БЮЛЛЕТЕНЬ
ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова

Санкт-Петербург
2013

Главный редактор
Е.В. Шляхто

Зам. главного редактора
А.О. Конради
М.А. Карпенко

Секретарь
Н.Г. Авдонина

Члены редакционной коллегии
Е.И. Баранова (Санкт-Петербург)
Е.Р. Баранцевич (Санкт-Петербург)
В.А. Барт (Санкт-Петербург)
О.А. Беркович (Санкт-Петербург)
В.Н. Вавилов (Санкт-Петербург)
М.М. Галагудза (Санкт-Петербург)
Е.Н. Гринева (Санкт-Петербург)
М.Л. Гордеев (Санкт-Петербург)
И.Е. Зазерская (Санкт-Петербург)
А.Ю. Зарицкий (Санкт-Петербург)
Э.В. Земцовский (Санкт-Петербург)
Д.О. Иванов (Санкт-Петербург)
Т.Л. Каронова (Санкт-Петербург)
М.А. Карпенко (Санкт-Петербург)
А.А. Костарева (Санкт-Петербург)
Д.И. Курапеев (Санкт-Петербург)
О.М. Моисеева (Санкт-Петербург)
А.О. Недошивин (Санкт-Петербург)
А.В. Рудакова (Санкт-Петербург)
Г.Н. Салогуб (Санкт-Петербург)
В.Н. Солнцев (Санкт-Петербург)
Л.А. Сорокина (Санкт-Петербург)
В.А. Цырлин (Санкт-Петербург)

Editor-in-Chief
E. Shlyakhto

Vice-editors
A. Konradi
M. Karpenko

Secretary
N. Avdonina

Editorial board
E. Baranova (St. Petersburg)
E. Barancevich (St. Petersburg)
V. Bart (St. Petersburg)
O. Berkovich (St. Petersburg)
V. Vavilov (St. Petersburg)
M. Galagudza (St. Petersburg)
E. Grineva (St. Petersburg)
M. Gordeev (St. Petersburg)
I. Zazerskaya (St. Petersburg)
A. Zaritskii (St. Petersburg)
E. Zemtsovskiy (St. Petersburg)
D. Ivanov (St. Petersburg)
T. Karonova (St. Petersburg)
M. Karpenko (St. Petersburg)
A. Kostareva (St. Petersburg)
D. Kurapeev (St. Petersburg)
O. Moiseeva (St. Petersburg)
A. Nedoshivin (St. Petersburg)
A. Rudakova (St. Petersburg)
G. Salogub (St. Petersburg)
V. Solntsev (St. Petersburg)
L. Sorokina (St. Petersburg)
V. Tsirlin (St. Petersburg)

Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Almазова

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Подача рукописей и переписка с авторами, размещение рекламы и подписка
e-mail: **bulleten@almazovcentre.ru**

Издательство
«ФОНД ВЫСОКИХ МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ»

Адрес: 194156, Санкт-Петербург,
пр. Пархоменко, д. 15, лит.Б.

Телефоны издательства: (812) 702 37 16

Бюллетень зарегистрирован
в Государственном комитете РФ по печати.
Свидетельство о рег. ПИ № ФС77-38713 от 22.01.2010 г.

Тираж 1100 экз.

Тематическая рассылка по специалистам.

Подписка по каталогу агентства «Роспечать» подписной индекс 57992

Все права защищены. Полное или частичное воспроизведение материалов, опубликованных в бюллетене, допускается только с письменного разрешения редакции.

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных материалов.

ISSN 2078-8150

Верстка П.В. Морозов

СОДЕРЖАНИЕ

КОЛОНКА РЕДАКТОРА 4

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

Гамилов Т.М., Симаков С.С., Холодов А.С.
Роль численного эксперимента в исследовании паталогий сердечно-сосудистой системы 5

Шпаков А.О., Шпакова Е.А.
Применение пептидной стратегии для создания новых лекарственных препаратов 14

Карпушев А.В., Ревитцер А.В., Худяков А.А., Ахметзянова С.В., Дмитриева Р.И.
Лазерная микродиссекция в трансляционных исследованиях 23

Кузнецов С.И., Буркова Н.В., Тюкавин А.И.
Контактная твердофазная гемомодуляция 28

Шпаков А.О., Карпова П.А., Баллюзек М.Ф.
Заболевания щитовидной железы у больных сахарным диабетом 34

Шпаков А.О., Деркач К.В., Чистякова О.В., Мойсеюк И.В., Бондарева В.М.
Изменение регуляторных эффектов гормонов и гуаниновых нуклеотидов на активность аденилатциклазы
у самцов крыс с 30-ти суточным стрептозотоциновым диабетом 42

Пеннияйнен В.А., Кипенко А.В., Лопатина Е.В., Крылов Б.В.
Участие Na+,K+-АТФазы в каскадных процессах, запускаемых фактором роста нервов 50

Сонин Д.Л., Енукашвили Н.И., Королёв Д.В., Галагудза М.М.
Кратковременная вентиляция ксеноном в первые минуты реперфузии не защищает миокард крысы
от ишемически-реперфузионного повреждения 54

Щербак Н.С., Галагудза М.М., Бещук О.В., Овчинников Д.А.,
Митрофанова Л.Б., Баранцевич Е.Р., Шляхто Е.В.
Эффект ишемического посткондиционирования на экспрессию HIF-1α при глобальной
ишемии-реперфузии головного мозга у крыс 62

Иванов С.А., Журавский С.Г., Галагудза М.М.
Молекулярные механизмы отопротекции в условиях феномена звукового прекондиционирования 69

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

Забирник А.С., Гудкова А.Я., Малашичева А.Б., Костарева А.А.
Ламины и ламинопатии: роль в самообновлении и дифференцировке стволовых клеток взрослого организма 77

Дмитриева Р.И., Клюкина М.А., Козлова С.Н., Зарицкий А.Ю.
Роль гипоксии в поддержании пролиферативной активности мультипотентных мезенхимных стволовых
клеток костного мозга, полученных от пациентов с сердечной недостаточностью и коморбидностями 83

Стругов В.В., Жук С.В., Бадаев Р.Ш., Бутылин П.А., Зарицкий А.Ю.
Моделирование микроокружения клеток хронического лимфолейкоза в лимфатических узлах 88

Костина А.С., Шишкова А.А., Костарева А.А., Малашичева А.Б.
Особенности эндотелиальных клеток у пациентов с аневризмой восходящего отдела грудной аорты 103

Кок Б.Б., Федоров А.В., Костарева А.А., Вавилов В.Н.
Факторы связанные с развитием рестеноза после реконструктивных операций на артериях 108

ОЧЕРКИ ИЗ ИСТОРИИ МЕДИЦИНЫ

Шевченко И.А., Вершинин А.С.
Исторические аспекты 50-летия создания российского кардиологического общества 112

Глубокоуважаемые читатели!

