу и высвобождению IL-1 и IL-18.

Цель исследования: оценка внутриклеточных белков-регуляторов жизненного цикла кератиноцитов интактного эпидермиса при сепсисе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работу проводили на 40 архивных парафиновых блоках фрагментах кожи в период 2018 – 19 гг. На основании анамнестических, клинических и морфологических данных были сформированы две группы. I группа (n=30) – аутопсийный материал кожи, умерших пациентов с установленным патологоанатомическим основным диагнозом: тяжелый бактериальный сепсис, синдром полиорганной недостаточности согласно консенсусу ACCP/SCCM. Критерии включения: возрастной интервал 18 – 45 лет, клинически и морфологически верифицированные признаки гипоперфузии внутренних органов, повышение сывороточного лактата > 4 ммоль/л, олигурия, нарушение сознания. Критерии исключения: беременность, установленное онкологическое заболевание, нозокомиальная этиология сепсиса, наследственные и приобретенные заболевания с поражением кожи и/или соединительной ткани (синдром Марфана, синдром Элерса-Данлоса, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, склеродермия, анкилозирующий спондилит, псориаз, фолликулярный гиперкератоз и др.), хроническое заболевание печени, хроническая почечная недостаточность, иммуносупрессивная и гормональная терапия, патология системы гемостаза в анамнезе. II группа (n=10) – аутопсийный материал кожи контрольной группы пациентов, умерших по причинам, не связанным с инфекционным заболеванием. Критерии включения: возрастной интервал 18 – 45 лет, отсутствие клинически и морфологически верифицированных признаков гипоперфузии внутренних органов. Критерии исключения: перенесенный сепсис, беременность, установленное онкологическое заболевание, наследственные и приобретенные заболевания с поражением кожи

и/или соединительной ткани (синдром Марфана, синдром Элерса-Данлоса, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, склеродермия, анкилозирующий спондилит, псориаз, фолликулярный гиперкератоз и др.), хроническое заболевание печени, хроническая почечная недостаточность, иммуносупрессивная и гормональная терапия, патология системы гемостаза в анамнезе.

Визуализацию материала производили на светооптическом микроскопе Leica DM 4000 B («Leica», Германия), совмещенном с видеокамерой и программным обеспечением.

Гистологическое исследование выполняли на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартному протоколу в автоматическом режиме в иммуногистостейнере Bond-Max («Leica», Германия). В качестве первичных использовали моноклональные антитела к Ki-67 (Clone MM1), каспазе-9 (Cas-9; Clone EPR18107, 1:300), Bcl-2 (Clone bcl-2/100/D5) и p53 (Clone DO-7), в качестве вторичных применяли универсальные антитела (HiDef Detection™ HRP Polymer system, «Cell Marque», США), позволяющие выявлять мышьиные и кроличьи первичные антитела, конъюгированные с ферментным комплексом на основе пероксидазы хрена. Для каждого маркера выполнялись контрольные исследования с целью исключения псевдоположительных и псевдонегативных результатов. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера; срезы промывали под проточной водой; дегидратировали и заключали в бальзам.

Характер иммуногистохимических реакций оценивали, используя полуколичественную шкалу по 3-балльной системе с подсчетом количества иммунопозитивных клеток в 10 случайно отобранных полях зрения при увеличении $\times 400$ (в %): «-» отсутствие, «+» слабая (5 – 25% клеток), «++» умеренная (25 – 50% клеток), «+++»

выраженная ($\geq 51\%$ клеток). Полученные в результате подсчета данные обрабатывали с использованием компьютерной программы SPSS 7.5 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США). Так рассчитывали средние арифметические величины с ее предельными отклонениями и среднеквадратичную ошибку. Соответствие данных нормальному распределению подтвердили с применением критерия Колмогорова – Смирнова. При статистической обработке для оценки достоверности различий средних значений между группами использовали следующие непараметрические критерии: U-критерий Манна–Уитни, H-критерий Краскала–Уоллеса. При отсутствии нормального распределения данных использовали непараметрический критерий F. Wilcoxon (Statistical methods for research workers) с уровнем значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Во всех исследуемых образцах кожи пациентов с сепсисом отмечали выраженное утолщение эпидермиса по сравнению с контрольной группой.

Данные иммуногистохимического исследования.

Ki-67-положительную интрануклеарную реакцию наблюдали в основном в базальных кератиноцитах: в I группе она была в 1,5 раза меньше чем в контрольной группе (табл. 1)

Во всех исследуемых группах отмечали иммуномечение на каспазу-3 в цитоплазме кератиноцитов. Проведенный полуколичественный анализ уровня апоптоза в I группе показал стабильно умеренно выраженную экспрессию маркера апоптоза по сравнению с контрольной (табл. 1). Сравнительная качественная оценка процессов пролиферации и апоптоза демонстрирует, что во II группе первый превалирует над последней (табл. 1).

Таблица 1

Сравнительная характеристика экспрессии маркеров пролиферации/апоптоза в эпидермисе в условиях системного воспаления (%)

Маркер	Сепсис	Контрольная группа
Ki-67	15,2± 4,1	46,4±3,2
Caspase-3	39,4±1,2	28,2±0,2
Bcl-2	4,2±1,2	10,2±0,83
p-53	18,4±0,7	12,5±0,6

Экспрессия белка готовности к апоптозу p-53 в кератиноцитах (преимущественно зернистого и меньше базального слоя) эпидермиса II груп-

пы была выше в 1,1 раза чем в контрольной. Тогда как маркер антиапоптотической активности (Bcl-2) демонстрирует слабое иммуномечение

в эпидермисе при сепсисе (рис. 1). Кроме того, экспрессия Bcl-2 у пациентов наблюдалась как в базальных, так и в вышележащих слоях эпидермиса, тогда как в кератиноцитах контрольных образцов она ограничивалась только базальным слоем. Эти данные подтверждают то, что в коже пациентов при сепсисе наблюдается изменение баланса пролиферации / апоптоза.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании при изучении интактной кожи при сепсисе мы установили изменения пролиферации и апоптоза кератиноцитов, такие как снижение метаболического состояния, гипопролиферация и изменение дифференцировки. Поддержание гомеостаза кожи требует тонко-

го баланса между пролиферацией, дифференцировкой и апоптозом [5]. Для изучения клеточной пролиферации использовали маркер Ki-67. Этот белок структурно связан с хроматином и отвечает за пролиферацию клеток и присутствует в фазах G1, S, G2 и M жизненного цикла [6]. Можно утверждать, что на фоне тяжелого инфекционного процесса происходит умеренное снижение количества клеточных слоев эпидермиса или пролиферативного статуса кератиноцитов, что вероятно связано с действием цитокинов. Клеточная пролиферация и дифференцировка могут быть опосредованы через влияние EGFR, лиганды которого (TGF- α , амфирегулин, гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста) сверхэкспрессируются в условиях системного воспаления [7].

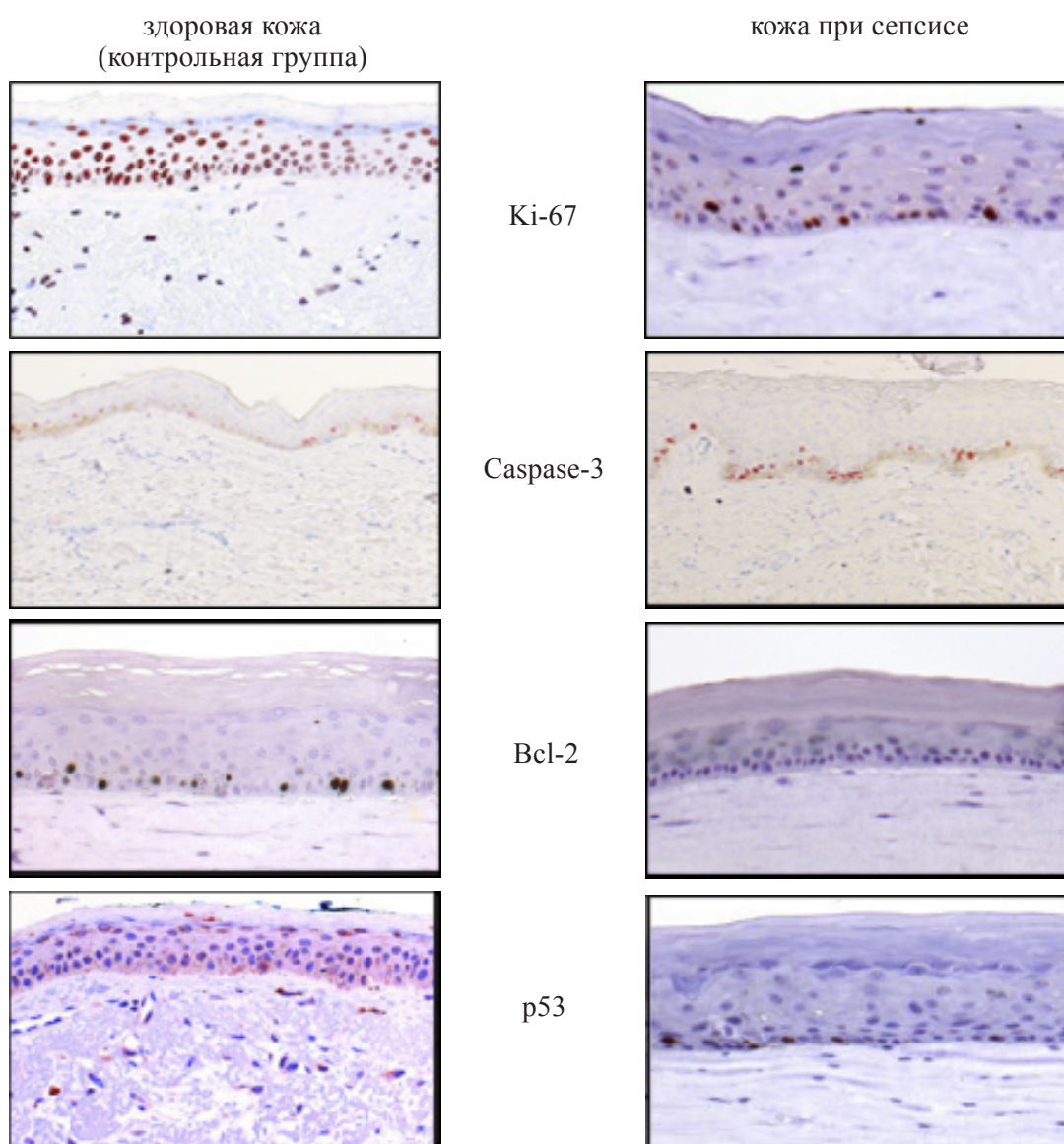


Рис. 1. Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии маркеров пролиферации/ апоптоза в эпидермисе в норме и в условиях системного воспаления. Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к Ki-67, caspase 3, Bcl-2 и p53, докрасивание ядер гематоксилином, увелич. $\times 200$.

Интерлейкины также играют важную роль в регуляции терминальной дифференцировки кератиноцитов [8].

По-видимому, ключевым компонентом многих воспалительных заболеваний является активация каспазного пути, приводя к генерации активного IL-1 β , что можно наблюдать также в интактной коже в нашем исследовании, где отмечается выраженная клеточная гибель кератиноцитов [9;10].

Изменения экспрессии регуляторных белков апоптоза p53 и Bcl-2, в интактной коже, по-видимому, зависит от тяжести и глубины действия инфекционного агента. Значения противоапоптотического белка – Bcl-2 подтверждают его биологическую роль в пролиферативно-апоптотическом дисбалансе при активации медиаторов системного воспаления

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При сепсисе в эпидермисе отмечается дисбаланс пролиферативно-апоптотической активности кератиноцитов в сторону снижения их митотического деления и активации апоптоза, приводящего к гибели клеток. Повышение уровня p53 в кератиноцитах в течение сепсиса может быть причиной ингибирования пролиферации клеток и усиления как апоптоза, так и иммунной дисфункции лимфоцитов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hotchkiss R., Colston E., Yende S., Angus D. Immune Checkpoint Inhibition in Sepsis. *Critical*

Care Medicine. 2019;47(5):632–642. doi: 10.1097/CCM.0000000000003685.

2. Rittirsch D., Redl H., Huber-Lang M. Role of complement in multiorgan failure. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:962927. doi: 10.1155/2012/962927.

3. Gallo R., Huttner K. Antimicrobial Peptides: An Emerging Concept in Cutaneous Biology. *J Invest Dermatol*. 1998;111(5):739-43. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00361.x.

4. Leise B., Yin C., Pettigrew A., Belknap J. Proinflammatory cytokine responses of cultured equine keratinocytes to bacterial pathogen-associated molecular pattern motifs. *Equine Vet J*. 2010;42(4):294-303. doi:10.2746/042516409X478523.

5. Shi G., Liao P., Cai X., Pi X., Zhang M. FoxO1 enhances differentiation and apoptosis in human primary keratinocytes. *Exp Dermatol*. 2018;27(11):1254-1260. doi:10.1111/exd.13775.

6. Booth D., Earnshaw W. Ki-67 and the Chromosome Periphery Compartment in Mitosis. *Trends Cell Biol*. 2017;27(12):906-916. doi: 10.1016/j.tcb.2017.08.001.

7. Xu X., Wang J., Yang R., Dong Z., Zhang D. Genetic or pharmacologic inhibition of EGFR ameliorates sepsis-induced AKI. *Oncotarget*. 2017;8(53):91577-91592. doi:10.18632/oncotarget.21244.

8. Hotchkiss, R. S., Chang, K. C., Swanson, P. E., Tinsley, K. W., Hui, J. J., Klender, P. (2000). Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nature Immunology*, 1(6), 496–501. doi:10.1038/82741.

9. Aziz, M., Jacob, A., & Wang, P. (2014). Revisiting caspases in sepsis. *Cell Death & Disease*, 5(11), e1526–e1526. doi:10.1038/cddis.2014.488.

10. Luan, Y., Yao, Y., Xiao, X., & Sheng, Z. (2015). Insights into the Apoptotic Death of Immune Cells in Sepsis. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 35(1), 17–22. doi:10.1089/jir.2014.0069.

УДК 616-018616-092.4+547.995.15

DOI: 10.37279/2224-6444-2020-10-2-53-60

САНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЛОКАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КОМПРЕССИОННОЙ ТРАВМЕ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

Шперлинг И. А.¹, Шулепов А. В.¹, Шперлинг Н. В.^{1,2}, Юркевич Ю. В.¹, Кузьмина О. Ю.¹,

Арутюнян А. А.¹, Заргарова Н. И.¹

¹ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, 195043, ул. Лесопарковая д.4, Санкт-Петербург, Россия.

²Частное учреждение образовательная организация высшего образования «Медицинский университет «Реавиз», 198095, ул. Калинина 8, Санкт-Петербург, Россия

Для корреспонденции: Шперлинг Игорь Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, начальник управления ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: gniiivm_2@mil.ru.

For correspondence: Igor A. Shperling, MD PhD, head of department of the Federal State Budgetary Establishment «State Scientific Research Test Institute of the military medicine» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia; e-mail: gniiivm_2@mil.ru.

Information about authors:

Shperling I. A., <https://orcid.org/0000-0002-7029-8602>

Shulepov A. V., <https://orcid.org/0000-0002-6134-809X>

Shperling N. V., <https://orcid.org/0000-0002-7865-486X>

Yurkevich Yu. V., <https://orcid.org/0000-0002-9385-7104>

Kuzmina O. Yu., <https://orcid.org/0000-0003-4095-985X>

Arutyunyan A. A., <https://orcid.org/0000-0002-4131-5530>

Zargarova N. I., <https://orcid.org/0000-0002-6502-7410>

РЕЗЮМЕ

Перспективным направлением саногенеза мышечных повреждений представляется регионарная активация клеточных систем репарации, в том числе при локальном применении гиалуроновой кислоты.

Цель: выявить саногенетические и фармакологические эффекты локального применения гиалуроновой кислоты при экспериментальной компрессионной травме мягких тканей.

Компрессионную травму моделировали механической компрессией правой тазовой конечности крысы на уровне голени в течение 7 ч с силой давления 10–12 кг/см². Далее животные были распределены на 2 группы: через 3 ч после декомпрессии животным в основной группе в область компрессии вводили 3,5% гиалуроновую кислоту (препарат «Гиалифт 3,5») вверным обкалыванием стерильным одноразовым шприцем в 5–6 точек на глубину 0,5 - 0,8 см в объеме до 0,1 мл в каждую точку; крысам в контрольной группе вводили аналогичным способом и в эквивалентном объеме 0,9% раствор натрия хлорида. Исследованы уровень миоглобина в крови, микроциркуляция, гистоморфологическая и иммуногистохимическая характеристика тканей в области компрессии. Комплексный анализ результатов исследования позволил установить, что раннее локальное введение в область компрессионного повреждения мягких тканей (через 3 ч после декомпрессии) 3,5% гиалуроновой кислоты оказывает миопротективное действие, активирует систему репарации поврежденных скелетных мышц. Сделано заключение, что саногенетический эффект гиалуроновой кислоты опосредован механизмами ее фармакологического действия: активацией ангиогенеза, улучшением *in situ* эффективности микроциркуляции и метаболизма, уменьшением выраженности первичного, вторичного некроза и перитравматических нарушений, активацией регенерации поврежденных мышечных волокон с образованием мышечной ткани. Гиалуроновая кислота является активным стимулятором репаративных процессов в ракурсе фармакотерапии и может оказаться перспективным компонентом в локальной коррекции обширных травматических повреждений.

Ключевые слова: синдром длительного раздавливания, скелетная мышца, микроциркуляция, гиалуроновая кислота, локальное применение

SANOGENETIC AND PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF LOCAL APPLICATION OF HYALURONIC ACID IN EXPERIMENTAL SOFT TISSUE COMPRESSION TRAUMA

Shperling I. A.¹, Shulepov A. V.¹, Shperling N. V.^{1,2}, Yurkevich Yu. V.¹, Kuzmina O. Yu.¹,
Arutyunyan A. A.¹, Zargarova N. I.¹,

¹State Scientific Research Test Institute of the military medicine, Saint-Petersburg, Russia

²Medical University «Reaviz», Saint-Petersburg, Russia

SUMMARY

Regional activation of cellular repair systems, including local application of hyaluronic acid, is a promising direction for the sanogenesis of muscle injuries.

Purpose: to identify the sanogenetic and pharmacological effects of local application of hyaluronic acid in experi-

mental soft tissue compression trauma. Compression injury was simulated by mechanical compression of the right pelvic limb of a rat at the level of the lower leg for 7 hours with a pressure force of 10-12 kg/cm². Further, the animals were divided into 2 groups: 3 hours after decompression, animals in the main group were injected with 3.5% hyaluronic acid (the drug «Hyalift 3.5») by fan-pricking with a sterile disposable syringe at 5-6 points to a depth of 0.5-0.8 cm in a volume of up to 0.1 ml at each point; rats in the control group were given a similar method and an equivalent volume of 0.9% sodium chloride solution. The level of myoglobin in the blood, microcirculation, histomorphological and immunohistochemical characteristics of tissues in the compression area were studied. A comprehensive analysis of the results of the study allowed us to establish that early local administration of 3.5% hyaluronic acid to the area of compression damage of soft tissues (3 hours after decompression) has a muscle-protecting effect, activates the repair system of damaged skeletal muscles. It is concluded that the sanogenetic effect of hyaluronic acid is mediated by the mechanisms of its pharmacological action: activation of angiogenesis, improvement of in situ efficiency of microcirculation and metabolism, reduction of the severity of primary and secondary necrosis and about traumatic disorders, activation of regeneration of damaged muscle fibers with the formation of muscle tissue. Hyaluronic acid is an active stimulant of reparative processes in the perspective of pharmacotherapy and may be a promising component in the local correction of extensive traumatic injuries.

Key words: prolonged crushing syndrome, skeletal muscle, microcirculation, low molecular weight hyaluronic acid, local application

Синдром длительного раздавливания является опасным для жизни осложнением компрессионной травмы. В результате ишемии и механического травмирования тканей развиваются цитоллиз, рабдомиолиз, мембраногенный отёк, токсемия, миоглобинемия. После извлечения пострадавших из-под завалов и декомпрессии тканей в ишемизированных тканях развивается реперфузия, что становится причиной прогрессирования патологического процесса. Определяющую роль в исходе заболевания играет генерализация эндотоксикоза, степень которой напрямую зависит от объема поврежденной ткани. В связи с этим оказание помощи направлено на сохранение тканей в области воздействия компрессионного фактора с целью профилактики развития системных нарушений: устранение метаболических нарушений, сохранение и восстановление структурно-функционального статуса тканей [1; 2].

Перспективным направлением саногенеза мышечных повреждений представляется регионарная активация клеточных систем репарации [3]. Имеются доказательства положительного регенеративного эффекта локального применения гидрогеля гиалуруновой кислоты [4; 5; 6]. Вместе с тем закономерности формирования структурно-клеточных преобразований в области обширного компрессионного повреждения мягких тканей при локальном введении гиалуруновой кислоты не изучены. Это определяет необходимость поиска механизмов действия гиалуруновой кислоты и оценки ее эффективности в рамках разработки перспективных методов лечения компрессионных повреждений мягких тканей.

Цель исследования - выявить саногенетические и фармакологические эффекты локального применения гиалуруновой кислоты при экспериментальной компрессионной травме мягких тканей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом исследования явились результаты экспериментов, выполненных на 280 крысах-самцах линии Вистар весом 300-340 гр. в соответствии с требованиями действующего законодательства о работе с лабораторными животными, заключением локального Комитета по этике Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации.

Дизайн исследования включал: моделирование компрессионной травмы мягких тканей голени (сдавление в течение 7 ч), декомпрессия и через 3 ч локальное введение препарата гиалуруновой кислоты (или 0,9% раствора натрия хлорида) в область повреждения, динамическое наблюдение с контрольными исследованиями в течение 28 сут.

Перед проведением эксперимента животных наркотизировали внутримышечным введением смеси кетамина и ксилазина из расчета 60 мг/кг и 10 мг/кг массы тела соответственно. Механической компрессии подвергалась правая тазовая конечность на уровне голени в течение 7 ч с силой давления 10–12 кг/см² (оптимальную силу сдавления определили с помощью электронного измерительного устройства с датчиком давления типа FSR в серии предварительных экспериментов при условии максимальной компрессии сдавления без размождения тканей) (рис. 1).

В исследование включены животные с повреждением мягких тканей без нарушения целостности кости. Для решения задач исследования животные после моделирования компрессионной травмы были распределены на 2 группы: через 3 ч после декомпрессии крысам основной группы (132 особи) локально вводили препарат гиалуруновой кислоты, в контрольной группе (132 особи) - 0,9% раствор натрия хлорида. Для получения значений нормы использовали



Рис. 1. Моделирование экспериментальной компрессионной травмы: а – тиски; б – крыса в условиях компрессии мягких тканей.

значения исследуемых показателей у здоровых животных без моделированной травмы (группа интактных животных – 18 крыс).

Гиалуроновую кислоту применяли в форме препарата «Гиалифт 3,5» (Aesthetic Dermal S.L., Испания), предназначенного для использования в косметологической практике (регистрационное удостоверение на технологию «Мезотерапия в дерматокосметологии» № ФС-2006/057-04 от 27.04.2006). Состав: преимущественно низкомолекулярная гиалуроновая кислота (до 30 кДа) с высоко- и среднемолекулярными фрагментами, полученная биотехнологическим путем; гликозаминогликан (мукополисахарид), состоящий из дисахаридных звеньев.

Гиалуроновую кислоту и 0,9% раствор натрия хлорида вводили в область компрессии веерным обкалыванием (инфильтрацией) стерильным одноразовым шприцем через 3 ч после декомпрессии. Прокол мягких тканей голени осуществляли в 5–6 точках на глубину 0,5 – 0,8 см, нагнетая препараты в объеме до 0,1 мл в одну точку прокола. Объем вводимых препаратов составлял в среднем 0,5 мл (1,5–1,7 мл/кг веса животного), что соответствует объему препаратов, вводимых в камбаловидную мышцу крыс на моделях механических повреждений тазовой конечности [7].

Динамическое наблюдение с применением комплекса методов исследования проводили с периодичностью контрольных исследований через 7, 14 и 28 сут после введения препаратов.

Содержание миоглобина в сыворотке крови (нг/мл) определяли экспресс-методом с помощью набора реагентов (Myoglobin (STAT) Elecsys, cobase; Roche Diagnostics, Германия).

Функцию микроциркуляторного звена в области сдавления оценивали с помощью лазерной доплеровской флоуметрии и оптической тканевой оксиметрии на аппарате «ЛАКК-М» (Россия). Измеряли показатель микроциркуляции (ПМ - постоянная составляющая перфу-

зии, измеряется в перфузионных единицах - пф. ед.), повышение которого указывает на улучшение микроциркуляции и наоборот. С помощью спектрофотометрического канала прибора определяли показатели относительного уровня кислородной сатурации (оксигенации) крови микроциркуляторного русла ткани (SO_2 , %) и показатель удельного потребления кислорода тканями (U , %), отражающие условия и общее потребление кислорода на единицу объема циркулирующей крови [8].

Для выявления особенностей регенерационного гистогенеза фрагменты мягких тканей области травмы исследовали с помощью световой микроскопии и иммуногистохимического исследования. Для световой микроскопии биоматериал окрашивали гематоксилин-эозином, по Маллори, по Массону, далее в перинекротической области в 3 случайных полях зрения измеряли относительную площадь мышечных волокон (S_{muscle} , %) и относительную площадь межмышечного интерстициального пространства (S_{matrix} , %) [9] с помощью графического пакета ImageJ (НИН, открытая лицензия).

Для оценки активности сосудистого роста проводили иммуногистохимическую оценку материала по маркеру VEGF с помощью антител к VEGF (клон SP28, NeoMarkers, США). Рассчитывали индекс капиллярного роста (I_{VEGF} , %), увеличение которого указывает на нарастание выраженности капиллярной сети в исследуемой ткани.

Для оценки полученных данных применяли вариационно-статистический метод с помощью пакета прикладных программ Statistica 10. Рассчитывали среднюю арифметическую (M), стандартную ошибку среднего (m), уровень достоверности определяли по критерию Манна-Уитни (критическим принят уровень статистической значимости $p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Продолжительная (7 ч) компрессия мягких тканей голени задней конечности у крыс вызвала развитие выраженного рабдомиолиза. Уровень миоглобина в сыворотке крови у крыс через 7-28 сут после локального введения 0,9% натрия хлорида был в среднем в 28-21 раз ($p \leq 0,05$) выше значений у интактных животных.

В аналогичные сроки исследования у крыс после введения гиалуроновой кислоты выраженность миоглобинемии была существенно меньше: уровень миоглобина превышал значения у интактных животных в среднем в 13-8 раз, что в целом свидетельствовало о миопротективном действии препарата, введенного локально в ранний посттравматический период (3 ч после декомпрессии).

Таблица 1

Динамика уровня миоглобина в сыворотке крови (нг/мл) у крыс при экспериментальной компрессионной травме мягких тканей голени, $M \pm m$

Группы животных	Сроки после введения, сут		
	7	14	28
Основная (3,5 % гиалуроновая кислота)	381,3±50,6 ^{1,2}	353,6±86,8 ^{1,2}	253,0±78,5 ^{1,2}
Контрольная (0,9% натрия хлорид)	846,0±94,6 ¹	807,0±145,7 ¹	629,3±109,9 ¹
Интактная	30,3±6,2		

Примечание. Здесь и в табл. 2-4: ^{1/2} - статистически значимые ($p \leq 0,05$) различия относительно показателей в группе интактных животных / животных в контрольной группе

Миопротективный эффект локального применения гиалуроновой кислоты подтвердили результаты морфометрического исследования гистологических препаратов. Продолжительное сдавление мягких тканей вызвало грубые структурные изменения скелетных мышц в зоне воздействия в течение всего периода наблюдения. Так, по состоянию через 7, 14 и 28 сут после травмы у крыс в контрольной группе, которым в зону повреждения вводили 0,9% раствор натрия хлорида, относительная площадь мышечных во-

локон (S_{muscle}) была в среднем на 57,1%, 48,5% и 45,7% ($p \leq 0,05$) меньше значений у интактных крыс. Введение гиалуроновой кислоты в зону повреждения в аналогичные сроки наблюдения по сравнению с контрольной группой позволило увеличить показатель S_{muscle} в среднем на 23,7%, 26,5% и 26,9% ($p \leq 0,05$). Изменения показателей относительной площади мышечных волокон сопровождались соответствующей динамикой показателя относительной площади межмышечных пространств (S_{matrix}) (табл. 2).

Таблица 2

Относительная площадь мышечных волокон (S_{muscle}) и интерстициальных пространств (S_{matrix}) в области компрессионного повреждения мягких тканей голени, $M \pm m$

Группы животных		Сроки после введения, сут		
		7	14	28
Основная (3,5 % гиалуроновая кислота)	S_{muscle} , %	51,8±4,2 ^{1,2}	64,5±4,3 ^{1,2}	68,4±4,6 ^{1,2}
	S_{matrix} , %)	46,1±4,9 ¹	33,5±3,6 ^{1,2}	30,6±3,3 ^{1,2}
Контрольная (0,9% натрия хлорид)	S_{muscle} , %	39,5±3,6 ¹	47,4±4,95 ¹	50,0±5,2 ¹
	S_{matrix} , %)	58,5±5,1 ¹	50,6±5,9 ¹	47,0±4,6 ¹
Интактная	S_{muscle} , %	92,1±8,6		
	S_{matrix} , %)	7,9±1,3		

Весь период наблюдения в гистологическом материале мягких тканей голени у всех животных с компрессионной травмой регистрировалось превышение более чем в 6 раз иммуногистохимической плотности VEGF-позитивных клеток как свидетельство активного сосудистого роста в зоне

повреждения. Локальное введение гиалуроновой кислоты более значимо влияло на повышение определяемого показателя в период наблюдения 14 (на 77,8%, $p \leq 0,05$) и 28 сут (на 33,3%, $p \geq 0,05$) по сравнению с эффектом 0,9 % раствора натрия хлорида соответственно (табл. 3).

Таблица 3

Индекс капиллярного роста (I_{VEGF}) в иммуногистохимических препаратах скелетных мышц области компрессионного повреждения мягких тканей голени у крыс, $M \pm m$

Группы животных	Сроки после введения, сут		
	7	14	28
Основная (3,5 % гиалуроновая кислота)	1,6±0,2 ¹	3,2±0,5 ^{1,2}	2,4±0,4 ¹
Контрольная (0,9% натрия хлорид)	1,2±0,2 ¹	1,8±0,2 ¹	1,6±0,3 ¹
Интактная	0,2±0,1		

Полученные результаты указывают на наличие умеренного проангиогенного свойства у гиалуроновой кислоты, обеспечивающего ее участие в регуляции неоангиогенеза.

Посткомпрессионный период характеризовался существенным снижением микроциркуляции в зоне сдавления. Локальное введение 3,5% гиалуроновой кислоты позволило улучшить перфузионные характеристики микроциркуляции, что является основным условием метаболизма и регенерации поврежденных тканей. Несмотря на то, что к исходу периода наблюдения у животных с компрессионной травмой показатели микроциркуляции не достигли значений

нормы (интактной группы), у крыс после введения гиалуроновой кислоты в течение 7-14 сут эксперимента значения показателей ПМ (отражает перфузию в микроциркуляторном русле) и U (отражает степень потребления кислорода тканями) были статистически значимо больше по сравнению с группой животных, которым вводили 0,9% раствор натрия хлорида. При этом значение такого функционального показателя микроциркуляции, как кислородная сатурация (SO_2), было ниже, что в целом свидетельствует о более высокой метаболической активности тканей под влиянием гиалуроновой кислоты (табл. 4).

Таблица 4

Показатели микроциркуляции в мягких тканях голени области компрессионного повреждения у крыс, $M \pm m$

Группы животных	Сроки после введения, сут	Показатели		
		ПМ, пф. ед.	SO_2 , %	U, усл. ед.
Основная (3,5 % гиалуроновая кислота)	7	8,3±0,4 ^{1,2}	71,4±1,8 ^{1,2}	0,91±0,08 ^{1,2}
	14	10,3±0,9 ¹	68,3±1,9 ^{1,2}	1,06±0,11 ^{1,2}
	28	9,7±1,0 ¹	72,1±2,2 ¹	1,02±0,14 ¹
Контрольная (0,9% натрия хлорид)	7	6,7±0,3 ¹	82,9±2,4 ¹	0,57±0,06 ¹
	14	8,7±0,5 ¹	77,9±1,9 ¹	0,65±0,05 ¹
	28	9,3±0,4 ¹	71,2±1,6 ¹	1,02±0,08 ¹
Интактная	7-28	14,9±1,4	52,5±1,8	2,82±0,31

Таким образом, локальное введение гиалуроновой кислоты крысам в ранний посткомпрессионный период позитивно влияло на динамику структурно-функционального состояния мягких тканей области компрессионного воздействия, что демонстрирует наличие миопротективного и регенеративного эффектов у гиалуроновой кислоты.

ОБСУЖДЕНИЕ

Посттравматическая регенерация скелетных мышц является многогранным саногенетическим процессом, требующим пространственной и временной координации различных структур-

но-функциональных механизмов мио-, ангио-, нейрогенеза и др. [10].

Комплексный анализ полученных результатов исследований зоны компрессионной травмы мягких тканей конечностей у экспериментальных животных показал, что локально введенная гиалуроновая кислота включается в систему репарации поврежденных скелетных мышц, улучшая *in situ* эффективность микроциркуляции и метаболизма. Это в целом способствует уменьшению перитравматической зоны, активизирует регенерацию поврежденных мышечных волокон с активным новообразованием мышечной ткани (Таблица 5).

Таблица 5

Саногенетические и фармакологические эффекты локального введения 3,5% гиалуроновой кислоты через 3 ч после декомпрессии при экспериментальной компрессионной травме мягких тканей (относительно эффектов 0,9% раствора натрия хлорида)

Показатели		Сроки после введения, сут		
		7	14	28
Биохимический признак рабдомиолиза: концентрация миоглобина в сыворотке крови (нг/мл)		↓	↓	-
Гистоморфологические признаки регенерации тканей области компрессии	Относительная площадь мышечных волокон (S_{muscle} , %)	↑	↑	↑
	Относительная площадь межмышечного интерстициального пространства (S_{matrix} , %)	-	↓	↓
Перфузия микроциркуляции в мышцах области компрессии (ПМ, пф. ед.)		↑	-	-
Состояние кислородного снабжения мышц области компрессии	Уровень оксигенации крови микроциркуляторного русла, SO_2 , %	↓	↓	↓
	Общее потребление кислорода на единицу объема циркулирующей крови, U, усл.ед.	↑	↑	-
Регенеративно направленная динамика ультраструктуры скелетных мышц области компрессии		↑	↑	↑
Индекс капиллярного роста (I_{VEGF} , %) в скелетных мышцах области компрессии		-	↑	-

Примечание: ↑/↓ статистически значимое ($p \leq 0,05$) повышение/понижение показателя относительно значений в группе после введения 0,9% раствора натрия хлорида

Участие гиалуроновой кислоты в саногенезе компрессионной травмы может быть обусловлено ее свойствами как биологически активной субстанции.

Гиалуроновая кислота как естественный компонент межклеточного матрикса играет важнейшую роль в создании комфортной среды для адгезии, миграции и пролиферации клеток, положительно влияет на скорость метаболических реакций в тканях, опосредованно стимулирует неоколлагенез, проявляет антиоксидантную активность, способствует восстановлению свойств клеточных мембран, оказывая цитопротективное действие [6; 11; 12; 13].

Ионообменная активность гиалуроновой кислоты, способность поддерживать гидробаланс, связывать катионы и концентрировать биологически активные вещества позитивно отражаются на трофике, репарации и механических свойствах различных тканей [14].