С 2014 года журнал «Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» изменит свое название и станет «Трансляционной медициной». Трансляционный цикл в медицине начинается с фундаментальных исследований, необходимость проведения которых продиктована клинически значимой проблемой. Поэтому нам кажется символичным, что последний номер журнала в 2013 году посвящен вопросам экспериментальной медицины, молекулярной биологии и генетики. Номер открывает обзорная статья о значении вычислительного эксперимента в изучении патологии системы кровообращения. Читатели смогут познакомиться как с оригинальными, так и с обзорными статьями, посвященными вопросам защиты сердца и головного мозга от ишемического-реперфузионного повреждения. В ряде статей номера рассматриваются физиологические и патогенетические механизмы, связанные с эндо- и паракринной регуляцией функции клетки. Большое внимание уделено вопросам биологии стволовых клеток и эндотелиоцитов. Надеемся, что материалы данного тематического номера будут интересны как экспериментаторам, так и практикующим врачам.

С уважением,
члены редколлегии журнала

Директор Института молекулярной биологии и генетики
ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ,
А.А. Костарева

Директор Института экспериментальной медицины,
ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ,
М.М. Галагудза

РОЛЬ ЧИСЛЕННОГО ЭКСПЕРИМЕНТА В ИССЛЕДОВАНИИ ПАТАЛОГИЙ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

Т.М. Гамилов, С.С. Симаков, А.С. Холодов

ФГАОУ ВПО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Москва, Россия

Гамилов Тимур Мударисович — ассистент МФТИ; *Симаков Сергей Сергеевич* — кандидат физико-математических наук, доцент кафедры вычислительной математики, МФТИ; *Холодов Александр Сергеевич* — член-корр. РАН, профессор, заведующий кафедрой вычислительной математики МФТИ, директор Института автоматизации проектирования РАН, ассоциированный профессор БФУ им. И. Канта.

Контактная информация: Московский физико-технический институт, Институтский пер., д. 9, Московская обл., г. Долгопрудный, Россия, 141707. Тел.: 8 (495) 408–731–81. E-mail: simakov@crec.mipt.ru (Симаков Сергей Сергеевич).

Резюме

Обсуждаются основные принципы построения математических моделей кровотока в сосудах, вопросы идентификации их параметров и круг применимости таких моделей для практических задач.

Ключевые слова: математическое моделирование, компьютерное моделирование, кровообращение.

COMPUTATIONAL MODELS FOR CARDIOVASCULAR RESEARCH

T.M. Gamilov, S.S. Simakov, A.S. Kholodov

Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

Corresponding author: Moscow Institute of Physics and Technology, 9 Institutskiy per., Dolgoprudny, Moscow Region, Russia, 141700. Tel.: 8 (495) 408–731–81. E-mail: simakov@crec.mipt.ru (Sergey S. Simakov — PhD in Physics and Mathematics sciences, Associate Professor, Department of Applied Mathematics).

Abstract

In this Article discusses the main principles of constructing mathematical models of blood flow in vessels, issues of identification of their parameters and the range of applicability of these models for practical problems.

Key words: Mathematical modeling, computer simulation, circulation.

Статья поступила в редакцию 01.11.13, принята к печати 11.11.13.

Введение

Медицина — одна из старейших составляющих человеческой культуры, которая в течение многих веков развивалась как искусство. Накопленный объем фактического материала потребовал его обработки и систематизации. Далее медицина обогащается методами математической статистики. Открытие и освоение новых физических явлений вместе с разработкой современных методов математической обработки данных привело к появлению принципиально новых способов диагностики и лечения, такие, как рентгеновская, акустическая или магнитная томография, ультразвуковая допплерография и др. К концу XX в. медицина стала наукой, опирающейся в своих исследованиях на биологическое моделирование, натурный эксперимент, математическую статистику и физико-математические принципы диагностики и анализа данных.

Эволюция электронно-вычислительной техники привела к тому, что компьютер, появившийся

УДК.612.08:616.1

на свет как мощный арифмометр, прибор для вычислений, становится инструментом диалога исследователя с природой. Этот диалог исследователь осуществляет путем создания математической модели природного явления и на ее основе вычислительного эксперимента.

У медицины XXIв. появилась возможность дополнить традиционные биологические модели, в качестве которых используются органы животных, моделями математическими. Не случайно, поэтому, в последние годы в медицине возрастает роль вычислительных экспериментов. Их главным достоинством является возможность проводить практически неограниченное число опытов без опасности для жизни и здоровья пациента. Настроенные под конкретного человека современные математические модели способны помочь поставить диагноз, оценить возможные последствия различных стратегий лечения и выбрать наиболее оптимальный метод терапии. Многие современные модели до сих пор находятся в стадии физико-математической разработки и исследования и малопригодны для широкого практического использования. Тем не менее, в некоторых приложениях их успехи достаточно высоки.

Одной из сфер, в которых математическое моделирование добилось значительного успеха в последние годы, является вычислительное исследование патологий сердечно-сосудистой системы. Распространение вычислительных моделей в этой области связано, с одной стороны, с потребностью медицины в тщательном качественном и количественном изучении различных методик лечения, с другой — с наличием развитого математического аппарата моделирования гидродинамических течений, который можно применить к описанию кровотока в сосудах.

История развития математических представлений о гемодинамике

Вопросы механики кровотока интересуют человечество на протяжении многих веков. Основа современных представлений была заложена Вильямом Гарвеем (1578–1657 гг.). С этого периода исследование механики кровотока начинает проводиться с привлечением математического аппарата и моделей, построенных на физических принципах. Хейлзом в 1733 г. предложена модель аортальной компрессионной камеры. Бернулли (1700–1782 гг.) и Эйлер (1707–1783 гг.) именно в результате исследований механики кровотока предложили уравнения, ставшие впоследствии фундаментальными для всей гидродинамики. В них определяется взаимосвязь между перепадом давления и изменением кинетической и потенциальной энергии движущейся жидкости. Юнг (1808 г.) и Моенс и Кортевег (1878 г.) впервые осуществили математические исследования волновой природы кровотока в артериях.

С середины XX века после появления теории Фурье о разложении волны на гармонические составляющие появились работы, включающие в себя пространственно-временной анализ. Начало современного этапа в развитии механики кровотока было положено работами Уомерсли (1955–1957 г.) в которых было исследовано движение вязкой несжимаемой жидкости в одной трубке.