Взаимодействуя с рецепторами CD44 клеточной мембраны фибробластов, гиалуроновая кислота увеличивает их синтетическую активность в выработке компонентов межклеточного матрикса (коллагена, эластина и гиалуроновой кислоты) для построения соединительной ткани [15]. Гиалуроновая кислота, стимулируя физио-

логические репарационные процессы и ангиогенез, направляет фиброгенез по органотипическому пути [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования позволяют заключить, что раннее локальное введение в область компрессионного повреждения мягких тканей (через 3 ч после декомпрессии) 3,5% гиалуроновой кислоты оказывает миопротективное действие, активирует систему репарации поврежденных скелетных мышц. Саногенетический эффект гиалуроновой кислоты опосредован механизмами ее фармакологического действия: активацией ангиогенеза, улучшением *in situ* эффективности микроциркуляции и метаболизма, уменьшением выраженности первичного, вторичного некроза и перитравматических нарушений, активацией регенерации поврежденных мышечных волокон с образованием мышечной ткани. Гиалуроновая кислота является активным стимулятором репаративных процессов в ракурсе фармакотерапии и может оказаться перспективным компонентом в локальной коррекции обширных травматических повреждений.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Шугаева К. Я., Магомедов М. А., Магомедов К. К., Шахбанов Р. К. Современные аспекты патогенеза синдрома длительного сдавления мягких тканей в клинике и эксперименте. Известия Дагестанского Государственного педагогического университета. Серия Естественные и точные науки. 2012;2:96-100.
2. Хитричев В. Е., Жигаев Г. Ф., Рыбдылов Д. Д., Миткинов О. Э. Синдром длительного сдавления: литературный обзор. Врач скорой помощи. 2017;2:55-68.
3. Roth P., Duda G., Radojewski P., Preininger B., Perka C., Winkler T. Mesenchymal Stem Cell Therapy Following Muscle Trauma Leads to Improved Muscular Regeneration in Both Male and Female Rats. *Gend Med.* 2012 Apr;9(2):129-136. doi: 10.1016/j.genm.2012.01.007.
4. Jang C. H., Park H., Cho Y. B., Song C. H. Mastoid obliteration using a hyaluronic acid gel to deliver a mesenchymal stem cells-loaded demineralized bone matrix: an experimental study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2008 Nov;72(11):1627-32. doi:10.1016/j.ijporl.2008.07.017.
5. Москвин С. В., Антипов Е. В., Зарубина Е. Г., Рязанова Е. А. Изменение содержания липофусцина и состояния коллагеново-эластинового матрикса кожи лица после лазерофореза гиалуроновой кислоты у женщин различных возрастных групп. *Лазерная медицина.* 2011;15(2):89.
6. Хабаров В. Н., Бойко П. Я., Селянин М. А. Гиалуроновая кислота: получение, свойства, применение в биологии и медицине. Москва: Практическая медицина; 2012.
7. Shimazaki J., Matsumoto N., Ogura H., Muroya T., Kuwagata Y., Nakagawa J., Yamakawa K., Hosotsubo H., Imamura Y., Shimazu T. Systemic involvement of high-mobility group box 1 protein and therapeutic effect of anti-high-mobility group box 1 protein antibody in a rat model of crush injury. *Shock.* 2012 June;37(6):634-638. doi:10.1097/SHK.0b013e31824ed6b7.
8. Крупаткин А. И., Сидоров В. В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: колебания, информация, нелинейность. Москва: Книжный дом «ЛИБРОКОМ»; 2014.
9. Мавликеев М. О., Плотников М. В., Максимов А. В., Гафиятуллина Г. Р., Муртазин А. И., Терегулов Ю. Э., Шамсутдинова И. И., Гумерова А. А., Ризванов А. А., Киясов А. П. Патогистологическая оценка состояния скелетной мышцы после прямой генной терапии VEGF165 пациентов с хроническими облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей. *Гены и Клетки.* 2014;9(3-1):105-111.
10. Flann K. L., Rathbone C. R., Cole L. C., Liu X., Allen R. E., Rhoads R. P. Hypoxia simultaneously alters satellite cell-mediated angiogenesis and hepatocyte growth

factor expression. *J Cell Physiol.* 2014 May;229(5):572-579. doi:10.1002/jcp.24479.

11. Адельшин А. И., Рахматуллин Р. Р., Бурцева Т. И., Бурлуцкая О. И. Нативные матриксы для создания живого эквивалента кожи. *Морфологические ведомости.* 2013;3:8-13.
12. Collins M.N., Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - A review. *Carbohydr Polym.* 2013 Feb;92(2):1262-1279. doi:10.1016/j.carbpol.2012.10.028.
13. Sokolowska M., Chen L. Y., Eberlein M., Martinez-Anton A., Liu Y., Alsaaty S., Qi H.-Y., Logun C., Horton M., Shelhamer J. H. Low molecular weight hyaluronan activates cytosolic phospholipase A2 α and eicosanoid production in monocytes and macrophages. *J. Biol. Chem.* 2014;289(7):4470-4488. doi:10.1074/jbc.M113.515106.
14. Строителев В. В., Федорищев И. А. Гиалуроновая кислота - биологически активное вещество, обладающее защитными и иммуномодулирующими функциями. *Вестник новых медицинских технологий.* 1997;4(3):98-102.
15. Жукова О. В., Потеекаев Н. Н., Стенько А. Г., Бурдина А. А. Патогенез и гистоморфологические особенности рубцовых изменений кожи. *Клиническая дерматология и венерология.* 2009;3:4-9.
16. Сатаев Ч. Б. Структурная организация хирургической раны в динамике после применения гиалуроновой кислоты в возрастном аспекте. *Ульяновский медико-биологический журнал.* 2013;2:29-35.

REFERENCES

1. Shugaeva K. Ya., Magomedov M. A., Magomedov K. K., Shakhbanov R. K. Modern aspects of the pathogenesis of long-term syndrome in clinic and experiment. *Proceedings of Dagestan State pedagogical University. A series of Natural and exact Sciences.* 2012;2:96-100. (In Russ.).
2. Khitreev V. E., Zhigaev G. F., Rybdilov D. D., Mitkinov O. E. Crush syndrome: review of the literature. *Ambulance surgeon.* 2017;2:55-68. (In Russ.).
3. Roth P., Duda G., Radojewski P., Preininger B., Perka C., Winkler T. Mesenchymal Stem Cell Therapy Following Muscle Trauma Leads to Improved Muscular Regeneration in Both Male and Female Rats. *Gend Med.* 2012 Apr;9(2):129-136. doi:10.1016/j.genm.2012.01.007.
4. Jang C. H., Park H., Cho Y. B., Song C. H. Mastoid obliteration using a hyaluronic acid gel to deliver a mesenchymal stem cells-loaded demineralized bone matrix: an experimental study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2008 Nov; 72(11):1627-32. doi:10.1016/j.ijporl.2008.07.017.
5. Moskvin S. V., Antipov E. V., Zarubina E. G., Ryazanova E. A. Changes in the content of lipofuscin and the state of the collagen-elastin matrix of the skin after hyaluronic acid laserphoresis in women of different age groups. *Laser medicine.* 2011;15(2):89. (In Russ.).

6. Habarov V. N., Bojko P. YA., Selyanin M. A. Hyaluronic acid: preparation, properties, application in biology and medicine. Moscow: Practical medicine; 2012. (In Russ.).
7. Shimazaki J., Matsumoto N., Ogura H., Muroya T., Kuwagata Y., Nakagawa J., Yamakawa K., Hosotsubo H., Imamura Y., Shimazu T. Systemic involvement of high-mobility group box 1 protein and therapeutic effect of anti-high-mobility group box 1 protein antibody in a rat model of crush injury. *Shock*. 2012 June;37(6):634–638. doi:10.1097/SHK.0b013e31824ed6b7.
8. Krupatkin A. I., Sidorov V. V. Functional diagnostics of the state of microcirculatory and tissue systems: fluctuations, information, non-linearity. Moscow: Book house «LIBROKOM»; 2014. (In Russ.).
9. Mavlikeev M.O., Plotnikov M.V., Maksimov A.V., Gafiyatullina G.R., Murtazin A.I., Teregulov U.E., Shamsutdinova I.I., Gumerova A.A., Rizvanov A.A., Kiassov A.P. Pathohistological assessment of skeletal muscle after direct gene therapy with VEGF165 of patients with peripheral arterial diseases. *Genes and Cells*. 2014;9(3-1):105-111. (In Russ.).
10. Flann K. L., Rathbone C. R., Cole L. C., Liu X., Allen R. E., Rhoads R. P. Hypoxia simultaneously alters satellite cell-mediated angiogenesis and hepatocyte growth factor expression. *J Cell Physiol*. 2014 May;229(5):572-579. doi:10.1002/jcp.24479.
11. Adelshin A. I., Rakhmatullin R. R., Burceva T. I., Burlutskaya O. I. Native matrices to create a living skin equivalent. *Morphological statements*. 2013;3:8-13. (In Russ.).
12. Collins M.N., Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - A review. *Carbohydr Polym*. 2013 Feb;92(2):1262-1279. doi:10.1016/j.carbpol.2012.10.028.
13. Sokolowska M., Chen L. Y., Eberlein M., Martinez-Anton A., Liu Y., Alsaaty S., Qi H.-Y., Logun C., Horton M., Shelhamer J. H. Low molecular weight hyaluronan activates cytosolic phospholipase A2 α and eicosanoid production in monocytes and macrophages. *J. Biol. Chem*. 2014;289(7):4470–4488. doi:10.1074/jbc.M113.515106.
14. Stroitelev V. V., Fedorishchev I. A. Hyaluronic acid is a biologically active substance that has protective and immunomodulatory functions. *Bulletin of new medical technologies*. 1997;4(3):98-102. (In Russ.).
15. Zhukova O. V., Potekaev N. N., Sten'ko A. G., Burdina A. A. Pathogenesis and histomorphological features of scarring of the skin. *Clinical dermatology and venereology*. 2009;3:4-9. (In Russ.).
16. Sataev C. B. The structural organization of the surgical wound in dynamics after application hyaluronic of the acid in age aspect. *Ulyanovsk medical and biological journal*. 2013;2:29-35. (In Russ.).

УДК 591.82:616.002

DOI: 10.37279/2224-6444-2020-10-2-61-68

ИЗМЕНЕНИЯ СЕКРЕТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ В МАСТОЦИТАХ КОЖИ КРЫС ПРИ РАЗВИТИИ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА

Яглова Н. В., Обернихин С. С., Яглов В. В.

Лаборатория развития эндокринной системы ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», 117418, ул. Цюрупы, д. 3, Москва, Россия

Для корреспонденции: Яглова Наталья Валентиновна, доктор медицинских наук, зав. лабораторией развития эндокринной системы НИИ морфологии человека, e-mail: yaglova@mail.ru

For correspondence: Yaglova N. V., MD, Head of Laboratory of Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology, e-mail: yaglova@mail.ru

Information about authors:

Yaglova N. V., <http://orcid.org/0000-0002-8239-5039>.

Obernikhin S. S., <http://orcid.org/0000-0003-0997-6766>

Yaglov V. V., <http://orcid.org/0000-0003-4357-0639>

РЕЗЮМЕ

Мастоциты – активные участники реакций врожденного иммунитета. При системном воспалительном ответе реактивные изменения развиваются во многих органах, в том числе не являющихся первичными мишенями бактериальных и вирусных инфекций. Цитофизиология мастоцитов органов, непосредственно не вовлеченных в воспалительный процесс, таких, например, как кожа, изучена недостаточно. Исследования в этой области необходимы для выявления патогенетических механизмов ряда заболеваний кожи, развитие которых связано с перенесенной кишечной или респираторной инфекцией.

Целью исследования было изучение структурных показателей секреторной деятельности мастоцитов кожи крыс при развитии системного воспалительного ответа.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на 45 самцах крыс Вистар. Системный воспалительный ответ вызывали интраперитонеальным введением сублетальной дозы липополисахарида (20 мг/кг). Выживших животных выводили из эксперимента через 1 и 7 суток.

В сыворотке крови определяли концентрацию цитокинов интерлейкина-2, 12p40, интерферона- γ методом твердофазного иммуноферментного анализа. Проводили гистологическое исследование препаратов кожи живота, окрашенных гематоксилином и эозином, а также толудиновым синим.

Результаты. У крыс развился системный воспалительный ответ, выраженность которого уменьшилась к 7-м суткам. Существенных изменений в строении кожи не было обнаружено. В популяции мастоцитов наблюдались изменения, свидетельствующие об активном выделении медиаторов без усиления дегрануляции клеток. На 7-е сутки отличий в цитофизиологических характеристиках мастоцитов от контрольной группы не было найдено.

Заключение. Развитие системного воспалительного ответа на введение сублетальной дозы бактериального липополисахарида не вызывает усиления миграции мастоцитов в кожу, но обуславливает изменение секреторных процессов, усиливая выделение секреторных продуктов способом постепенной дегрануляции.

Ключевые слова: кожа, системный воспалительный ответ, мастоциты, секреция

CHANGES IN SECRETION OF RAT SKIN MAST CELLS IN SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE

Yaglova N. V., Obernikhin S. S., Yaglov V. V.

Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

SUMMARY

Mast cells are active participants of innate immune response. Systemic immune response induces functional changes even in organs, which are not considered primary targets of bacterial or viral infections. Cytophysiology of mast cells located in organs not affected by systemic inflammatory response, like skin, is still poorly studied. Investigations of this issue might elucidate some pathogenetic mechanism of skin diseases associated with previously developed intestinal or respiratory infection.

The aim was to investigate structural changes of rat skin mast cells in systemic inflammatory response indicative of mast cell secretion.

Materials and methods: The experiment was performed on 45 male Wistar rats. Systemic inflammatory response was induced by intraperitoneal injection of sublethal dose of lipopolysaccharide *E. coli* (20 mg/kg). The survived rats were sacrificed 1 and 7 days after injection. Serum levels of interleukine-2, 12p40, and interferon- γ were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay. Histological examination of abdominal skin slices, stained with hematoxylin and eosin and toluidine blue was performed.

Results. The rats developed systemic inflammatory response, which attenuated on the 7th day after lipopolysaccharide injection. No significant changes in skin morphology were found. Skin mast cells demonstrated some morphological and functional changes indicative of active secretion of mediators without activation of degranulation. On the 7th day mast cell cytophysiology had no significant changes compared to the control group.

Conclusion. Systemic inflammatory response induced by bacterial lipopolysaccharide does not activate migration of mast cells to skin, but changes their secretory processes by enhancing peptidase-mediated degranulation.

Key words: skin, systemic inflammatory response, mast cells, secretion

Развитие тяжелых патологических процессов в организме сопровождается комплексными реактивными изменениями, как в органах-мишенях, так и в органах, непосредственно не вовлеченных в патологический процесс. Системный воспалительный ответ характеризуется активацией клеток естественного иммунитета и повышенной секрецией медиаторов воспаления [1]. Мастоциты являются участниками системы естественного иммунитета, поскольку экспрессируют паттерн-распознающие толл-подобные и NOD-рецепторы, участвуют в реакциях фагоцитоза, синтезируют природные антибактериальные соединения кателицидины и дефенсины, и провоцируют развитие воспалительного процесса, выделяя хемоаттрактанты и цитокины [2; 3; 4]. На сегодняшний день вопрос об особенностях секреторных процессов в мастоцитах органов, непосредственно не поражаемых при бактериальных и вирусных инфекциях, мало изучен, в то время как установление и изменений секреторного профиля, а главным образом способа выделения биологически активных веществ может привести к значительному прогрессу в терапии кожных заболеваний. Известно, что ряд заболеваний кожи, таких как многоформная экссудативная эритема, узловатая эритема, красный плоский лишай и др., возникает на фоне или после окончания инфекционно-воспалительных процессов [5-8]. Мастоциты регулируют проницаемость микроциркуляторного русла, являются триггерами ремоделирования соединительной ткани дермы, но в то же время и выполняют протективную роль при развитии инфекционных процессов в коже, способствуя элиминации возбудителей и миграции антиген-распознающих клеток [9].

Цель исследования – изучить структурные показатели секреторной деятельности мастоцитов кожи крыс при развитии системного воспалительного ответа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 45 самцах крыс Вистар массой тела 180-200гг. Системный воспалительный ответ моделировали введением крысам (n=30) липополисахарида *E. coli* серотип 026:B6 (Sigma, США), растворенного в физиологическом растворе в концентрации 10мг/мл, в сублетальной дозе 20мг/кг интраперитонеально. Животным контрольной группы (n=15) вводили аналогичный объем физиологического раствора. Часть животных экспериментальной группы (n=5) погибли от развившегося эндотоксикоза на 2-3-й сутки. Животных выводили из эксперимента в два этапа. Половину крыс контрольной и экспериментальной групп вывели

из эксперимента через сутки, вторую половину – через 7 суток после введения липополисахарида передозировкой золетила («Virbac Sante Animale», Франция). Эксперимент проведен в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977г. Уход за животными, содержащимися в виварии, осуществлялся по нормам и правилам обращения с лабораторными животными, в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985г.), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 19.06.2003г. №267) и законом «О защите животных от жестокого обращения» гл. V, ст. 10, 4679-ГД от 01.12.1999 г.

Для верификации развития системного воспалительного ответа проводили определение концентрации цитокинов интерлейкинf (ИЛ)-2, интерферона-γ (ИНФ-γ), а также субъединицы р40 ИЛ-12 – ингибитора рецептора ИЛ-12, способствующего дифференцировке Т-хелпер-1 лимфоцитов, в сыворотке крови крыс методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов («Bio Source International», Бельгия) в сыворотке крови крыс.

Кожу передней брюшной стенки фиксировали в жидкости Карнуа и после стандартной автоматизированной гистологической проводки с помощью гистопроцессора «Tissue-Tek VIP 5 Jr» («Hygesco», Франция) образцы были залиты в парафин. Срезы изготавливали с помощью микротомы «Microm HM 340E» («Microm GmbH», Германия). Полученные препараты окрашивали гематоксилином и эозином, а также 1%ным раствором толуидинового синего с рН 2,0 для выявления мастоцитов. Изучение цитофизиологических характеристик мастоцитов проводили по методу Н.В. Ягловой [10], с определением числа выявляемых клеток в 1мм², индекса дегрануляции и среднего гистохимического коэффициента (СГК).

Статистическую обработку проводили с помощью пакета программ Statistica 7,0 («Statsoft Inc.», США). Проводили анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения с использованием критериев Лиллиефорса, Шапиро-Уилка. Количественные показатели, имеющие приблизительно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения (M±m).

Сравнение независимых групп по количественному признаку с учетом небольшого размера выборок проводили с помощью t-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о

равенстве дисперсий и критерия χ^2 . Порог статистической значимости p был понижен до 0,01 с учетом множественности сравнений. В связи с отсутствием различий между контрольными группами двух сроков исследования по морфологическим и биохимическим параметрам, данные были объединены в общую контрольную группу.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Через сутки после введения липополисахарида отмечалось повышение концентрации цитокинов ИНФ- γ и ИЛ-2 и уменьшение концентрации ИЛ-12p40 в системном кровотоке. На 7-е сутки у выживших животных отмечено уменьшение концентрации ИНФ- γ и ИЛ-2 и повышение уровня ИЛ-12p40 в сыворотке крови и отсутствие статистически значимых отличий от значений контрольной группы по этим показателям (рис. 1).

В гистологических препаратах кожи крыс контрольной группы различалось три слоя: эпидермис, дерма, гиподерма. Кератиноциты имели ядра овальной формы, ориентированные как горизонтально, так вертикально и умеренно базофильную цитоплазму. Дерма была представлена коллагеновыми и эластическими волокнами. Границы между сетчатым и сосочковым слоями были нечеткими. В дерме находилось большое количество сальных желез и волосяных фолликулов. В дерме выявлялось небольшое количество клеток, в основном фибробластов. Гиподерма была умеренно развита. Отмечалось неравномерное кровенаполнение сосудов (рис. 2а).

Через сутки после введения липополисахарида существенных изменений в строении кожи и клеточном составе дермы крыс не наблюдалось. Аналогично и на 7-е сутки структура кожи не отличалась от таковой в контрольной группе (рис. 2б,в).

Мастоциты в коже крыс контрольной группы выявлялись в различных слоях дермы и гиподермы. В дерме они часто располагались вдоль кровеносных сосудов. Более половины выявляемых мастоцитов представляли собой темные клетки, с высоким содержанием секреторного материала. Клетки с низким содержанием секреторных продуктов локализовались преимущественно субэпидермально и составляли меньшую часть популяции мастоцитов. Количество мастоцитов, выделяющих секреторный материал путем выброса гранул было невелико. В основном, наблюдалась слабая дегрануляция (рис. 3а, 4).

Через сутки после введения липополисахарида количество выявляемых мастоцитов в коже незначительно уменьшилось. Их гистотопография была аналогичной контрольной. В отличие

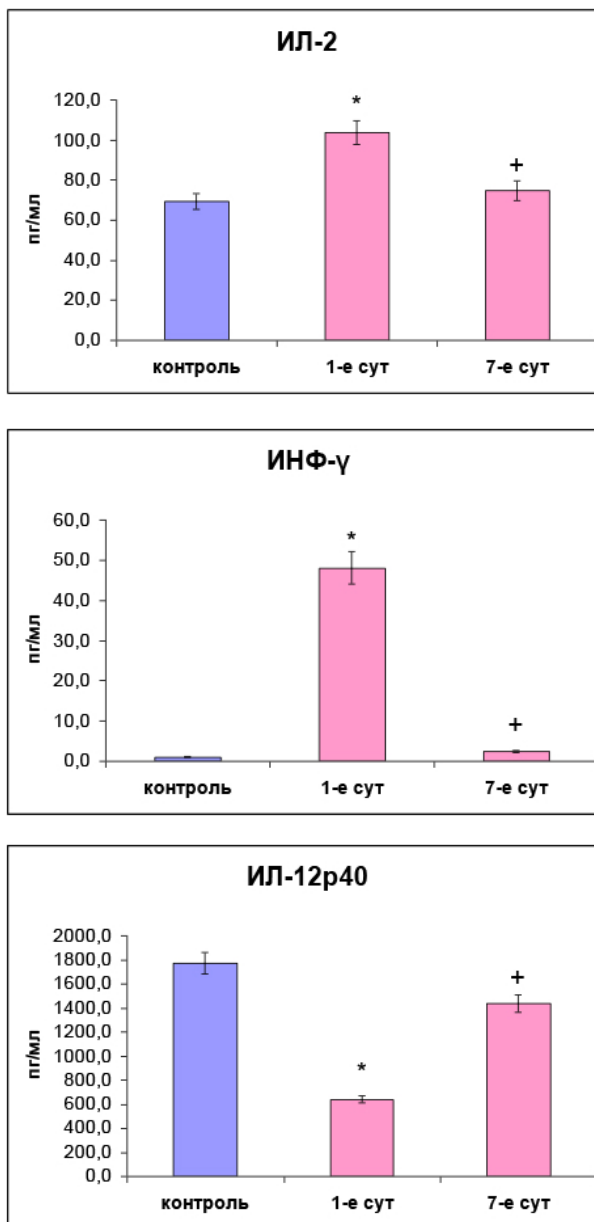
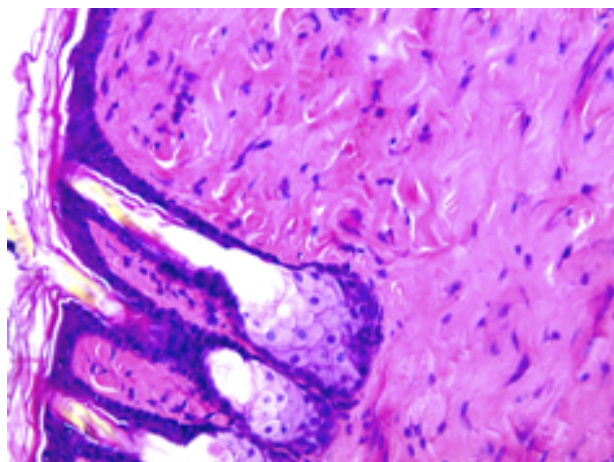


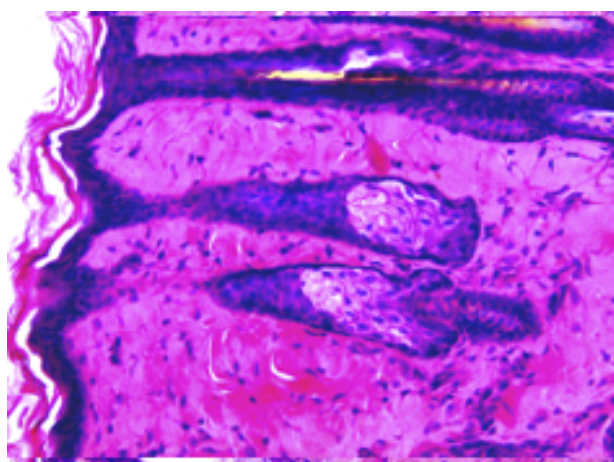
Рис. 1. Изменение концентрации провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов в сыворотке крови крыс через 1 и 7 суток после введения липополисахарида ($M \pm m$).

Примечания: $p < 0,01$ при сравнении с контрольной группой (*), 7-ых суток с 1-ми сутками после введения липополисахарида (+).

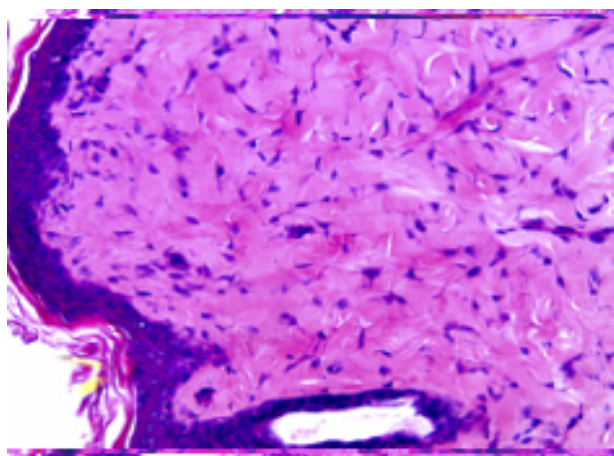
от контрольной группы очень темные клетки с высоким содержанием секреторного материала встречались реже, в то время как количество светлых клеток увеличилось. Таким образом, СГК мастоцитов при развитии системного воспалительного ответа уменьшался, что свидетельствует о выделении мастоцитами секреторного материала. Индекс дегрануляции мастоцитов уменьшился в основном за счет уменьшения числа клеток с умеренными проявлениями дегрануляции (рис. 3б, 4).



а

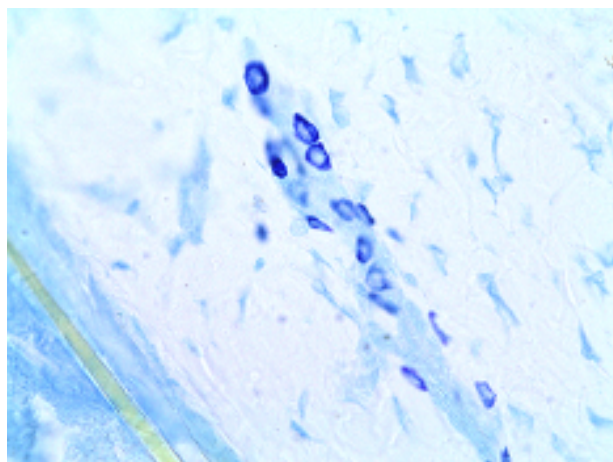


б

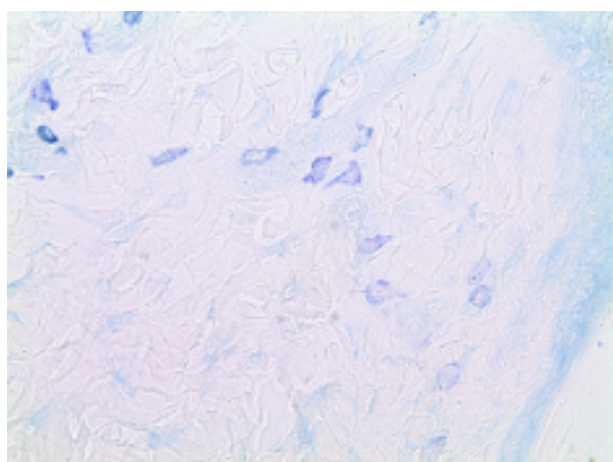


в

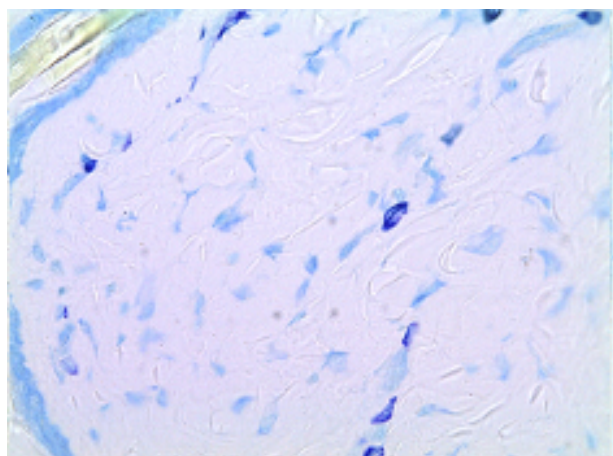
Рис. 2. Строение кожи крыс контрольной группы (а) и через 1 (б) и 7 (в) суток после введения липополисахарида. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200.



а



б



в

Рис. 3. Тучные клетки кожи крыс контрольной группы (а) и через 1 (б) и 7 (в) суток после введения липополисахарида. Окраска толуидиновым синим. Ув. 400.

Через 7 суток после введения липополисахарида количество выявляемых мастоцитов практически не изменилось. Мастоциты располагались в дерме. Выявлена тенденция к накоплению секреторного материала в цитоплазме мастоцитов, что проявлялось высоким содержанием очень темных и темных клеток и очень небольшим количеством очень светлых клеток. Это привело к повышению СГК популяции мастоцитов по сравнению с пре-

дыдущим сроком исследования. Индекс дегрануляции мастоцитов увеличился. Как и через 1 сутки после введения липополисахарида и у животных контрольной группы среди дегранулирующих мастоцитов преобладали клетки со слабой дегрануляцией. В целом, цитофизиологические показатели мастоцитов кожи через 7 суток после введения липополисахаридов были близки к значениям контрольной группы (рис. 3в, 4).

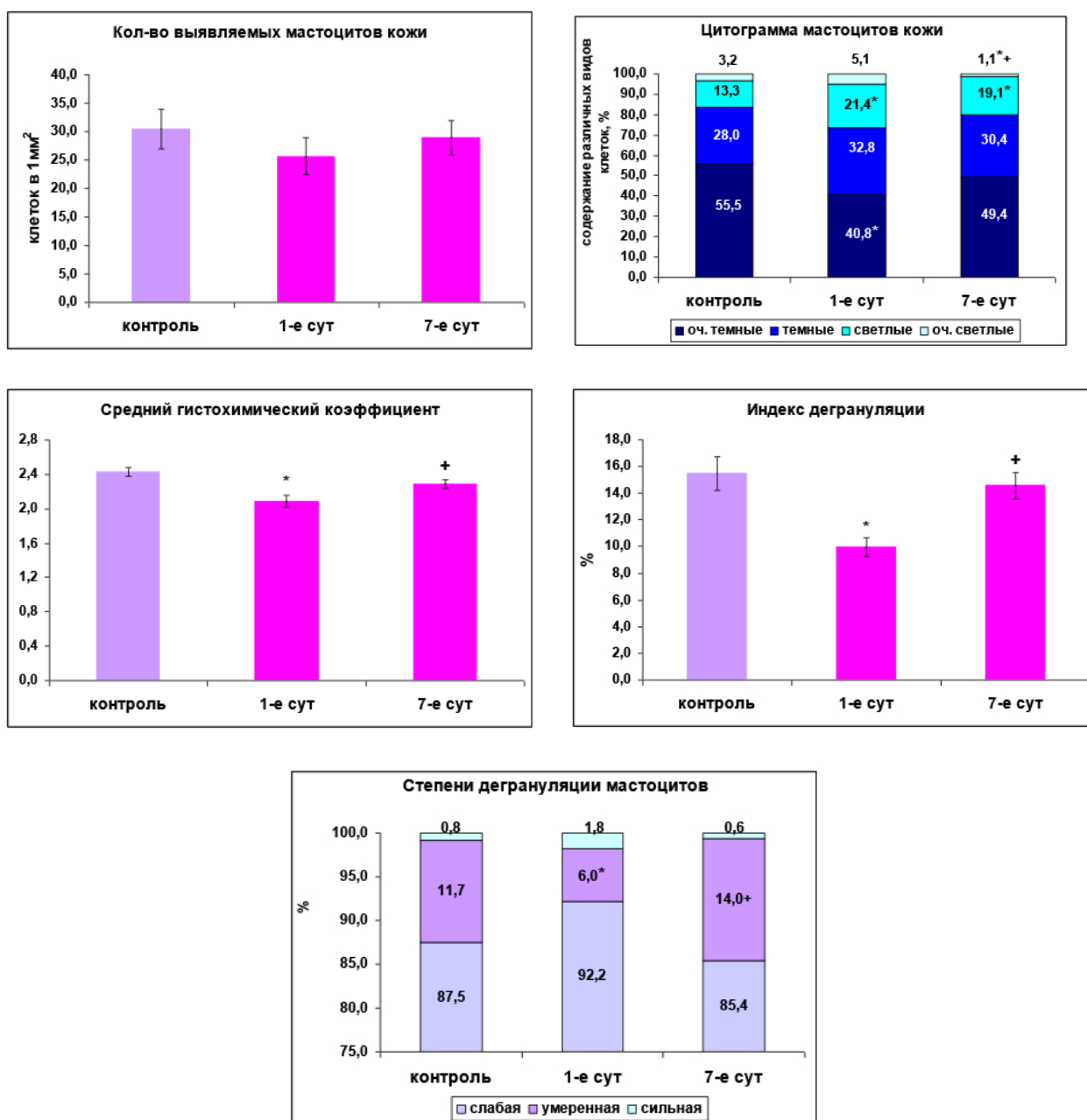


Рис. 4. Изменения цитофизиологических характеристик мастоцитов кожи после введения липополисахарида.

Примечания: $p < 0,01$ при сравнении с контрольной группой (*), 7-ых суток с 1-ми сутками после введения липополисахарида (+).

ОБСУЖДЕНИЕ

Введение сублетальной дозы липополисахарида приводило к развитию генерализованного воспалительного процесса, о чем свидетельствовало увеличение продукции провоспалительных цитокинов и дальнейшая гибель части животных. Гистологические исследования препаратов кожи показали, что, несмотря на тяжесть воспалительного процесса, в коже не происходит существенных морфологических изменений, но секреторные процессы в мастоцитах меняются. В научной литературе описаны три способа выделения синтезированных и преформированных секреторных продуктов мастоцитами – быстрая дегрануляция, постепенная дегрануляция, и реже экзоцитоз [10]. Постепенная дегрануляция начинается с оводнения секреторной гранулы и дезинтеграции ее содержимого. Затем от мембраны секреторной гранулы отделяются мелкие везикулы, заполненные секреторным материалом. Они транспортируются к наружной цитоплазматической мембране, и секрет выделяется за пределы клетки путем микроэкзоцитоза [11]. Существует также и молекулярный способ постепенной дегрануляции, заключающийся в образовании везикул вокруг секреторных гранул, приводящих в конечном итоге к их набуханию, растворению и выделению из них секреторного материала [12]. При экзоцитозе оводненные секреторные гранулы выделяют свое содержимое через поросому в наружной цитоплазматической мембране [13]. Быстрая дегрануляция заключается в выбросе целых секреторных гранул в матрикс окружающей соединительной ткани и является легко выявляемым процессом при световой микроскопии. Обнаруженные в начале развития системного воспалительного ответа изменения указывали на превалирование постепенной дегрануляции над другими способами выделения секреторного материала, так как содержание секреторных продуктов снижалось с уменьшением интенсивности выделения гранул за пределы клетки. Нормализация продукции цитокинов, выявленная на 7-е сутки, свидетельствовала о начале регресса воспалительного процесса. Секреторные процессы в мастоцитах кожи также возвращались к исходным показателям. То есть, мастоциты переходили в фазу накопления секреторных продуктов. Важно отметить, что ни на 1-ые, ни на 7-ые сутки количество выявляемых мастоцитов в коже не изменялось, то есть усиления миграции мастоцитов не происходило, а изменялись только секреторные процессы. Это обусловлено наличием толл-подобных рецепторов-4 у мастоцитов, лигандом которых является липополисахарид [14; 15; 16].

В наших предыдущих работах мы показали, что введение липополисахарида приводило к аналогичному уменьшению содержания секреторных продуктов в мастоцитах щитовидной железы без усиления быстрой дегрануляции [17; 18]. Эти данные свидетельствуют об универсальности реакции мастоцитов при развитии эндотоксикоза, обусловленного введением липополисахарида. С другой стороны эти данные указывают на то, что развитие бактериального эндотоксикоза вызывает превалирование постепенной дегрануляции над быстрой дегрануляцией. Фактически, это может быть проявлением изменения секреторного профиля, поскольку различные соединения имеют превалирующий путь выделения за пределы клетки, например, интерлейкины выделяются мастоцитами в основном путем постепенной дегрануляции [19]. С другой стороны данные показывают, что медикаментозное блокирование мембран мастоцитов существенно не повлияет на интенсивность выделения биологически активных веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие системного воспалительного ответа на введение сублетальной дозы бактериального липополисахарида не вызывает усиления миграции мастоцитов в кожу, но обуславливает изменение секреторных процессов в них.

В мастоцитах усиливается выделение секреторных продуктов способом постепенной дегрануляции.

Изменения способа выделения биологически активных веществ мастоцитами вследствие взаимодействия липополисахарида с толл-подобными рецепторами-4 при отсутствии воспалительных изменений в дерме указывает на возможное изменение профиля выделяемых секреторных продуктов, что может лежать в основе патогенеза ряда заболеваний кожи, ассоциированных с инфекционными заболеваниями.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА

1. Афанасьева А.Н., Одинцова И.Н., Удут В.В. Синдромы эндогенной интоксикации и системного воспалительного ответа: общность и различия. Анестезиология и реаниматология. 2007;4:67–71.
2. Di Nardo A., Yamasaki K., Dorschner R., Lai Y., Gallo R. Mast Cell Cathelicidin Antimicrobial Peptide Prevents Invasive Group A Streptococcus Infection of the Skin. The Journal of Immunology. 2008;180(11):7565–7573. doi:10.4049/jimmunol.180.11.7565

3. Malaviya R., Abraham S. N. Mast cell modulation of immune responses to bacteria. *Immunol. Rev.* 2001;179:16–24. doi:10.1034/j.1600-065x.2001.790102.x

4. Piliponsky A., Acharya M., Shubin N. Mast Cells in Viral, Bacterial, and Fungal Infection Immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(12):2851. doi:10.3390/ijms20122851

5. Жилин С.А., Радченко В.Г., Добрица В.П. Внекишечные проявления воспалительных заболеваний кишечника. Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. 2013;5(2):111–117.

6. Летаева О.В., Филимонкова Н.Н. Красный плоский лишай. Обзор литературы. Уральский медицинский журнал. 2011;8(86):105–109.

7. Сорокина Е.В., Ахматова Н.К., Сходова С.А., Масюкова С.А., Чалая Е.Л. Эффекторы врожденного иммунитета в патогенезе и дифференциальной диагностике эритем. *Клиническая дерматология и венерология.* 2017;16(2):24–32.

8. Corouhi F., Davari P., Fazel N. Cutaneous and mucosal lichen planus: A comprehensive review of clinical subtypes, risk factors, diagnosis, and prognosis. *Scientific World Journal.* 2014;748286. doi: 10.1155/2014/748286

9. Arifuzzaman M., Mobley Y.R., Choi H.W., Bist P., Salinas C.A., Brown Z.D., Chen S.L., Staats H.F., Abraham S.N. MRGPR-mediated activation of local mast cells clears cutaneous bacterial infection and protects against reinfection. *Sci. Adv.* 2019;5(1):eaav0216. doi: 10.1126/sciadv.aav0216

10. Яглова Н.В., Яглов В.В. Биология секреции тучных клеток. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2012;4:4–10.

11. Crivellato E., Nico B., Gallo V., Ribatti D. Cell secretion mediated by granule-associated vesicle transport: a glimpse at evolution. *The anatomical record.* 2010;293(7):1115–1124. doi:10.1002/ar.21146.

12. Яглова Н.В., Яглов В.В. Секреция тучных клеток щитовидной железы при воздействии тиреотропного гормона. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2012;2:36–40.

13. Lindau M., Gomperts B. Techniques and concepts in exocytosis: focus on mast cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991;1071(4):429–471. doi:10.1016/0304-4157(91)90006-i.

14. Ikeda T., Funaba M. Altered function of murine mast cells in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Immunol. Lett.* 2003;88(1):21–26. doi:10.1016/s0165-2478(03)00031-2.

15. Leal-Berumen I., Conlon P., Marshal J. IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 1994;152(11):5468–5476.

16. McCurdy J., Lin T.-J., Marshal J. Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *Journal of Leukocyte Biology.* 2001;70:977–984. doi:10.1189/jlb.70.6.977.

17. Яглова Н.В., Яглов В.В. Ультраструктурные проявления молекулярного способа выделения секреторного материала тучными клетками щитовидной железы при воздействии липополисахарида. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2013;155(2):229–232.

18. Яглова Н.В. Цитофизиологические особенности популяции тучных клеток щитовидной железы при воздействии липополисахарида. *Морфологические ведомости.* 2008;3-4:94–98.

19. Melo R., Spencer L., Perez S., Ghiran I., Dvorak A.F., Weller P. Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartment. *Traffic.* 2005;6(11):1047-1057. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00344.x

REFERENCES

1. Afanasyeva A.N., Odintsova I.N., Udut V.V. Syndrome of endogenous intoxication and systemic inflammatory response: similarity and differences. *Russian Journal of Anaesthesiology and Reanimatology «Anesteziologiya i reanimatologiya».* 2007;4:67–71. (In Russ).

2. Di Nardo A., Yamasaki K., Dorschner R., Lai Y., Gallo R. Mast Cell Cathelicidin Antimicrobial Peptide Prevents Invasive Group A Streptococcus Infection of the Skin. *The Journal of Immunology.* 2008;180(11):7565–7573. doi:10.4049/jimmunol.180.11.7565.

3. Malaviya R., Abraham S.N. Mast cell modulation of immune responses to bacteria. *Immunol. Rev.* 2001;179:16–24. doi:10.1034/j.1600-065x.2001.790102.x.

4. Piliponsky A., Acharya M., Shubin N. Mast Cells in Viral, Bacterial, and Fungal Infection Immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(12):2851; doi:10.3390/ijms20122851.

5. Zhilin S. A., Radchenko V.G., Dobritsa V.P. Extra intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Herald of North-Western state medical university named after I.I. Mechnikov.* 2013;5(2):111–117. (In Russ).

6. Letaeva O.V., Filimonkova N.N. Lichen planus. Review. *Ural Medical Journal.* 2011;8(86):105–109. (In Russ).

7. Sorokina E.V., Akhmatova N.K., Skhodova S.A., Masyukova S.A., Chalajadai E.L. Effectors of innate immunity in the pathogenesis and differential diagnosis of erythema. *Russian Journal of dermatology and Venereology.* 2017;16(2):24–32. doi:10.17116/klinderma201716224-32. (In Russ).

8. Corouhi F., Davari P., Fazel N. Cutaneous and mucosal lichen planus: A comprehensive review of clinical subtypes, risk factors, diagnosis, and prognosis. *Scientific World Journal.* 2014;748286. doi: 10.1155/2014/748286.

9. Arifuzzaman M., Mobley Y.R., Choi H.W., Bist P., Salinas C.A., Brown Z.D., Chen S.L., Staats H.F., Abraham S.N. MRGPR-mediated activation of local mast cells clears cutaneous bacterial infection and protects against reinfection. *Sci. Adv.* 2019;5(1):eaav0216. doi: 10.1126/sciadv.aav0216.

10. Yaglova N.V., Yaglov V.V. Biology of mast cell secretion. *Clinical and Experimental Morphology*. 2012;4:4–10. (In Russ).
11. Crivellato E., Nico B., Gallo V., Ribatti D. Cell secretion mediated by granule-associated vesicle transport: a glimpse at evolution. *The anatomical record*. 2010;293(7):1115–1124. doi: 10.1002/ar.21146.
12. Yaglova N.V., Yaglov V.V. Secretion of thyroid mast cells induced by thyroid-stimulating hormone. *Clinical and Experimental Morphology*. 2012; 2:36–40. (In Russ).
13. Lindau M., Gomperts B. Techniques and concepts in exocytosis: focus on mast cells. *Biochim. Biophys. Acta*. 1991;1071(4):429–471. doi:10.1016 / 0304-4157 (91) 90006-i.
14. Ikeda T., Funaba M. Altered function of murine mast cells in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Immunol. Lett*. 2003;88(1):21–26. doi: 10.1016/s0165-2478(03)00031-2.
15. Leal-Berumen I., Conlon P., Marshal J. IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol*. 1994;152(11):5468–5476.
16. McCurdy J., Lin T.-J., Marshal J. Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2001;70:977–984. doi.org/10.1189/jlb.70.6.977.
17. Yaglova N.V., Yaglov V.V. Ultrastructural Characteristics of Molecular Release of Secretory Products from Thyroid Mast Cells Induced by Lipopolysaccharide. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013;155(2):260–263.
18. Yaglova N.V. Altered cytophysiology of thyroid mast cells in response to lipopolysaccharide. *Morphological Newsletter*. 2008;3-4:94–98. (In Russ).
19. Melo R., Spencer L., Perez S., Ghiran I., Dvorak A.F., Weller P. Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartment. *Traffic*. 2005;6(11):1047-1057. DOI: 10.1111 /j.1600-0854.2005.00344.x.

ДИАГНОСТИКА COVID-19: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ В ОТРАСЛИ

Горбунов А. А., Сорокина Л. Е., Чегодарь Д. В., Кубышкин А. В., Фомочкина И. И.

Кафедра общей и клинической патофизиологии, Медицинская академия имени С.И.Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И.Вернадского», 295051, бульвар Ленина 5/7, Симферополь, Россия

Для корреспонденции: Фомочкина Ирина Ивановна, доктор медицинских наук, профессор кафедры общей и клинической патофизиологии, Медицинская академия имени С. И. Георгиевского, ФГАОУ ВО «КФУ им.В.И. Вернадского», e-mail: fomochkina_i@mail.ru

For correspondence: Fomochkina I. I., MD, Professor of the Department of General and Clinical Pathophysiology of Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: fomochkina_i@mail.ru

Information about authors:

Gorbunov A. A., <https://orcid.org/0000-0002-2886-6178>

Sorokina L. E., <http://orcid.org/0000-0002-1862-6816>

Chegodar D. V., <https://orcid.org/0000-0001-8067-6411>

Kubyshkin A. V., <https://orcid.org/0000-0002-1309-4005>

Fomochkina I. I., <https://orcid.org/0000-0003-3065-5748>

РЕЗЮМЕ

SARS-CoV-2 – это новый представитель мира вирусологии, относящийся к коронавирусам и способный вызвать широкий диапазон заболеваний дыхательной системы: от незначительных проявлений рутинной вирусной инфекции до респираторного дистресс-синдрома с тяжелой дыхательной недостаточностью. Патогенез новой коронавирусной инфекции (COVID-19) связан со способностью SARS-CoV-2 связываться с АПФ-рецепторами и в последующем активировать IL-6 – главный стимулятор «цитокинового шторма» в организме. Именно благодаря таким особенностям патогенеза вируса необходимо раннее и точное выявление как активных форм, так и вирусоносительства. В представленном обзоре рассматривается весь спектр основных методов диагностики, со сравнением эффективности и указанием условий использования, новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2: от применяющихся на данный момент методов (ОТ-ПЦР, ИФА) к потенциально возможным (ОТ-LAMP, CRISPR), а также тем, которые находятся в стадии разработки (хемилюминесценция).

Ключевые слова: SARS-CoV2, COVID-19, диагностика, ОТ-ПЦР, ИФА.

COVID-19 DIAGNOSTICS: CURRENT STATE OF THE PROBLEM AND PROSPECTS IN THE BRANCH

Gorbunov A. A., Sorokina L. E., Chegodar D. V., Kubishkin A. V., Fomochkina I. I.

Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU

SUMMARY

SARS-CoV-2 is a new representative of the world of virology related to coronaviruses and can cause a wide range of diseases of the respiratory system: from colds to acute respiratory distress-syndrome with severe respiratory failure. The pathogenesis of a new coronavirus infection (COVID-19) is associated with the ability of SARS-CoV-2 to bind to ACE receptors and subsequently activate IL-6, the main stimulator of the "cytokine storm". Due to such features of the viral pathogenesis, early and accurate detection of active forms, as well as virus carriage are needed. In review, the whole spectrum of the main diagnostic methods is represented, with a comparison of the effectiveness and conditional indication of COVID-19: from the currently used methods (RT-PCR, ELISA) to potentially possible (OT-LAMP, CRISPR), as well as those still under development (chemiluminescence).

Key words: SARS-CoV-2, COVID-19, diagnostics, RT-PCR, ELISA.

Первая половина наступившего 2020 года ознаменовалась важными для всего человечества событиями в области общественного здравоохранения: 30 января на втором заседании Чрезвычайного комитета ВОЗ эпидемия, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, была признана «чрезвычайной ситуацией, имеющей международное значение» [1; 2]. Пандемия привлекла к себе внимание специалистов во всем мире, так

как ранее коронавирусные инфекции у людей не выходили за пределы допустимого уровня биологического риска, однако последствия произошедших мутаций этих вирусов указывают на то, что трансформации последних могут приводить к непредвиденным последствиям. Таким образом, на сегодняшний день все более актуальным становится вопрос о необходимости своевременной высокоточной диагностики ко-

ронавирусной инфекции. Повсеместное внедрение диагностических тестов позволит не только уточнить эпидемиологическую ситуацию, но и сформировать целостное представление об основных патогенетических звеньях заболевания, а также повысить качество проводимых лечебных и профилактических мероприятий.

Коронавирусы, получившие свое название благодаря некоторым морфологическим особенностям, являются членами крупного ареала РНК-вирусов *Riboviria*. Согласно современной номенклатуре они входят в порядок *Nidovirales*, субпорядок *Cornidovirineae*, семейство *Coronaviridae*, подсемейство *Orthocoronavirinae*. В контексте данного обзора особый интерес представляют виды из подродов *Sarbecovirus* и *Merbecovirus*, среди которых имеются возбудители опасных инфекционных заболеваний человека, а именно SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2. В 2002-2003 гг. вирус SARS-CoV вызвал вспышку атипичной пневмонии в 24 странах, что привело к заражению 8096 человек. Распространение MERS-CoV наблюдалось в 2015 г. в Южной Корее, где показатели заболеваемости и смертности составили 2494 человек и 872 человека соответственно [1].

Генетическая информация коронавирусов представлена в виде плюс-цепи линейной одноцепочечной РНК. Транскрипционный процесс у коронавирусов происходит путем синтеза с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) негативной цепи, служащей в дальнейшем матрицей для наработки плюс-цепей РНК. Размеры геномов у большинства известных коронавирусов

варьируют от 27 до 32 тысяч нуклеотидов [1]. Нуклеиновая кислота нового возбудителя, SARS-CoV-2, была выявлена в декабре 2019 г. у пациента с пневмонией в городе Ухань провинции Хубэй в Китае. 7 января 2020 г. после тщательного микробиологического анализа данный возбудитель был отнесен к семейству *Coronaviridae*, а болезнь, которую вызывает вирус, ВОЗ назвали COVID-19 [2]. Его геном представлен +sРНК длиной 30kb (29891 нуклеотид, G+C=38%) и имеет следующий порядок: [5'-ORFs-структурные белки: S-E-M-N-3']. Вирус состоит из 4 структурных полипротеинов: S – поверхностный, спайчный белок; M – мембранный белок; E – оболочечный белок; N – нуклеокапсидный белок [3]. У данного вируса имеется по меньшей мере 6 открытых рамок считывания (ORFs). Первая рамка – ORF1a/b – занимает примерно 2/3 длины генома и кодирует 16 неструктурных белков (nsp1-16). Между ORF1a и ORF1b происходит сдвиг на 1 рамку считывания, что приводит к образованию двух полипептидов: pp1a и pp1ab. Эти полипептиды в дальнейшем обрабатываются вирус-кодируемой химотрипсиноподобной протеазой (или основной протеазой), а также одной или двумя папаиноподобными протеазами с расщеплением двух полипептидов на 16nsp [3, 4]. Неструктурные белки формируют в двумембранных везикулах репликационно-транскрипционный комплекс (РТК), в котором синтезируется набор субгеномных РНК между открытыми рамками считывания ORFs. Организация генома вируса SARS-CoV-2, по данным ряда авторов [5-8], показана на рис. 1.



Рис. 1. Упрощенная схема геномной организации бетакоронавирусов (масштаб не соблюден). 5'-UTR – 5'-нетранслируемая область, ORF1a/b (replicase/transcriptase) кодирует 16 неструктурных белков (NSP), S – белок зубца короны (spike), E – малый белок оболочки (envelope), M – мембранный гликопротеин (membrane), N – нуклеокапсидный белок (nucleocapsid), 3'-UTR – 3'-нетранслируемая область

В патогенезе SARS-CoV-2 важную роль играет субъединица S1 гликопротеина S, которая связывается с мембранным белком – ангиотензинпревращающим ферментом 2 (АПФ2) на поверхности альвеолоцитов II типа, энтероцитов тонкого кишечника, эндотелиоцитов, а также гладкомышечных клеток [9; 10; 11]. АПФ2 представляет собой компонент ренин-ангиотензиновой системы, металлопротеиназу, уравнивающую функцию АПФ и отрица-

тельно регулирующий уровень ангиотензина II (рисунок 2.). Первым этапом жизненного цикла вируса является рецепторная адсорбция вирусной частицы на поверхности клетки-мишени в результате специфического связывания первой субъединицы спайкового белка S1 с клеточным рецептором. Для SARS-CoV-2 таковым является как раз АПФ2 [12].

После рецепторного связывания с поверхностью клетки-мишени последующие стадии –

общие для всех коронавирусов: рецептор-опосредованный эндоцитоз завершается проникновением вирусного нуклеокапсида в цитоплазму клетки-хозяина, где вирионная РНК выступает в качестве мРНК для синтеза двух протяжённых полипротеинов pp1a и pp1ab длиной порядка 2000 и 7000 аминокислотных остатков, соответственно. pp1ab включает в себя pp1a и образуется в результате игнорирования рибосомой

в 20-30 % случаев стоп-сигнала из-за шпильки, смещающей рамку считывания [13]. Надо иметь в виду, что pp1a и pp1ab не существуют в клетке как единые молекулы и котрансляционно нарезаются протеазами на 16 неструктурных белков, регулирующих дальнейшую репликацию и, в частности, преобразующих складки эндоплазматического ретикулума в своеобразные «фабрики» для поздних стадий репликации вируса [14].

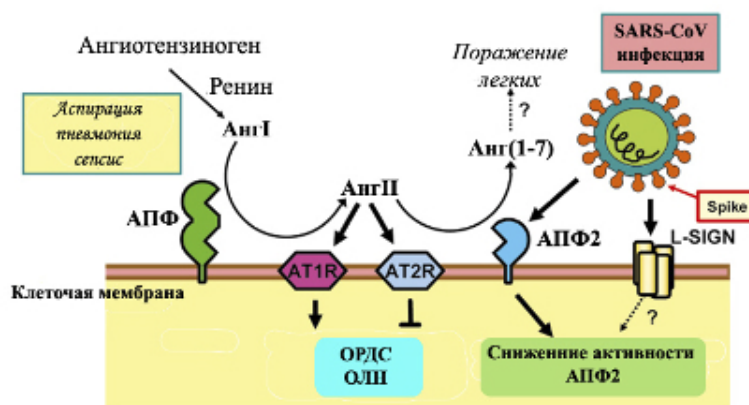


Рис.2. Принципиальная схема роли ренин-ангиотензиновой системы в развитии острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), острой легочной недостаточности (ОЛН) и атипичной коронавирусной пневмонии. Анг I – ангиотензин I, Анг II – ангиотензин II, АТ1R – рецептор ангиотензина II типа 1, АТ2R – рецептор ангиотензина II типа 2, АПФ – ангиотензин превращающий фермент, Spike – субъединица S1 гликопротеина S для связывания с рецептором АПФ (Yumiko Imai, et al., Circulation Journal, 2020).

Одним из важнейших неструктурных белков является РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp), которая синтезирует комплементарную вирионной нить РНК отрицательной полярности, которая, в свою очередь, выступает в качестве матрицы для синтеза геномных РНК (войдут в состав дочерних вирионов). Помимо этого, RdRp синтезирует на матрице геномной РНК серию субгеномных РНК отрицательной полярности (сгРНК-) с разрывом цепи и переносом её к 3'-концу матрицы, в результате чего все сгРНК-этой серии имеют одинаковые 5'- и 3'-фланги и центральные части различной степени вложенности друг в друга. Далее сгРНК- используются в качестве матрицы для синтеза субгеномных матричных РНК положительной полярности, с которых считываются структурные белки. Сборка дочерних вирионов происходит в эндоплазматическом ретикулуме, и затем они покидают клетку хозяина путём экзоцитоза [4].

Морфологическим субстратом патогенеза средне-тяжелых и тяжелых форм COVID 19 является диффузное альвеолярное повреждение: вирус вызывает повышение проницаемости клеточных мембран и усиленный транспорт жидкости, богатой альбумином, в интерстициальную ткань лёгкого и просвет альвеол – раз-

вивается интерстициальный и альвеолярный отек. При этом нарушается синтез сурфактанта, развивается коллапс альвеол, в результате резкого нарушения газообмена развивается острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) [15; 16]. Иммуносупрессивное состояние больного способствует развитию оппортунистических бактериальных и микотических инфекций респираторного тракта. Данные о длительности и напряженности иммунитета в отношении SARS-CoV-2 в настоящее время отсутствуют. Иммунитет при инфекциях, вызванных другими представителями семейства коронавирусов, нестойкий, и возможно повторное инфицирование.

Инфекционный процесс сопровождается выработкой антител двух типов: IgM и IgG. IgM-антитела производятся первыми, их уровень быстро нарастает в начале инфекции, достигая максимума в острый период болезни, а затем постепенно снижается, полностью исчезая к моменту выздоровления. IgG-антитела появляются в крови в острой стадии инфекционного процесса, но максимальная их выработка происходит обычно через 10-14 дней после перенесенной инфекции. Есть данные о том, что уровень IgG и IgM против внутреннего и поверхностного нуклеопротеина SARS-CoV-2 коррелировал с ней-

трализирующей активностью. Время сероконверсии имеет решающее значение для определения оптимальных сроков сбора образцов сыворотки с целью изучения динамики болезни и разработки моноклональных антител в качестве терапевтического агента [17].

Приоритетной проблемой и направлением в борьбе с новой коронавирусной инфекцией является разработка и внедрение валидных и быстрых методов выявления SARS-CoV-2.

«Золотым стандартом» на данный момент является полимеразная цепная реакция (ПЦР) с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР), направленная на обнаружение генов N, E, RdRp и др. [18]. Есть сообщения о разработке двух одноступенчатых количественных ОТ-ПЦР-анализов, обнаруживающих области ORF1b и N вирусного генома [20]. Наборы для количественной ПЦР на основе флуоресценции в течение короткого промежутка времени стали широко использоваться для лабораторного подтверждения заболевания в Китае; тогда же стал доступен целый ряд коммерческих тестов [1]. Для лабораторного подтверждения заболевания необходимы положительные результаты как по гену ORF1ab, так и по гену N.

Несколько позже китайскими учеными был разработан новый анализ ОТ-ПЦР в реальном времени, нацеленный на РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp)/хеликазу (Hel) (COVID-19-RdRp/HEL-анализ) с низким пределом обнаружения (1,8 TCID₅₀/мл с геномной РНК и 11,2 копии РНК/реакция с транскриптами РНК *in vitro*). Сравнительный анализ его с RdRp-P2, используемым в настоящее время в европейских лабораториях, показывает более высокую точность в определении возбудителя. Так, COVID-19-RdRp/Hel был положительным для дополнительных 42 RdRp-P2-отрицательных образцов (119 из 273 (43,6%) против 77 из 273 (28,2%) $P < 0,001$) COVID-19-RdRp/Hel не вступал в перекрестную реакцию с другими патогенными коронавирусами человека и респираторными патогенами в клеточной культуре и клинических образцах, в то время как анализ RdRp-P2 перекрестно реагировал с SARS-CoV в клеточной культуре [20; 21]. Еще одной разновидностью ОТ-ПЦР (на основе SYBR Green) стал альтернативный протокол-набор для диагностики COVID-19, состоящий из фарингеального тампона для самостоятельного сбора образцов, реактивов для очистки РНК на основе Тризола и др. [22].

До сих пор обсуждается спектр сред организма, определение возбудителя COVID-19 в которых будет наиболее точным и простым в применении. Так, в литературе имеются данные о

результате ПЦР-тестирования образцов стула и ротоглотки и изучение корреляционных связей полученных данных [23]. В более крупном исследовании проанализировано в общей сложности 1070 различных образцов, собранных у 205 пациентов с COVID-19 [24]. Наиболее точные результаты получены при анализе бронхоальвеолярного лаважа (93%), за которым следовали мокрота (72%), мазки из носа (63%), анализ содержимого кисти фибробронхоскопа (46%), мазки из глотки (32%), анализ образцов стула (29%) и кровь (1%); при этом ни один из 72 образцов мочи не дал положительного результата. Благодаря простоте сбора материала, еще одной средой для выявления генома SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР стал конденсат выдыхаемого воздуха (ЕВС) в качестве образца. В перспективе, данный вариант отбора проб для определения возбудителя может быть использован в масштабных скрининговых исследованиях пациентов с подозрением на COVID-19 [25].

Несмотря на все достоинства ОТ-ПЦР, при анализе и сопоставлении результатов были выявлены и проблемы, основной из которых стала необходимость повторной постановки реакции, в том числе с образцами, полученными из нижних дыхательных путей, в ситуации отрицательного результата ОТ-ПЦР и наличия клинических проявлений COVID-19 [26]. Проанализировав опубликованные наборы праймеров и их соответствии 77 общедоступным последовательностям генома SARS-CoV-2 было установлено, что пять наборов праймеров ОТ-ПЦР (нацеленных на Orf1ab или ген N) потенциально могут давать ложноотрицательные результаты, связанные с влиянием эволюционных процессов на вирусный геном. Для минимизации рисков получения ложноотрицательных или сомнительных результатов целесообразно ориентироваться на консервативный ген nsp12 (RdRp), проводить комплексное клиничко-лабораторное обследование (например, ОТ-ПЦР и компьютерную томографию органов грудной полости), придерживаться высоких стандартов в вопросах процедуры отбора проб, следовать стандартам надлежащей лабораторной практики и т.п. [27].

Наряду с ОТ-ПЦР, актуальными методами диагностики новой коронавирусной инфекции, основывающимся на молекулярном строении SARS-CoV-2, являются петлевая изотермическая амплификация с обратной транскрипцией (ОТ-LAMP) и амплификация рекомбинантной полимеразы обратной транскрипции (ОТ-PRA), которые обладают рядом преимуществ: высокой специфичностью, быстротой и легкостью в использовании. Предлагаемые методы, используемые для детекции MERS-CoV, можно при-

менять и для раннего выявления SARS-CoV-2. Еще одним вариантом экспресс-скрининговой диагностики (требуемое время составляет до 30 минут) является обратная транскрипционная петлевая изотермическая амплификация (RT-LAMP) [28]. Многообещающей с точки зрения быстроты (время постановки варьирует от 15 до 40 минут) и высокой чувствительности (97,6%) стала разработка китайских исследователей на основе LAMP, в которой в качестве амплифицирующего фрагмента взят ген ORF1ab [29].

Несмотря на то, что главное предназначение CRISPR/Cas технологии заключается в проведении геномного редактирования, тем не менее отдельные компоненты этих систем находят применение и в других областях [30; 31]. Так, в частности, с использованием CRISPR/Cas технологии недавно разработана высокоспецифичная и чувствительная CRISPR-nCoV система детекции нового коронавируса SARS-CoV-2 [32]. В ее основе лежит RPA амплификация, сопровождаемая транскрипцией полученных ампликонов, несущих в составе одного из праймеров на 5'-конце экстрапоследовательность нуклеотидов, соответствующую фаговому промотору T7, с помощью которого T7 РНК полимеразы нарабатывает множество копий молекул РНК, после чего включается нацеленная на разрушение молекул РНК Cas13a нуклеаза, формирующая со специальной sgРНК рибонуклеопротеидный комплекс, причем данная sgРНК несет гидовую последовательность, узнающую выбранную мишень на бетакоронавирусной РНК. При этом в растворе присутствует еще специальный репортерный рибоолигонуклеотид. Нуклеаза Cas13a после активации фермента специфичной РНК, соответствующей участку-мишени SARS-CoV, за счет своей коллатеральной активности расщепляет уже неспецифически все присутствующие в реакционной смеси молекулы РНК, а так как специально добавленные репортерные молекулы РНК несут флуорохром и гаситель, то после физического разобщения последних, вследствие разрушения всех подряд молекул РНК, флуоресцентный краситель начинает светиться, что и регистрируется с помощью соответствующих устройств. Чувствительность данного теста находится на уровне единичных молекул вируса, а время, затрачиваемое на всю детекцию, составляет 40 минут, из которых 30 минут уходит на RPA амплификацию, а 10 минут – на CRISPR детекцию.

Другой группой исследователей была разработана система детекции SARS-CoV-2 также на основе CRISPR/Cas технологии, названная All-In-One-Dual CRISPR-Cas12a (AIOD-CRISPR) [33]. В ней так же, как и в описанном выше

подходе, на первой стадии применяется RPA амплификация с той лишь разницей, что далее используется Cas12a нуклеаза, которая разрушает ДНК, и поэтому не требуется использование праймера с T7 промотором, а в качестве репортерных молекул служат подобные олигонуклеотиды с дезоксирибозой, несущие соответствующие флуорохром и гаситель флуоресценции. Подобная же работа по детекции SARS-CoV-2 с помощью CRISPR/Cas технологии с нуклеазой Cas12 выполнена еще одним международным коллективом, с той лишь разницей, что детекция результатов амплификации осуществляется двумя методами – регистрацией флуоресценции и тонкослойной хроматографией на бумаге [34].

Описан метод диагностики SARS-CoV-2 с использованием Cas12 нуклеазы с использованием тонкослойной хроматографии, получивший название SARS-CoV-2 DETECTR test. При этом на первой стадии для наработки продуктов амплификации применяется LAMP технология [35]. Данный тест завершается менее чем за 40 минут, из которых в течение первых 20-30 минут проводится петлевая амплификация, после чего 10 минут необходимо для Cas12 нуклеазы и разрушения репортерных олигонуклеотидов. Дополнительно две минуты затрачиваются на хроматографию. Анализ нескольких десятков образцов, как здоровых, так и больных с помощью SARS-CoV-2-DETECTR test продемонстрировал высокую чувствительность и специфичность: 95% для положительных результатов и 100% – для отрицательных. Сравнение ОТ-ПЦР с SARS-CoV-2 DETECTR test позволяет надеяться на то, что последний при сходной чувствительности будет иметь некоторое преимущество по времени и доступности используемого оборудования, однако невозможен в количественном варианте.

В последнее время широкое применение для определения точной величины титра антител к SARS-CoV-2 находит иммуноферментный анализ (ИФА) [36]. Метод основан на взаимодействии иммобилизованного в лунках планшета антигена коронавируса со специфическими антителами из исследуемой пробы сыворотки и последующем выявлении полученного комплекса конъюгатом (меченными пероксидазой хрена специфическими антителами к IgG). Связанная пероксидаза вызывает разложение находящейся в хромоген-субстратном растворе перекиси водорода и окисление хромогена. В лунках развивается окраска, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству антител в определяемой пробе. Для уточнения диагноза проводят повторные исследования клинического материала с интервалом 2–4 недели. Снижение

или увеличение титра антител напрямую связано с течением инфекционного процесса [37; 38]. Описаны протоколы ИФА для выявления антител к SARS-CoV-2, а также накоплены данные, полученные с помощью коммерческих наборов [36].

В доступной литературе уже есть результаты первых исследований на основе ИФА, посвященных изучению гуморального ответа на SARS-CoV-2. Так, выполнение анализов с использованием рекомбинантного вирусного нуклеокапсида (N) по изучению IgA, IgM и IgG в 208 образцах плазмы из 82 подтвержденных и 58 вероятных случаев заболевания COVID-19 показало диагностическую ценность определения IgM [39]. Медиана времени обнаружения антител IgM и IgA составила 5 дней, в то время как IgG был обнаружен на 14-й день после появления симптомов, причем положительная частота составила 85,4%, 92,7% и 77,9% соответственно. В подтвержденных и вероятных случаях положительные показатели IgM-антител составили 75,6% и 93,1% соответственно. Эффективность обнаружения новой коронавирусной инфекции путем определения IgM с помощью ИФА была выше, чем у метода ОТ-ПЦР, спустя 5 дней после появления первых симптомов. Положительная частота обнаружения значительно возросла (до 98,6%) при комбинированном анализе IgM с помощью ИФА и ОТ-ПЦР для каждого пациента по сравнению с одним тестом ОТ-ПЦР (51,9%).

Иммунологическое тестирование было также проведено у 16 пациентов в Гонконге с использованием образцов сыворотки крови, собранных через 14 дней или более после появления симптомов [4]. Были зарегистрированы следующие показатели серопозитивности: 94% для анти-N IgG (n=15), 88% для анти-N IgM (n=14), 100% для анти-RBD (рецепторсвязывающий домен) IgG (n=16) и 94% для анти-RBD IgM (n=15). Уровни IgG анти-SARS-CoV-2-N или анти-SARS-CoV-2-RBD коррелировали с титром нейтрализации вируса ($R^2 > 0.9$). В исследовании, выполненном группой китайских ученых под руководством Fan Wu и Aojie Wang, охарактеризована реакция со стороны антител у 175 выздоровевших пациентов, у которых новая коронавирусная инфекция протекала в легкой форме [40]. Параллельно ученые контролировали уровни специфических нейтрализующих антител (NAbs) к SARS-CoV-2 (анализ нейтрализации на основе псевдотипированных лентивирусных векторов) и S-связывающих антител (ИФА с использованием белков RBD, S1 и S2). SARS-CoV-2-специфичные NAbs были обнаружены у пациентов с 10-15-го дня после начала заболева-

ния и сохранялись после исчезновения симптомов. Перекрестной реактивности с SARS-CoV не наблюдалось. Титры NAbs коррелировали с S-связывающими антителами, нацеленными на области S1, RBD и S2. Пациенты пожилого и среднего возраста имели достоверно более высокие титры NAbs в плазме крови ($p < 0,0001$) и S-связывающих антител ($p = 0,0003$), чем молодые пациенты. Интересен тот факт, что имела место положительная корреляция титров NAbs с уровнем С-реактивного белка в плазме крови, и отрицательная с количеством лимфоцитов у пациентов на момент поступления, что указывает на связь между гуморальным и клеточным иммунным ответом при COVID-19.

В исследовании Catalan-Dibene J., опубликованном в "Nature Reviews Immunology", продемонстрировано наличие вирусспецифичных В-клеток памяти, распознающих рецепторсвязывающий домен белка S у инфицированных SARS-CoV-2 пациентов [41]. Вирусологи наблюдали перекрестную активность антител у этих пациентов против S-белков SARS-CoV-2, но не против RBD SARS-CoV-1. С помощью секвенирования получено 206 специфичных к SARS-CoV-2 RBD моноклональных антител; причем два клона показали 98-99% блокирование вирусного входа, что коррелировало с высокой конкурирующей способностью против рецептора АПФ.

Проведен сравнительный анализ специфичности и эффективности определения антител (IgG и IgM) посредством ИФА и иммунохроматографической серодиагностики с применением коллоидного золота (ИХГ) [42]. В исследовании использовано 63 образца для ИФА и 91 образец плазмы для ИХГ и обнаружена чувствительность комбинированного ИФА IgM и ИФА IgG, которая составила 87,3%, а также чувствительность ИХГ – 82,4%. Оба метода показали специфичность 100%. Liu Y. и соавторы сообщили об оценке N-и S-белковых IgM и IgGc помощью ИФА у 214 подтвержденных пациентов с COVID-19 [43]. Чувствительность S-основанного ИФА обнаружения IgM была значительно выше, чем у N-основанного ИФА. Рост чувствительности по обнаружению IgM и IgG наблюдался с увеличением числа дней от начала заболевания: так, положительная частота N-и S-основанных IgM и IgG была менее 60% на ранней стадии (0-10-й день) заболевания и повышалась через 10 дней.

Следует отметить, что серологические методы обладают рядом преимуществ: возможность выявления пациентов с высоким уровнем иммунного ответа для формирования когорты потенциальных доноров сывороток из реконвалесцентов;

скрининговое выявление тех, кто уже обладает иммунитетом (как среди медицинских работников, так и в популяции в целом) и т.д. При этом многие аспекты серологической диагностики продолжают оставаться предметом для дальнейших исследований, а именно: коррелируют ли титры антител со степенью иммунологической толерантности к COVID-19; какие именно изо-типы антител и уровни реактивности могут свидетельствовать о силе иммунного ответа; защищены ли пациенты с антителами к SARS-CoV-2 от повторного заражения; насколько реагенты для ИФА, созданные на основании азиатского штамма могут быть использованы для пациентов, инфицированных вирусами европейского происхождения и т.п. Серологический метод не лишен и недостатков, к которым можно отнести: чувствительность менее 60% на ранней стадии заболевания (день 0-8); необходимость обнаружения антител против 2 разных антигенов во избежание ложноотрицательных результатов; возможное наличие у пациентов системных заболеваний соединительной ткани и/или нарушений пуринового обмена, которые могут привести к ложноположительной реактивности и т.п. [44; 45].

В связи с этим ряд исследователей рекомендуют «двойной» контроль: серологическую и молекулярную диагностику, который в комплексе дает максимальную валидность и исключает диагностические «упущения». Так, в исследовании Zhao R. и соавторы изучали динамику общего количества антител, IgM и IgG, против SARS-CoV-2 в серийных образцах крови, полученных у 173 подтвержденных пациентов с COVID-19 [46]. Антитела были обнаружены у <40% пациентов в течение 1 недели с момента начала заболевания и быстро увеличились до 94,3% – IgM и 79,8% – IgG к 15-му дню от начала заболевания. Напротив, выявляемость РНК с помощью ОТ-ПЦР снизилась с 66,7% в образцах, собранных до 7-го дня, до 45,5% между 15-м и 39-м днями. Таким образом, обнаружение РНК с помощью молекулярных методов и серологическая диагностика в комплексе значительно повышают чувствительность при выполнении диагностики COVID-19. При этом во избежание ложноотрицательных результатов целесообразно обнаружение антител против 2 различных (S- и N-основанных) антигенов [45].