Современные методики исследований пульсирующего кровотока при этом достаточно сложны и разнообразны. Существуют модели основанные на стохастических методах [1] и комбинированном фрактально-вейвлетном анализе [2], модели с сосредоточенными параметрами [3–6], среди которых наиболее широко распространена методика электромеханических аналогий [7–10] и др. Наиболее адекватным реальности, тем не мене, является подход на основе моделирования в различном приближении течения вязкой несжимаемой жидкости в сети эластичных трубок [11–19] и др. Большое количество работ имеет дело с двух [20, 21] и трехмерными моделями [3, 22, 23], которые преимущественно используются для моделирования локальных крупных участков кровеносной системы. При этом, для многомерных моделей до сих пор серьезной проблемой является учет эластичности и, как следствие, подвижности, стенки сосуда из-за их большой вычислительной ресурсоемкости. Одномерные (гидравлические) модели [14, 24–30] позволяют описывать волновые и процессы массопереноса во всех крупных и средних сосудах обоих кругов кровообращения. Для описания областей микроциркуляций используются специализированные модели, учитывающие особый характер течения через капилляры [29, 30] или фильтрационные модели [18, 19, 30]. Все шире распространяются идеи многомасштабного [33, 34] и мультимодельного [18, 28, 35, 36] подходов, используются более сложные (связные) модели: разных размерностей (одномерные гидравлические сети совместно с многомерными локальными моделями или нуль-мерной моделью сердца), разных режимов течения (пульсовые — в крупных и средних артериях совместно с «фильтрационными» моделями периферического кровообращения), с учетом различных физических аспектов (свойства эндоваскулярных имплантатов и др.).

Следует отметить, что развитие математических моделей кровотока было бы невозможным без ис-

пользования вычислительных методов, разработанных в течение последних десятилетий [37–41]. Таким образом, механика кровотока является сложной областью, требующей междисциплинарного подхода включающего анатомию, физиологию, физику, математический аппарат, в том числе методы численного моделирования.

Анализ практической применимости

Мощности современной вычислительной техники и прогресс в области численных методов решения нелинейных уравнений с частными производными позволяют исследовать течение крови в областях сложной формы и высокой размерности [42–44]. В результате удается составить подробную картину кровотока при стенозе [45] и артериальной аневризме [46], рассмотреть течение в области ветвления артерий и рассчитать деформации стенки сосуда [42]. Тем не менее, этот подход применим лишь для локальных крупных участков сосудистого русла. Замкнутый кровоток может быть описан с помощью квазиодномерных моделей сердечно-сосудистой системы [47–50], при построении которых предполагается, что длина каждого сосуда намного больше его диаметра и в качестве переменных величин таких моделей используются осредненные по поперечному сечению величины (линейная скорость и поперечное сечение в каждой точке в сосуде). В итоге, с помощью законов сохранения массы и импульса решается задача о пульсирующем движении вязкой несжимаемой жидкости в сети эластичных трубок. В том числе такими трубками интегрально могут моделироваться целые участки мелких сосудов и области микроциркуляции. Эластичность сосудов включается с помощью уравнения состояния стенки, связывающего площадь поперечного сечения сосуда с давлением в нем.

Такой квазиодномерный подход позволяет рассматривать сердечно-сосудистую систему в замкнутом виде. Этот подход может с успехом применяться при исследовании распространения пульсовых волн, при определении скоростей распространения концентрации лекарственных веществ и др. В рамках такого подхода возможно детальное рассмотрение структуры сосудов определенных областей. Была построена замкнутая модель, включающая большой и малый круги кровообращения с учетом газообмена в легких [51]. Показано, как эта модель позволяет проанализировать влияние низкочастотных воздействий на кровоток и концентрацию кислорода в крови.

В большинстве квазиодномерных моделей артерии и вены имеют сходное описание и отличаются лишь геометрическими и эластичными свойствами, либо венозная часть исключается из рассмотрения. В некоторых случаях венозный отдел играет важную роль [52, 53]. Венозные клапаны и гравитация оказывают существенное влияние на кровоток. При ходьбе и беге дополнительное влияние оказывает мышечный насос — мышцы сдавливают вены и проталкивают кровь обратно к сердцу, а венозные клапаны препятствуют обратному кровотоку во время мышечного расслабления. Была предложена модель, позволяющая рассчитывать кровоток через вены нижних конечностей при различной частоте шагов при ходьбе или беге [50, 54]. Показано, что при определенной оптимальной для данного роста и уровня физической подготовки частоте кровоток достигает максимума и эти величины находятся в хорошем соответствии с данными для спортсменов мирового уровня.

Регуляторные механизмы сердечно-сосудистой системы также могут оказывать существенное влияние на кровоток при нестационарных режимах. Учет нейрорегуляторных механизмов позволяет отслеживать изменение частоты сердца [55] и сердечного выброса при скачках давления и смене положения тела, а также при физической нагрузке. Другим важным регуляторным механизмом является ауторегуляция сосудов. Была предложена математическая модель, учитывающая многослойное строение артериальной стенки, протекающие в ней диффузионно-кинетические процессы и их связь с нелинейными вязкоупругими свойствами материала стенки, обусловленного способностью гладкомышечных клеток сжиматься или расслабляться в зависимости от среднего за сердечный цикл давления в сосуде [56]. С помощью предложенной модели найдены точные стационарные распределения концентраций оксида азота, кальция и миозина в стенке артерии. На основе этой работы был предложен метод моделирования сосудистой ауторегуляции для каждого сосуда в квазиодномерной модели [50]. С механической точки зрения эластичность стенок оказывается пропорциональной среднему за сердечный цикл давлению в сосуде.

Несмотря на большое количество упрощений и допущений при построении математических моделей, вычислительные эксперименты при адаптации модели под конкретного человека дают не только качественные, но и достаточно точные количественные результаты [19, 49, 50].

Идентификация математической модели с учетом индивидуальных особенностей конкретного пациента является одной из основных проблем при моделировании сердечно-сосудистой системы. Эта

проблема на сегодняшний день не имеет окончательного решения. Прогресс на этом пути может быть достигнут только при тесном взаимодействии физиологов, врачей и математиков.

Методы получения данных, необходимых для настройки математической модели и проведения вычислительных экспериментов, весьма разнообразны: компьютерная томография и ангиография дают представление о топологии и геометрических характеристиках (длины, диаметры, пространственное расположение); ультразвуковая допплерография позволяет получить представление о скоростном режиме в различных участках сосудистого русла. Данные об эластичности сосудов и гидродинамическом сопротивлении кровотоку не могут быть получены путем стандартных клинических исследований. Настройка этих параметров производится путем восстановления поля скоростей, известного после ультразвукового картирования.

Автоматическая настройка моделей связана с необходимостью использования алгоритмов распознавания изображений. Был предложен алгоритм на основе фильтра Габора, позволяющий с высокой точностью идентифицировать отдельные сосуды на снимках сетчатки глаза, что делает его пригодным для диагностики ретинопатии [57]. Такого рода методы могут использоваться сами по себе. Например, была предложена классификация геометрии бифуркации сонной артерии на основе данных пятидесяти пациентов [58, 60].

Тем не менее, современный уровень диагностики не позволяет получить данные о структуре сосудистого русла целиком. В лучшем случае с помощью компьютерной томографии возможно получение in vivo лишь структуры сосудов верхней или нижней части тела (от сердца). В некоторых работах [23] производится сопряжение таких данных, полученных от разных пациентов с предварительным масштабированием сети с учетом общих морфометрических характеристик (рост, вес). Ясно, что такая методика не дает полностью адекватного представления о структуре сосудистого русла конкретного пациента. Это, однако, требуется не всегда. Как правило, в прикладной задаче существует область интереса (ткань, орган или его часть), сосудистое русло которой должно быть настроено с высокой степенью точности, в то время как остальная часть должна лишь отражать общие физиологические закономерности. Указанный выше метод является одним из способов решения данной проблемы. Другой метод состоит в моделировании структуры сосудистой сети на основе ее топологических свойств (например, фрактальные модели, предполагающие самоподобность [60]) или предположений о функциональной оптимальности [61–63].

Вычислительный эксперимент при моделировании патологий сердечно-сосудистой системы

Несмотря на большое количество допущений и предположений, накладываемых при выводе математических моделей, с их помощью удается проводить вычислительные эксперименты, результаты которых являются не только физиологически корректными, но и позволяют систематизировать накопленный практический опыт и разрабатывать новые стратегии и методы лечения.

Были предложены методы моделирования трехмерного течения крови в артерио-венозных мальформациях головного мозга, в том числе до, во время и после процедуры их эмболизации [64, 65]. Такие вычислительные эксперименты позволяют определить необходимую вязкость эмболизата, оптимальное количество и наиболее эффективные области его введения, проанализировать влияние различных сценариев на церебральный кровоток после процедуры.

Эффективное лечение сосудистых аневризм требует оценки распределения давлений и потоков крови после курса лечения. С этой целью используется численное моделирование области аневризмы до, непосредственно и спустя некоторое время после проведения процедуры по установке стента [66]. Следует отметить, что эта проблема является достаточно популярной в вычислительной физиологии. Однако, большинство современных моделей, как правило, основаны на предположении о неподвижности стенок аневризмы и не рассматривают влияние окружающих тканей, что может быть существенным.

Одним из ярких примеров демонстрирующих продуктивное использование вычислительного эксперимента в медицине является моделирование установки артериовенозного шунта, необходимого при гемодиализе. Была построена модель распространения пульсовых волн с использованием электромеханических аналогий, которая затем используется для выбора оптимального местоположения шунта [67]. В качестве критерия оценки был выбран поток через плечевую артерию после операции. Были проведены вычислительные эксперименты, анализирующие нескольких вариантов расположения шунта для различных пациентов, на основе которых была выработана стратегия выбора оптимального положения шунта.

Другой яркий пример использования вычислительных моделей связан с атеросклерозом и его лечением. Атеросклероз является одним из наиболее распространенных сердечно-сосудистых заболеваний. Исследование процессов формирования атеросклеротических бляшек, устойчивости к разрыву их фиброзного покрова и непосредственное влияние на гемодинамику является предметом многих численных моделей [68–73]. Был описан метод, позволяющий получить трехмерную модель коронарных артерий, пораженных атеросклерозом [70]. Для построения модели использовались данные, полученные благодаря компьютерной томографии (КТ) и внутрисосудистого ультразвукового исследования (ВСУЗИ) трех пациентов. В работе предложен алгоритм, позволяющий моделировать геометрию и состояние сосудов после удаления атеросклеротических бляшек. Данный алгоритм позволяет предсказать величину поперечного сечения в ключевых точках сосудов и получить оценку давлений и скоростей после предполагаемой операции. Предсказанные с помощью модели значения были сопоставлены с измеренными величинами после реальной операции. Отклонение составило менее 15 %. Также, на основе разработанного алгоритма был предложен метод, позволяющий с помощью анализа полей давлений и скоростей предсказать области сосудов, подверженные возникновению бляшек.

Одной из основных трудностей при лечении атеросклероза является диагностика и локализация пораженного сосуда, что требует рентгеновских или ультразвуковых исследований. Вычислительные модели позволяют сгенерировать структуру сосудов, соответствующую характеристикам определенного пациента, а затем рассчитать несколько вариантов месторасположения атеросклеротической бляшки [71]. Пораженный сосуд при этом представляется как эластичная трубка с зауженным просветом и повышенной жесткостью стенки [73]. Каждый вычислительный эксперимент дает свою картину скоростей и давлений, которые будут зависеть от месторасположения больного сосуда и степени его поражения. Анализ расчетных данных позволяет локализовать атеросклеротическую бляшку на основе нескольких измерений давления или скорости кровотока у пациента.

Широко распространенной прикладной задачей является моделирование установки стентов различной конфигурации и выбора области установки. С помощью вычислительного эксперимента становится возможным подобрать оптимальную форму стента и рассчитать напряжения, действующие на него после имплантации в сосуд [74]. Это позволяет существенно увеличить эффект от лечения и снизить риски неудачной имплантации.

Другим примером внутрисосудистых имплантатов являются кава фильтры. Их установка до сих пор связана с различными негативными последствиями, что, несомненно, требует предварительного вычислительного анализа. В силу своего строения кава фильтры растягивают стенки вены в области установки, что сказывается на ее эластических свойствах. Были выполнены моделирование этого эффекта в рамках замкнутой одномерной модели кровотока [33, 75] и детальный трехмерный анализ кровотока в области кава фильтра с захваченным тромбом [33, 76, 77].

Существенная часть современных исследований гемодинамики посвящена изучению процессов активации, роста тромбов, их отрыва от стенки и дальнейшего распространения и роста в потоке. В этой связи получен ряд важных результатов с помощью вычислительных моделей [78–88].

Обсуждение

Анализ современных работ связанных с моделированием патологий сердечно-сосудистой системы показывает высокую полезность и значимость данной области для задач, стоящих перед клиницистами. Некоторые модели уже нашли свое практическое применение. Большинство еще только идет по этому пути. Основными проблемами при использовании математических моделей и вычислительного эксперимента являются: достаточно большое количество допущений и предположений, связанных с механистическим представлением о физиологических процессах без учета большинства биологических процессов оказывающих существенное влияние на гемодинамику; ограниченные возможности современной диагностики и, как следствие, трудности настройки моделей с учетом индивидуальных особенностей конкретного пациента; трудности, связанные с взаимодействием пользователя с моделями при их настройке и интерпретации результатов, что требует разработки специальных интерактивных аппаратно-программных средств; мультидисциплинароность исследований, требующая высокого уровня знаний в таких областях, как математическое моделирование, физиология и медицина.