В связи с вышеописанными особенностями и недостатками имеющихся диагностических инструментов в диагностике COVID-19 много нерешенных вопросов, которые требуют дальнейшего внимания исследователей, как с точки зрения совершенствования имеющихся методов, так и со стороны решения фундаментальных научных задач.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сегодня уже стало очевидно, что новый вирус SARS-CoV-2 через некоторое время встанет в одну линейку с существующими вирусами и будет периодически приводить к вспышкам COVID-19. В связи с этим, оптимальное планирование профилактических и лечебных мероприятий требует налаживания точной диагностики. Чем больше чувствительность и специфичность тест-систем, тем более точно можно определить состояние пациента и спланировать лечебную тактику. С этой целью ведется разработка новых методов и подходов для раннего выявления вируса. На данный момент «золотым стандартом» диагностики COVID-19 является ОТ-ПЦР с КТ органов грудной клетки. Однако продолжают исследования по разработке инновационных молекулярно-биологических методик, основанных на изотермической амплификации и ее модификации, хемилюменисценции, CRISPR/Cas технологии и ряда других, что позволит существенно расширить возможности диагностики.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wang M., Wu Q., Xu W. Clinical diagnosis of 8274 samples with 2019-novel coronavirus in Wuhan. doi :10.1101/2020.02.12.20022327v1.full.pdf.
2. WHO, Novel Coronavirus (2019-nCoV).
3. Chan J. F., Yuan S., Kok K. H., To K. K., Chu H., Yang J., Xing F., Liu J., Yip C. C. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *Lancet*. 2020 . pii: S0140-736(20)30154-9. [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-736\(20\)30154-9/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-736(20)30154-9/fulltext)
4. Chen Y., Li L. SARS-CoV-2: virus dynamics and host response. *Lancet Infect Dis*. 2020. pii: S1473-3099(20)30235-8. [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(20\)30235-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(20)30235-8/fulltext)
5. te Velthuis A.J., Fodor E. Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nat Rev Microbiol*. 2016;18:473–493.
6. Kirchdoerfer R.N., Ward A.B. Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. *Nature communications*. 2019;10(1):1-9.
7. Ogando N.S., Ferron F., Decroly E., Canard B., Posthuma C., Snijder E. The Curious Case of the Nidovirus Exoribonuclease: Its Role in RNA Synthesis and Replication Fidelity. *Front Microbiol*, 2019;10:1813.
8. Gao Y., Yuan Y., Li T.T., Wang W.X., Li Y.X., Li A. Evaluation the auxiliary diagnosis value of antibodies

- assays for detection of novel coronavirus (SARS-CoV-2) causing an outbreak of pneumonia (COVID-19). 2020:03.26.20042044.
9. Rice G.I., Thomas D.A., Grant P.J., Turner A.J., Hooper N.M. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J* 2004;383:4–51.
10. Imai Y., Kuba K., Ohto-Nakanishi T., Penninger J.M. Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) in Disease Pathogenesis. *Circulation Journal* Vol.74, March 2010.
11. Lin L., Lu L., Cao W., Taisheng Li. Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection – a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerging Microbes & Infections*, 2020. doi:10.1080/22221751.2020.1746199.
12. Gu J., Han B., Wang J. COVID-19: Gastrointestinal manifestations and potential fecal-oral transmission. *Gastroenterology*. PMID 32142785 doi:10.1053/j.gastro.2020.02.054
13. Lan J., Ge J., Yu J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020 Mar 30. <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2180-5>
14. Ortega J.T., Serrano M.L., Pujol F.H., Rangel H.R. Unrevealing sequence and structural features of novel coronavirus using in silico approaches: The main protease as molecular target *EXCLI Journal* 2020;19:400-409.
15. Adhikari S. P., Meng S., Wu Y. J., Mao Y. P., Ye R. X., Wang Q. Z., Sun C., Sylvia S., Rozelle S., Raat H., Zhou H. Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. *Infectious diseases of poverty*, 2020; 9(1): 1-12. doi:10.1186/s40249-020-00646-x.
16. Dhama K., Sharun K., Tiwari R., Dadar M., Malik Y.S., Singh K.P., Chaicumpa W. COVID-19, an emerging coronavirus infection: advances and prospects in designing and developing vaccines, immunotherapeutics, and therapeutics. *Hum Vaccin Immunother* 2020;18:1–7. doi:10.1080/21645515.2020.1735227.
17. Hanff T.C., Harhay M.O., Brown, T.S., Cohen J.B., Mohareb A.M. Is there an association between COVID-19 mortality and the renin-angiotensin system — a call for epidemiologic investigations. *Clin. Infect.* doi:10.1093/cid/ciaa329 (2020).
18. Yu F., Du L., Ojcius D.M., Pan C., Jiang S. Measures for diagnosing and treating infections by a novel coronavirus responsible for a pneumonia outbreak originating in Wuhan, China. *Microbes Infect.* 2020. pii:S1286-4579(20)30025-3. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1286457920300253?token=F533A90BB952A07098709C62274972C65700B71A42CC8179DA9ADB1C06E6257A7C447B6DBB151968FF1420353399BF4A>
19. Chu D.K.W., Pan Y., Cheng S.M., Hui P., Krishnan P., Liu Y., Ng D.Y. M., Wan K.C., Yang P., Wang Q., Peiris M., Poon L.M. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia, *Clinical Chemistry*, 2019;66(4):549–555. doi:10.1093/clinchem/hvaa029
20. Moran A., Beavis K.G., Matushek S.M., Ciaglia C., Francois N., Tesic V., Love N. The Detection of SARS-CoV-2 using the Cepheid XpertXpress SARS-CoV-2 and Roche cobas SARS-CoV-2 Assays. *J. Clin. Microbiol.* 2020. pii: JCM.00772-20. <https://jcm.asm.org/content/jcm/early/2020/04/17/JCM.00772-20.full.pdf>
21. Chan J.F., Yip C.C., To K.K., Tang T.H., Wong S.C., Leung K.H., Fung A.Y., Ng A.C., Zou Z., Tsoi H.W., Choi G.K., Tam A.R., Cheng V.C., Chan K.H., Tsang O.T., Yuen K.Y. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay validated in vitro and with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2020. pii: JCM.00310-20. <https://jcm.asm.org/content/early/2020/02/28/JCM.00310-20.long>
22. Won J., Lee S., Park M., Kim T.Y., Park M.G., Choi B.Y., Kim D., Chang H, Kim VN, Lee C.J. Development of a Laboratory-safe and Low-cost Detection Protocol for SARS-CoV-2 of the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Exp. Neurobiol.* 2020. <https://www.en-journal.org/journal/view.html?uid=513&vmd=Full#T1>
23. Gorse G.J., Donovan M.M., Patel G.B. Antibodies to Coronaviruses Are Higher in Older Compared with Younger Adults and Binding Antibodies Are More Sensitive than Neutralizing Antibodies in Identifying Coronavirus-Associated Illnesses. *J. Med. Virol.* 2020. doi:10.1002/jmv.25715
24. Wang W., Xu Y., Gao R. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA.* 2020;323(18):1843–1844. doi:10.1001/jama.2020.3786.
25. Khoubnasabjafari M., Jouyban-Gharamaleki V., Ghanbari R., Jouyban A. Exhaled breath condensate as a potential specimen for diagnosing COVID-19. *Bioanalysis* Published online: 15 April 2020. doi:10.4155/bio-2020-0083
26. Tahamtan A., Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2020. doi:10.1080/14737159.2020.1757437
27. Xia J.G., Zhao J.P., Cheng Z.S., Hu Y., Duan J., Zhan Q.Y. Non-invasive respiratory support for patients with novel coronavirus pneumonia: clinical efficacy and reduction in risk of infection transmission. *Chin. Med. J. (Engl).* 2020. https://journals.lww.com/cmj/Citation/publishahead/Non_invasive_respiratory_support_for_patients_with.99377.aspx
28. Lamb L.E., Bartolone S.N., Ward E., Chancellor M.B. Rapid Detection of Novel Coronavirus (COVID-19) by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification \ medRxiv, 2020. doi:10.1101/2020.02.19.20025155v1
29. Yu L., Wu S., Hao X., Li X., Liu X., Ye S., Han H., Dong X., Li X., Li J., Liu J., Liu N., Zhang W., Pelechano V., Chen W-C., Yin X. Rapid colorimetric detection of

COVID-19 coronavirus using a reverse tran-scriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic plat-form: iLACO medRxiv February 24, 2020. doi:10.1101/2020.02.20.20025874v1

30. Kuluev B. R., Baimiev An. Kh., Chemeris D. A., Matniyazov R. T., Gerashenkov G. A., Nikonorov Yu. M., Baimiev Al. Kh., Chemeris A. V. CRISPR application loci not for genome editing. *Biomics*. 2017;9:271-283.

31. Chemeris D. A., Kiryanova O. Yu., Gerashenkov G. A., Kuluev B. R., Rozhnova N. A., Matniyazov R. T., Baimiev An. Kh., Baimiev Al. Kh., Gubaidullin I. M., Chemeris A. V. Bioinformatics resources for CRISPR / Cas editing genomes. *Biomics*. 2017;9:203-228.

32. Hou T., Zeng W., Yang M., Chen W., Ren L., Ai J., Wu J., Liao Y., Gou X., Li Y., Wang X., Su H., Gu B., Wang J., Xu T. Development and Evaluation of A CRISPR-based Diagnostic For 2019-novel Coronavirus medRxiv 2020.02.22.20025460. doi:10.1101/2020.02.22.20025460

33. Ding X., Yin K., Li Z., Liu C. All-in-One Dual CRISPR-Cas12a (AIOD-CRISPR) Assay: A Case for Rapid, Ultrasensitive and Visual Detection of Novel Coronavirus SARS-CoV-2 and HIV virus at the Point of Care Dimensions? March 2020 5(17)/ <https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1127229539>

34. Curi L., Federico P.-B., Gimenez C.A. An ultrasensitive, rapid, and portable coronavirus SARS-CoV-2 sequence detection method based on CRISPR-Cas12. *bioRxiv*. doi:10.1101/2020.02.29.971127.

35. Broughton J.P., Deng X., Yu G., Fasching C.L., Servellita V., Singh J., Miao X., Streithorst J.A., Granados A., Sotomayor-Gonzalez A., Zorn K., Gopez A., Hsu E., Gu W., Miller S., Pan C.Y., Guevara H., Wadford D.A., Chen J.S., Chiu C.Y. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol*. 2020 Apr 16. <https://www.nature.com/articles/s41587-020-0513-4>

36. Amanat F., Stadlbauer D., Strohmeier S. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat Med*. 2020. doi:10.1038/s41591-020-0913-5

37. Gonzalez-Reiche A., Hernande M. Introductions and early spread of SARS-CoV-2 in the New York City area Research Gate 2020.5(16) https://www.researchgate.net/publication/341754585_Introductions_and_early_spread_of_SARS-CoV-2_in_the_New_York_City_area

38. Hu Z., Song C., Xu C., Jin G., Chen Y., Xu X., Ma H., Chen W., Lin Y., Zheng Y. Clinical characteristics of 24

asymptomatic infections with COVID-19 screened among close contacts in Nanjing, China. *Sci China Life Sci*. 2020. 63, 706–711. doi:10.1007/s11427-020-1661-4

39. Dudley J.P., Lee N.T. Disparities in Age-Specific Morbidity and Mortality from SARS-CoV-2 in China and the Republic of Korea. *Clin Infect Dis*. 2020 Mar 31. pii:ciaa354. doi:10.1093/cid/ciaa354/5813861

40. Wu F., Wang A., Liu M., Wang Q., Chen J., Xia S., Ling Y., Zhang Y., Xun J., Lu L., Jiang S., Lu H., Wen Y., Huang J. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications April 20, 2020. doi:10.1101/2020.03.30.20047365v2

41. Catalan-Dibene J. Human antibodies can neutralize SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Immunol*. 2020 Apr 14. <https://www.nature.com/articles/s41577-020-0313-6>

42. Xiang J., Yan M., Li H., Liu T., Lin C., Huang S., Shen C. Evaluation of Enzyme-Linked Immunoassay and Colloidal Gold- Immunochromatographic Assay Kit for Detection of Novel Coronavirus (SARS-Cov-2) Causing an Outbreak of Pneumonia (COVID-19) March 01, 2020. doi:10.1101/2020.02.27.20028787v1

43. Liu Y., Liu Y., Diao B., Ren F., Wang Y., Ding J., Huang Q. Diagnostic Indexes of a Rapid IgG/IgM Combined Antibody Test for SARS-CoV-2. doi:10.1101/2020.03.26.20044883. PPR:PPR130625.

44. Wang Q., Du Q., Guo B., Mu D., Lu X., Ma Q., Guo Y., Fang L., Zhang B., Zhang G., Guo X. A method to prevent SARS-CoV-2 IgM false positives in gold immunochromatography and enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin. Microbiol*. 2020 Apr 10. pii:JCM.00375-20. <https://jcm.asm.org/content/early/2020/04/09/JCM.00375-20.long>

45. Okba N.M.A., Müller M.A., Li W., Wang C., Geurtsvan Kessel C.H., Corman V.M., Lamers M.M., Sikkema R.S., de Bruin E., Chandler F.D., Yazdanpanah Y., Le Hingrat Q., Descamps D., Houhou-Fidouh N. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients. *Emerg Infect Dis*. 2020 Apr 8;26(7). https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/7/20-0841_article

46. Zhao R., Li M., Song H. Serological diagnostic kit of SARS-CoV-2 antibodies using CHO-expressed full-length SARS-CoV-2 S1 proteins. *medRxiv*. 2020;27:20042184.

НЕЙРОМОДУЛЯТОРНАЯ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОРНАЯ СИСТЕМА TIP39-PTH2R

Курзанов А. Н., Быков И. М.

ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, 350063, ул. Седина 4, Краснодар, Россия

Для корреспонденции: Курзанов Анатолий Николаевич, д.м.н., профессор кафедры фундаментальной и клинической биохимии, ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России, e-mail: kurzanov@mail.ru

For correspondence: Kurzanov Anatoly Nikolaevich, MD, Professor of the Department of Fundamental and Clinical Biochemistry, Kuban State Medical University, e-mail: kurzanov@mail.ru

Information about authors:

Kurzanov A. N., <https://orcid.org/0000-0002-0566-256X>

Bykov I. M., <https://orcid.org/0000-0002-1787-0040>

РЕЗЮМЕ

Широко распространенные аксонные терминалы нейронов, экспрессирующих тубероинфундибулярный пептид 39 (tuberoinfundibular peptide 39 (TIP39)) имеют распределение, аналогичное распределению нейронов, содержащих рецептор паратиреоидного гормона 2 (PTH2R), и их волокон, что обеспечивает анатомическую основу нейромодулирующего действия TIP39. Это функциональное и анатомическое сопряжение позволило констатировать, что TIP39 и PTH2R образуют нейромодуляторную лиганд-рецепторную систему. Основываясь на механизмах передачи сигнала, используемых TIP39 и PTH2R, предполагается, что они могут индуцировать нейромодуляторные эффекты во многих областях мозга. TIP39-PTH2R представляют собой уникальную нейропептидно-рецепторную систему, локализация и функции которой в ЦНС отличаются от таковых у любых других нейропептидов. Система TIP39-PTH2R преимущественно участвует в нейроэндокринной модуляции воздействуя на эндокринные структуры посредством своего присутствия в нескольких областях гипоталамуса. TIP39 влияет на нейроны, содержащие соматостатин и кортикотропин-релизинг гормон. TIP39 также может влиять на выброс аденокортикотропина, лютеинизирующего гормона, гормона роста и аргинин-вазопрессина из гипофиза. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что TIP39 модулирует регуляторную сеть тревоги и депрессии, несколько аспектов стресс-реакции, а также контролирует температуру тела, участвует в обработке слуховой и ноцицептивной информации. Физиологическая роль системы TIP39-PTH2R еще во многом неизвестна. Тем не менее, распределение PTH2R и TIP39 в тканях вне ЦНС предполагает и другие потенциальные физиологические эффекты для этого сигнального пути. Полагают, что систему TIP39-PTH2R, возможно, стоит рассматривать в качестве потенциальной терапевтической мишени, для лечения тревожности, депрессии и хронической боли, контроля и коррекции нейроэндокринных нарушений.

Ключевые слова: тубероинфундибулярный пептид 39 (TIP39); рецептор паратиреоидного гормона 2 (PTH2R); нейромодуляция; лиганд-рецепторная система.

NEUROMODULATOR LIGAND-RECEPTOR SYSTEM TIP39 - PTH2R

Kurzanov A. N., Bykov I. M.

Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

SUMMARY

Widely spread axon terminals of TIP39 neurons have a distribution similar to PTH2R containing neurons and their fibers which provides an anatomic base of neuromodulation action of TIP39. This functional and anatomic linking lets state that TIP39 and PTH2R form a neuromodulator ligand-receptor system. Basing on mechanisms of signal transmission used by TIP39 and PTH2R, they can form a neuromodulator system in many brain parts. TIP39-PTH2R system is a unique neuropeptide-receptor system, which localization and functions in the central nervous system differ from any other neuropeptides. Neuromodulator system TIP39-PTH2R predominantly participates in neuroendocrine modulation by affecting the endocrinal system by means of its presence in several areas of hypothalamus. TIP39 influences neurons that contain somatostatin and corticotropin-releasing hormone. TIP39 can affect the release of adrenocorticotropin, luteinizing hormone, growth hormone and arginine-vasopressin from hypophysis. Experimental data prove that TIP39 modulates regulatory network of anxiety and depression, several aspects of stress reaction and also controls body temperature, participates in processing of auditory and nociceptive information. Physiological role of TIP39-PTH2R system is still to some extent unknown. However, distribution of PTH2R and TIP39 in tissues outside central nervous system assumes other potential physiological effects for this signal way. It is assumed that TIP39-PTH2R system should be probably considered as a potential therapeutic target for treatment of anxiety, depression and chronic pain, control and correction of neuroendocrine disruptions.

Key words: tuberoinfundibular peptide 39 (TIP39); parathyroid hormone 2 receptor (PTH2R); neuromodulation; ligand-receptor system.

Рецептор паратиреоидного гормона второго типа (PTH2R) является членом семейства рецепторов, связанных с G-белком (GPCR). Он был открыт на основании сходства его последовательностей с другими белками, принадлежащими к этому семейству рецепторов [1]. Новый рецептор был назван PTH2R из-за его сходства последовательностей с рецептором паратиреоидного гормона, а также потому, что человеческий PTH2R может быть активирован гормоном паращитовидной железы [2]. Клонирование PTH2R вызвало поиск пептидного лиганда, который является его естественным агонистом и избирательно активирует PTH2R. Прорывом в области исследования рецепторов гормона паращитовидной железы стало открытие нового тубероинфундибулярного пептида из 39 аминокислотных остатков (TIP39), являющегося эндогенным лигандом PTH2R [3]. TIP39 был очищен из ткани бычьего гипоталамуса [3]. Последовательность TIP39 имеет мало аминокислотных остатков, общих с паратиреоидным гормоном, но имеет похожую трехмерную структуру [4]. TIP39 является высокоаффинным и полностью активным агонистом как для PTH2R человека, так и грызунов [3]. Помимо повышения цАМФ (предположительно, через Gs-белки), TIP39 также повышает уровни внутриклеточного Ca²⁺ (предположительно, через Gq-белки) в некоторых типах клеток [5;6].

Экспрессия PTH2R в ЦНС выше, чем в периферических тканях [1;7;8]. На периферии паттерн его экспрессии был обнаружен в синтезирующих соматостатин D-клетках панкреатических островков Лангерганса, в крупных сосудах бронхов и легких, в эндотелии сердца, клетках сосудистого полюса почечных клубочков, придатка яичка, атретических фолликулах яичника, хондроцитах и в щитовидном хряще. Небольшое количество клеток, экспрессирующих PTH2R обнаружено в костной ткани, в парафолликулярных C-клетках щитовидной железы и в некоторых клетках желудочно-кишечного тракта, синтезирующих пептиды. Существует относительно мало информации о PTH2R-опосредованных эффектах за пределами мозга, и потенциальные функции на периферии в этом обзоре не обсуждаются.

Локализация компонентов системы TIP39-PTH2R в ЦНС.

TIP39-экспрессирующие клетки (нейроны TIP39) в мозге взрослого человека локализованы в медиальной и латеральной частях субпарафаскулярной области и заднем внутриламинарном комплексе таламуса, а также в медиальном паралемнисковом ядре моста [9]. Во время эмбрионального развития переходная зона миндалин

ны-гиппокампа также содержит нейроны TIP39 [10]. Нейроны, синтезирующие TIP39 в субпарафаскулярной области, подразделяются на медиально расположенную группу в перивентрикулярном сером бугре таламуса (PVG) и группу заднего интраламинарного комплекса (PIL) таламуса [11]. Последние данные подтверждают идею о том, что анатомическое разделение этих групп клеток сопряжено с различными функциями. Сходство в их распределении подтверждает, что TIP39 доступен для активации PTH2R везде, где они присутствуют в мозге. Таким образом, нейроны в трех сайтах экспрессии TIP39 могут предоставлять всю информацию, необходимую для действия через PTH2R в мозге. Имеются данные, что экспрессирующие TIP39 нейроны, в субпарафаскулярной области проецируют свои нейрональные волокна на лимбическую и гипоталамическую области переднего мозга, в то время как нейроны TIP39 в медиальном паралемнисковом ядре обеспечивают волокна TIP39 для заднего мозга и спинного мозга, потенциально влияя на слуховые и ноцицептивные функции [12-14].

Распределение PTH2R-иммунопозитивных нейрональных волокон и PTH2R-экспрессирующих клеток в целом сходно в головном мозге и особенно в нейроэндокринном гипоталамусе [15;16]. Обнаружение того, что PTH2R-иммунопозитивные волокна часто локализируются в непосредственной близости от PTH2R-экспрессирующих нейронов, позволяет предположить, что эти волокна могут представлять собой либо аксоны, либо дендриты локальных PTH2R-экспрессирующих нейронов. Коллокализация PTH2R с везикулярными переносчиками глутамата предполагает его аксональную локализацию. Отмечено, что распределения и даже субрегиональные распределения TIP39- и PTH2R-содержащих аксонных терминалов удивительно похожи [17;16]. Таким образом, терминалы аксонов TIP39 и PTH2R совместно распределены в одних и тех же структурах мозга, что позволяет осуществлять пресинаптическую модуляцию терминалов аксонов PTH2R. Следовательно, аксо-аксональное действие TIP39 вполне вероятно [11]. Поэтому было высказано предположение, что TIP39 и PTH2R формируют нейромодуляторную систему во многих областях мозга.

Роль системы TIP39-PTH2R в регуляции различных аспектов нейроэндокринных функций.

Нейромодуляторная система TIP39-PTH2R широко представлена в областях гипоталамуса, экспрессирующих нейроэндокринные гормоны. Высокая плотность PTH2R-экспрессирующих

клеток и T1P39- и PTH2R-содержащих волокон присутствует в медиальном преоптическом ядре и некоторых окружающих частях медиальной преоптической области гипоталамуса [16;17]. Нейромодуляторная система T1P39-PTH2R также широко распространена в паравентрикулярных и перивентрикулярных ядрах. Таким образом, терминалы T1P39 идеально расположены для воздействия на нейроны-продуценты соматостатина и кортитропин-релизинг-гормона (CRH). Было продемонстрировано, что соматостатин-продуцирующие нейроны экспрессируют PTH2R [15;17], а также, что T1P39- и PTH2R-содержащие терминалы аппроксимируют CRH-экспрессирующие нейроны в парцеллюлярном подразделении паравентрикулярного ядра гипоталамуса [18;19]. Точно так же дугообразное ядро содержит самую высокую плотность PTH2R-экспрессирующих клеток и T1P39- и PTH2R-содержащих волокон, обеспечивая анатомическую основу для влияния на высвобождение гормона роста (GH) и пролактина через гормон роста-релизинг гормон (GHRH) и дофаминовые нейроны в дугообразном ядре.

В ЦНС нейрональные волокна, содержащие T1P39 и PTH2R широко распространены в областях гипоталамуса, лимба и сенсорного мозга, которые потенциально оказывают влияние на нейроэндокринную систему. Было показано, что нейронные проекции на гипофизотропные нейроны содержат высокую плотность PTH2R-экспрессирующих клеточных тел, а также T1P39- и PTH2R-содержащих волокон. Эти области мозга включают медиальную префронтальную область, особенно инфралимбическую кору, латеральное ядро перегородки, ядро ложа *stria terminalis*, миндалевидное тело, некоторые срединные и интраламинарные ядра таламуса, периакведуктальную серую зону, боковые парабрахсиальные ядра, locus coeruleus и subcoeruleus, ядро одиночного тракта. В гипоталамусе высокий уровень T1P39 и PTH2R зафиксирован, кроме вышеупомянутых нейроэндокринных областей: в дорсомедиальном и периферическом ядрах [9;15;16;18]. Элементы нейромодуляторной системы T1P39-PTH2R также локализованы в некоторых областях мозга, которые не участвуют в нейроэндокринной регуляции. T1P39, а также волокна PTH2R обнаружены в избытке в медиальном коленчатом теле, сегментарных участках среднего мозга, глубоких слоях верхнего колликулуса, внешней коре нижнего колликулуса, периоливариальной области, ядре трапецевидного тела, поверхностных слоях дорсального рога спинного мозга и в паравертебральных ганглиях [9;15;16;18;20;21]. Некоторые из этих областей головного мозга мо-

гут участвовать в сенсорной, особенно слуховой обработке информации, которая может представлять нейроэндокринно-связанные функции нейромодуляторной системы T1P39-PTH2R.

На основании представительства компонентов системы T1P39-PTH2R в головном мозге было предположено ее участие в эндокринной, лимбической, ноцицептивной и слуховой функциях [12]. Исследования, в которых PTH2R активировались введением экзогенного T1P39, а также с использованием подходов *in vitro*, позволили получить некоторое представление о возможных функциях системы T1P39-PTH2R. Создание селективного пептидного антагониста PTH2R [21] позволило установить, что пептидная нейромодуляторная система T1P39-PTH2R участвует в различных нейроэндокринных функциях, включая реакцию на стресс, терморегуляцию, высвобождение пролактина, кортикотропин-релизинг гормона (CRH), гормона роста (GH) и аргинина вазопрессина (AVP).

Роль системы T1P39 -PTH2R в высвобождении аргинина-вазопрессина

Роль PTH2R в высвобождении AVP исследовали у крыс путем интрацеребровентрикулярной инъекции T1P39. Пониженные уровни AVP были обнаружены в плазме через 5 минут после введения T1P39 [22]. T1P39 также подавлял повышение AVP в плазме после дегидратации путем лишения воды, гиперосмолярности после внутривентрикулярного введения гипертонического солевого раствора и гиповолемии после внутривентрикулярного введения полиэтиленгликоля. Эти ингибирующие эффекты не были обусловлены снижением уровня осмотической или гиповолемической стимуляции, поскольку содержание Na⁺ и общего белка плазмы не изменились после инъекции T1P39 [22]. Эффект T1P39 также не был следствием изменения артериального давления, потому что инъекция T1P39 вызвала падение среднего артериального давления, что скорее стимулировало бы секрецию AVP. Налоксон, антагонист опиоидных рецепторов, значительно изменил ингибирующий эффект T1P39 на индуцированное дегидратацией высвобождение AVP [22]. Эти результаты предполагают, что T1P39 ингибирует высвобождение AVP центральным действием, возможно, через опиоидную систему, но без гемодинамического или осмотического влияния. Эффект был быстрым и длился недолго, подтверждая предположение, что T1P39 может играть роль в динамической регуляции высвобождения AVP. T1P39 может оказывать эффект ингибирования высвобождения AVP, действуя через дугообразное ядро гипоталамуса, которое содержит высокую плотность иммунореактивности T1P39 и PTH2R

[16], а также множество опиоидных нейронов, которые участвуют в регуляции высвобождения AVP [23;24]. Косвенное действие T1P39 также возможно через гипоталамические ангиотензиновые и содержащие предсердный натрийуретический пептид нейроны, влияющие на высвобождение AVP [25].

Участие системы T1P39 -PTN2R в секреции гормона роста.

Инъекция T1P39 в боковой желудочек самцов крыс почти полностью блокировала появление GH в плазме в течение следующих 3 часов [26]. Этот факт согласуется с данными, показывающими высокую плотность T1P39-содержащих волокон вокруг нейронов соматостатина в перивентрикулярном ядре гипоталамуса. Нейроны соматостатина в этой области проецируются на срединное возвышение и ингибируют высвобождение GH [27]. Экспрессия PTN2R была продемонстрирована на многих из этих нейронов соматостатина у крыс [3], а также у человека [18], обеспечивая анатомическую основу для T1P39-индуцируемого высвобождения соматостатина, который в свою очередь ингибирует секрецию гормона роста [27].

T1P39-PTN2R-сопряженная регуляция кортикотропин-релизинг гормона

Доказательства того, что PTN2R может участвовать в регуляции высвобождения кортикотропин-релизинг гормона CRH, было получено в исследованиях [28], которые показали, что T1P39 увеличивает секрецию CRH гипоталамическими эксплантами и зафиксировали дозозависимое повышение уровня АКТГ в плазме через 10 минут после интрацеребровентрикулярной инъекции T1P39. В другом исследовании местная инъекция T1P39 выше паравентрикулярного ядра гипоталамуса (PVN) у мышей также повышала уровни кортикостерона в плазме [19]. Эти эффекты T1P39 отсутствовали у нокаутированных по PTN2R животных [19], что свидетельствует о потенциальной модулирующей роли системы T1P39-PTN2R в активации оси гипоталамус-гипофиз-надпочечник (HPA). Кроме того, суточный пик уровня кортикостерона в основной плазме был снижен у мышей с абляцией гена T1P39, что свидетельствует о том, что эндогенный T1P39 играет роль в циркадной регуляции уровней кортикостерона [19]. Эти результаты согласуются с высокой плотностью волокон T1P39, PTN2R-экспрессирующих клеток и PTN2R-содержащих волоконных терминалов в подразделениях PVN [16]. Тесная аппроксимация между нейронами CRH и PTN2R-содержащими волокнами была продемонстрирована на мышцах [19], а также на людях [18].

Роль передачи сигналов T1P39 / PTN2R в модуляции норадренергических эффектов

Существующие данные свидетельствуют о возможности взаимодействия T1P39 с некоторыми норадренергическими путями. Мыши с абляцией гена, кодирующего T1P39, которым инъекцировали антагонист PTN2R, продемонстрировали избирательное ухудшение характеристик памяти во время вызванного новизной возбуждения [29]. Норадренергическая передача сигналов оказывала двухфазное, инвертированное U-образное влияние на когнитивные функции [30]. Изменения, вызванные нарушением передачи сигналов T1P39 / PTN2R нивелировались с помощью пропранолола, антагониста β -адренорецепторов, предполагая, что передача сигналов PTN2R влияет на эффект стресса новизны через взаимодействие с норадренергическими механизмами [29].

Роль лиганд-рецепторной системы T1P39-PTN2R в физиологических действиях T1P39, не связанных напрямую с его нейроэндокринными эффектами

Влияние системы T1P39-PTN2R на уровень тревоги и развитие страха установлено в экспериментальных исследованиях, в которых получены данные, указывающие на анксиолитический эффект и антидепрессантоподобное действие T1P39 [31]. Эти результаты согласуются с ролью эндогенного T1P39 в ограничении последствий стрессовых возмущений. Мыши, лишённые T1P39 или PTN2R, продемонстрировали поведение, подобное повышенной тревожности и депрессии [32]. Установлено, что нормальная передача сигналов T1P39 уменьшает долгосрочные последствия аверсивного стимула, индуцировавшего формирование страха [33]. Поскольку известно, что миндалина участвует в реакции страха [34], система T1P39-PTN2R в миндалине, особенно в ее центральном и медиальном ядрах [16], может быть вовлечена в эти эффекты.

Участие системы T1P39-PTN2R в регуляции температуры тела продемонстрировано рядом исследований. Инъекция T1P39 в боковой желудочек увеличивала внутреннюю температуру мышей дикого типа, тогда как инъекция T1P39 не оказывала влияния на мышей с нокаутом гена PTN2R, у которых было также выявлено нарушение выработки тепла при воздействии холода, но без изменений базальной температуры, что свидетельствует о том, что система T1P39-PTN2R играет особую роль в сохранении температуры в холодной среде [35]. PTN2R в срединном преоптическом ядре, по-видимому, участвуют в терморегуляторном действии T1P39, потому что T1P39, введенный локально в срединное преоптическое ядро, вы-

зывает большее повышение температуры тела в течение более длительных периодов времени, чем инъекция того же количества ТПР39 в боковой желудочек. Кроме того, местное введение ТПР39 в дорсомедиальное ядро гипоталамуса не влияло на температуру тела [16;35].

Роль системы ТПР39-РТН2R в модуляции ноцицептивных эффектов обеспечивается на нескольких уровнях обработки ноцицептивной информации в ЦНС. Интратекальная инъекция ТПР39 стимулировала дозозависимый ноцифативный ответ. Интратекальная инъекция антитела к ТПР39 увеличивала латентность ответа в тестах с воздействием аверсивного стимула, что соответствовало уменьшению чувствительности [36]. После повреждения периферического нерва у мышей, нокаутированных по РТН2R и ТПР39, в меньшей мере развивалась тактильная и термическая гиперчувствительность, по сравнению с контрольными животными, и они быстрее возвращались к исходным сенсорным порогам. Эффекты воспалительного повреждения задней лапы были аналогичным образом снижены у нокаутированных мышей. Блокада α -2 адренергических рецепторов увеличивала тактильную и термическую чувствительность явно выздоравливавших нокаутных мышей, возвращая ее к уровням нейропатического контроля [37]. Это, вероятно, связано с облегчением ноцицептивной передачи от сенсорных нейронов спинномозгового ганглия к нейронам дорзального рога спинного мозга, где присутствует интенсивная иммунореактивность РТН2R в поверхностных слоях заднего рога спинного мозга, в которых заканчивается большинство ноцицептивных афферентов [15;20]. Система ТПР39-РТН2R также может участвовать в супраспинальной модуляции ноцицепции. Интрацеребровентрикулярная инъекция ТПР39 уменьшала латентность ответа в тестах с воздействием аверсивного стимула, тогда как инъекция антагониста РТН2R имела противоположный антиноцицептивный эффект [37]. Кроме того, мыши с нокаутом ТПР39 и РТН2R также продемонстрировали снижение ноцицептивных ответов в этих тестах, доказывая про-ноцицептивную функцию эндогенного ТПР39 опосредованную через взаимодействие сРТН2R [37]. Эти данные согласуются с распределением ТПР39 и РТН2R в различных областях мозга, которые, как известно, участвуют в обработке ноцицептивной информации. Считается, что эти области являются компонентами вегетативно-лимбических болевых путей, включая восходящую ретикулярную активирующую систему [38].

Система ТПР39-РТН2R в модуляции послеродовых событий у матерей

В период лактации у матерей происходят различные физиологические адаптационные изменения, которые позволяют им правильно воспитывать свое потомство. Имеются доказательства того, что в заднем внутривентрикулярном комплексе таламуса (PIL) во время лактации экспрессируется нейропептид ТПР39 и рецептор РТН2R, которые участвуют в функционировании этих адаптационных механизмов [39;40]. ТПР39-содержащие нейроны в PIL идеально расположены для ретрансляции или даже объединения соматосенсорных и слуховых сигналов, полученных от щенков крыс, и передачи этой информации в гипоталамус для индуцирования поведения матерей и гормональных реакций. Нейроны, содержащие ТПР39 в PIL активируются у крыс-матерей в ответ на воздействие щенка и проецируются в преоптические, перивентрикулярные, паравентрикулярные, дугообразные и дорсомедиальные области гипоталамуса. ТПР39-содержащие нейроны могут быть активированы актом сосания [39]. Существуют дополнительные изменения в организме кормящей матери, потенциально обусловленные нейромодуляторной системой ТПР39-РТН2R, например, подавление секреции гонадотропин-рилизинг гормона и, следовательно, снижение уровня эстрогена, приводящее к лактационной анестезии [41]. Полагают [42], что нейроны ТПР39 в PIL передают информацию о сосании к гипоталамусу. ТПР39 может способствовать высвобождению пролактина из гипофиза и поддержанию материнской мотивации через рецептор РТН2R.

Допускается, что экспрессия ТПР39, индуцированная материнством, может способствовать снижению тревожного и депрессивного поведения. Механизмы преодоления стресса также изменяются на поздних сроках беременности и в послеродовом периоде: у крыс-матерей наблюдается пониженная чувствительность оси гипоталамо-гипофиз-надпочечники, и в том числе снижается синтез и высвобождение рилизинг-гормона кортикотропина [42-45]. Поскольку сосание стимулирует гиперреактивность оси гипоталамо-гипофиз-надпочечники в послеродовом периоде участие ТПР39 в этом изменении материнского поведения возможно, потому что ТПР39 модулирует активность нейронов, содержащих кортикотропин-рилизинг-гормон [19]. Другой специфической поведенческой характеристикой матерей является материнская агрессия, то есть защита помета от внешней угрозы. ТПР39 может влиять на материнскую агрессию, поскольку волокна ТПР39 были описаны в нескольких ядрах, включая латеральную перегородку, паравентрикулярное гипоталамическое ядро и вентральное мамиллярное ядро, которые участвуют в мате-

ринской агрессии [43;45;46]. Таким образом, предполагается, что TIR39-опосредованные общие соматосенсорные входные сигналы от щенков вызывают высвобождение окситоцина в центральном миндалевидном ядре, чтобы влиять на материнскую агрессию [46].