Ключевыми фундаментальными проблемами на сегодняшний день являются: создание модели сердца, описывающей его функционирование как совокупность электрофизиологической активности, механических напряжений в стенках и гидродинамики кровотока с учетом их взаимного влияния;

создание комплексных математических моделей, объединяющих наиболее важные для жизнедеятельности системы организма, в том числе кровеносную и дыхательную с учетом физико-механических и регуляторных процессов и технологий идентификации параметров таких моделей с учетом максимального числа индивидуальных особенностей конкретного пациента.

Решение этих задач, несомненно, приведет к существенному прорыву в использовании вычислительного эксперимента для клинической практики в области сердечно-сосудистых патологий.

Благодарности

Авторы благодарят Мясникова А.В. за ряд ценных замечаний и идеологическую поддержку данной работы. Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ 11–01–00855, 11–01–00971 и Гранта Президента РФ для поддержки молодых ученых — кандидатов наук 2719.2012.9.

Литература

1. *Huang W., Shen Z., Fung, Y.C. et. al.* Engineering analysis of biological data: an example of blood pressure over one day // Proceedings of the National Academy of Sciences USA 95. — 1998 — P. 4816–4821.

2. *Marrone A., Polosa A.D., Scioscia G. et al.* Multiscale analysis of blood pressure signal // Physical Review — 1999 — E60 — P. 1088–1091.

3. *Logana K., Balossino R., Migliavacca F. et al*. Multiscale modeling of the cardiovascular system: application to the study of pulmonary and coronary perfusion in the univentricular circulation // J. Biomech. — 2005. — Vol. 38. — P. 1129–1141.

4. *Brunette R. R*. Computer simulation of human blood flow and vascular resistance // Comput. Bio. Med. — 1996. — Vol. 26. — P. 363–369.

5. *Byczkowski J*. A linked pharmacokinetic model and cancer risk assessment for breast-fed infants // J. Drug Info. — 1996. — Vol. 30. — P. 401–412.

6. *Godfrey K*. Compartmental models and their application. — London: Academic Press, 1983.

7. *Olufsen M., Nadi A.* On deriving lumped models for blood flow and pressure in the systemic arteries // Math. biosciences and engineering. — 2004. — Vol. 1. — P. 61–80.

8. *Heidt T., Shim E.B., Kamm R.D., Mark R.G.* Model-based parameter estimation using cardiovascular response to orthostatic stress // Comput. Cardiol. — 2001. — Vol. 28. — P. 337–340.

9. *Carlo D., Nardinocchi P., Pontrelli G. et al.* A heterogeneous approach for modelling blood flow in an arterial segment // Simulation in Biomedicine. — 2003. — Vol. 5. — P. 69–78.

10. *Formaggia L., Nobile F., Quarteroni A. et al.* Multiscale modelling of the circulatory system: a preliminary analysis // Computing and Visualization in Science. — 1999. — Vol. 2. — P. 75–83.

11. *Sherwin S.J., Formaggia L., Peiro J. et al*. Computational modelling of 1D blood flow with variable mechanical properties and its application to the simulation of wave propagation in the human arterial system *// Int. J. Numer Meth. Fl.* — 2003. — Vol. 43, № 6–7. — P. 673–700.

12. *Formaggia L., Quarteroni A., Veneziani A.* The circulatory system: from case studies to mathematical modeling. // Complex Systems in Biomedicine / Ed. by Quarteroni A., Formaggia L., Veneziani A. — Milan: Springer, 2006. — P. 243–287.

13. *Кошелев В.Б., Мухин С.И., Соснин Н.В., и соавт*. Математическое моделирование квази-одномерной гемодинамики. — М: МАКС Пресс, 2010. — С. 15–23.

14. *Абакумов М.В., Гаврилюк К.В., Есикова Н.Б. и соавт*. Математическая модель гемодинамики сердечно-сосудистой системы // Дифференциальные уравнения. — 1997. — Т. 33, № 7. — С. 892–898.

15. *Абакумов М.В., Ашметков И.В., Есикова Н.Б. и соавт*. Методика математического моделирования сердечно-сосудистой системы // *Матем. моделирование.* — 2000. — Т. 12. — С. 106–117.

16. *Григорян С.С., Саакян Ю.З., Цатурян А.К.* К теории метода Короткова // Биомеханика — София, 1987 — С. 15–16.

17. *Evdokimov A.V., Kholodov A.S.* Pseudo-steady spatially distributed model of human circulation // Computational Models and Medical Progress / Ed. by Belotserkovsky O.M., Kholodov A.S. — Moscow: Nauka, 2001 — P. 164–193 [in Russian].

18. *Simakov S.S., Kholodov A.S., Evdokimov A.V. et al.* Numerical simulations of cardiovascular diseases and global matter transport // Proceedings of the international Conf. / Ed. By S. Ablameyko, et. al. — Minsk: United Institute of Informatics Problems of the NAS of Belarus, 2005. — Vol. 2. — P. 188–192.

19. *Симаков С.С., Холодов А.С., Евдокимов А.В.* Методы расчета глобального кровотока в организме человека с использованием гетерогенных вычислительных моделей // Медицина в зеркале информатики. / Под ред. О.М. Белоцерковский, А.С. Холодов. — М.: Наука, 2008 — С. 124–170.

20. *Chakravarty S., Mandal P. H*. A nonlinear two-dimensional model of blood flow in an overlapping arterial stenosis subjected to body acceleration // Math. Comput. Modeling. — 1996. — Vol. 24. — P. 43–58.

21. *Yakhot A., Grinberg L., Nikitin N.* Modeling rough stenosis by an immersedboundary method // J. Biomech. — 2005. — Vol. 38. — P. 1115–1127.

22. *Peskin C., McQueen D*. Fluid dynamics of the heart and its valves // Case studies in mathematical modeling, ecology, physiology, and cell biology. — New Jersey: Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, 1996. — P. 309–337.

23. *Xiao N., Humphrey J.D., Figueroa C.A.* Multi-scale computational model of three-dimensional hemodynamic within a deformable full-body arterial network. // J. Comput. Phys. — 2013 — Vol. 244 — P. 22–40.

24. *Voltairas P. A., Fotiadis D.I., Massalas C.V. et al.* Anharmonic analysis of arterial blood pressure and flow pulses // J. Biomech. — 2005. — Vol. 38. — P. 1423–1431.

25. *Каро К., Педли Т., Штотер Р. и соавт.* Механика кровообращения. — М.: Мир, 1981. — 624 с.