Тот факт, что в нейронах PII присутствует пептид TIR39, свидетельствует о том, что их влияние на целевые области зависит от состояния материнства, поскольку TIR39 экспрессируется только в этот период у взрослых самок крыс. TIR39 является оптимальным кандидатом для этой функции, так как нейропептиды являются сигнальными молекулами в нервной системе, которые обычно имеют медленное действие, но играют важные нейромодулирующие функции во время адаптационных процессов [41]. Хотя родительская забота у человека более сложная, чем у животных, поскольку включает эмоциональные и когнитивные корковые функции, роль PII в передаче соматосенсорной информации может быть важной и для человека. Прикосновение вызывает высвобождение окситоцина, и физический контакт с детьми может способствовать привязанности родителей. Действительно, как TIR39, так и рецептор PTH2R имеют такое же распределение у человека и макаки, как и у грызунов [18]. О таких сходствах между паттернами распределения в мозге приматов и грызунов часто сообщалось о других нейропептидах и рецепторах нейропептидов, предполагающих сходные функции у разных видов [47;48]. Эти данные подтверждают идею о том, что система рецептора TIR39-PTH2R также может участвовать в аналогичных функциях. Эмоциональные изменения, которые происходят в послеродовом периоде, также могут модулироваться TIR39 на основе локализации системы TIR39-PTH2R в медиальном и центральном ядрах миндалина [49], в переходной зоне миндалина-гиппокампа, преамиллярных ядрах [50], вентральном субикулуме и периакведуктальном сером бугре [51], которые являются нейрональными компонентами репродуктивной и эмоциональной регуляции [52;53].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ информации, представленной в публикациях, материалы которых использованы при подготовке настоящего обзора, позволил заключить, что нейромодуляторная система TIR39-PTH2R может играть важную роль в регуляции нескольких различных аспектов нейроэндокринных функций. TIR39-экспрессирующие нейроны в перивентрикулярном сером бугре таламуса могут стимулироваться стрессовыми воздействиями, нарушающими гомеостаз, в то

время как нейроны TIR39 заднего интраламинарного комплекса активируются различными репродуктивными событиями. Нейроны, экспрессирующие TIR39 в заднем таламусе взаимодействуют с нейронами, расположенными в нейроэндокринных и лимбических областях мозга, оказывая прямое и косвенное воздействие на нейроэндокринные системы. TIR39 влияет на высвобождение гормонов гипофиза, включая аргинин-вазопрессин и гормон роста. Имеются существенные доказательства участия системы TIR39-PTH2R в регуляции кортикостерона и пролактина. TIR39, действующий через PTH2R, модулирует несколько аспектов реакции на стресс. Он вызывает высвобождение кортикотропина путем активации нейронов, содержащих кортикотропин-рилизинг-гормон, в гипоталамусе. Блокирование передачи сигналов TIR39 повышает тревожное состояние животных и их реакцию на страх, а также усиливает вызванную стрессом анальгезию. Была также определена роль системы TIR39-PTH2R в терморегуляции, в обработке ноцицептивной информации и в контроле материнского поведения. Дальнейшее изучение уникальной мультипотентной нейромодуляторной системы TIR39-PTH2R может открыть новые возможности в разработке перспективных подходов для контроля и коррекции нейроэндокринных нарушений.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Usdin T. B., Gruber C., Bonner T. I. Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem.* 1995; 270 (26): 154551–5458. doi:10.1074/jbc.270.26.15455.
2. Usdin T. B., Bonner T. I., Hoare S. R. The parathyroid hormone 2 (PTH2) receptor. *Receptors Channels.* 2002; 8(3-4): 211–8. doi:10.3109/10606820213682.
3. Usdin T. B., Hilton J., Vertesi T., Harta G., Segre G., Mezey E. Distribution of the parathyroid hormone 2 receptor in rat: immunolocalization reveals expression by several endocrine cells. *Endocrinology.* 1999b;140:3363–3371. doi:10.1210/en.140.7.3363.
4. Piserchio A., Usdin T., Mierke D.F. Structure of tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *J Biol Chem.* 2000;275(35):27284–27290. doi:10.1074/jbc.M003869200
5. Gould CP, Usdin TB, Hoare SR. Regions in rat and human parathyroid hormone (PTH) 2 receptors controlling receptor interaction with PTH and with antagonist ligands. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;299:678–690.
6. Della Penna K., Kinose F., Sun H., Koblan K. S., Wang H. Tuberoinfundibular peptide of 39 residues

- (TIP39): molecular structure and activity for parathyroid hormone 2 receptor. *Neuropharmacology*. 2003;44:141–53. doi:10.1016/S0028-3908(02)00335-0.
7. Usdin T. B., Bonner T. I., Harta G., Mezey E. Distribution of parathyroid hormone-2 receptor messenger ribonucleic acid in rat. *Endocrinology*. 1996;137: 4285–4297. doi:10.1210/endo.137.10.8828488.
8. Usdin T.B., Hoare S.R., Wang T., Mezey E., Kowalak J.A. TIP39: a new neuropeptide and PTH2-receptor agonist from hypothalamus. *Nat Neurosci*. 1999a; 2(11):941–943. doi: 10.1038/14724.
9. Dobolyi A., Palkovits M., Usdin T.B. Expression and distribution of tuberoinfundibular peptide of 39 residues in the rat central nervous system. *J Comp Neurol*. 2003b;455:547–566. doi:10.1002/cne.10515.
10. Brenner D., Bago A.G., Gallatz K., Palkovits M., Usdin T.B., Dobolyi A. Tuberoinfundibular peptide of 39 residues in the embryonic and early postnatal rat brain. *J Chem Neuroanat*. 2008; 36: 59–68. DOI:10.1016/j.jchemneu.2008.04.001.
11. Dobolyi A., Palkovits M., Usdin T.B. The TIP39-PTH2 receptor system: unique peptidergic cell groups in the brainstem and their interactions with central regulatory mechanisms. *Prog Neurobiol*. 2010;90(1):29–59. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.10.017.
12. Dobolyi A., Palkovits M., Bodnar I., Usdin T.B. Neurons containing tuberoinfundibular peptide of 39 residues project to limbic, endocrine, auditory and spinal areas in rat. *Neuroscience*. 2003;122:1093–1105. doi: 10.1016/j.neuroscience.2003.08.034.
13. Wang J., Palkovits M., Usdin T.B., Dobolyi A. Afferent connections of the subparafascicular area in rat. *Neuroscience*. 2006b;138:97–220. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.11.010.
14. Palkovits M., Usdin T.B., Makara G.B., Dobolyi A. Tuberoinfundibular peptide of 39 residues- immunoreactive fibers in the zona incerta and the supraoptic decussations terminate in the neuroendocrine hypothalamus. *Neurochem Res*. 2010;35(12):2078–85. doi:10.1007/s11064-010-0292-2.
15. Wang T., Palkovits M., Rusnak M., Mezey E., Usdin T.B. Distribution of parathyroid hormone-2 receptor-like immunoreactivity and messenger RNA in the rat nervous system. *Neuroscience*. 2000;100:629–649. doi:10.1016/S0306-4522(00)00282-7.
16. Faber C.A., Dobolyi A., Sleeman M., Usdin T.B. Distribution of tuberoinfundibular peptide of 39 residues and its receptor, parathyroid hormone 2 receptor, in the mouse brain. *J Comp Neurol*. 2007;502:563–83. doi: 10.1002/cne.21330.
17. Dobolyi A., Irwin S., Wang J., Usdin T.B. The distribution and neurochemistry of the parathyroid hormone 2 receptor in the rat hypothalamus. *Neurochem Res*. 2006a;31:227–236. doi:10.1007/s11064-005-9011-9.
18. Bagó AG, Dimitrov E, Saunders R, Seress L, Palkovits M, Usdin TB, Dobolyi A. Parathyroid hormone 2 receptor and its endogenous ligand tuberoinfundibular peptide of 39 residues are concentrated in endocrine, viscerosensory and auditory brain regions in macaque and human. *Neuroscience*. 2009;162:128–147. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.04.054.
19. Dimitrov E., Usdin T.B. Tuberoinfundibular peptide of 39 residues modulates the mouse hypothalamic-pituitary-adrenal axis via paraventricular glutamatergic neurons. *J Comp Neurol*. 2010;518:4375–4394. doi:10.1002/cne.22462.
20. Matsumoto M., Kondo S., Usdin T. B., Ueda H. Parathyroid hormone 2 receptor is a functional marker of nociceptive myelinated fibers responsible for neuropathic pain. *J. Neurochem*. 2010;112:521–530. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06473.x.
21. Kuo J., Usdin T.B. Development of a rat parathyroid hormone 2 receptor antagonist. *Peptides*. 2007;28:887–892. doi:10.1016/j.peptides.2006.12.002.
22. Sugimura Y., Murase T., Ishizaki S., Tachikawa K., Arima H., Miura Y., Usdin T.B, Oiso Y. Centrally administered tuberoinfundibular peptide of 39 residues inhibits arginine vasopressin release in conscious rats. *Endocrinology*. 2003; 144:2791–2796. doi:10.1210/en.2002-0017.
23. Haaf J. A., Maigret C., Andringa-Bakker E. A., van Wimersma Greidanus T. B. Dynorphin- (1–13) is a potent in vivo suppressor of vasopressin levels in the rat. *Acta Endocrinol*. 1987;114:96–101. doi:10.1530/acta.0.1140096.
24. Heijning B. J., Herik I. K., Rots N. Y., Greidanus, T. B. Enhanced neurohypophyseal vasopressin release is associated with increased opioid inhibition of oxytocin release. *J. Neuroendocrinol*. 1991;(3):57–64.
25. Antunes-Rodrigues J., de Castro, M., Elias, L. L., Valenca, M. M., and McCann, S. M.. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol. Rev*. 2004;84:169–208. doi:10.1152/physrev.00017.2003.
26. Usdin T. B., Dobolyi A., Ueda H., Palkovits M. Emerging functions for tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Trends Endocrinol. Metab*. 2003;14:14–19. doi:10.1016/S1043-2760(02)00002-4.
27. Luque R. M., Park S., Kineman R. D. Role of endogenous somatostatin in regulating GH output under basal conditions and in response to metabolic extremes. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2008;286:155–168. doi: 10.1016/j.mce.2007.12.005.
28. Ward H.L., Small C.J., Murphy K.G., Kennedy A.R., Ghatei M.A., Bloom S.R. The actions of tuberoinfundibular peptide on the hypothalamo-pituitary axes. *Endocrinology*. 2001;142:3451–3456. doi: 10.1677/joe.0.1740095.
29. Coutellier, L., Logemann, A., Kuo, J., Rusnak, M., and Usdin, T. B. TIP39 modulates effects of novelty-induced arousal on memory. *Genes Brain Behav*. 2011a;10:90–99. doi:10.1111/j.1601-183X.2010.00643.x.
30. Arnsten A. F. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat. Rev. Neurosci*. 2009;10:410–422. doi:10.1038/nrn2648.
31. LaBuda C.J., Dobolyi A., Usdin T.B. Tuberoinfundibular peptide of 39 residues produces

- anxiolytic and antidepressant actions. *Neuroreport*. 2004;15: 881–885. doi:10.1097/00001756-200404090-00030.
32. Coutellier L., and Usdin T. B. Enhanced long-term fear memory and increased anxiety and depression-like behavior after exposure to an aversive event in mice lacking TIP39 signaling. *Behav. Brain Res.* 2011; 222, 265–269. doi:10.1016/j.bbr.2011.02.043.
33. Fegley D.B., Holmes A., Riordan T., Faber C.A., Weiss J.R., Ma S., Batkai S., Pacher P., Dobolyi A., Murphy A., Sleeman M.W., Usdin T.B. Increased fear- and stress-related anxiety-like behavior in mice lacking tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Genes Brain Behav.* 2008;7(8):933–42. doi:10.1111/j.1601-183X.2008.00432.x.
34. LeDoux, J. The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2003;23:727–738. doi:10.1023/a:1025048802629.
35. Dimitrov E.L., Kim Y.Y., Usdin T.B. Regulation of hypothalamic signaling by tuberoinfundibular peptide of 39 residues is critical for the response to cold: a novel peptidergic mechanism of thermoregulation. *J Neurosci.* 2011;31:18166–18179. doi:10.1523/JNEUROSCI.2619-11.2011.
36. Dobolyi A., Ueda H., Uchida H., Palkovits M., Usdin T.B. Anatomical and physiological evidence for involvement of tuberoinfundibular peptide of 39 residues in nociception. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:1651–1656. doi:10.1073/pnas.042416199.
37. Dimitrov E. L., Petrus E., and Usdin T. B. Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39) signaling modulates acute and tonic nociception. *Exp. Neurol.* 2010;226:68–83. doi:10.1016/j.expneurol.2010.08.004.
38. Benarroch, E. E. Painautonomic interactions. *Neurol. Sci.* 2006;27(Suppl 2), S130–S133. doi:10.1007/s10072-006-0587-x.
39. Cservenak M, Keller D, Kis V, Fazekas EA, Ollos H, Leko AH, Szabo ER, Renner E, Usdin TB, Palkovits M, Dobolyi A. A Thalamo-Hypothalamic Pathway That Activates Oxytocin Neurons in Social Contexts in Female Rats. *Endocrinology.* 2017a;158:335–348. doi:10.1210/en.2016-1645.
40. Varga T., Mogyoródi B., Bagó A.G. et al. Paralemniscal TIP39 is induced in rat dams and may participate in maternal functions. *Brain Struct Funct.* 2012;217: 323–335. doi:10.1007/s00429-011-0357-2.
41. Dobolyi A., Dimitrov E., Palkovits M., Usdin, T. The Neuroendocrine Functions of the Parathyroid Hormone 2 Receptor. *Frontiers in endocrinology.* 2012;3:121. doi:10.3389/fendo.2012.00121.
42. Cservenák M., Szabó É.R., Bodnár I., Lékó A., Palkovits M., Nagy G.M., Usdin T.B., Dobolyi A. Thalamic neuropeptide mediating the effects of nursing on lactation and maternal motivation. *Psychoneuroendocrinology.* 2013;38(12):3070–84. doi:10.1016/j.psyneuen.2013.09.004.
43. Carter C.S., Altemus M., Chrousos G.P. Neuroendocrine and emotional changes in the post-partum period. *Prog Brain Res.* 2001;133:241–249. doi: 10.1016/s0079-6123(01)33018-2.
44. Neumann I.D. Alterations in behavioral and neuroendocrine stress coping strategies in pregnant, parturient and lactating rats. *Prog Brain Res.* 2001;133: 143–152. doi:10.1016/S0079-6123(01)33011-X.
45. Neumann I.D. Brain mechanisms underlying emotional alterations in the peripartum period in rats. *Depress Anxiety.* 2003;17:111–121. doi:10.1002/da.10070.
46. Bosch O.J., Neumann I.D. Both oxytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: from central release to sites of action. *Horm Behav.* 2012;61:293–303. doi:10.1016/j.yhbeh.2011.11.002.
47. Lacalle S. de, Saper C.B. Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity marks putative visceral sensory pathways in human brain. *Neuroscience.* 2000;100:115–130. doi:10.1016/S0306-4522(00)00245-1.
48. Kostich W.A., Grzanna R., Lu N.Z., Largent B.L. Immunohistochemical visualization of corticotropin-releasing factor type 1 (CRF1) receptors in monkey brain. *J Comp Neurol.* 2004;478:111–125. doi:10.1002/cne.20271.
49. Li, C., Chen, P., and Smith, M. S. Neural populations in the rat forebrain and brainstem activated by the suckling stimulus as demonstrated by cFos expression. *Neuroscience* 1999;94:117–129. doi:10.1016/S0306-4522(99)00236-5.
50. Lin S. H., Miyata S., Matsunaga W., Kawarabayashi T., Nakashima T., Kiyohara, T.. Metabolic mapping of the brain in pregnant, parturient and lactating rats using fos immunohistochemistry. *Brain Res.* 1998;787:226–236. doi:10.1016/S0006-8993(97)01484-4.
51. Lonstein, J. S., and Stern, J. M. Role of the midbrain periaqueductal gray in maternal nurturance and aggression: c-fos and electrolytic lesion studies in lactating rats. *J. Neurosci.* 1997;17:3364–3378. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-09-03364.1997.
52. Simerly, R. B. Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* 2002;25:507–536. doi:10.1146/annurev.neuro.25.112701.142745.
53. Hasen, N. S., and Gammie, S. C. Differential fos activation in virgin and lactating mice in response to an intruder. *Physiol. Behav.* 2005;84:681–695. doi:10.1016/j.physbeh.2005.02.010.

СТЕХИОМЕТРИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ МЕТАБОЛИЗМА ЖИВОТНОЙ КЛЕТКИ: ПОНЯТИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Тутаев К. Ю.¹, Стрыгин А. В.^{1,3}, Букатин М. В.³, Толкачев Б. Е.³, Морковин Е. И.^{1,3},

Колобродова Н. А.^{1,3}, Стрыгина А. О.^{1,3}, Кузнецова О. Ю.³, Срослова Г. А.^{1,2},

Доценко А. М.^{1,3}, Лисина О. А.³, Кнышова Л. П.^{1,3}

¹ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», 400131, площадь Павших борцов, 1, Волгоград, Россия

²ФГАОУ ВО «Волгоградский государственный университет», 400062, пр-т Университетский, 100, Волгоград, Россия

³ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России (ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России), 400131, площадь Павших борцов 1, Волгоград, Россия

Для корреспонденции: Колобродова Наталья Александровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории геномных и протеомных исследований ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», доцент кафедры биологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, e-mail: medbiochem@mail.ru

For correspondence: Kolobrodova Natalia Aleksandrovna, PhD, Senior Researcher at the Laboratory of Genomics and Proteomics of Volgograd Medical Research Center, Associate Professor of the Department of Biology, Volgograd State Medical University; e-mail: medbiochem@mail.ru

Information about authors:

Tutaev K. Yu., <http://orcid.org/0000-0003-2678-2322>

Strygin A. V., <http://orcid.org/0000-0002-6997-1601>

Bukatin M. V., <http://orcid.org/0000-0003-1031-0697>

Tolkachev B. E., <http://orcid.org/0000-0002-7934-6586>

Morkovin E. I., <http://orcid.org/0000-0002-7119-3546>

Kolobrodova N. A., <http://orcid.org/0000-0002-8927-4811>

Strygina A. O., <http://orcid.org/0000-0001-7478-2007>

Kuznetsova O. Yu., <http://orcid.org/0000-0002-9991-6136>

Sroslova G. A., <http://orcid.org/0000-0002-9118-7098>

Docenko A. M., <http://orcid.org/0000-0003-3324-3351>

Lisina O. A., <http://orcid.org/0000-0002-8017-4726>

Knysheva L. P., <http://orcid.org/0000-0001-6002-1231>

РЕЗЮМЕ

Возможность получать большие массивы разнородных данных о компонентах животной клетки с помощью высокопроизводительных молекулярно-биологических технологий вызывает необходимость развития методов компьютерной обработки данных. Одним из таких методов является представление животной клетки как единой биологической системы посредством стехиометрической модели метаболической сети клетки. Процесс метаболизма клетки во времени рассматривается в такой модели как ряд последовательных квазистатических состояний. Процедура валидации модели включает ряд последовательных этапов: анализ метаболической сети; подтверждение выводов модельного анализа экспериментальными данными на живой клетке; настройка параметров модели, направленная на более точное имитирование метаболизма клетки. Модель представляют ориентированный граф и математическая матрица, которые отображают одномоментное состояние стехиометрических уравнений ферментативных реакций, формирующих метаболическую сеть клетки. При определении функционального состояния метаболической системы клетки используются матричные вычисления, задачи оптимизации метаболических функций клетки решаются методами линейного программирования и теории графов. Примером практического применения моделей метаболизма клетки человека являются модели Reson. Они нашли практическое применение в исследованиях при определении биомаркеров действия биологически активных веществ, изучении врожденных дефектов метаболизма, выявлении побочных эффектов лекарственных действий, определении мишеней воздействия биологически активных веществ, исследований метаболизма раковых клеток. На сегодня созданы для применения в различных областях биомедицинских исследований модели метаболизма различных клеток: гепатоцитов, кардиомиоцитов, астроцитов, клеток почек, адипоцитов, эритроцитов, мононуклеаров крови, мезенхимальных стволовых клеток, тромбоцитов, миоцитов, сперматозоидов, энтероцитов, эндотелиальных клеток, раковых клеток, нейронов мозга.

Ключевые слова: животная клетка, адаптация, стехиометрические модели, метаболизм, биомедицинские исследования

**STOICHIOMETRIC MODELS OF ANIMAL CELL METABOLISM:
CONCEPT AND APPLICATION IN BIOMEDICAL RESEARCH**

Tutaev K. Yu.¹, Strygin A. V.^{1,3}, Bukatin M. V.³, Tolkachev B. E.³, Morkovin E. I.^{1,3},
Kolobrodova N. A.^{1,3}, Strygina A. O.^{1,3}, Kuznetsova O. Yu.³, Sroslova G. A.^{1,2}, Docenko A. M.^{1,3},
Lisina O. A.³, Knyshova L. P.^{1,3}

¹Volgograd Medical Research Center, Volgograd, Russia

²Volgograd State University, Volgograd, Russia

³Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

SUMMARY

The ability to obtain large amounts of heterogeneous data on the components of an animal cell using high-performance molecular biological technologies necessitates the development of computer data processing methods. One of these methods is the representation of an animal cell as a single biological system through a stoichiometric model of the metabolic network of the cell. The process of cell metabolism over time is considered in such a model as a series of sequential quasistatic states. The model validation procedure includes a number of successive stages: analysis of the metabolic network; confirmation of the conclusions of model analysis by experimental data on a living cell; tuning of model parameters aimed at more accurate imitation of cell metabolism. The model is represented by a directed graph and a mathematical matrix, which display the simultaneous state of stoichiometric equations of enzymatic reactions forming the metabolic network of the cell. When determining the functional state of the metabolic system of a cell, matrix calculations are used; the tasks of optimizing the metabolic functions of a cell are solved by linear programming methods and graph theory. An example of the practical application of human cell metabolism models are Recon models. They found practical application in research when determining biomarkers of the action of biologically active substances, studying birth defects in metabolism, identifying side effects of a drug action, determining targets for exposure to biologically active substances, and studying cancer cell metabolism. Today, metabolic models of various cells have been created for use in various fields of biomedical research: hepatocytes, cardiomyocytes, astrocytes, kidney cells, adipocytes, red blood cells, blood mononuclear cells, mesenchymal stem cells, platelets, myocytes, sperm cells, enterocytes, endothelial cells, cancer cells, brain neurons.

Key words: animal cell, adaptation, stoichiometric models, metabolism, biomedical research

Одним из действенных способов понять и предсказать адаптационный ответ клетки человека на внешнее или внутреннее (мутация гена) воздействие является представление её как биологической системы с целью проведения системного анализа. На уровне человеческой клетки реализация заложенной в геноме информации нацелена на выполнение определённых функций в составе целого организма так что, каждая клетка человека обладает набором целевых функций, в который помимо функций поддержания гомеостаза входят функции, определяющие типоспецифичный фенотип. Модель метаболизма клетки является имитацией метаболического фенотипа, который является результатом последовательной реализации генетической информации на уровне эпигенома, транскриптома, протеома и метаболома. Информация, полученная со всех этих уровней может быть использована для построения метаболической модели клетки. Компромиссом высокой производительности аналитических методов протеомики, транскриптомики и метаболомики является разрушение клетки, так что получаемые данные содержат информацию о состоянии клетки в момент её разрушения. Такие свойства данных диктуют вид модели животной клетки, которая является статической. Процесс метаболизма клетки во времени рассматривается в такой модели как ряд последовательных квазиста-

тичных состояний. Квазистатичность состояния задаётся условием метаболического равновесия, при котором каждый внутренний метаболит потребляется с той же скоростью, что и образуется, а количество масс веществ, входящих в систему и выходящих из системы, неизменно. В уравнениях ферментативных реакций модели баланс масс выражается через стехиометрические коэффициенты, а модель метаболизма называется стехиометрической. Для проведения системного анализа модель метаболизма клетки должна обладать масштабом; минимум – охватывать основные подсистемы метаболизма, максимум – задействовать все ферменты и белки метаболизма, закодированные в геноме клетки, так называемая геном - масштабированная модель. Стехиометрические модели метаболизма животной клетки активно применяются в доклинических исследованиях по выявлению побочных эффектов лекарственных веществ и определению маркеров лекарственного воздействия, в поиске перспективных мишеней лекарственного воздействия при создании новых лекарственных препаратов, в исследованиях метаболических нарушений, вызванных различными патогенными состояниями.

Условие квазистатичности состояния и количество компонентов биологической системы являются не единственными ограничениями, определяющими стехиометрическую модель

клеточного метаболизма, которую классифицируют как модель на основе ограничений [1]. Другими ограничениями являются: топология метаболической сети, условие непротиворечивости физико - химическим законам, минимальные и максимальные пределы мощности образования продукта отдельно взятых метаболических реакции. Наложение ограничений определяет пространство квазистатических состояний, в которых может существовать метаболическая модель биологической системы. Любое квазистатическое состояние модели рассматривается как в определенной степени достоверности предположение о поведении и свойствах моделируемого биологического объекта при определенных внешних условиях, которое требует экспериментального подтверждения, так называемой валидации. Процедура валидации модели метаболизма животной клетки включает следующие этапы: анализ метаболической сети; подтверждение выводов модельного анализа экспериментальными данными на живой клетке; настройка параметров модели согласно данным эксперимента, направленная на более точное имитирование метаболизма клетки. Одним из видов анализа метаболической сети, применяемый в процедуре валидации модели, является топологический анализ, который выявляет ошибки и упущения, допущенные при реконструкции метаболической сети, такие как метаболический тупик или сетевой разрыв. Кроме этого анализ топологических свойств метаболической сети клетки выявляет узлы с наибольшим количеством смежных дуг (хабы), часто повторяющиеся подграфы (мотивы), мотивы с наибольшей плотностью связей (кластеры), и другие показатели, которые в конечном итоге определяют основные принципы регуляции метаболической сети при том или ином внешнем воздействии или патологическом состоянии [2].

Стехиометрическая модель метаболизма клетки систематизирует, связывает и формализует разрозненные данные из геномных, протеомных и метаболомных баз данных сначала в формат графа, а затем в матрицу, получившую название стехиометрическая матрица. Метаболическая сеть клетки отображается двудольным графом, в котором узлы есть метаболиты, дуги – ферментативные реакции, последовательность смежных дуг – метаболический путь. В графической модели метаболизма клетки показано какими метаболическими путями поступающий в клетку субстрат преобразуются до конечного покидающего клетку продукта. Скорость преобразования поступившего в клетку субстрата в продукт, называется метаболический поток клетки. Данный показатель можно получить

экспериментально, измерив в единицу времени количество входящих в клетку субстратов и выходящих из клетки метаболитов. Понятие метаболический поток распространяется не только в отношении целой клетки, но и для отдельного метаболического пути или ферментативной реакции таким образом, что можно представить метаболический поток клетки как совокупность потоков метаболических путей, которые есть различные комбинации метаболических потоков реакций. Имеется несоответствие между модельным понятием поток метаболической реакции и характером данных, получаемых мультиомными методами исследований: в модели метаболизма клетки используется понятие метаболический поток, а не понятие концентрация метаболита, в то же время высокопроизводительные аналитические методы дают статистическую оценку концентрации молекул внутри клетки, но не определяют скорость ферментативной реакции. Данный парадокс несоответствия характера данных разрешают следующим способом: метаболический поток реакции задают в модели путём введения верхнего предела скорости метаболической реакции, который является линейной аппроксимацией данных о количественном содержании мРНК, белка или метаболита, участвующих в данной реакции [3]. Каждый из молекулярно – биологических методов мультиомных исследований имеет недостатки, затрудняющие возможность использования получаемых данных для определения метаболического потока, так для транскриптомики это неустойчивая корреляция между уровнем мРНК и активностью ферментов метаболизма [4: 43], для протеомики это технологическая сложность определения всех посттрансляционных модификаций ферментов, определяющих скорость метаболических реакций [5], для метаболомики это отсутствие единого аналитического метода, способного охватить весь метаболом, по причине большой разнородности химических структур метаболитов и низкой химической устойчивости метаболитов. Недостатки отдельно взятых методов мультиомных исследований преодолеваются интеграцией разнородных данных на основе стехиометрической модели метаболизма. Технология интеграции данных геномики, протеомики и метаболомики для определения метаболических потоков в стехиометрической модели метаболизма клетки именуется флюксомика [6].

Метаболическая модель клетки строится на основе информации из геномных, протеомных, метаболомных баз данных. Изначально определяется топология метаболической сети модели. Далее полученный граф представляется в виде

матрицы, из которой согласно условию квазистатического состояния вычисляют нулевую матрицу. Данная задача решается путём реализации алгоритма линейных комбинаторных преобразований на основе метода Гаусса-Джордана. В ходе реализации данного алгоритма проводятся алгебраические преобразования исходных конфигураций реакционных потоков в потоки с нулевым суммарным сочетанием реакций, последовательность осуществляемых при этом линейных комбинаций и перестановок потоков метаболических реакций заносится в идентификационную матрицу. Алгоритм выполняется до получения стехиометрической матрицы с нулевыми значениями, при этом в идентификационной матрице будет содержаться комбинация исходных реакционных потоков, которые образуют пути метаболических реакций, в которых субстратами и продуктами крайних реакций являются вещества входящие и выходящие из клетки. Идентификационная матрица содержащая конечные комбинации потоков метаболических реакций (ПМР), называется матрица метаболический путей. В полученных метаболических путях нельзя убрать ни одну из реакций, цепочки метаболических превращений, без выключения всего пути метаболизма. При этом полученные пути метаболизма нельзя разложить на более простые пути, которые способны осуществить подобный метаболизм поступающего в систему вещества до выходящего конечного продукта. Метаболический путь, обладающий выше описанными свойствами, называют элементарной конфигурацией потоков метаболических реакций или элементарным вектором потоков метаболических реакций. В множестве элементарных векторов ПМР выделяют подмножество векторов, в которых метаболизм поступающих веществ до конечных выходящих из системы метаболитов осуществляется наиболее коротким путём, такие вектора называются предельными метаболическими потоками, поскольку они определяют пределы пространства возможных путей метаболических реакций, которое задаётся набором введенных в модель ограничений. Каждый элементарный вектор ПМР можно представить, как линейную комбинацию предельных векторов ПМР [7; 8]. По - средством граф ориентированного анализа баланса элементарных векторов ПМР и предельных векторов ПМР определяют основные принципы регуляции и базовые топологические свойства метаболической сети клетки [9; 10].

Число возможных путей в сети метаболических реакций модели растёт экспоненциально с увеличением числа реакций, таким образом число определяемых элементарных векторов и

предельных метаболических потоков ограничено вычислительными мощностями компьютера. Существует ряд подходов преодоления данного ограничения путём разделения системы метаболических реакций модели на подсистемы, размер которых позволяет вычислить возможные пути метаболических реакций [11; 12].

Определение изменений в потоках метаболических реакций на внешнее (ксенобиотик) или внутреннее (мутация гена) воздействие проводится на стехиометрической модели метаболизма посредством решения задачи линейного программирования, условия которой формулируются следующим образом:

1. Скорость ферментативных реакций, обеспечивающих реализацию целевой функции клетки должна быть максимальной ($\max v_{\text{цф}}$), где $v_{\text{цф}}$ – скорость метаболической реакции в уравнении масс ферментативной реакции, обеспечивающей реализацию определённой целевой функции клетки.

2. Скорость отдельной ферментативной реакции должна быть больше нуля и меньше $\gamma = 1$ ($0 < v_{\text{цф}} < \gamma$), где γ – произвольное число, установленное для данной системы как 1.

3. Должно выполняться условие стационарного состояния системы, т.е. метаболического равновесия, при котором каждый внутренний метаболит потребляется с той же скоростью, что и образуется, а скорость реакций обмена с внешней средой постоянна ($S^*v = 0$), где S – стехиометрическая матрица размером $m \times n$, где m – число метаболитов, n – число реакций, в которой каждая ячейка определяется индексом метаболита i и индексом реакции j .

4. Для всех реакций обмена рассматриваемой метаболической системы с внешней средой скорость реакции потребления субстрата или реакции расхода продукта не должна превышать 1000 ($-1000 \leq v_b \leq +1000 \forall j \in B, \exists \iota \in M, \exists (\varphi, \iota) \in \{N_{\iota, \varphi}: \varphi \in B\}$), где $N_{\iota, j}$ – множество всех ячеек матрицы; v – вектор, метаболического потока реакции в стехиометрической матрице; v_b – скорость метаболической реакции на входе и на выходе из системы; B – множество индексов метаболических реакций на входе и на выходе из системы; M – множество индексов всех метаболитов системы;

5. Скорость реакции, заблокированной в результате действия внутреннего или внешнего фактора, должна равняться нулю ($v_p = 0$), где v_p – скорость реакции, заблокированной в результате действия внутреннего или внешнего фактора.

Решение данной задачи позволяет подобрать распределение потоков метаболических реакций, формирующее метаболический путь, кото-

рый выполняет целевую функцию клетки наиболее оптимальным способом.

Примером практического применения моделей метаболизма клетки человека являются модели Recon [13]. Модели Recon нашли практическое применение при определении биомаркеров лекарственного действия, изучении врожденных дефектов метаболизма, выявлении побочных эффектов лекарственного действия, определении мишеней лекарственного воздействия, исследований метаболизма раковых клеток. Стехиометрическая модель метаболизма версии Recon 2.2 имеет, уравновешенную по балансу масс и заряду всех входящих реакций матрицу, состоящую из 5324 метаболита и 7785 реакции. Белки, осуществляющие метаболические реакции модели, являются продуктами экспрессии 1675 генов. Новшеством модели Recon 2.2 в сравнении предыдущими версиями является введение нового клеточного компартмента митохондриального межмембранного пространства, что обеспечило более точную имитацию энергетического метаболизма, которая позволила определять электрохимический протонный градиент [14]. Крайней версией моделей линейки Recon является Recon3D, которая включает 3288 открытые рамки считывания, кодирующие белки участвующие в 13543 реакции с 4140 метаболитами. В версиях моделей Recon 2.2 и Recon3D в клетке выделено девять областей: цитоплазма [c], лизосома [l], ядро [n], митохондрия [m], митохондриальное межмембранное пространство [i], пероксисома [x], внеклеточное пространство [e], аппарат Гольджи [g], эндоплазматический ретикулум [r]. Стехиометрическая модель метаболизма версии Recon 3D имеет уравновешенную стехиометрическую матрицу, состоящую из 10 600 реакций и 5835 метаболитов. Модель Recon3D выполняет 431 целевую метаболическую функцию. Качественным отличием модели Recon3D от предыдущих версий является наличие информации о трехмерной структуре 12890 белков метаболизма и перекрестных ссылок на базы данных метаболитов и белков, содержащие информацию о трехмерной (3D) структуре белков и метаболитов. Наличие информации о 3D - структуре белков метаболизма и структуре молекулы испытуемого лекарственного вещества позволяет определить, какие реакции метаболической сети являются наиболее вероятными мишенями лекарственного воздействия. И на стехиометрической модели методом анализа баланса метаболических потоков определить изменение путей метаболических реакций, после введения нулевых значений в те потоки, ферменты которых являются мишенями лекарственного воздействия [15]. Модели Recon 2.2 и

Recon3D поддерживают унифицированный формат системной биологии (SBML) и совместимы с программой по реконструкции и анализу моделей на ограничениях (COBRA) [16; 17; 18]. Надо отметить, что модели Recon не учитывают типоспецифичность метаболического фенотипа клетки, т.е. являются так называемыми обобщенными моделями метаболизма клетки человека, что обусловлено тем, что компоненты модели определяются от генома, т.е. снизу - вверх: экзом – транскриптом – протеом – метаболом. Однако, требования к точности фармакологических исследований диктуют необходимость более точной имитации типоспецифичных особенностей метаболического фенотипа, которая достигается применением типоспецифичных моделей клеточного метаболизма. Создание метаболической модели клеток определённого типа происходит путём анализа данных мультиомных методов исследования и определения типоспецифичного набора целевых метаболических функций т.е. модель строится от фенотипа; транскриптом, протеом, метаболом – экзом [19]. На сегодня созданы для применения в фармакологических исследованиях модели метаболизма гепатоцитов [20; 21; 22], кардиомиоцитов [23; 24], астроцитов [25], клеток почек [26; 27], адипоцитов [28], эритроцитов [29], мононуклеаров крови [30; 31], мезенхимальных стволовых клеток [29], тромбоцитов [33], миоцитов [34], сперматозоидов [35], энтероцитов [36], эндотелиальных клеток [37], раковых клеток [38; 39; 40; 41], нейронов мозга [42].