26. *Olufsen M.* Structured tree outflow condition for blood flow in larger systemic arteries // Am. J. Physiol. — 1999. — Vol. 267. — P. H257–H268.

27. *Pedley T.J.* Mathematical modelling of arterial fluid dynamics // J. of engeneering mathematics. — 2003. — Vol. 47. — P. 419–444.

28. *Van de Vosse F.N.* Mathematical modelling of the cardiovascular system // J. of engeneering mathematics. — 2003. — Vol. 47. — P. 419–444.

29. *Холодов А.С.* Некоторые динамические модели внешнего дыхания и кровообращения с учетом их связности и переноса веществ // Компьютерные модели и прогресс медицины / Под ред. Белоцерковский О.М., Холодов А.С. — М.: Наука, 2001 — С. 127–163.

30. *Simakov S.S., Kholodov A.S., Evdokimov A.V. et al.* Matter transport simulations using 2D model of peripheral circulation coupled with the model of large vessels // Proceedings of II International Conference on Computational Bioengineering. / Ed. by Rodriges H., Cerrolaza M., Doblare M. et al. — Vol. 1. — IST Press, Instituto Superior Tecnico, 2005. — P. 479–490.

31. *Dhadwal A., Wiggs B., Doerschuk C.M., Kamm R.D.* Effects of anatomic variability on blood flow and pressure gradients in the pulmonary capillaries // J. Appl. Physiol. — 1997. — Vol. 83. — P. 1711–1720.

32. *Huang Y., Doerschuk C.M., Kamm R.D.* Computational modeling of RBC and neutrophil transit through the pulmonary capillaries // J. Appl. Physiol. — 2001. — Vol. 98, № 3. — P. 545–546.

33. *Formaggia L., Quarteroni A., Vergara C.* On the physical consistency between three-dimensional and one-dimensional models in haemodynamics // J. Comp. Phys. — 2013 — Vol. 244 — P. 97–112.

34. *Moghadam M.E., Vignon-Clementel I.E., Figliola R. et al.* A modular numerical method for implicit 0D/3D coupling in cardiovascular finite element simulations // J. Comp. Phys. — 2013. — Vol. 244. — P. 63–79.

35. *Vassilevski Y.V., Simakov S.S., Kapranov S.A.* A multi-model approach to intravenous filter optimization // Int. J. Num. Meth. Biomed. Eng. — 2010 — Vol. 26. — P. 915–925.

36. Simakov *S.,* Vassilevsky *Y., Salamatova V.A.V. et al.* Computational multi-model framework for cardiovascular system simulation // Proceedings of the V International Symposium on Modelling of Physiological Blood Flows / Ed. by Manzoni A. — Chia Laguna, Italy, 2005 (11–14 June). — P. 58–59.

37. *Холодов А.С.* Разностные схемы с положительной аппроксимацией для многомерных систем уравнений гиперболического типа на нерегулярных сетках // Рациональное численное моделирование в нелинейной механике / Под ред. Белоцерковский О.М. — М.: Наука, 2001 — С. 49–62.

38. *Холодов А.С.* Сеточно-характеристические численные методы для многомерных задач механики сплошных сред // Вопросы кибернетики — М.: 1987, НСК АН СССР — № 15 — С. 140–163.

39. *Kholodov Ya.A., Kholodov A.S.* A Monotone High-Order Accuracy Scheme for Hyperbolic CFD Problem // The second M.I.T. Conference on Computational Fluid and Solid Mechanics — Cambrige, U.S.A., M.I.T. campus, 2003 (14–17 June).

40. *Белоцерковский О.М., Евдокимов А.В., Лобанов А.И., Петров И.Б., Холодов А.С. Вычислите*льные модели в физиологии человека. // Теоретические и практические аспекты медицинской кибернетики: Материалы научно-практической конференции — М.: ГВКГ им. Бурденко, 2001 — С. 26–28

41. *Холодов А.С.* Numerical Methods for Solving Hyperbolic Equations and Systems // Encyclopedia of Low Temperature Plasmas — Yanus-K, Moscow, 2008 — Vol. VII1, Part 2. — P. 141–174 [in Russian].

42. *Formaggia L., Quarteroni A.* Mathematical Modeling and Numerical Simulation of the Cardiovascular System // Computational Models for the Human Body, Special Volume of Handbook of Numerical Analysis. — 2004 — Vol. 12. — P. 3–127.

43. *Nieuwstadt H.A., Akyildiz A.C., Speelman L.* The influence of axial image resolution on atherosclerotic plaque stress computations // J. Biomech. — 2013 — Vol. 46. — P. 689–695.

44. *Quarteroni A., Veneziani A.* Analysis of a geometrical multiscale model based on the coupling of ODE's and PDE's for blood flow simulations // Multiscale Model Sim. — 2003 — Vol. 1, № 2. — P. 173–195.

45. *Melih Guleren K.* Numerical flow analysis of coronary arteries through concentric and eccentric stenosed geometries // J. Biomech. — 2013. — Vol. 46. — P. 1043–1052.

46. *Borghi A., Wood N.B., Mohiaddin R.H. et al.* 3D geometric reconstruction of thoracic aortic aneurysms // Biomed. Eng. Online. — 2006. — Vol. 5: 59.

47. *Müller L.O., Parés C., Toro E.F.* Well-balanced high-order numerical schemes for one-dimensional blood flow in vessels with varying mechanical properties // J. Comput. Phys. — 2013. — Vol. 242. — P. 53–85.

48. *Mynard J.P., Nithiarasu P.* A 1D arterial blood flow model incorporating ventricular pressure, aortic valve and regional coronary flow using the locally conservative Galerkin (LCG) method // Commun. Numer. Meth. Eng. — 2008. — Vol. 24. — P. 367–417.

49. *Oluffsen M.S., Peskin C.S., Kim W.Y. et al.* Numerical simulation and experimental validation of blood flow in arteries with structured-tree outflow Conditions // Ann. of Biomed. Eng. — 2000. — Vol. 28. — P. 1281–1299.

50. *Simakov S.S., Gamilov T.M., Soe Y.N.* Computational study of blood flow in lower extremities under intense physical load // Russ. J. Numer. Anal. M. — 2013. — Vol. 28, № 5. — P. 485–504.

51. *Simakov S.S., Kholodov A.S.* Computational Study of Oxygen Concentration in Human Blood under Low Frequency Disturbances // Mathematical Models and Computer Simulations. — 2009. — Vol. 1, № 2. — P. 283–295.

52. *Müller L.O.,* Montecinos *G.I.,* Toro *E.F.* Some Issues in Modelling Venous Haemodynamics // Numerical Methods for Hyperbolic Equations: Theory and Applications. An international conference to honour Professor E.F. Toro. (4–8 July, Santiago de Compostela). — 2011. — P. 347–354.

53. *Müller L.O., Toro E.F.* A global multi-scale mathematical model for the human circulation with emphasis on the venous system // Fluid2Bio IP 2013 Conference (24 June-5 July, L'Aquila). — 2013.

54. *Kholodov A.S., Simakov S.S., Soe Y.N. et al.* Computational model of blood flow optimization in lower extremities during intensive exercise // Proceedings of the conference Instabilities and Control of Excitable Networks (25–30 May, Dolgoprudny). — 2012. — P. 77–82.

55. *Кошелев В.Б., Мухин С.И., Соколова Т.В. и соавт.* Математическое моделирование гемодинамики сердечно-сосудистой системы с учетом влияния нейрорегуляции // Матем. моделирование. — 2007. — Т. 19, № 3. — С. 15–28.

56. *Кудряшов Н.А., Чернявский И.Л.* Численное моделирование процесса ауторегуляции в артерии // Изв. РАН. МЖГ. — 2001. — № . 1 — С. 38–56.

57. *Siddalingaswamy P.C., Prabhu K.G.* Automatic detection of multiple oriented blood vessels in retinal images // J. Biomedical Science and Engineering. — 2010. — Vol. 3, № 1. — P. 101–107.

58. *Bijari P.B., Antiga L., Gallo D. et al.* Improved prediction of disturbed flow via hemodynamically-inspired geometric variables // J. Biomech. — 2012. — Vol. 45. — P. 1632–1637.

59. *Zhang Q., Steinman D.A., Friedman M.H.* Use of factor analysis to characterize arterial geometry and predict hemodynamic risk: application to the human carotid bifurcation // J. Biomech. Eng. — 2010. — Vol. 132: 114505.

60. *Kalda J.* Fractal model of blood vessel system // Fractals. — 1993. — Vol. 1. — P. 191–197.

61. *Bukharov I.B., Khanin M.A.* Optimal arterial blood pressure // J. Theor. Biol. — 1991. — Vol. 148. — P. 289–294.

62. *Bukharov I.B., Khanin M.A.* Optimal pulmonary arterial blood pressure // J. Theor. Biol. — 1993. — Vol. 162. — P. 431–445

63. *Bukharov I.B., Khanin M.A.* Optimal structure of microcirculatory bed // J. Theor. Biol. — 1994. — Vol. 169. — P. 431–435

64. *White A.H., Smith F.T.* Computational modelling of the embolization process for the treatment of arteriovenous malformations (AVMs) // Math. Comput. Model. — 2013. — Vol. 57. — P. 1312–1324.

65. *Панарин В.А., Орлов К.Ю., Кривошапкин А.Л. и тд..* Использование гидродинамических расчетов в выборе сценария эмболизации церебральной артериовенозной мальформации с фистульным компонентом // Патологии кровообращения и кардиохирургия. — 2012. — Т. 3. — С. 39–43.

66. *Vorobtsova N.A., Yanchenko A.A., Cherevko A.A. et al.* Modeling of cerebral aneurysm parameters under stent installation // Russ. J. Numer. Anal. M. — Vol. 28, № 5. — P. 505–516.

67. *Huberts W., Bode A.S., Kroon W. et al.* A pulse wave propagation model to support decision-making in vascular access planning in the clinic // Med. Eng Phys — 2012. — Vol. 34. — P. 233–248.

68. El Khatib N., Genieys S., Kazmierczak B. *et al.* Reaction-Diffusion Model of Atherosclerosis Development // J. Math. Biol. — 2012. — Vol. 65, № 2. — P. 349–374.

69. *El Khatib N., Genieys S., Volpert V.* Atherosclerosis initiation modeled as an inflammatory process // Math. Model. Nat. Phen. — 2007. — Vol. 2, № 2. — P. 126–141.

70. *Ryou H.S., Kim S., Kim S.W., Cho S.W.* Construction of healthy arteries using computed tomography and virtual histology intravascular ultrasound // J. Biomech. — 2012. — Vol. 45. — P. 1612–1618.

71. *Vassilevski Y., Simakov S., Salamatova V. et. al.* Blood flow simulation in atherosclerotic vascular network using fiber-spring representation of diseased wall // Math. Model. Nat. Phenom. — 2011. — Vol. 6, № 5. — P. 333–349.

72. *Vassilevski Y., Simakov S., Salamatova Y. et al.* Numerical issues of modelling blood flow in networks of vessels with pathologies // Russ. J. Numer. Anal. M. — 2011. — Vol. 26, № 6. — P. 605–622.

73. *Vassilevski Y., Simakov S., Salamatova Y. et al.* Vessel wall models for simulation of atherosclerotic vascular networks // Math. Model. Nat. Phenom. — 2011. — Vol. 6, № 7. — P. 82–99.

74. *Masoumi E.K.A., Pasini D., Cecere R.* Shape optimization of stress concentration-free lattice for self-expandable Nitinol stent-graft // J. Biomech. — 2012. — Vol. 45. — P. 1028–1035.

75. Ivanov Y.A., Dobroserdova T.K. Mathematical modelling of intravenous filter influence on the blood system haemodymaics // Scientific and Technical Bulletin of St. Petersburg State University of IT, Mechanics and Optics. — 2010. — Vol. 4, № 68 — P. 94–98.

76. *Vassilevski Y.V., Kapranov S.A.* Parallel modeling of blood flow peculiarities in the vicinity of cava filter with captured clot // Math. Mod. — 2005. — Vol. 17, № 11. — P. 3–15.

77. *Dobroserdova T., Olshanskii M.* A finite element solver and energy stable coupling for 3D and 1D fluid models // Comput. Method. Appl. M. — 2013. — Vol.259. — P.166–176.

78. *Гузеватых А.П., Лобанов А.И., Гурия Г.Т.* Математическое моделирование активации внутрисосудистого тромбообразования вследствие развития стеноза // Матем. моделирование — 2000. — Т. 12, № 4. — С. 39–60.

79. *Zarnitsina V.I., Ataullakhanov F.I., Lobanov A.I., Morozova O.L.* Dynamics of spatially nonuniform patterning in the model of blood coagulation // Chaos. — 2001. — Vol. 11, № 1. — P. 57–70.

80. *Гурия Г.Т., Лобанов А.И., Старожилова Т.К..* Моделирование роста оторвавшегося тромба в пристеночном потоке // Компьютерные модели и прогресс медицины / Под ред. Белоцерковский О.М., Холодов А.С. — М.: Наука, 2001 — С. 250–263.

81. *Лобанов А.И., Старожилова Т.К., Зарницына В.И., Атауллаханов Ф.И.* Сравнение двух математических моделей для описания пространственной динамики процесса свертывания крови // Матем. моделирование. — 2003. — Т. 15, № 1. — С. 14–28.