Несмотря на довольно упрощенное представление о биологической системе стехиометрических модели метаболизма клетки находят широкое применение в биомедицинских исследованиях механизмов патогенеза заболеваний, поиске новых мишеней и биомаркёров лекарственного действия.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bordbar A., Monk J. M., King Z. A., Palsson B. Ø. Constraint-based models predict metabolic and associated cellular functions. *Nature Reviews Genetics*. 2014;15(2):107-20. doi:10.1038/nrg3643.
2. Rolfsson Ó., Paglia G., Magnúsdóttir M., Palsson B. Ø., Thiele I. Inferring the metabolism of human orphan metabolites from their metabolic network context affirms human gluconokinase activity. *The Biochemical Journal*. 2013;449(2):427-35. doi: 10.1042/BJ20120980.
3. Tepper N., Shlomi T. Efficient Modeling of MS/MS Data for Metabolic Flux Analysis. *Public Library of*

- Science ONE. 2015;10(70):e0130213. doi: 10.1371/journal.pone.0130213.
4. Ohtsuki S., Schaefer O., Kawakami H. et al. Simultaneous Absolute Protein Quantification of Transporters, Cytochromes P450, and UDP-Glucuronosyltransferases as a Novel Approach for the Characterization of Individual Human Liver: Comparison with mRNA Levels and Activities. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*. 2012;40(1):83-92. doi:10.1124/dmd.111.042259.
 5. Horvatovich P., Franke L., Bischoff R. Proteomic Studies Related to Genetic Determinants of Variability in Protein Concentrations. *Journal of proteome research*. 2014;13(1):5-14. doi: 10.1021/pr400765y.
 6. Winter G., Kromer J. O. Fluxomics – connecting ‘omics analysis and phenotypes. *Environmental Microbiology*. 2013;15(7):1901-1916. doi:10.1111/1462-2920.12064.
 7. Rienksma R. A., Suarez-Diez M., Spina L., Schaap P. J., Martins dos Santos V. A. P. Systems-level modeling of mycobacterial metabolism for the identification of new (multi-) drug targets. *Seminars in Immunology*. 2014;26(6):610-22. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.013.
 8. Schilling C. H., Letscher D., Palsson B. Ø. Theory for the Systemic Definition of Metabolic Pathways and their use in Interpreting Metabolic Function from a Pathway-Oriented Perspective. *Journal of Theoretical Biology*. 2000;203(3):229-248. doi: 10.1006/jtbi.2000.1073.
 9. Arabzadeh M., Zamani M. S., Sedighi M., Marashi S.-A. A Graph-Based Approach to Analyze Flux-Balanced Pathways in Metabolic Networks. *Biosystems*. 2018;165:40-51. doi: 10.1016/j.biosystems.2017.12.001.
 10. Xi Y., Wang F. Extreme pathway analysis reveals the organizing rules of metabolic regulation. *Public Library of Science ONE*. 2019;14(2):1-29. doi: 10.1371/journal.pone.0210539.
 11. Massucci F.A., Font-Clos F., De Martino A., Castillo I. A Novel Methodology to Estimate Metabolic Flux Distributions in Constraint-Based Models. *Metabolites*. 2013;3(3):838-852. doi: 10.3390/metabo3030838.
 12. Erdrich P., Steuer R., Klamt S. An algorithm for the reduction of genome-scale metabolic network models to meaningful core models. *BMC Systems Biology*. 2015;9(1):48. doi: 10.1186/s12918-015-0191-x.
 13. Thiele I., Swainston N., Fleming R. M. T. et al. A community-driven global reconstruction of human metabolism. *Nature biotechnology*. 2013;31(5):419-25. doi: 10.1038/nbt.2488.
 14. Swainston N., Smallbone K., Hefzi H. Recon 2.2: from reconstruction to model of human metabolism. *Metabolomics*. 2016;12(7):109. doi:10.1007/s11306-016-1051-4.
 15. Brunk E., Sahoo S., Zielinski D. et al. Recon3D: A Resource Enabling A Three-Dimensional View of Gene Variation in Human Metabolism. *Nature Biotechnology*. 2018; 36(3):272-281. doi:10.1038/nbt.4072.
 16. Noronha A., Daniélsdóttir A. D., Gawron P. et al. ReconMap: an interactive visualization of human metabolism. *Bioinformatics*. 2017;33(4):605-607. doi: 10.1093/bioinformatics/btw667.
 17. Huckal M., Bergmann F. T., Hoops S. et al. The Systems Biology Markup Language (SBML): Language Specification for Level 3 Version 1 Core. *Journal of Integrative Bioinformatics*. 2015;12(2):266. doi:10.1515/jib-2015-266.
 18. Orman M. A., Mattick J., Androulakis I. P., Berthiaume F. et al. Stoichiometry Based Steady-State Hepatic Flux Analysis: Computational and Experimental Aspects. *Metabolites*. 2012;2(1):268-91. doi: 10.3390/metabo2010268.
 19. O'Brien E. J., Monk J. M., Palsson B. Ø. Using Genome-Scale Models to Predict Biological Capabilities. *Cell*. 2015;161(5):971-987. doi:10.1016/j.cell.2015.05.019.
 20. Mardinoglu A., Agren R., Kampf C., Asplund A., Uhlen M., Nielsen J. Genome-scale metabolic modelling of hepatocytes reveals serine deficiency in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nature Communications*. 2014;5:3083. doi: 10.1038/ncomms4083.
 21. Gille C., Bölling C., Hoppe A. et al. HepatoNet1: a comprehensive metabolic reconstruction of the human hepatocyte for the analysis of liver physiology. *Molecular Systems Biology*. 2010;6:411. doi:10.1038/msb.2010.62.
 22. Rawls K. D., Blais E. M., Dougherty B.V. et al. Genome-Scale Characterization of Toxicity-Induced Metabolic Alterations in Primary Hepatocyte. *Toxicological Sciences*. 2019;172(2):279-291. doi:10.1093/toxsci/kfz197.
 23. Karlstädt A., Fliegner D., Kararigas G. et al. CardioNet: A human metabolic network suited for the study of cardiomyocyte metabolism. *BMC Systems Biology*. 2012;6:114. doi:10.1186/1752-0509-6-114.
 24. Zhao Y., Huang J. Reconstruction and analysis of human heart-specific metabolic network based on transcriptome and proteome data. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011;415(3):450-4. doi:10.1016/j.bbrc.2011.10.090.
 25. Martín-Jiménez, C. A., Salazar-Barreto D., Barreto G. E. et al. Genome-Scale Reconstruction of the Human Astrocyte Metabolic Network. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2017;9:23 doi:10.3389/fnagi.2017.00023.
 26. Zhang A., Dai S., Huang J. Reconstruction and Analysis of Human Kidney-Specific Metabolic Network Based on Omics Data. *BioMed Research International*. 2013;2013:187509. doi: 10.1155/2013/187509.
 27. Chang R. L., Xie L., Xie L., Bourne P. E., Palsson B. Ø. Drug Off-Target Effects Predicted Using Structural Analysis in the Context of a Metabolic Network Model. *Public Library of Science Computational Biology*. 2010;6(9):e1000938. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000938.
 28. Mardinoglu A., Agren R., Kampf C., Asplund A. et al. Integration of clinical data with a genome-scale metabolic model of the human adipocyte. *Molecular Systems Biology*. 2013;9:649. doi:10.1038/msb.2013.5.

29. Bordbar A., Jamshidi A., Palsson B. Ø. iAB-RBC-283: A proteomically derived knowledgebase of erythrocyte metabolism that can be used to simulate its physiological and patho-physiological states. *BMC Systems Biology*. 2011;5:110. doi:10.1186/1752-0509-5-110.
30. Han F., Li G., Dai S., Huang J. Genome-wide metabolic model to improve understanding of CD4(+) T cell metabolism, immunometabolism and application in drug design. *Molecular BioSystems*. 2016;12(2):431-43. doi:10.1039/c5mb00480b.
31. Sen P., Kempainen E., Orešič M. Perspectives on Systems Modeling of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2018;4:96. doi: 10.3389/fmolb.2017.00096.
32. Fouladiha H., Marashi S.-A., Shokrgozar M. A. Reconstruction and validation of a constraint-based metabolic network model for bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*. 2015;48(4):475-85. doi:10.1111/cpr.12197.
33. Thomas A., Rahmanian S., Bordbar A. et al. Network reconstruction of platelet metabolism identifies metabolic signature for aspirin resistance. *Scientific Reports*. 2014;4:3925. doi:10.1038/srep03925.
34. Varemo L., Scheele C., Broholm C. et al. Proteome- and Transcriptome-Driven Reconstruction of the Human Myocyte Metabolic Network and Its Use for Identification of Markers for Diabetes. *Cell Reports*. 2015;11(6):921-933. doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.010.
35. Asghari A., Marashi S.-A., Ansari-Pour N. A sperm-specific proteome-scale metabolic network model identifies non-glycolytic genes for energy deficiency in asthenozoospermia. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2017;63(2):100-112. doi:10.1080/19396368.2016.1263367.
36. Sahoo S., Thiele I. Predicting the impact of diet and enzymopathies on human small intestinal epithelial cells. *Human Molecular Genetics*. 2013;22(13):2705-22. doi: 10.1093/hmg/ddt119.
37. Patella F., Schug Z. T., Persi E. et al. Proteomics-Based Metabolic Modeling Reveals That Fatty Acid Oxidation (FAO) Controls Endothelial Cell (EC) Permeability. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2015;14(3):621-34. doi:10.1074/mcp.M114.045575.
38. Megchelenbrink W., Katzir R., Lu X. et al. Synthetic dosage lethality in the human metabolic network is highly predictive of tumor growth and cancer patient survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(39):12217-22. doi: 10.1073/pnas.1508573112.
39. Ghaffari P., Mardinoglu A., Asplund A. et al. Identifying anti-growth factors for human cancer cell lines through genome-scale metabolic modeling. *Scientific Reports*. 2015;5: 8183. doi: 10.1038/srep08183.
40. Nam H., Campodonico M., Bordbar A. et al. A Systems Approach to Predict Oncometabolites via Context-Specific Genome-Scale Metabolic Networks. *Public Library of Science Computational Biology*. 2014;10(9):e1003837. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003837.
41. Motamedian E., Ghavami G., Sardari S. Investigation on metabolism of cisplatin resistant ovarian cancer using a genome scale metabolic model and microarray data. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2015;18(3):267-76.
42. Supandi F., van Beek J. Computational prediction of changes in brain metabolic fluxes during Parkinson's disease from mRNA expression. *Public Library of Science ONE*. 2018;13(9):e0203687. doi: 10.1371/journal.pone.0203687.
43. Jouhten P., Wiebe M., Penttilä M. Dynamic flux balance analysis of the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* during the shift from fully respirative or respirofermentative metabolic states to anaerobiosis. *The FEBS Journal*. 2012;279(18):3338-54. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08649.x.

REFERENCES

- Bordbar A., Monk J. M., King Z. A., Palsson B. Ø. Constraint-based models predict metabolic and associated cellular functions. *Nature Reviews Genetics*. 2014;15(2):107-20. doi: 10.1038/nrg3643.
- Rolfsson Ó., Paglia G., Magnúsdóttir M., Palsson B. Ø., Thiele I. Inferring the metabolism of human orphan metabolites from their metabolic network context affirms human gluconokinase activity. *The Biochemical Journal*. 2013;449(2):427-35. doi: 10.1042/BJ20120980.
- Tepper N., Shlomi T. Efficient Modeling of MS/MS Data for Metabolic Flux Analysis. *Public Library of Science ONE*. 2015;10(70):e0130213. doi: 10.1371/journal.pone.0130213.
- Ohtsuki S., Schaefer O., Kawakami H. et al. Simultaneous Absolute Protein Quantification of Transporters, Cytochromes P450, and UDP-Glucuronosyltransferases as a Novel Approach for the Characterization of Individual Human Liver: Comparison with mRNA Levels and Activities. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*. 2012;40(1):83-92. doi: 10.1124/dmd.111.042259.
- Horvatovich P., Franke L., Bischoff R. Proteomic Studies Related to Genetic Determinants of Variability in Protein Concentrations. *Journal of proteome research*. 2014;13(1):5-14. doi: 10.1021/pr400765y.
- Winter G., Kromer J. O. Fluxomics – connecting 'omics analysis and phenotypes. *Environmental Microbiology*. 2013;15(7):1901-1916. doi: 10.1111/1462-2920.12064.
- Rienksma R. A., Suarez-Diez M., Spina L., Schaap P. J., Martins dos Santos V. A. P. Systems-level modeling of mycobacterial metabolism for the identification of new (multi-) drug targets. *Seminars in Immunology*. 2014;26(6):610-22. doi: 10.1016/j.smim.2014.09.013.
- Schilling C. H., Letscher D., Palsson B. Ø. Theory for the Systemic Definition of Metabolic Pathways and their use in Interpreting Metabolic Function from a Pathway-

Oriented Perspective. *Journal of Theoretical Biology*. 2000;203(3):229-248. doi: 10.1006/jtbi.2000.1073.

9. Arabzadeh M., Zamani M. S., Sedighi M., Marashi S.-A. A Graph-Based Approach to Analyze Flux-Balanced Pathways in Metabolic Networks. *Biosystems*. 2018;165:40-51. doi: 10.1016/j.biosystems.2017.12.001.

10. Xi Y., Wang F. Extreme pathway analysis reveals the organizing rules of metabolic regulation. *Public Library of Science ONE*. 2019;14(2):1-29. doi: 10.1371/journal.pone.0210539.

11. Massucci F.A., Font-Clos F., De Martino A., Castillo I. A Novel Methodology to Estimate Metabolic Flux Distributions in Constraint-Based Models. *Metabolites*. 2013;3(3):838-852. doi: 10.3390/metabo3030838.

12. Erdrich P., Steuer R., Klamt S. An algorithm for the reduction of genome-scale metabolic network models to meaningful core models. *BMC Systems Biology*. 2015;9(1):48. doi: 10.1186/s12918-015-0191-x.

13. Thiele I., Swainston N., Fleming R. M. T. et al. A community-driven global reconstruction of human metabolism. *Nature biotechnology*. 2013;31(5):419-25. doi: 10.1038/nbt.2488.

14. Swainston N., Smallbone K., Hefzi H. Recon 2.2: from reconstruction to model of human metabolism. *Metabolomics*. 2016;12(7):109. doi:10.1007/s11306-016-1051-4.

15. Brunk E., Sahoo S., Zielinski D. et al. Recon3D: A Resource Enabling A Three-Dimensional View of Gene Variation in Human Metabolism. *Nature Biotechnology*. 2018; 36(3):272-281. doi: 10.1038/nbt.4072.

16. Noronha A., Daniëlsdóttir A. D., Gawron P. et al. ReconMap: an interactive visualization of human metabolism. *Bioinformatics*. 2017;33(4):605-607. doi: 10.1093/bioinformatics/btw667.

17. Huckal M., Bergmann F. T., Hoops S. et al. The Systems Biology Markup Language (SBML): Language Specification for Level 3 Version 1 Core. *Journal of Integrative Bioinformatics*. 2015;12(2):266. doi: 10.1515/jib-2015-266.

18. Orman M. A., Mattick J., Androurakis I. P., Berthiaume F. et al. Stoichiometry Based Steady-State Hepatic Flux Analysis: Computational and Experimental Aspects. *Metabolites*. 2012;2(1):268-91. doi: 10.3390/metabo2010268.

19. O'Brien E. J., Monk J. M., Palsson B. Ø. Using Genome-Scale Models to Predict Biological Capabilities. *Cell*. 2015;161(5):971-987. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.019.

20. Mardinoglu A., Agren R., Kampf C., Asplund A., Uhlen M., Nielsen J. Genome-scale metabolic modelling of hepatocytes reveals serine deficiency in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nature Communications*. 2014;5:3083. doi: 10.1038/ncomms4083.

21. Gille C., Bölling C., Hoppe A. et al. HepatoNet1: a comprehensive metabolic reconstruction of the human hepatocyte for the analysis of liver physiology. *Molecular Systems Biology*. 2010;6:411. doi: 10.1038/msb.2010.62.

22. Rawls K. D., Blais E. M., Dougherty B.V. et al. Genome-Scale Characterization of Toxicity-Induced Metabolic Alterations in Primary Hepatocyte. *Toxicological Sciences*. 2019;172(2):279-291. doi: 10.1093/toxsci/kfz197.

23. Karlstädt A., Fliegner D., Kararigas G. et al. CardioNet: A human metabolic network suited for the study of cardiomyocyte metabolism. *BMC Systems Biology*. 2012;6:114. doi: 10.1186/1752-0509-6-114.

24. Zhao Y., Huang J. Reconstruction and analysis of human heart-specific metabolic network based on transcriptome and proteome data. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011;415(3):450-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.10.090.

25. Martín-Jiménez, C. A., Salazar-Barreto D., Barreto G. E. et al. Genome-Scale Reconstruction of the Human Astrocyte Metabolic Network. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2017;9:23 doi: 10.3389/fnagi.2017.00023.

26. Zhang A., Dai S., Huang J. Reconstruction and Analysis of Human Kidney-Specific Metabolic Network Based on Omics Data. *BioMed Research International*. 2013;2013:187509. doi: 10.1155/2013/187509.

27. Chang R. L., Xie L., Xie L., Bourne P. E., Palsson B. Ø. Drug Off-Target Effects Predicted Using Structural Analysis in the Context of a Metabolic Network Model. *Public Library of Science Computational Biology*. 2010;6(9):e1000938. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000938.

28. Mardinoglu A., Agren R., Kampf C., Asplund A. et al. Integration of clinical data with a genome-scale metabolic model of the human adipocyte. *Molecular Systems Biology*. 2013;9:649. doi: 10.1038/msb.2013.5.

29. Bordbar A., Jamshidi A., Palsson B. Ø. iAB-RBC-283: A proteomically derived knowledgebase of erythrocyte metabolism that can be used to simulate its physiological and patho-physiological states. *BMC Systems Biology*. 2011;5:110. doi: 10.1186/1752-0509-5-110.

30. Han F., Li G., Dai S., Huang J. Genome-wide metabolic model to improve understanding of CD4(+) T cell metabolism, immunometabolism and application in drug design. *Molecular BioSystems*. 2016;12(2):431-43. doi: 10.1039/c5mb00480b.

31. Sen P., Kempainen E., Orešič M. Perspectives on Systems Modeling of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2018;4:96. doi: 10.3389/fmolb.2017.00096.

32. Fouladiha H., Marashi S.-A., Shokrgozar M. A. Reconstruction and validation of a constraint-based metabolic network model for bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*. 2015;48(4):475-85. doi: 10.1111/cpr.12197.

33. Thomas A., Rahmanian S., Bordbar A. et al. Network reconstruction of platelet metabolism identifies metabolic signature for aspirin resistance. *Scientific Reports*. 2014;4:3925. doi: 10.1038/srep03925.

34. Varemo L., Scheele C., Broholm C. et al. Proteome- and Transcriptome-Driven Reconstruction

- of the Human Myocyte Metabolic Network and Its Use for Identification of Markers for Diabetes. *Cell Reports*. 2015;11(6):921-933. doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.010.
35. Asghari A., Marashi S.-A., Ansari-Pour N. A sperm-specific proteome-scale metabolic network model identifies non-glycolytic genes for energy deficiency in asthenozoospermia. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2017;63(2):100-112. doi: 10.1080/19396368.2016.1263367.
36. Sahoo S., Thiele I. Predicting the impact of diet and enzymopathies on human small intestinal epithelial cells. *Human Molecular Genetics*. 2013;22(13):2705-22. doi: 10.1093/hmg/ddt119.
37. Patella F., Schug Z. T., Persi E. et al. Proteomics-Based Metabolic Modeling Reveals That Fatty Acid Oxidation (FAO) Controls Endothelial Cell (EC) Permeability. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2015;14(3):621-34. doi: 10.1074/mcp.M114.045575.
38. Megchelenbrink W., Katzir R., Lu X. et al. Synthetic dosage lethality in the human metabolic network is highly predictive of tumor growth and cancer patient survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(39):12217-22. doi: 10.1073/pnas.1508573112.
39. Ghaffari P., Mardinoglu A., Asplund A. et al. Identifying anti-growth factors for human cancer cell lines through genome-scale metabolic modeling. *Scientific Reports*. 2015;5: 8183. doi: 10.1038/srep08183.
40. Nam H., Campodonico M., Bordbar A. et al. A Systems Approach to Predict Oncometabolites via Context-Specific Genome-Scale Metabolic Networks. *Public Library of Science Computational Biology*. 2014;10(9):e1003837. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003837.
41. Motamedian E., Ghavami G., Sardari S. Investigation on metabolism of cisplatin resistant ovarian cancer using a genome scale metabolic model and microarray data. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2015;18(3):267-76.
42. Supandi F., van Beek J. Computational prediction of changes in brain metabolic fluxes during Parkinson's disease from mRNA expression. *Public Library of Science ONE*. 2018;13(9):e0203687. doi: 10.1371/journal.pone.0203687.
43. Jouhten P., Wiebe M., Penttilä M. Dynamic flux balance analysis of the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* during the shift from fully respirative or respirofermentative metabolic states to anaerobiosis. *The FEBS Journal*. 2012;279(18):3338-54. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08649.x.

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СОПРЯЖЕНИЯ В СИСТЕМЕ «СУПЕРОРГАНИЗМА» (ХОЗЯИН – МИКРОБИОТА)

Шестопапов А. В.^{1,2}, Шатова О. П.¹, Комарова Е. Ф.¹, Румянцев С. А.¹

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова (РНИМУ им. Н. И. Пирогова), 117997, ул. Островитянова, 1, Москва, Россия

²НМИЦ «Детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева», 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1

Для корреспонденции: Шатова Ольга Петровна, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии лечебного факультета, РНИМУ им. Н. И. Пирогова, e-mail: shatova.op@gmail.com

For correspondence: Shatova O. P., Associate Professor of Biochemistry and Molecular Biology of the Medical Faculty, N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, e-mail: shatova.op@gmail.com

Information about authors:

Shestopalov A. V., <https://orcid.org/0000-0002-1428-7706>

Shatova O. P., <https://orcid.org/0000-0003-4265-1293>

Komarova E. F., <https://orcid.org/0000-0002-7553-6550>

Rumyantsev S. A., <https://orcid.org/0000-0002-7418-0222>

РЕЗЮМЕ

На сегодняшний день считается, что организм человека и микробиота кишечника сосуществуют в метаболическом сопряжении, основанном на принципе мутуализма. Основной метаболической функцией микробиотической популяции кишечника является гиперпродукция короткоцепочечных жирных кислот, выполняющих энергетическую функцию, как для микроорганизмов, так и для клеток человека, регулирующих quorum sensing и участвующих в ответе иммунокомпетентных клеток макроорганизма через специфические сигнальные механизмы. Также характерным звеном в метаболическом сопряжении «суперорганизма» являются метаболические пути обмена триптофана и, соответственно, индолов, кинуренинов и серотонина. Индол выполняет роль межвидовой сигнальной молекулы и отвечает как за бактериальный quorum sensing, так и за регуляцию дифференцировки нервной ткани. Многие метаболические пути превращения триптофана амплифицированы микробиотическим сообществом, однако, образование кинуреновой кислоты, которая является сигнальной молекулой в энергетическом метаболизме, характерно только для макроорганизма. Следует отметить роль мембранных бактериальных везикул во взаимодействии хозяина и микробиоты как носителей факторов вирулентности и других модуляторов функции клеток макроорганизма. Несмотря на значительное количество исследований, метаболическое сопряжение системы «хозяин – микробиота» остаётся малоизученным. В связи с этим, целью данного обзора было осветить некоторые аспекты метаболического взаимодействия макроорганизма и его микробиоты.

Ключевые слова: микробиота; триптофан; кинуренины; короткоцепочечные жирные кислоты; индолы; метаболическое сопряжение; бактериальные везикулы.

FEATURES OF METABOLIC COUPLING IN THE «SUPERORGANISM» SYSTEM (HOST – MICROBIOTA)

Shestopalov A. V.^{1,2}, Shatova O. P.¹, Komarova E. F.¹, Rumyantsev S. A.¹

¹N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

²Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

SUMMARY

Today, it is believed that the human body and the intestinal microbiota exist in a metabolic coupling based on the principle of mutualism. The main metabolic function of the intestinal microbiotic population is the hyperproduction of short-chain fatty acids, which perform an energy function for both microorganisms and human cells, regulate the quorum and participate in the response of immune cells of the macroorganism through specific signaling mechanisms. Also, a characteristic link in the metabolic coupling of the «superorganism» is the metabolic pathways of tryptophan and, respectively, indoles, kynurenines and serotonin. Indole acts as an interspecific signaling molecule and is responsible for both the bacterial quorum and, for example, regulates the differentiation of nerve tissue. Many metabolic pathways of tryptophan conversion are amplified by the microbiotic community, but the formation of kynurenine acid, which is a signal molecule in energy metabolism, is characteristic only for the macroorganism. It should be noted the role of membrane bacterial vesicles in the interaction of the host and the microbiota as carriers of virulence factors and other modulators of the function of macroorganism cells. Despite a significant amount of research, the metabolic coupling of the «macroorganism – gut microbiota» system remains poorly understood. In this regard, the purpose of this review was to highlight some aspects of the metabolic interaction of the macroorganism and its microbiota.

Key words: the microbiome; tryptophan; kynurenine; short-chain fatty acids; indoles; metabolic coupling; bacterial vesicles.

В настоящее время организм человека принято рассматривать с позиций «суперорганизма», который представлен макроорганизмом и микроорганизмами, численный состав которых, равно как и их разнообразие, зависит от возраста, пола, национальной принадлежности и соматического состояния макроорганизма [1; 2; 3]. Численно геном микроорганизмов превосходит в несколько раз геном организма человека и составляет около 99 % от суммарного генома «суперорганизма» [4]. Исходя из существенного превалирования микробиотического генома, следует сделать вывод, что макроорганизм осуществляет хостинг нужной ему генетической информации и, как из «облачного хранилища», извлекает нужные ему для гомеостаза метаболиты. Очевидно, что отсутствие микробиотического органа или его серьёзное повреждение является не совместимым с жизнью.

Целью нашего обзора было проанализировать некоторые механизмы метаболического сопряжения макроорганизма и микробиоты кишечника. Под «метаболическим сопряжением» мы понимаем делегирование микробиотической популяции целого ряда метаболических функций макроорганизма, а также simultанное восприятие «суперорганизмом» целого пула метаболитов и сигнальных молекул.

Известно, что большая часть микроорганизмов человека живёт в толстой кишке (около 60 %) [5]. Видимо это обусловлено тем, что основной процесс переваривания и всасывания происходит проксимально, и макроорганизм беспрепятственно всасывает необходимое ему количество эссенциальных веществ. При этом микробиоту принято подразделять на резидентную (облигатную), которая составляет 90 % всех микроорганизмов, факультативную, которая составляет около 9,5 %, и транзитную (случайную), количество которой не превышает 0,5 % [6]. Микробиота каждого человека уникальна по видовому составу, разнообразию и количеству микроорганизмов. Число микроорганизмов увеличивается с рождения и достигает своей высшей точки в подростковом возрасте, а к старости имеет тенденцию к снижению [3]. Данный факт должен привлечь внимание специалистов, которые занимаются anti-aging терапией (коррекция микробиотического профиля кишечника должна стать обязательным её компонентом).

Роль микробиотических короткоцепочечных жирных кислот

Образование короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) одна из ключевых метаболических функций филометаболического ядра кишечной микробиоты [3]. При этом основным источником энергии и углерода при продукции

КЦЖК являются углеводы. Следует отметить, что человеческий геном кодирует всего лишь 17 ферментов для переваривания углеводов, тогда как некоторые бактерии кишечника, такие как *Bacteroides thetaiotaomicron*, кодируют более 260 различных гликозидаз [7]. Интересно, что бактериоиды производят преимущественно ацетат и пропионат, тогда как фирмикуты продуцируют преимущественно бутират [7].

КЦЖК являются топливными молекулами для микроорганизмов и в то же время выполняют регуляторную функцию для всего «суперорганизма». Следует отметить, что около 95 % из энтеральных КЦЖК попадает в макроорганизм (до 1 моль/сутки) [3]. КЦЖК транспортируются через монокарбоксилатный транспортёр 1 (МКТ1) энтероцитов или пассивным транспортом [8] и в макроорганизме также выполняют энергетическую функцию. Для колоноцитов бутират является главной топливной молекулой [7] и на 70 % покрывает их энергетические потребности, так как вовлекаются в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) метаболизируясь в ацетил-КоА [8]. Также КЦЖК ацетат является энергетически значимой молекулой для миокарда, головного мозга, мышечной ткани и почек макроорганизма. Таким образом КЦЖК, которые образуют представители микробиотических популяций в кишечнике являются энергетически значимыми как для самих микроорганизмов, так и для различных органов и тканей, в том числе для клеток кишечника.

Основным поставщиком КЦЖК – формиата, ацетата, пропионата и бутирата – является процесс окисления глюкозы в микроорганизмах. Тогда как изомасляная и изовалериановая кислоты образуются при катаболизме аминокислот с разветвлённым боковым радикалом (валина и лейцина). Однако роль КЦЖК не ограничена только энергетической функцией. Она также заключается в регуляции кровообращения в слизистой оболочке кишечника (пропионатом и бутиратом) [3]. Кроме того показано, что пропионат, лактат и ацетат угнетают прикрепление условно-патогенных микроорганизмов к слизистой кишечника и оказывают позитивное влияние на клеточную пролиферацию колоноцитов. Примечательно, что бутират стимулирует рост и пролиферацию колоноцитов в норме, тогда как на клетки гепатоцеллюлярной карциномы и аденокарциномы кишечника бутират оказывает антипролиферативное действие. Этот феномен получил своё название – «парадокс бутирата». Он объясняется тем, что бутират ингибирует деацетилазы гистоновых белков и стимулирует ацетилирование последних, подавляя таким образом пролиферацию опухолевых клеток [3].

Однако не только бутират ингибирует деацетилазы гистоновых белков. Так, аналогичным действием обладают кислоты, которые образуются из аминокислот с разветвлённым радикалом [7].

Известно, что КЦЖК – кишечный бутират и пропионат – препятствуют развитию ожирения [9]. Установлено, что у пациентов с ожирением отмечается низкое микробное разнообразие и истощение таксонов метаболического микробиотического ядра [10]. Видимо, важное значение при развитии ожирения играет подавление или снижение бутират-продуцирующей популяции микроорганизмов в кишечнике. Бутират, как и индол, стимулирует продукцию энтероэндокринными клетками кишечника глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) [11], а он, в свою очередь, оказывает стимулирующее действие на глюконеогенез в эпителиальных клетках слизистой оболочки кишечника и энергетический обмен макроорганизма, а также влияет на пищевое поведение. В эксперименте на животных показано, что КЦЖК стимулируют энтероэндокринные клетки кишечника посредством митоген-активируемого киназного пути, отвечают за образование ГПП-1 в них и липогенез в печени [11]. Также было показано, что КЦЖК активируют продукцию ГПП-1, воздействуя на рецепторы свободных жирных кислот (РСЖК) 2-го и 3-го типов [12]. Вместе с тем, такие же рецепторы гиперэкспрессированы в поджелудочной железе, что позволяет КЦЖК (ацетату, пропионату и бутирату) повышать секрецию глюкагона и подавлять секрецию панкреатических соматостатина и инсулина [12].

Пропионат также оказывает стимулирующее действие на локальный колоноцитарный глюконеогенез. Так, при проведении плацебо-контролируемого изучения влияния инулин-пропионата у женщин склонных к ожирению установили, что данное производное КЦЖК снижает индекс массы тела, уменьшает аппетит и повышает концентрацию ГПП-1 в сыворотке крови [13].

Quorum sensing (QS) и аутоиндукторы в метаболическом сопряжении макроорганизма и микробиоты кишечника

QS – это процесс бактериального синхронного взаимодействия, включающий в себя продукцию аутоиндукторов (АИ), их сигналинг (и, соответственно ответ на АИ), а также регуляцию их продукции [14]. Однако, существующее понимание QS несовершенно, так как имеется ещё и сопряжение через АИ между микроорганизмами и макроорганизмом. Интересно, что к АИ относятся и КЦЖК ацетат: так, в частности, на примере *Escherichia coli* было показано, что ацетат дозозависимо влияет на смену фаз развития культуры этого естественного симбионта человека [3].

Кроме ацетата показана регуляторная роль в QS производного аминокислоты триптофан – индола, который продуцируется многими представителями кишечной микробиоты [15]. Индол выступает молекулой QS для *Escherichia coli* и регулирует экспрессию гена мультилекарственного экспортёра (MDR), отвечает за формирование биоплёнок. В недавних исследованиях показано, что индол дозозависимо снижает образование мембранных везикул (при добавлении 50 мМ индола везикуляция снижается на 52 %, тогда как при добавлении 500 мМ – на 88 %). Также известно, что на везикулогенез и синтез пиоцианина влияет хинолоновый сигнал *Pseudomonas* (PQS), а индол, в свою очередь, снижает синтез PQS. Таким образом, индол негативно регулирует образование PQS и положительно регулирует везикулогенез. Хорошо известно, что мембранные везикулы *P. aeruginosa* обладают высокой литической активностью и убивают как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии, поскольку содержат пептидогликан-гидролазы. Индол же демонстрирует антимикробную активность, стимулирует везикулогенез *P. aeruginosa* [15].

Сигнальными молекулами АИ-1 являются N-ацилгомосерин лактоны (АГЛ), которые служат для межклеточной коммуникации, называемой зондированием QS. Такие регуляторные системы позволяют бактериям чувствовать клеточную плотность и локализацию в пределах микроокружения, в соответствии с которыми они синхронизируют функции всей популяции [16]. Для синтеза АГЛ используется аминокислота метионин (S-аденозилметионин) и арил-КоА (производное кумаровой кислоты, являющейся, в свою очередь, продуктом обмена аминокислоты тирозин), или ацил-КоА [17]. АГЛ синтезируют в основном протобактерии и, таким образом, оказывают регуляторное воздействие на экспрессию генов вирулентности и формирования биоплёнок у патогенов *P. aeruginosa* [17]. АГЛ были исторически первыми идентифицированными молекулами QS [18].

Однако известно, что АИ оказывают своё регуляторное влияние не только на QS микробиоты кишечника, но и на клетки макроорганизма. АГЛ являются липофильными молекулами и проникают как внутрь клеток, так и в ядро, модулируя активность транскрипционного фактора NF- κ B и экспрессию провоспалительных цитокинов [19]. Также АГЛ могут вызывать гибель лимфоцитов хозяина так как встраиваются в плазматическую мембрану и индуцируют растворение эукариотических липидных доменов. Это событие вытесняет рецептор фактора некроза опухоли 1 α (ФНО-1 α) в неупорядоченную мембрану [20].

доченную липидную фазу для его спонтанной лиганд-независимой тримеризации и приводит к опосредованному каспазой-3-и каспазой-8 апоптозу [20]. Таким образом, АГЛ оказывают про-апоптотическое и иммуномодулирующее воздействие на макроорганизм [21].

АИ-2 (диэфир фуранозилбората) – это медиатор межвидовой коммуникации у грамположительных и грамотрицательных бактерий. Тем не менее, термин «АИ-2» относится в более широком смысле и к фуранонам, полученным при спонтанной циклизации 4,5-дигидрокси 2,3-пентандиона с или без бора [16].

К АИ-3 типа относятся хинолоны и (классический представитель) PQS [16]. PQS (3-гидрокси-2-алкилхинолон) синтезируется из метаболита кинуренинового пути обмена триптофана – антралиновой кислоты [22]. В кишечнике антралилат имеет смешанное происхождение: это и метаболит бактериального шикиматного пути, и кинуренинового пути обмена триптофана в макроорганизме и в микробной популяции. Однако пока ещё не существует работ, которые демонстрировали бы вклад шикиматного и кинуренинового путей в содержание антралилата в кишечнике.

Макроорганизм также вовлечён в регуляцию синтеза АИ микробиотой. Так лейкоциты организма человека продуцируют антимикробный пептид – LL-37, который регулирует продукцию факторов вирулентности в группе *Streptococcus* [18]. Также было показано, что энтероциты имитируют бактериальный QS для сопряжения с микробиомом. Энтероциты производят имитирующую АИ-2 молекулу в ответ на бактериальные метаболиты. Этот аналог АИ-2 взаимодействует с бактериальным рецептором АИ-2 LuxP/LsrB (белок-регулятор транскрипции ацилгомосеринлактон-синтазы класса LuxI). Авторы предполагают, что кишечник рекрутирует на помощь метаболиты микробиома при повреждении патогенами через этот путь сопряжения [18]. Таким образом, кишечные бактерии способны реагировать на сигнальные молекулы макроорганизма, модулируя экспрессию генов.

Интересно, что гормоны человека адреналин и норадреналин, а также АИ-3 используются в качестве межклеточного химического сигнала между энтерогеморрагической *E. coli* и макроорганизмом. Сигналы воспринимаются двухкомпонентной системой QseB/QseC (гистидинкиназа, отвечающая за бактериальную вирулентность) микроорганизма, которая индуцирует экспрессию второй двухкомпонентной системы QseE/QseF, которая, как полагают, участвует в экспрессии генов вирулентности, воспринимая адреналин [18]. Также существуют и другие работы, которые ука-

зывают на потенциальные интерференции между бактериальными и эукариотическими гормональными коммуникациями. Так было показано, что эстрон, уменьшает частоту регулируемого QS горизонтального переноса опухоль-индуцирующей плазмиды у *Agrobacterium tumefaciens*. Эстрон, эстриол и эстрадиол также снижают накопление АГЛ и экспрессию шести QS-регулируемых генов в культурах условно-патогенного возбудителя *P. aeruginosa*. Наконец, моделирование структурных взаимодействий между гормонами человека и АГЛ-рецепторами LasR *P. aeruginosa* и TraR *A. tumefaciens* подтвердил конкурентную связывающую способность половых гормонов человека [23].

Роль производных аминокислот в метаболическом сопряжении макроорганизма и микробиоты кишечника

Из аминокислот тирозина и фенилаланина кишечной микробиотой и организмом человека образуются фенил-карбоновые кислоты: фенилацетат, фенил-пропионат, фенил-лактат и фенилбутират. Данные кислоты обладают антибактериальным, антигрибковым и противовоспалительным действием. Уровень фенил-карбоновых кислот резко повышается при заболеваниях кишечника. Также уровень фенил-лактата и индол-3-лактата значительно повышается у больных с печеночной дисфункцией [18]. Малоизученным остаётся вопрос о возможности КЦЖК являться непосредственными предшественниками в синтезе производных индола и фенола. Мы предполагаем, что между метаболизмом КЦЖК и обменом тирозина и триптофана также существует тесное сопряжение.

Лактобактерии (*Lactobacillus reuteri*) подавляют продукцию провоспалительных цитокинов [24], в частности продукцию ФНО-1 α первичными моноцитарными макрофагами. Недавно было установлено, что гистамин, который продуцируется *L. reuteri* – это ингибирующий фактор продукции ФНО-1 α . Существует предположение, что в некоторых микроорганизмах кишечника гистамин может синтезироваться не только путем декарбокислирования гистидина, но и благодаря одноуглеродным фрагментам, источником которых является тетрагидрофолиевая кислота (ТГФК). В эукариотических клетках катаболизм аминокислот, в том числе гистидина сопряжён с обменом производных ТГФК [24].

Самый большой интерес в обмене аминокислот микроорганизмами кишечника представляет метаболизм триптофана. Известно, что в кишечнике возможно превращение триптофана в индолы. При этом индол может быть образован в триптофаназной реакции (ЕС: 4.1.99.1) непосредственно из триптофана (Рис. 1). Так пока-

зано, что триптофаназа гиперэкспрессирована в микробиотической популяции при диете бога-

той мясными продуктами и индуцируется триптофаном [25].

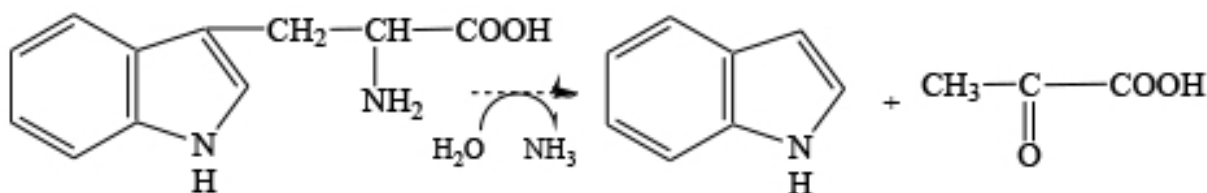


Рис.1. Превращение аминокислоты триптофан в индол, пировиноградную кислоту и аммиак под действием бактериальной триптофаназы.

Индол – межвидовая регуляторная молекула, которая участвует в формировании бактериального фенотипа [7]. В кишечнике возможно трансаминирование триптофана с пируватом (Рис. 2) и образование аланина и индол-3-пирувата благодаря триптофанаминотрансферазе (ЕС: 2.6.1.27). Ин-

тересно, что индол-3-пируват может образоваться в оксидазной реакции в дендритных клетках и макрофагах человека (ЕС: 1.4.3.2) при лейкемии [26]. Далее индол-3-пируват может превращаться в индол-3-ацетат благодаря ферменту индол-3-пируват-монооксигеназе (ЕС: 1.14.13.168).

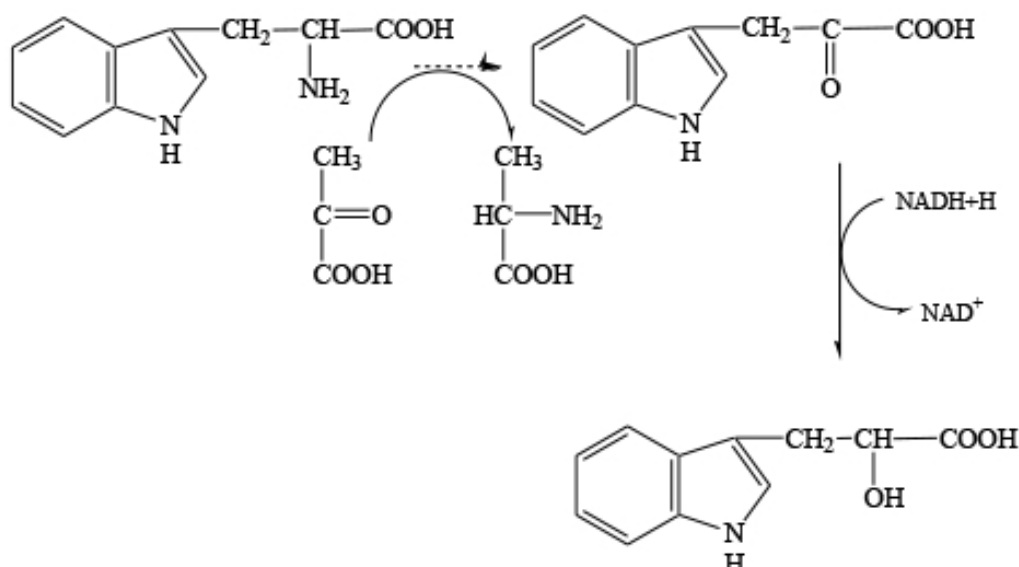


Рис.2. Превращение аминокислоты триптофан в индол-3-пируват и аланин под действием триптофанаминотрансферазы и дальнейшее восстановление до индол-3-лактата индол-3-пируватредуктазой.

Clostridium sporogenes способны обратимо восстанавливать индол-3-пируват до индол-3-лактата благодаря наличию НАДН-зависимой индол-3-пируват-редуктазе (ЕС: 1.1.1.110) [27]. При этом следует отметить, что сам индол-3-лактат является ингибитором кинуренинаминотрансферазы I (КАТ- I, ЕС: 2.6.1.7) в нервной ткани человека [28], то есть бактериальный индол-3-лактат регулирует кинурениновый путь превращения триптофана в клетках макроорганизма. Примечательно, что у новорожденных детей *Bifidobacterium* в кишечнике образуют огромное количество индол-3-лактата, который, попадая в макроорганизм, отвечает за дифференцировку нервной ткани [29]! Далее в кишечнике индол-3-лактат превращается циннамоил-КоА: фениллактатной КоА-трансферазой

Cl. sporogenes в индол-3-акрилат (ЕС: 2.8.3.17) [30], а затем индол-3-акрилат превращается в индол-3-пропионат (ЕС: 1.3.8.1). Бактериальный индол-3-пропионат отвечает за барьерную функцию в кишечнике через подавление продукции ФНО-1α в колоноцитах [31].

Однако главный путь в метаболизме триптофана «суперорганизма» – это кинурениновый путь превращения. При этом свыше 95 % триптофана, не использованного для синтеза белка, метаболизируется по кинурениновому пути [32]. Благодаря гем-содержащим ферментам макроорганизма – триптофан-2,3-диоксигеназе (ТДО; ЕС: 1.13.11.11), а также индоламин-2,3-диоксигеназе (ИДО; ЕС: 1.13.11.52), которая присутствует во многих клетках организма человека, а также и у микробной популяции тол-

стой кишки (*Pseudomonas*), аминокислота триптофан превращается в N-формил-L-кинуруенин [1]. Данный этап в обмене кинуруенина является регуляторным, и от его скорости зависят все три пути дальнейшего превращения L-кинуруенина [33]. Формамидазой (ЕС: 3.5.1.9) N-формил-L-кинуруенин превращается в L-кинуруенин. Далее у L-кинуруенина три возможных пути превращения: первый – кинуруениназой (ЕС: 3.7.1.3) в антраниловую кислоту, второй – кинуруенинаминотрансферазой (ЕС: 2.6.1.7) в кинуруеновую кислоту и третий – кинуруенинмонооксигеназой (ЕС:1.14.13.9) в 3-гидроксикинуруенин.

Превращение в антраниловую кислоту – ключевой этап метаболизма L-кинуруенина и он происходит как в микробиотической популяции кишечника (*Pseudomonas*, *E. coli*), так и в соматических клетках макроорганизма [34]. Однако образование антраниловой кислоты не происходит в энтероцитах человека, а локализовано в печени, почках, надпочечниках, лёгких, половых железах и в поджелудочной железе. Антраниловая кислота является смежным метаболитом и в кишечнике подвергается дальнейшему превращению в молекулу QS – PQS, о чём уже

упоминалось в данном обзоре. Антраниловая кислота оказывает на «суперорганизм» иммуномодулирующий эффект [1].

Образование кинуруеновой кислоты происходит только в клетках млекопитающих. Следует отметить, что кинуруеновая кислота является сигнальной молекулой и вовлечена в регуляцию энергетического гомеостаза, а также имеет выраженный антипролиферативный эффект [35].

Образование 3-гидроксикинуруенина происходит в бактериальном сообществе кишечника под действием НАДФН-зависимой кинуруенинмонооксигеназы [1] и в митохондриях клеток человека (в нервной ткани, печени и в иммунокомпетентных клетках) [36]. В свою очередь, 3-гидроксикинуруенин является предшественником в образовании ксантуруеновой кислоты (также кинуруенинаминотрансферазой) или 3-гидроксиантраниловой кислоты кинуруениназой. Далее 3-гидроксиантраниловая кислота превращается 3-гидроксиантранилат-3,4-диоксигеназой (ЕС: 1.13.11.6) в 2-амино-3-карбоксимуконат полуальдегид, а затем спонтанно в хинолиновую кислоту, которая является предшественником для синтеза никотинамидадениндинуклеотида (НАД) (Рис. 3).



Рис. 3. Кинуруениновый путь превращения аминокислоты триптофан.

Таким образом, мы видим, что метаболическое сопряжение в обмене триптофана очень выражено между макроорганизмом и микробной популяцией кишечника, а уникальной метаболической чертой макроорганизма является продукция кинуреновой кислоты.

Третий путь метаболизма триптофана, который имеется как в энтероцитах, так и в других клетках человека, это путь продукции нейромедиатора – серотонина. Следует отметить, что образование более чем 90 % серотонина в организме человека происходит в кишечнике в энтерохромаффинных клетках [37]. Однако гематоэнцефалический барьер непроницаем для данного медиатора, и его основная функция локализована в желудочно-кишечном тракте. Микробиота кишечника контролирует данный путь метаболизма триптофана, благодаря образованию дезоксихолево́й кислоты, которая обладает стимулирующим действием на синтез серотонина (триптофангидроксилазу-1, EC: 1.14.16.4) [1].

Мембранные везикулы в метаболическом сопряжении макроорганизма и микробиоты кишечника

Очевидно, что в кишечнике существует межбактериальная конкуренция и она отчасти реализована наружными мембранными везикулами (НМВ). НМВ – это липидные наночастицы, которые играют множество ролей в бактериальной физиологии и адаптации к разнообразным средам, и продуцируются грамотрицательными бактериями. Показано, что НМВ высвобождаемые экологическим патогеном *Chromobacterium violaceum*, доставляют антимикробное соединение виолацеин бактериям-конкурентам, опосредуя его токсичность *in vivo* на большом расстоянии. При этом на везикуляцию действует сам виолацеин [17].

НМВ ещё называют бактериальными мембранными везикулами (БМВ), их состав подобен мембране и цитоплазме родительской микробной клетки (это могут быть как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии). При этом явно существует спецификация инкорпорации белков, нуклеиновых кислот, метаболитов и токсинов в БМВ, так как необходимо их защитить от разрушения организмом человека и микробиотического окружения и придать потенциал для передвижения на большие расстояния. БМВ выполняют специализированные функции, адаптированные к изменяющимся условиям микроокружения, в частности в отношении взаимодействия микробного сообщества (включая определение QS, образование биоплёнки, устойчивость к антибиотикам, экспрессию и развертывание антимикробных пептидов). А самое главное, везикулы играют решающую роль во

взаимодействии хозяина и микробиоты как носители факторов вирулентности и других модуляторов функции клеток макроорганизма [38].

Инкорпорации подвергаются не все метаболиты, а те, которые являются лабильными и гидрофобными. Одна из основных молекул QS – PQS обладает высокой гидрофобностью и поэтому не может эффективно диффундировать через окружающую среду. Было показано, что около 86 % PQS упаковано в НМВ. Аналогично, гидрофобные молекулы QS C16-HSL *Paracoccus denitrificans* и CAI-1 *Vibrio harveyi* упаковываются в везикулы [39]. Сигнальные молекулы QS также могут влиять на образование НМВ, поскольку PQS является одновременно необходимым для везикулогенеза у *P. aeruginosa* и может даже индуцировать образование везикул у других видов [40].

P. aeruginosa – один из главных оппортунистических патогенов в организме человека – секретирует целое облако факторов вирулентности, включая такие как фосфолипаза C, проэластаза, щелочная фосфатаза, гемолизин. Транспорт данных белков происходит в мембранных везикулах (размером 50–250 нм в диаметре) непосредственно в клетки хозяина и другие бактерии [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, макроорганизм и микробиота кишечника находятся в тесном метаболическом сопряжении. Метаболиты микробиоты обеспечивают топливную функцию для тканей макроорганизма; выполняют локальную колоницидную регуляторную функцию, а также оказывают системное влияние на обмен веществ. Сигнальные микробиотические молекулы отвечают за продукцию ГПП-1, инсулина, соматостатина, глюкагона, и других гормонов, различных цитокинов, серотонина и гистамина. Данные метаболиты имеют антипролиферативный эффект, влияют на дифференцировку тканей, вовлечены в противо- и провоспалительный механизмы, а также имеют нейропротекторный эффект и оказывают широкомасштабное воздействие на иммунологический профиль макроорганизма и многое другое. Однако метаболическое сопряжение не одностороннее. Макроорганизм (экосистема) не только делегирует свои метаболические функции микробиотической популяции, а и сам синтезирует целый ряд различных метаболитов для микробиотической популяции, контролируя QS, метаболическую активность микробиоты и её способность к везикуляции.

Финансирование. Работа выполнена в рамках договора № 0373100122120000006 по проекту «Изучение эффектов молекул-кандидатов

видонеспецифических медиаторов систем QS на толерогенную и провоспалительную активности клеток иммунной системы, на клеточные культуры адипогенной дифференцировки МСК и на клеточные культуры трансформированных линий кишечного эпителия. Разработка лабораторного регламента получения ГЛФ кандидатного препарата».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Agus A, Planchais J, Sokol H. Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe*. 2018;23:716–724. doi:10.1016/j.chom.2018.05.003
2. Comai S, Bertazzo A, Brughera M, Crotti S. Tryptophan in health and disease. *Adv Clin Chem*. 2020; 95:165–218. doi:10.1016/bs.acc.2019.08.005
3. Vakhitov T. Y., Chalisova N, Sitkin S. I. Effect of carboxylic acids of gut microbial origin on host cell proliferation in organotypic tissue cultures. *Eksp Klin Gastroenterol*. 2016;12:73–82
4. Gill S. R., Pop M, Deboy R.T., Eckburg P.B., Turnbaugh P. J., Samuel B. S., Gordon JI, Relman D. A., Fraser Liggett C. M., Nelson K. E. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006;312:1355–1359. doi:10.1126/science.1124234
5. Fujimura KE, Slusher NA, Cabana MD, Lynch SV. Role of the gut microbiota in defining human health. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010; 8: 435–454. doi:10.1586/eri.10.14
6. Thomas CM, Versalovic J. Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes*. 2010;(1):148–163. doi:10.10.4161/gmic.1.3.11712
7. Kim CH. Immune regulation by microbiome metabolites. *Immunology*. 2018;154:220–229. doi: 10.1111/imm.12930
8. Лактат: от «тупика метаболизма» до сигнальной молекулы и клеточному перепрограммированию: монография / Шатова О.П. и др. Москва: Издательство РАМН, 2020.
9. Vallianou N, Stratigou T, Christodoulatos GS, Dalamaga M. Understanding the role of the gut microbiome and microbial metabolites in obesity and obesity-associated metabolic disorders: current evidence and perspectives. *Curr Obes Rep*. 2019;8:317–332. doi:10.1007/s13679-019-00352-2
10. Moran-Ramos S, Lopez-Contreras BE, Canizales-Quinteros S. Gut Microbiota in Obesity and Metabolic Abnormalities: A Matter of Composition or Functionality? *Arch Med Res*. 2017;48: 735–753. doi:10.1007/s13679-019-00352-2
11. Zhang J. M., Sun Y. S., Zhao L. Q., Chen T. T., Fan MN, Jiao H. C., Zhao J. P., Wang X. J., Li F. C., Li H.F., Lin H. SCFAs-Induced GLP-1 Secretion Links the Regulation of Gut Microbiome on Hepatic Lipogenesis in Chickens. *Front Microbiol*. 2019;10:2176. doi:10.3389/fmicb.2019.02176
12. Orggaard A, Jepsen SL, Holst JJ. Short-chain fatty acids and regulation of pancreatic endocrine secretion in mice. *Islets*. 2019;11:103–111. doi:10.1080/19382014.2019.1587976
13. Malkova D, Polyviou T, Rizou E, Gerasimidis K, Chambers ES, Preston T, Tedford MC, Frost G, Morrison DJ. Moderate intensity exercise training combined with inulin-propionate ester supplementation increases whole body resting fat oxidation in overweight women. *Metabolism*. 2020;104:154043. doi:10.1016/j.metabol.2019.154043
14. Dong SH, Nhu-Lam M, Nagarajan R, Nair SK. Structure-Guided Biochemical Analysis of Quorum Signal Synthase Specificities. *ACS Chem Biol*. 2020. doi:10.1021/acscchembio.0c00142
15. Tashiro Y, Toyofuku M, Nakajima-Kambe T, Uchiyama H, Nomura N. Bicyclic compounds repress membrane vesicle production and Pseudomonas quinolone signal synthesis in Pseudomonas aeruginosa. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;304:123–130. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.01897.x
16. Crepin A, Barbey C, Beury-Cirou A, Helias V, Taupin L, Reverchon S, Nasser W, Faure D, Dufour A, Orange N, Feuilloley M, Heurlier K, Burini JF, Latour X. Quorum sensing signaling molecules produced by reference and emerging soft-rot bacteria (*Dickeya* and *Pectobacterium* spp.). *PLoS One*. 2012;7:e35176. doi:10.1371/journal.pone.0035176
17. Batista JH, Leal FC, Fukuda TH, Diniz JA, Almeida F, Pupo MT, da Silva Neto JF. Interplay between two quorum sensing-regulated pathways, violacein biosynthesis and VacJ/Yrb, dictates outer membrane vesicle biogenesis in *Chromobacterium violaceum*. *Environ Microbiol*. 2020. doi: 10.1111/1462-2920.15033
18. Tobias NJ, Brehm J, Kresovic D, Brameyer S, Bode HB, Heermann R. New Vocabulary for Bacterial Communication. *ChemBiochem*. 2020;21:759–768. doi:10.1002/cbic.201900580.
19. Jahoor A, Patel R, Bryan A, Do C, Krier J, Watters C, Wahli W, Li G, Williams SC, Rumbaugh KP. Peroxisome proliferator-activated receptors mediate host cell proinflammatory responses to Pseudomonas aeruginosa autoinducer. *J Bacteriol*. 2020;190:4408–4415. doi:10.1128/JB.01444-07.
20. Song D, Meng J, Cheng J, Fan Z, Chen P, Ruan H, Tu Z, Kang N, Li N, Xu Y, Wang X, Shu F, Mu L, Li T, Ren W, Lin X, Zhu J, Fang X, Amrein MW, Wu W, Yan L.T., Lu J, Xia T, Shi Y. Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing metabolite induces host immune cell death through cell

surface lipid domain dissolution. *Nat Microbiol.* 2019;4:97–111. doi:10.1038/s41564-018-0290-8

21. Bryan A, Watters C, Koenig L, Youn E, Olmos A, Li G, Williams S. C., Rumbaugh K. P. Human transcriptome analysis reveals a potential role for active transport in the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa* autoinducers. *Microbes Infect.* 2010;12:1042–1050. doi: 10.1016/j.micinf.2010.07.006

22. Sifri CD. Healthcare epidemiology: quorum sensing: bacteria talk sense. *Clin Infect Dis.* 2008;47:1070–1076. doi:10.1086/592072

23. Beury-Cirou A, Tannieres M, Minard C, Soulere L, Rasamiravaka T, Dodd RH, Queneau Y, Dessaux Y, Guillou C, Vandeputte OM, Faure D. At a supra-physiological concentration, human sexual hormones act as quorum-sensing inhibitors. *PLoS One.* 2013; 8:e83564.

24. Thomas CM, Saulnier DM, Spinler JK, Hemarajata P, Gao C, Jones SE, Grimm A, Balderas MA, Burstein MD, Morra C, Roeth D, Kalkum M, Versalovic J. FcγC2-mediated folate metabolism contributes to suppression of inflammation by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Microbiologyopen.* 2016; 5: 802–818. doi:10.1002/mbo3.371

25. Chung K. T., Fulk G. E., Slein M. W. Tryptophanase of fecal flora as a possible factor in the etiology of colon cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1975;54:1073–1078. doi:10.1093/jnci/54.5.1073

26. Carbone-Puscian A, Copie-Bergman C, Baia M, Martin-Garcia N, Allory Y, Haioun C, Cremades A, Abd-alsamad I, Farcet JP, Gaulard P, Castellano F, Molinier-Frenkel V. The novel immunosuppressive enzyme IL4I1 is expressed by neoplastic cells of several B-cell lymphomas and by tumor-associated macrophages. *Leukemia.* 2009;23:952–960. doi:10.1038/leu.2008.380

27. Jean M, DeMoss RD. Indolelactate dehydrogenase from *Clostridium sporogenes*. *Can J Microbiol.* 1968; 14: 429–435. doi:10.1139/m68-068

28. Han Q, Robinson H, Cai T, Tagle DA, Li J. Structural insight into the inhibition of human kynurenine aminotransferase I/glutamine transaminase Structural insight into the inhibition of human kynurenine aminotransferase I/glutamine transaminase. *K. J Med Chem.* 2009;52:2786–2793. doi:10.1021/jm9000874

29. Wong CB, Tanaka A, Kuhara T, Xiao JZ. Potential Effects of Indole-3-Lactic Acid, a Metabolite of Human Bifidobacteria, on NGF-induced Neurite Outgrowth in PC12 Cells. *Microorganisms.* 2020; 8(3):398. doi:10.3390/microorganisms8030398

30. Dicker S, Pierik AJ, Buckel W. Molecular characterization of phenyllactate dehydratase and its

initiator from *Clostridium sporogenes*. *Mol Microbiol.* 2002; 44: 49–60. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02867.x

31. Venkatesh M, Mukherjee S, Wang H, Li H, Sun K, Benechet Alexandre P. Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4. *Immunity.* 2014;41(2):296–310

32. Cervenka I, Agudelo LZ, Ruas JL. Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science.* 2017;357(6349):eaaf9794. doi: 10.1126/science.aaf9794, doi:10.1126/science.aaf9794

33. Chaves Filho AJ, Lima CN, Vasconcelos SM, de Lucena DF, Maes M, Macedo D. IDO chronic immune activation and tryptophan metabolic pathway: A potential pathophysiological link between depression and obesity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2018;80:234–249. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.04.035

34. Maitrani C, Phillips RS. Substituents effects on activity of kynureninase from *Homo sapiens* and *Pseudomonas fluorescens*. *Bioorg Med Chem.* 2013;21:4670–4677. doi: 10.1016/j.bmc.2013.05.039

35. Walczak K, Turski WA, Rajtar G. Kynurenic acid inhibits colon cancer proliferation in vitro: effects on signaling pathways. *Amino Acids.* 2014;46:2393–2401. doi:10.1007/s00726-014-1790-3

36. Oxenkrug G, van der Hart M, Roeser J, Summergrad P. Peripheral kynurenine-3-monooxygenase deficiency as a potential risk factor for metabolic syndrome in schizophrenia patients. *Integr Clin Med.* 2017;1. doi:10.15761/ICM.1000105

37. Wang SZ, Yu YJ, Adeli K. Role of Gut Microbiota in Neuroendocrine Regulation of Carbohydrate and Lipid Metabolism via the Microbiota-Gut-Brain-Liver Axis. *Microorganisms.* 2020;8(4): 527. doi:10.3390/microorganisms8040527

38. Caruana JC, Walper SA. Bacterial Membrane Vesicles as Mediators of Microbe - Microbe and Microbe - Host Community Interactions. *Front Microbiol.* 2020;11:432. doi: 10.3389/fmicb.2020.00432

39. Brameyer S, Plener L, Muller A, Klingl A, Wanner G, Jung K. Outer membrane vesicles facilitate trafficking of the hydrophobic signaling molecule cai-1 between *Vibrio harveyi* cells. *J Bacteriol.* 2020;200(15). doi:10.1128/JB.00740-17

40. Tashiro Y, Ichikawa S, Shimizu M, Toyofuku M, Takaya N, Nakajima-Kambe T, Uchiyama H, Nomura N. Variation of physicochemical properties and cell association activity of membrane vesicles with growth phase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76:3732–3739. doi:10.1128/AEM.02794-09

АМБИВАЛЕНТНОСТЬ ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЖЕЛУДКА

Штыгашева О. В.¹, Агеева Е. С.²

¹Кафедра внутренних болезней, Медико-психолого-социальный институт ФГБОУ ВО «Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова», 655000, проспект Ленина, 90, Абакан, Россия

²Кафедра биологии медицинской, Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина, 5/7, Симферополь, Россия

Для корреспонденции: Агеева Елизавета Сергеевна, заведующий кафедрой биологии медицинской Медицинской академии имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского» 295051, бульвар Ленина, 5/7, Симферополь, Россия, e-mail: ageevaeliz@rambler.ru

For correspondence: Ageeva E.S., MD, the Head of the Department of Medical Biology of Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: ageevaeliz@rambler.ru

Information about authors:

Shtygasheva O. V., <http://orcid.org/0000-0002-5522-1148>

Ageeva E. S., <http://orcid.org/0000-0003-3770-2965>

РЕЗЮМЕ

Для язвенной болезни доказана этиологическая роль инфекции *H. pylori*, 60-90% случаев рака желудка ассоциированы с *H. pylori*. Бактерия признана канцерогеном первого порядка. Установлена ассоциация между успешной элиминацией *H. pylori* и снижением риска рака желудка и рецидивов язвенной болезни. В патогенезе хронического воспаления в слизистой оболочке желудка, ассоциированного с *H. pylori*, имеются реперные точки, определяющие дальнейший путь развития патологии.

Если язвенная болезнь не является следствием прямого повреждающего действия нестероидных противовоспалительных препаратов, она связана с развитием гастрита. При язвенной болезни желудка гастрит находят как в антральном, так и в фундальном отделах желудка. Атрофия желез начинается в антральном отделе, затем очаги ее обнаруживают в фундальном отделе на передней и задней стенках. Постепенно они увеличиваются в размерах, сливаются между собой, уменьшается зона, секретирующая кислоту, и граница между фундальными и пилорическими железами смещается в проксимальном направлении. При атрофическом фундальном гастрите повышается вероятность образования высоких язв и рака желудка. К формированию ЯБ ведет значительное усиление процессов апоптоза при относительной ригидности пролиферации, а канцерогенез обусловлен избыточной пролиферацией и накоплением клеточных мутаций. Один из субъектов повреждения - Cag A протеин *H. pylori*, реализующий ремоделирование эпителиального барьера желудка. Среди его эффектов - модуляция и нарушение пролиферации эпителия желудка, приводящие к морфологическим изменениям. Агрессивное действие Cag A протеина усиливают токсические дозы алкоголя и курение, поддерживая воспаление и вызывая повреждение слизистой оболочки желудка.

Не смотря на общность этиологии и патогенеза язвенной болезни желудка и рака желудка, связь с развитием атрофического пангастрита и схожесть конвенционных факторов риска, ключевым моментом в манифестации рака желудка является генетическое предрасположение в виде полиморфизма генов, обуславливающих тяжелую атрофию как следствие хронического воспаления.

Ключевые слова: хронический гастрит, воспаление, язвенная болезнь желудка, рак желудка, *H. pylori*, Cag A протеин, факторы риска

AMBIVALENCE OF CHRONIC INFLAMMATION IN THE MUSCULOUS STOMACH

Shtygasheva O. V.¹, Ageeva E. S.²

¹Institute of Medicine, Psychology and Social Work of the Khakas State University named after N. F. Katanov, Abakan, Russia

²Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

SUMMARY

For peptic ulcer disease, the etiological role of *H. pylori* infection has been proven, 60-90% of gastric cancer cases are associated with *H. pylori*. The bacterium is recognized as a first-order carcinogen. An association has been established between the successful elimination of *H. pylori* and a reduced risk of gastric cancer and relapse of peptic ulcer. In the pathogenesis of chronic inflammation in the gastric mucosa associated with *H. pylori*, there are reference points that determine the further path of development of the pathology. If peptic ulcer is not a consequence of the direct damaging effect of NSAIDs, it is associated with the development of gastritis. In gastric ulcer, gastritis is found in both the antrum and the fundus of the stomach

Atrophy of the glands begins in the antrum, then its foci are found in the fundus on the front and back walls. Gradually they increase in size, merge with each other, the acid secreting zone decreases, and the border between the fundus and pyloric glands shifts in the proximal direction.

With atrophic fundus gastritis, the likelihood of developing high ulcers and stomach cancer increases. Significant

increase in apoptosis processes with relative rigidity of proliferation leads to the formation of ulcer, and carcinogenesis is due to excessive proliferation and accumulation of cell mutations. One of the subjects of damage is Cag A *H. pylori* protein, which implements remodeling of the gastric epithelial barrier. Among its effects are modulation and impaired proliferation of gastric epithelium, leading to morphological changes. The aggressive action of Cag A protein enhances toxic doses of alcohol and smoking, supporting inflammation and causing damage to the gastric mucosa.

Despite the common etiology and pathogenesis of gastric ulcer and gastric cancer, the relationship with the development of atrophic pangastritis and the similarity of conventional risk factors determines that the key point in the manifestation of gastric cancer is a genetic predisposition in the form of gene polymorphism causing severe atrophy as a result of chronic inflammation.

Key words: chronic gastritis, inflammation, gastric ulcer, stomach cancer, *H. pylori*, Cag A protein, risk factors

Со времен публикации Jean Cruveilhier «О простой и хронической обыкновенной язве желудка» (1856 г.) обсуждается постулат о повышении риска развития рака желудка в 2 раза при язвенной болезни желудка (ЯБЖ) [1]. Ряд авторов отмечает, что язва желудка и рак желудка, наблюдаются у одного пациента в 2-3% случаев [2; 3]. Описан механизм малигнизации язвы желудка. Взаимосвязь может определяться общностью факторов этиологии и патогенеза [4]. Одним из доказанных этиологических факторов язвенной болезни (ЯБ) является инфекция *Helicobacter pylori* (НР) (рис. 1), в тоже время с НР ассоциировано 60-90% всех случаев возникновения рака желудка (РЖ) [6; 7]. У 10% пациентов с НР-ассоциированным гастритом на фоне атрофических изменений слизистой оболочки желудка (СОЖ) развивается дисплазия, а у 1-2% - РЖ. Установлена ассоциация между успешной элиминацией НР и снижением риска развития РЖ на 47% [8]. Достоверный уровень превенции возможен только у пациентов, не имеющих предраковых изменений СОЖ (атрофический гастрит с кишечной метаплазией или без неё) [9]. Как большинство заболеваний, имеющих мультифакториальную природу, ЯБ и РЖ формируются под влиянием эндогенных факторов и повреждающих факторов окружающей среды, которые в совокупности и определяют предрасположенность к той или иной болезни. Независимыми факторами риска в патогенезе и ЯБ и РЖ являются именно генетические особенности индивидуума. Тестирование полиморфизмов генов предрасположения составляет методическую основу предиктивной медицины, своего рода, технологию долгосрочного прогнозирования возможного сценария развития патологии у конкретного пациента.

Международным агентством по изучению рака инфекция НР зарегистрирована как канцероген первого порядка. Риск развития рака желудка в 2-6 раз выше у лиц, инфицированных НР, чем неинфицированных [10]. Среди других штаммов НР, наиболее вирулентным считается Cag A-позитивный, увеличивающий риск разви-

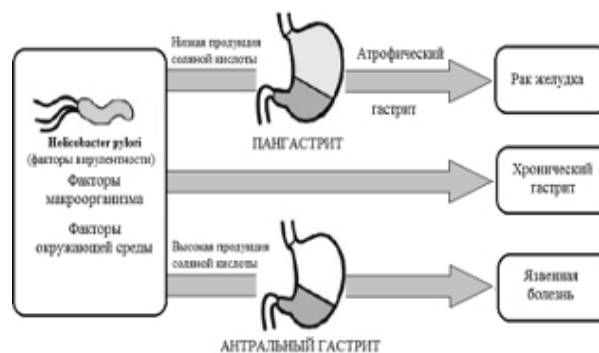


Рис. 1. Факторы, детерминирующие исход взаимодействия *Helicobacter pylori* и макроорганизма (по J. G. Kusters, 2006 с изменениями) [5]

тия атрофии и метаплазии с последующей злокачественной трансформацией (табл. 1). Особенно чувствительны к их воздействию очаги кишечной метаплазии и дисплазии.

Для инфекции НР характерны широкие колебания распространенности в разных популяциях. В Боливии – 80%, Чили – 68,6%, Эфиопии – 65,7%, Марокко – 75,5%, Китае – 63,4%, Японии – 75%, Тайвани – 72,1%. в Нидерландах до 71,6% в Италии и 84,2% в Португалии. В США зафиксировано снижение контаминации до 40% населения симультанно со снижением частоты РЖ [11-13]. В России, не зависимо от региона, общий уровень инфицирования *H. pylori* населения высокий (65-86%) [14; 15].

По решению Ассамблеи ВОЗ, начиная с 1965 г., в целях разработки мер профилактики основного заболевания, введена дефиниция фонового заболевания (болезнь, имеющая существенную роль в возникновении и неблагоприятном течении основного заболевания). В настоящее время установлена взаимосвязь ряда патологических состояний повышающих риск развития РЖ. К фоновым заболеваниям РЖ относят хронический атрофический гастрит (ХАГ), кишечную метаплазию, интраэпителиальную неоплазию (дисплазию), аденомы. Эти патологические процессы часто предшествуют развитию злокачественной опухоли, но не обязательно переходят в нее [16; 17]. К числу наиболее опасных пре-

Таблица 1

Ассоциация факторов патогенности *Helicobacter pylori* с заболеваниями желудка, по данным R. de Jonge, 2004; S. W. Jung, 2012; S. Kim, 2004; M. T. Kudo, 2004; H. Lu, 2005; A. Santos, 2003; M. J. Albert, 2010; K. Muhsen, 2011 [5]

Белок/ген		Ассоциированная патология
BabA (babA2)		ЯБ, аденокарцинома желудка
SabB		Отсутствие экспрессии sabB связано с развитием ЯБ двенадцатиперстной кишки (ДПК)
OipA		Интерстициальная метаплазия, ЯБ ДПК, РЖ
Регион jhp0947–jhp0950		РЖ, MALT-лимфома, ЯБДПК
IceA (iceA1)		Язвенная болезнь
DupA		ЯБ ДПК, уменьшение риска атрофии СОЖ и РЖ
CagA		ЯБЖ и ЯБДПК, атрофия СОЖ, РЖ
VacA	s1	ЯБЖ и ЯБДПК, атрофия СОЖ, РЖ
	m1	ЯБЖ

дикторов возникновения РЖ (первое место) относятся аденоматозные полипы желудка (доброкачественные железистые опухоли – аденомы), с частотой озлокачествления в 60–70% случаев. В то время как вероятность малигнизации гиперпластических полипов составляет 0,5% случаев. Одну из лидирующих позиций (второе место) в структуре предраковых состояний занимает ХАГ. В силу широкой распространенности ХАГ, значимость этой патологии велика. Следующее место, в порядке убывания среди фоновых предраковых состояний, занимает резецированный желудок (атрофический гастрит культи желудка, ахлоргидрия). У лиц, перенесших операцию в анамнезе, частота рака в культе желудка повышается в 3–4 раза. После резекции желудка по Бильрот II, у пациентов с ЯБЖ, в 2 раза возрастает риск аденокарциномы культи желудка [18].

В тоже время, из списка поражений, предшествующих РЖ, эксперты ВОЗ исключили ЯБЖ [19]. Однако, не все специалисты считают такое исключение целесообразным [10], объясняя малигнизацией язв случаи РЖ у пациентов с предшествующим течением ЯБЖ. Озлокачествление хронических язв, а по сути, переход от апоптоза к пролиферации дефектных клеток, наблюдается в 0,6–2% случаев. Особое внимание обращает группа пациентов с «зарубцевавшимися язвами» желудка, у которых в «заживших язвах» с признаками эпителизации, рак выявляется морфологически. Хотя ранее у них не фиксировались эндоскопические признаки малигнизации. Некоторые авторы считают, что на месте язвы образуется грануляционная ткань и слизистая оболочка, в которую потом прорастает опухоль *de novo* [20], другие связывают феномен с наличием первичного язвенного рака и склонности

его в ранних стадиях к заживлению. Причинно-следственные связи между ЯБЖ и РЖ среди экспертов остаются предметом дискуссий и изучения.

Анализ литературы демонстрирует, что в некоторых популяциях риск РЖ повышен среди пациентов с ЯБ. Так, например, в шведском исследовании было показано, что у пациентов с ЯБ риск РЖ увеличивается, кроме того среди женщин и пациентов моложе 50 лет регистрируется более высокий риск РЖ по сравнению с общей когортой пациентов [21]. Такие же результаты демонстрируют и более поздние исследования. Частота и относительный риск развития РЖ у пациентов с ЯБЖ и инфекцией НР были значительно выше, чем у пациентов дуоденальной ЯБ. Одним из солидаризирующих факторов для ЯБЖ и РЖ в патогенезе является их обоюдная связь с атрофическим пангастритом [22; 23]. Закономерность сочетания ЯБЖ и РЖ, также может быть связана с процессами репарации язвенного дефекта в СОЖ, включая и пролиферацию эпителиальных клеток, и контроль роста под влиянием эпидермальных факторов роста, и ангиогенез, и ингибирование секреции кислоты [24]. Наиболее часто выявляемый, при ЯБ и хроническом гастрите, антиген Ki-67 – ядерный белок, являющийся маркером клеточной пролиферации [24].

Одним из основных факторов повреждения НР является белок CagA НР, среди эффектов которого модуляция и нарушение пролиферации эпителиальных клеток желудка, приводящих к морфологическим изменениям в СОЖ. Ряд авторов отмечает важнейшую роль онкопротеина CagA НР в желудочном канцерогенезе в связи с эпигенетическим механизмом. CagA протеин

через синтез микро РНК реализует эффект ремоделирования эпителиальных клеток желудка с образованием участков кишечной метаплазии [25; 26; 27].

Кроме того, Сag-A-позитивные штаммы НР инициируют более высокий уровень пролиферации эпителиоцитов. При этом уровень апоптоза не соответствует ускоренной пролиферативной активности эпителия, возникает дисбаланс между гибелью клеток и их размножением, что увеличивает возможность выживания клеток, несущих онкогенные мутации. Отчасти это объясняется более активной экспрессией IL-8 Сag-A-позитивными штаммами НР, а следовательно, и более выраженным воспалением [28].

Фактором-синергистом в отношении риска ЯБ и РЖ является курение. Сигаретный дым содержит более 7000 веществ, у 150 из них доказан канцерогенный эффект [29, 30]. Курение признано канцерогеном, связанным с развитием рака желудка. Прогрессирующее повреждение, хроническое воспаление слизистой оболочки желудка доказывают роль курения как независимого фактора риска язвенной болезни. Показано, что у курильщиков язвенная болезнь не только чаще возникает, но и труднее поддается лечению.

Среди патогенетических механизмов, объясняющих пути возникновения РЖ у пациентов с ЯБ, можно выделить следующие (рис. 2). Высокий уровень химических веществ у курильщиков приводит к окислительному стрессу [31; 32]. Индукция апоптоза в клетках СОЖ может происходить опосредовано через активные формы кислорода (АФК) по р53-независимому пути, а так же через прокаспазный путь индуцируемый бензапиреном. Плурализм негативного воздействия курения включает ингибирование восстановления ткани и снижение возможности реализации защитных механизмов СОЖ. Кроме того, курение стимулирует ангиогенез, способствует повышению концентрации соляной кислоты и снижению концентрации бикарбонатов. Установлено, что курение протезирует бактериальной контаминации НР в СОЖ, а комбинированное действие курения и микроорганизма сопровождается высокой продукцией TNF α , IL-6, IL-1 β [33].

С нашей точки зрения, целесообразно учитывать механизмы такого сочетанного эффекта. Установлено, что TNF α инициирует повреждение ДНК, супрессирует ДНК репарацию и выступает в качестве промотора роста опухолевых клеток. Кроме того, члены семейства TNF подавляют иммунный ответ в клетках, окружающих опухоль. В свою очередь, IL-6 проявляет эффекты активатора транскрипции STAT 1/3и SHp2-

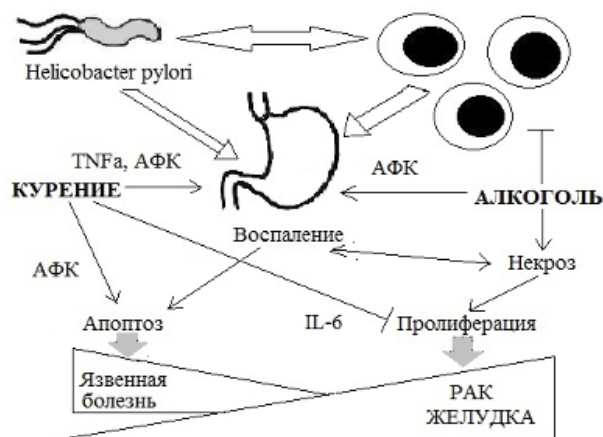


Рис. 2. Схема патогенетических механизмов, приводящих к развитию рака желудка

RAS-ERK, вовлеченного в IL-6-опосредованную пролиферацию кишечных эпителиоцитов. Ключевая молекула повреждения - IL-1 β – может выступать в качестве промотора клеток опухоли к метастазам, путем активации канцер-индуцированных воспалительных каскадов [34]. Хроническое воспаление приводит к нарушению клеточного обновления, как совокупной результирующей пролиферации и гибели эпителиоцитов слизистой оболочки желудка. Значительное усиление процессов апоптоза при относительной недостаточности их пролиферации ведет к формированию ЯБ. В то время как усиление интенсивности пролиферации сопровождается появлением клеточных мутаций, если своевременная элиминация их не произошла, создаются условия для канцерогенеза.

Влияние алкоголя на патогенез ЯБ и РЖ носит амбивалентный характер. Алкоголь не признан ульцерогеном, но часто является триггером кровотечений из верхних отделов ЖКТ. Большинство исследователей относят алкоголь к несомненным желудочным канцерогенам, считая значимой триадой его повреждающих факторов: увеличение секреции соляной кислоты в желудке, образование АФК и иммуносупрессию. Метаболиты алкоголя могут оказывать косвенное влияние на канцерогенез. Например, ацетальдегид индуцирует разрывы цепи ДНК [35; 36; 37]. Тем не менее, анализ литературы показывает неоднозначное влияние различных суточных доз и длительность употребления алкоголя на канцерогенез. О выраженном проканцерогенном эффекте алкоголя свидетельствуют результаты Zaridze [38]. Большинство авторов утверждает, что воздержание от алкоголя может снизить риск рака желудка, особенно среди субъектов, которые не были инфицированы НР. Некоторые исследователи показывали анти-

микробное действие алкоголя и снижение риска развития РЖ. Резюмируя данные более современных работ, можно сделать вывод о том, что эффект алкоголя в развитии патологии желудка зависит от величины дозы: малые и большие оказывают повреждающее проканцерогенное действие, средние дозы ограничивают канцерогенный потенциал, снижая степень контаминации СОЖ НР.

Таким образом, представленные в литературе факты убедительны в отношении высокой вероятности развития РЖ у индивидуума, страдающего ЯБЖ. ЯБЖ может стать фоновым заболеванием для РЖ, поскольку имеются тождественные факторы этиологии и риска, обоюдные патогенетические механизмы, а чувствительность клеток СОЖ к таким мутагенам, как курение, алкоголь и НР, с возрастом значительно повышается. При этом, каждый из перечисленных мутагенов по отдельности, имеет независимый потенциал к повреждению ДНК клеток слизистой оболочки желудка, развитию хронического воспаления [39]. Комбинация этих факторов усиливает возможность трансформации и вероятности возникновения РЖ. С мужским полом связана интеграция нескольких факторов риска (неблагоприятные комбинации) [40], их экспрессия и длительность воздействия. Увеличение возраста также способствует накоплению мутаций (ошибок репликаций), увеличивая возможность деструктивных изменений клеток СОЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Язвенная болезнь и рак желудка формируются под влиянием эндогенных факторов (мужской пол, увеличение возраста) и экзогенных повреждающих факторов (инфекция *Helicobacter pylori*, курение табака, алкоголь в токсических дозах), которые в совокупности и определяют предрасположение к той или иной болезни. В условиях хронического воспаления, ассоциированного с инфекцией *Helicobacter pylori*, полиморфизм генов детерминирует развитие тяжелой степени атрофии в слизистой оболочке желудка, являясь независимым фактором риска рака желудка. Амбивалентность хронического воспаления в слизистой оболочке желудка обусловлена нарушением клеточного обновления, балансирующего между избыточной пролиферацией с накоплением клеточных мутаций или усилением процессов апоптоза при относительной ригидности пролиферации, ведущих к ульцерогенезу.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interests to declare.

ЛИТЕРАТУРА

1. La Vecchia C., Braga C., Negri E., Franceschi S. Risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer. *Eur. J. Cancer Prev.* 1997; 6(1):20-23.
2. Ogura M., Yamaji Y., Hikiba Y., Maeda S., Matsumura M., Okano K., Sassa R., Yoshida H., Kawabe T., Omata M. Gastric cancer among peptic ulcer patients: retrospective, long-term follow-up. *Dig. Liver Dis.* 2006; 38(11):811-814. doi:10.1016/j.dld.2006.07.004
3. Shimoyama S., Joujima Y., Oohara T., Kaminishi M. Dual roles of peptic ulcer in the carcinogenesis or extension of early gastric cancer. *Annals of Surgical Oncology.* 1999; 6(5):495-499.
4. Molloy R. M., Sonnenberg A. Relation between gastric cancer and previous peptic ulcer disease. *Gut.* 1997;40:247-252.
5. Штыгашева О. В., Агеева Е.С., Харьков В. Н., Степанов В. А. Гены и болезни хакасов. Красноярск: Поликор; 2010.
6. Шептулин А. А. Инфекция *Helicobacter pylori* и рак желудка: современное состояние проблемы. *РЖГГК.* 2012; 2:77-82.
7. Testerman T. L., Morris J. Beyond the stomach: An updated view of *H. pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol.* 2014;20(36):12781-12808.
8. Lee Y. C., Chiang T. H., Chou C. K. Association between *Helicobacter pylori* eradication and gastric cancer incidence: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology.* 2016;150(5):1113-1124.
9. Ford A., Hunt R. H., Yuan Y., Moayyedi P. *Helicobacter pylori* eradication therapy to prevent gastric cancer in healthy asymptomatic infected individuals: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMJ.* 2014; 348: 3174.
10. Никитина Л. В. Рак желудка: факторы риска, диагностика рака и предшествующих поражений <file:///C:/Users/User/Downloads/rak-zheludka-factory-riska-diagnostika-raka-i-predshestvuyuschih-porazheniy.pdf>
11. Mentis A., Lehours P., Megraud F. Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2015;9(20,S.I): 1-7.
12. Peleteiro B., Bastos A., Ferro A., Lunet N. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage. *Dig Dis Sci.* 2014;8 (59)(8):1698-1709.
13. Eusebi L. H., Zagari R. M., Bazzoli F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2014;9(19) (S.1):1-5.
14. Рахманин Ю. А., Герман С. В. Распространенность и пути трансмиссии пилорической хеликобактерной инфекции. II. Трансмиссия инфекции из внешних источников (Обзор литературы). *Гигиена и санитария.* 2015;1:12-15.
15. Штыгашева О.В., Агеева Е.С. Синергизм факторов, способствующих развитию язвенной бо-

лезни желудка и раку желудка экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2019; 12: 65-70. doi: 0.31146/1682-8658-ecg-172-12-65-70.

16. Аруин Л. И. Рак желудка. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 2003;3:36.

17. Черняховская Н. Е., Андреев В. Г., Черепянец Д. П. Эндоскопическая диагностика заболеваний пищевода, желудка и тонкой кишки: учеб. пос. М.: МЕДпресс-информ; 2008.

18. Hansson L.E. Risk of stomach cancer in patients with peptic ulcer disease. *World J. Surg.* 2000; 24:315-320.

19. Баранская Е. К., Ивашкин В. Т. Клинический спектр предраковой патологии желудка. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 2002; 12(3):7-14.

20. Сеферов Б. Д., Соркин В. М., Кляритская И. Л., Амдиев А. А., Кривой В. В. Инфицированность *Helicobacter pylori* и заболеваемость раком желудка в различных этнических группах населения Крыма. Крымский терапевтический журнал. 2008;1(1):99-105.

21. Hansson L. E., Nyren O., Hsing A. W., Bergström R., Josefsson S., Chow W. H., Fraumeni Jr J.F., Adami H.O. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N Engl J Med.* 1996 Jul 25;335(4):242-9. doi:10.1056/NEJM199607253350404.

22. Hwang J. J., Lee D. H., Lee A. R., Yoon H., Shin C. M., Park Y. S., Kim N. Characteristics of gastric cancer in peptic ulcer patients with *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol.* 2015;21(16):4954-4960. doi:10.3748/wjg.v21.i16.4954

23. Graham Y. D. History of *Helicobacter pylori*, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. *World J Gastroenterol,* 2014;20(18):5191-5204.

24. Chen L. W., Chang L. C., Hua C. C., Hsieh B. J., Chen S. W., Chien R. N. Analyzing the influence of gastric intestinal metaplasia on gastric ulcer healing in *Helicobacter pylori*-infected patients without atrophic gastritis. *BMC Gastroenterology.* 2017;17:1. doi: 10.1186/s12876-016-0563-8.

25. Wu J., Xu S., Zhu Y. *Helicobacter pylori* CagA: a critical destroyer of the gastric epithelial barrier. *Dig. Dis. Sci.* 2013;58(7):1830–1837.

26. Zhu Y., Jiang Q., Lou X., Ji X., Wen Z., Wu J., Tao H., Jiang T., He W., Wang C., Du Q., Zheng S., Mao J., Huang J. MicroRNAs up-regulated by CagA of *Helicobacter pylori* induce intestinal metaplasia of gastric epithelial cells. *PLoS One.* 2012;7(4):e35147. doi: 10.1371/journal.pone.0035147

27. Stein M., Ruggiero P., Rappuoli R., Bagnoli F. *Helicobacter pylori* CagA: From pathogenic mechanisms to its use as an anticancer vaccine. *Front Immunol.* 2013;4:328.

28. Склянская О.Л., Лапина Т.Л. Атрофический гастрит, вызванный *Helicobacter pylori*, как предраковое заболевание. Архив патологии. 2004;6:57-60.

29. Praud D., Rota M., Pelucchi C. Cigarette smoking and gastric cancer in the Stomach Cancer Pooling (StoP) Project. *Eur. J. Cancer Prev.* 2018;27:124-133.

30. World Health Organization. World No Tobacco Day 2017: beating tobacco for health, prosperity, the environment and national development; 2017 [cited 2017 Jun 1]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/no-tobacco-day/en/>

31. Dyke G. W., Craven J. L., Hall R., Garner R. C. Smoking-related DNA adducts in human gastric cancers. *Int. J. Cancer.* 1992;52:847-850.

32. Pfeifer G.P., Denissenko M.F., Olivier M., Tretyakova N., Hecht S.S., Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene.* 2002;21:7435-7451.

33. Агеева Е. С., Штыгашева О. В., Пуликов А. С., Буторин Н. Н. Роль IL-1 и IL-8 в патоморфозе слизистой оболочки желудка при *Helicobacter pylori*-ассоциированном гастрите. *Acta biomedica scientifica.* 2011;1-1(77):16-20.

34. Kayastha F., Madhu H., Vasavada A., Johar K. Andrographolide reduces proliferation and migration of lens epithelial cells by modulating PI3K/Akt pathway. *Experimental eye research;* 2014;28:23–26.

35. Seitz H.K., Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 2007; 7:599-612.

36. Deman J, Van Larebeke N. Carcinogenesis: mutations and mutagens. *Tumour Biol.* 2001; 22:191-202.

37. Aberle N.S., Burd L., Zhao B.H., Ren J. Acetaldehyde-induced cardiac contractile dysfunction may be alleviated by vitamin B1 but not by vitamins B6 or B12. *Alcohol.* 2004; 39(5):450–454.

38. Zaridze D., Borisova E., Maximovitch D., Chkhikvadze V: Alcohol consumption, smoking and risk of gastric cancer: case-control study from Moscow, Russia. *Cancer Causes Control.* 2000;11:363-371.

39. Poorolajal J., Moradi L., Mohammadi Y., Cheraghi Z., Fatemeh G.-E. Risk factors for stomach cancer: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiol Health.* 2020;42:1-8. doi:10.4178/epih.e2020004.

40. Штыгашева О. В., Агеева Е. С. Феномен полового диморфизма и факторы риска при раке желудка. Крымский терапевтический журнал. 2019; 3:55-61.

REFERENCES

1. La Vecchia C., Braga C., Negri E., Franceschi S. Risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer. *Eur. J. Cancer Prev.* 1997; 6(1):20-23.

2. Ogura M., Yamaji Y., Hikiba Y., Maeda S., Matsumura M., Okano K., Sassa R., Yoshida H., Kawabe T., Omata M. Gastric cancer among peptic ulcer patients: retrospective, long-term follow-up. *Dig. Liver Dis.* 2006; 38(11):811-814. doi:10.1016/j.dld.2006.07.004

3. Shimoyama S., Joujima Y., Oohara T., Kaminishi M. Dual roles of peptic ulcer in the carcinogenesis or extension

- of early gastric cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 1999; 6(5):495-499.
4. Molloy R. M., Sonnenberg A. Relation between gastric cancer and previous peptic ulcer disease. *Gut*. 1997;40:247-252.
5. Shtygasheva O. V., Ageeva E.S., Har'kov V. N., Stepanov V. A. Genes and diseases of Khakas. Krasnoyarsk: Polikor; 2010. (In Russ).
6. Sheptulin A. A. Infekciya *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: current status of the problem. *The Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2012; 2: 77-82. (In Russ).
- 7 Testerman T. L., Morris J. Beyond the stomach: An updated view of *H. pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol*. 2014;20(36):12781–12808.
8. Lee Y. C., Chiang T. H., Chou C. K. Association between *Helicobacter pylori* eradication and gastric cancer incidence: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 2016;150(5):1113-1124.
9. Ford A., Hunt R. H., Yuan Y., Moayyedi P. *Helicobacter pylori* eradication therapy to prevent gastric cancer in healthy asymptomatic infected individuals: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMJ*. 2014; 348: 3174.
10. Nikitina L.V. Gastric cancer: risk factors, diagnosis of cancer and previous lesions file:///C:/Users/User/Downloads/rak-zheludka-factory-riska-diagnostika-raka-i-predshestvuyuschih-porazheniy.pdf. (In Russ).
11. Mentis A., Lehours P., Megraud F. Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2015;9(20,S.I): 1–7.
12. Peleteiro B., Bastos A., Ferro A., Lunet N. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection worldwide: a systematic review of studies with national coverage. *Dig Dis Sci*. 2014;8 (59)(8):1698–1709.
13. Eusebi L. H., Zagari R. M., Bazzoli F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2014;9(19) (S.1):1–5.
14. Rahmanin Y. A., German S. V. The prevalence and transmission of pyloric *Helicobacter pylori* infection. II. Transmission of infection from external sources. *Hygiene and sanitation*, 2015; 1:12-15. (In Russ)
15. Shtygasheva O. V., Ageeva E. S. Synergies of factors contributing to the development of gastric ulcer and gastric cancer. *Experimental and clinical gastroenterology journal*. 2019;12:65-70. (In Russ).
16. Aruin L. I. Gastric cancer. *The Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2003;3:36. (In Russ).
17. Chernyahovskaya N. E., Andreev V. G., Cherepyancev D. P. Endoscopic diagnosis of diseases of the esophagus, stomach and small intestine: studies. M.: MEDpress-inform, 2008: 192. (In Russ).
18. Hansson L. E. Risk of stomach cancer in patients with peptic ulcer disease. *World J. Surg*. 2000; 24:315-320.
19. Baranskaya E. K., Ivashkin V. T. Clinical spectrum of precancerous pathology of the stomach. *The Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2002;12(3):7-14.
20. Seferov B. D., Sorkin V. M., Klyaryts'ka I. L., Amdiev A. A., Kryvy V. V. Contamination by *Helicobacter pylori* and cancer of stomach in various ethnic groups of the Crimea population. *Crimean journal of internal diseases* , 2008; 1(1):99-105. (in Russ)
21. Hansson L. E., Nyren O., Hsing A. W., Bergström R., Josefsson S., Chow W. H., Fraumeni Jr J. F., Adami H. O. The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N Engl J Med*. 1996 Jul 25;335(4):242-9. doi: 10.1056/NEJM199607253350404.
22. Hwang J. J., Lee D. H., Lee A. R., Yoon H., Shin C. M., Park Y. S., Kim N. Characteristics of gastric cancer in peptic ulcer patients with *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol*. 2015; vol.21(16), pp.4954-4960. doi: 10.3748/wjg.v21.i16.4954
23. Graham Y. D. History of *Helicobacter pylori*, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 2014; 20(18): 5191-5204.
24. Chen L. W., Chang L. C., Hua C. C., Hsieh B. J., Chen S. W., Chien R. N. Analyzing the influence of gastric intestinal metaplasia on gastric ulcer healing in *Helicobacter pylori*-infected patients without atrophic gastritis. *BMC Gastroenterology*. 2017;17:1. doi: 10.1186/s12876-016-0563-8.
25. Wu J., Xu S., Zhu Y. *Helicobacter pylori* CagA: a critical destroyer of the gastric epithelial barrier. *Dig. Dis. Sci*. 2013; 58(7):1830–1837.
26. Zhu Y., Jiang Q., Lou X., Ji X., Wen Z., Wu J., Tao H., Jiang T., He W., Wang C., Du Q., Zheng S., Mao J., Huang J. MicroRNAs up-regulated by CagA of *Helicobacter pylori* induce intestinal metaplasia of gastric epithelial cells. *PLoS One*. 2012;7(4):e35147. doi: 10.1371/journal.pone.0035147
27. Stein M., Ruggiero P., Rappuoli R., Bagnoli F. *Helicobacter pylori* CagA: From pathogenic mechanisms to its use as an anticancer vaccine. *Front Immunol*. 2013;4:328.
28. Sklyanskaya O. L., Lapina T. L. Atrophic gastritis caused by *Helicobacter pylori* as a precancerous disease. *Arh. Patol*. 2004;6:57-60. (in Russ)
29. Praud D., Rota M., Pelucchi C., et al. Cigarette smoking and gastric cancer in the Stomach Cancer Pooling (StoP) Project. *Eur. J. Cancer Prev*. 2018;27:124-133.
30. World Health Organization. World No Tobacco Day 2017: beating tobacco for health, prosperity, the environment and national development; 2017 [cited 2017 Jun 1]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/no-tobacco-day/> en
31. Dyke G. W., Craven J. L., Hall R., Garner R. C. Smoking-related DNA adducts in human gastric cancers. *Int. J. Cancer*. 1992; .52:847-850.
32. Pfeifer G. P., Denissenko M. F., Olivier M., Tretyakova N., Hecht S. S., Hainaut P., Tobacco smoke

carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. 2002;21:7435-7451.

33. Ageeva E. S., Shtygasheva O. V., Pulikov A. S., Butorin N. N. The role of IL-1 and IL-8 in pathomorphosis of the mucous coat of stomach at the *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Acta biomedica scientifi*; 2011;1–1 (77):16–20. (In Russ).

34. Kayastha F., Madhu H., Vasavada A., Johar K. Andrographolide reduces proliferation and migration of lens epithelial cells by modulating PI3K/Akt pathway. *Experimental eye research*; 2014,28:23–26.

35. Seitz H. K., Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer*. 2007; 7:599-612.

36. Deman J, Van Larebeke N. Carcinogenesis: mutations and mutagens. *Tumour Biol*. 2001; 22:191-202.

37. Aberle N. S., Burd L., Zhao B. H., Ren J. Acetaldehyde-induced cardiac contractile dysfunction may be alleviated by vitamin B1 but not by vitamins B6 or B12. *Alcohol*. 2004; 39(5):450–454.

38. Zaridze D., Borisova E., Maximovitch D., Chkhikvadze V: Alcohol consumption, smoking and risk of gastric cancer: case–control study from Moscow, Russia. *Cancer Causes Control*. 2000;11:363-371.

39. Poorolajal J., Moradi L., Mohammadi Y., Cheraghi Z., Fatemeh G.-E. Risk factors for stomach cancer: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiol Health*. 2020, 42: 1-8. doi.org/10.4178/epih.e2020004. doi: 10.4178/epih.e2020004 .

40. Shtygasheva O. V., Ageeva E.S . The phenomenon of sexual dimorphism and risk factors in gastric cancer, *Crimean journal of internal diseases*. 2012;3:55-61. (In Russ).

ПРОФЕССОР АНАТОЛИЙ АНДРЕЕВИЧ БАБАНИН**(К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ)****Фоминых Т. А., Куцевол Б. Л., Киселев В. В., Захарова А. Н., Уланов В. С., Саенко А. Г.,****Грицкевич О. Ю.**

Кафедра судебной медицины, Медицинская академия имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», 295051, бульвар Ленина, 5/7, Симферополь, Россия.

Для корреспонденции: Уланов В. С., старший преподаватель кафедры судебной медицины Медицинской академии имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», e-mail: ulyan4ik@mail.ru

For correspondence: Ulanov V.S., senior lecturer of the department of forensic medicine Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, e-mail: ulyan4ik@mail.ru

Information about authors:

Fominykh T. A., <http://orcid.org/0000-0001-6572-2387>

Kutsevol B. L., <http://orcid.org/0000-0003-4415-9083>

Kisel'ev V. V., <http://orcid.org/0000-0001-6425-0111>

Zakharova A. N., <http://orcid.org/0000-0001-6243-3360>

Ulanov V. S., <http://orcid.org/0000-0002-4096-2787>

Saenko A. G., <https://orcid.org/0000-0003-0987-919X>

Gritskevich O. Yu., <https://orcid.org/0000-0002-0312-9972>

РЕЗЮМЕ

Статья посвящена 80-летию юбилею доктора медицинских наук, профессора Бабанина Анатолия Андреевича. В статье освещены основные события в жизни известного ученого, перечислены основные достижения и научные свершения. Жизнь и научная деятельность Анатолия Андреевича неразрывно связаны с Крымским медицинским институтом (университетом), в стенах которого будущий профессор вначале получал высшее медицинское образование, а затем, спустя годы успешной научной деятельности, возглавлял вуз в качестве ректора на протяжении многих лет. Благодаря талантливому руководству Крымский медицинский университет достиг высокого уровня научно-технического развития и международного признания. За долгий плодотворный труд и научные достижения профессор Бабанин А.А. удостоен многочисленных правительственных и международных наград и званий, и в настоящее время продолжает активно работать на благо высшего медицинского образования в Крыму.

Ключевые слова: профессор Бабанин А.А., Крымский государственный медицинский университет, судебная медицина, морфология

PROFESSOR ANATOLY ANDREEVICH BABANIN (THE 80TH ANNIVERSARY)

Fominykh T. A., Kutsevol B. L., Kisel'ev V. V., Zakharova A. N., Ulanov V. S., Saenko A. G., Gritskevich O. Yu.

Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia

SUMMARY

The article is dedicated to the 80th anniversary of the Doctor of Medical Sciences (MD), Professor Anatoly Andreevich Babanin. The article highlights the main events in the life of the famous scientist, lists the main achievements and scientific achievements. The life and scientific activities of Anatoly Andreevich are inextricably linked with the Crimean Medical Institute (University), within the walls of which the future professor first received a higher medical education, and then, after years of successful scientific activity, headed the university as a rector for many years. Thanks to the talented leadership, the Crimean Medical University has reached a high level of scientific and technological development and international recognition. For long productive work and scientific achievements, Professor A.A. Babanin awarded numerous government and international awards and titles, and currently continues active work for the benefit of higher medical education in Crimea.

Key words: Professor A.A. Babanin, Crimean State Medical University, forensic medicine, morphology

19 августа 2020 г. исполняется 80 лет доктору медицинских наук, профессору, члену-корреспонденту РАН, почетному академику Международной академии антропологии, Польской и

Нью-Йоркской медицинских академий Анатолию Андреевичу Бабанину [12].

Бабанин А.А. родился в 1940 г. в посёлке Матяш Прилузского района Коми АССР. После



**ПРОФЕССОР АНАТОЛИЙ АНДРЕЕВИЧ
БАБАНИН**

окончания Генической средней школы поступил в Симферопольский медицинский техникум, который окончил с красным дипломом [13]. В 1959 г. поступил в Крымский медицинский институт, который в 1965 г. также с отличием окончил.

Еще в студенческие годы Анатолий Андреевич заинтересовался наукой и по окончании института остался на кафедре оперативной хирургии и топографической анатомии, где проработал в должности ассистента с 1966 по 1978 год. Многочисленные научные эксперименты и операции на животных стали базой для написания и успешной защиты в 1967 г. кандидатской диссертации на тему: «Состояние эвакуаторно-моторной функции желудка после резекций по некоторым модификациям способа Бильрот-2 в свете ранних эвакуаторных нарушений» [1].

В 1974 г. А.А. Бабанин защитил докторскую диссертацию [2]. В ходе научно-экспериментальных исследований им была создана и успешно апробирована новая хирургическая рассасывающаяся нить из твердой мозговой оболочки «Биофил», которая по своим медико-биологическим показателям превосходит многие аналоги [5, 6]. После присвоения в 1980 г. научного звания профессора Анатолий Андреевич некоторое время заведовал кафедрой нормальной анатомии [8, 10, 11].

В 1982 году профессор Бабанин возглавил кафедру судебной медицины с курсом права, где основал научную школу экспериментальной морфологии. Многие годы научная тематика кафедры касалась вопросов морфологической и судебно-медицинской оценки висцеральной патологии при алкогольной интоксикации. Основным направлением исследовательской работы являлось создание алгоритмов судебно-медицинской диагностики отравлений алкоголем с использованием не только токсикологических методов, но и комплекса других (морфологического, биохимического, физического и др.) [4, 7].

В 1996 г. профессор Бабанин А.А. был избран ректором Крымского государственного медицинского института имени С.И. Георгиевского. За годы руководства университетом Анатолию Андреевичу удалось стабилизировать и значительно улучшить экономическое положение вуза, оснастить учебный процесс и научную деятельность современной техникой, организовать современные научные лаборатории, обеспечить финансовой поддержкой развитие англоязычной формы обучения для иностранных студентов, количество которых возросло в разы благодаря дипломатичной и мудрой политике руководства университета на международном образовательном рынке. В результате всех указанных положительных и прогрессивных преобразований Крымский медицинский институт в 1998 году был реорганизован в Крымский государственный медицинский университет (КГМУ) имени С.И. Георгиевского [3]. Благодаря неоспоримым организаторским способностям и таланту хозяйственника Бабанину А.А. удалось построить и оснастить современной техникой университетскую клинику, открывшуюся в 2005 г. и ставшую не только еще одной клинической базой для старшекурсников, но и многопрофильным лечебным учреждением, обеспечивающим медицинское обслуживание населения Крыма, в том числе студентов и сотрудников вуза [9].

Под руководством ректора Бабанина А.А. университет многие годы занимал лидерские позиции в рейтинге медицинских университетов страны. В 2006 году Крымский государственный медицинский университет стал единственным в Украине медицинским вузом, успешно прошедшим международную сертификацию: Международная организация по вопросам образования (IES, Лондон) сертифицировала университет по высшему рейтинговому уровню АА как «лучшее высшее учебное заведение, известное и признанное в мире». На протяжении многих лет КГМУ являлся также лидером в англоязычной форме обучения иностранных студентов, для которых силами руководства университета были

возведены несколько многоэтажных корпусов современных удобных общежитий с благоустроенной прилегающей территорией. По инициативе и под личным патронатом ректора на территории университета возведен и уже много лет функционирует Храм святителя Луки в память о выдающемся хирурге Валентине Феликсовиче Войно-Ясенецком, архиепископе Симферопольском и Крымском [9].

Неоценимый вклад в науку внес Анатолий Андреевич также в качестве многолетнего председателя защитного Совета по морфологии при Крымском медицинском университете. Специализированный совет под руководством профессора Бабанина А.А. за годы работы приобрел значительный вес и уважение среди членов научного сообщества страны как требовательный и высокопрофессиональный, но доброжелательный и продуктивный «научный фильтр», давший путевку в жизнь не одному поколению ученых-морфологов, патологов, эмбриологов и хирургов. И сейчас диссертационный совет при Медицинской академии имени С.И. Георгиевского успешно продолжает работу, поддерживая репутацию высоконаучного уровня, заработанную крымским сообществом морфологов под руководством профессора Бабанина А.А.

Всего за годы научной деятельности профессор Бабанин А.А. подготовил 5 докторов и 28 кандидатов медицинских наук, опубликовал 290 научных статей и 7 монографий по вопросам морфологии, экспериментальной хирургии и судебной медицины, а также ряд монографий, учебников и учебных пособий, в том числе и английском языке. Сравнительно недавно вышла в печати автобиографическая книга воспоминаний о деятельности Крымского медицинского университета (института).

За многолетний плодотворный труд и достижения на научном поприще профессор Бабанин А.А. награжден орденом «За заслуги» III степени, Золотой медалью Альберта Швейцера, орденом Святого равноапостольного князя Владимира I степени, орденом Петра Великого I степени, орденом Святого Луки, архиепископа Крымского и многими другими орденами и наградами государственного и международного уровня. В 2008 г. за личные достижения в сфере образования и вклад в мировой образовательный процесс профессор Бабанин А.А. был причислен Кембриджским Международным биографическим центром к ведущим педагогам мира. В 2014 г. Анатолий Андреевич был рекомендован к вступлению в Оксфордское академическое общество и присвоению международной награды в области научных исследований «The Name in

Science» с включением в международный реестр «Выдающиеся ученые мира».

В настоящее время профессор Бабанин Анатолий Андреевич продолжает активно участвовать в жизни родного вуза, являясь советником ректора Крымского федерального университета по медицинским вопросам.

Коллектив кафедры судебной медицины Медицинской академии имени С.И. Георгиевского (структурное подразделение) Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского от имени коллег и учеников искренне поздравляет Анатолия Андреевича Бабанина с очередным юбилеем и желает здоровья, долголетия и дальнейших творческих успехов и научных достижений!

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабанин А.А. Состояние эвакуаторно-моторной функции желудка после резекции по некоторым модификациям способа Бильрот-II в свете ранних эвакуаторных нарушений (экспериментальное исследование): Автореферат дис. ... канд. мед. наук. Донецк, 1967; 20 с.
2. Бабанин А.А. Материалы к оценке достаточности способов соединения стенок желудочно-кишечного тракта. Экспериментальное исследование: Автореф. дис... докт. мед. наук. Москва-Симферополь, 1974; 34 с.
3. Бабанин А.А. Обновлёнными в XXI век (К 70-летию юбилею Крымского медицинского университета им. С. И.Георгиевского). Асклепий. 2001; (3): 4-14.
4. Бабанин А.А., Иванченко Е.Д., Киселев В.В., Куцевол Б.Л., Уланов В.С., Щербакова В.М. Анализ структуры смертельных отравлений психоактивными веществами по г. Симферополю и Симферопольскому району за 2011-2015 гг // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2016; 6(4): 4-8.
5. Бабанин А.А., Коротко А.Ш. Способ получения хирургической шовной нити. Патент на изобретение RU 2033810 С1, 30.04.1995. Заявка № 92004623/14 от 14.10.1992.
6. Бабанин А.А., Коротко А.Ш., Хгумеров Х. Новая рассасывающаяся хирургическая нить «Биофил». Материалы II Междунар. конф. «Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантов». М., 1995; 305-306.
7. Бабанин А.А., Морозов И.С., Кузьминский А.А., Беловицкий О.В. Краткий исторический очерк о развитии судебно-медицинской службы в Крыму. Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Юридические науки». 2008; 21, 2(60): 3-10.
8. Малов А.Е., Пикалюк В.С., Овчаренко В.В., Шкурченко В.П. Эволюция научных направлений крымской школы анатомов. Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2016; 6(3): 212-217.

9. Мороз Г.А. Профессор Бабанин Анатолий Андреевич (к 70-летию со дня рождения). Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2010; 9(3): 101-103.

10. Пикалюк В.С., Бессалова Е.Ю., Шкуренко В.П. и др. Кафедра анатомии в лицах и судьбах. Страницы истории. Под ред. В.С. Пикалюка; 2-е изд., перераб. и доп. Симферополь, 2017; 114 с.

11. Пикалюк В.С., Шкуренко В.П. К истории кафедры нормальной анатомии человека и морфологического музея Медицинской академии имени С.И. Георгиевского. Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. 2016; 6(3): 218-222.

12. Профессор Анатолий Андреевич Бабанин (к 70-летию со дня рождения). Вісник проблем біології і медицини. 2010; (3): 10-12.

13. Профессор Анатолий Андреевич Бабанин. Світ медицини та біології. 2010; (4): 184.

REFERENCES

1. Babanin A.A. Condition of evacuator-motor function of stomach after resection on some modifications of Billroth-II method in the light of early evacuator violations (experimental research): Author's abstracts of candidate dissertation. Donetsk, 1967; 20 p. (In Russ).

2. Babanin A.A. Materials to the estimation of sufficientness of methods of connection of walls of gastrointestinal tract. Experimental research: Author's abstracts of doctor dissertation. Moscow-Simferopol, 1974. – 34 p. (In Russ).

3. Babanin A.A. Renewed in a XXI century (To the 70-years-old anniversary of the Crimean medical university named after S.I. Georgievsky). Asclepius. 2001; (3): 4-14. (In Russ).

4. Babanin A.A., Ivanchenko E.D., Kiselyov V.V., Kutsevol B.L., Ulanov V.S., Scherbakova V.M. Analysis of structure of the mortal poisoning by psychoactive substances in Simferopol and Simferopol district after 2011-2015 years. The Crimean journal of experimental and clinical medicine. 2016; 6(4): 4-8. (In Russ).

5. Babanin A.A., Korotko A.H., Method of receipt of surgical filament of guy-sutures. Patent on the invention of RU 2033810 C1, 30.04.1995. Request № 92004623/14 from 14.10.1992. (In Russ).

6. Babanin A.A., Korotko A.H., Hgumerov H. The new absorbable surgical thread «Biofil». Modern approaches to the development of effective wound dressings, sutures materials and polymeric implants. Materials of II International conf., 21-22 November 1995. Moscow, 1995; 305-306. (In Russ).

7. Babanin A.A., Morozov I.S., Kuzminsky A.A., Belovitsky O.V. The short historical essay about development of medico-legal service in Crime. The Scientific messages of the Tavric national university named after V.I. Vernadsky. Series «Legal sciences». 2008; 21, 2(60): 3-10. (In Russ).

8. Malov A.Y., Pikalyuk V.S., Ovcharenko V.V., Shkurenko V.P. Evolution of scientific direction of the Crimean anatomical school. The Crimean journal of experimental and clinical medicine. 2016; 6(3): 212-217. (In Russ).

9. Moroz G.A. Professor Babanin Anatoliy Andreevich (to the 70year from the day of birth). Clinical anatomy and operative surgery. 2010; 9(3): 101-103. (In Russ).

10. Pikalyuk V.S., Bessalova Y.Yu., Shkurenko V.P. and al. Department of human anatomy in persons and faces. Pages of history; 2th ed. Simferopol, 2017; 114 p. (In Russ).

11. Pikalyuk V.S., Shkurenko V.P. To the history of human normal anatomy department and morphological museum of the Medical academy named after S.I. Georgievsky. The Crimean journal of experimental and clinical medicine. 2016; 6(3): 218-222. (In Russ).

12. Professor Anatoliy Andreevich Babanin (to the 70year from the day of birth). The bulletin of problems of the biology and medicine. 2010; (3): 10-12. (In Russ).

13. Professor Anatoliy Andreevich Babanin. The world of the biology and medicine. 2010; (4): P. 184. (In Russ).