82. *Ataullakhanov F.I., Zarnitsina V.I., Pokhilko A.V. Et al.* Spatio-temporal dynamics of blood coagulation and pattern formation: a theoretical approach // Int. J. Bifurcat. Chaos. — 2002. — Vol. 12, № 9.

83. *Крутикова М.П., Куриленко И.А., Лобанов А.И., Старожилова Т.К.* Двумерные стационарные структуры в математической модели свертывания крови с учетом гипотезы о переключении активности тромбина // Матем. моделирование. — 2004. — Т. 16, № 12. — С. 85–95.

84. *Lobanov A.I., Starozhilova T.K.* The effect of convective flows on blood coagulation processes // Pathophysiol. Haemost. Thromb. — 2005. — Vol. 34, № 2–3, — P. 121–134.

85. *Буравцев В.Н., Лобанов А.И., Украинец А.В.* Математическая модель роста тромбоцитарного тромба // Матем. моделирование. — 2009. — Т. 21, № 3. — С. 109–119.

86. *Лобанов А.И., Куриленко И.А., Украинец А.В.* Автоволновые решения и диссипативные структуры в двух математических моделях динамики свертывания крови // Труды МФТИ. — 2009. — Т. 1, № 4. — С. 34– 51.

87. *Kurilenko I.A., Lobanov A.I., Ukrainets A.V.* Numerical study of the stability of some autowave solutions in a mathematical model of blood clotting // Biophysics. — 2009. — Vol. 54, № 1. — P. 51–57.

88. *Lobanov A.I., Nikolaev A.V., Starozhilova T.K.* Mathematical Model of Fibrin Polymerization // Math. Model. Nat. Phenom. — 2011. — Vol. 6, № 7. — P. 55–69.

ПРИМЕНЕНИЕ ПЕПТИДНОЙ СТРАТЕГИИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

А.О. Шпаков[1], Е.А. Шпакова[2]

[1] ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
[2] ФГБУН «Институт высокомолекулярных соединений» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Александр Олегович Шпаков — доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии; *Елена Александровна Шпакова* — аспирант.

Контактная информация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» Российской академии наук, пр. Тореза, д. 44, Санкт-Петербург, 194223. Тел.: 8 (812) 552–31–17; факс: 8 (812) 552–30–12. E-mail: alex_shpakov@list.ru (Шпаков Александр Олегович).

Резюме

Пептидная стратегия является одним из перспективных путей для разработки селективных регуляторов гормональных сигнальных систем и контролируемых ими физиологических и биохимических функций. Она основана на синтезе пептидов и их производных, структурно соответствующих функционально важным участкам рецепторов и других сигнальных белков. Эти пептиды могут быть использованы в экспериментальной эндокринологии для изучения молекулярных механизмов передачи гормонального сигнала в клетку, а также в медицине и фармакологии для разработки лекарственных препаратов, предназначенных для лечения онкологических, эндокринных, сердечно-сосудистых и других заболеваний. В настоящее время наибольшие успехи достигнуты в разработке пептидов, соответствующих цитоплазматическим петлям сопряженных с G-белками рецепторов (GPCR). Показано, что модифицированные гидрофобными радикалами GPCR-пептиды (пепдуцины) способны подавлять опухолевый ангиогенез, предотвращать артериальный тромбоз, регулировать эндокринные функции. Достижениям и перспективам использования пептидной стратегии в фундаментальной биологии и медицине посвящен настоящий обзор.

Ключевые слова: ангиогенез, артериальный тромбоз, гетеротримерный G-белок, пепдуцин, пептид, гормональная сигнальная система, сопряженный с G-белками рецептор

THE USE OF THE PEPTIDE STRATEGY FOR CREATION OF NEW DRUGS

A.O. Shpakov[1], E.A. Shpakova[2]

[1] I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia
[2] Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, pr. Thorez 44, St Petersburg, 194223. Tel.: 8 (812) 552–31–17; fax: 8 (812) 552–30–12. E-mail: alex_shpakov@list.ru (Alexander O. Shpakov — Dr.Sci.Biol, Head of the Laboratory of Molecular Endocrinology).

Abstract

The peptide strategy is one of the promising ways for developing selective regulators of hormonal signaling systems and physiological and biochemical functions controlled by the systems. The strategy is based on the

УДК.615.014

synthesis of peptides and their derivatives, which structurally correspond to functionally important regions of receptors and other signal proteins. These peptides can be used in experimental endocrinology to study the molecular mechanisms of hormonal signal transduction into the cell, as well as in medicine and pharmacy to develop drugs for treatment of cancer, endocrine, cardiovascular and other diseases. At present the greatest successes were achieved in the development of peptides corresponding to the intracellular loops of G protein-coupled receptors (GPCR). It is shown that GPCR-peptides modified by hydrophobic radicals (pepducins) can inhibit tumor angiogenesis, prevent arterial thrombosis, and regulate the endocrine functions. This review is devoted to the achievements and prospects of the use of the peptide strategy in fundamental biology and medicine.

Key words: angiogenesis, arterial thrombosis, heterotrimeric G-protein, pepducin, peptide, hormonal signaling system, G protein-coupled receptor.

Статья поступила в редакцию 01.11.13, принята к печати 10.11.13.

Введение

Регуляция биохимических и физиологических процессов в организме человека и животных осуществляется с помощью сигнальных молекул — гормонов, ростовых факторов, цитокинов, которые специфично связываются с расположенными на поверхности клеток рецепторами. Далее сигнал через трансдукторные белки и систему вторичных посредников передается к внутриклеточным эффекторам и транскрипционным факторам, которые регулируют генную экспрессию и контролируют жизненно важные клеточные процессы — метаболизм, рост, дифференцирование, движение. Нарушение функционирования гормональных сигнальных систем приводит к широкому спектру эндокринных патологий, онкологических заболеваний, дисфункциям нервной, сердечно-сосудистой, выделительной и других систем организма [1-7]. Вследствие этого изучение молекулярных механизмов действия гормонов и других сигнальных молекул на клетку и поиск подходов для коррекции нарушений в этих механизмах является одной из актуальных проблем современной биологии и медицины. Другая, не менее важная проблема состоит в поиске новых, высоко эффективных регуляторов гормональных сигнальных систем, которые способны селективно взаимодействовать с белками-мишенями, компонентами сигнальных каскадов, что приводит к подавлению или, напротив, к стимуляции их функциональной активности.

Традиционно регуляторами сигнальных систем считают природные гормоны и их синтетические аналоги, которые специфично взаимодействуют с лигандсвязывающим сайтом рецептора. Они широко применяются в медицине и составляют свыше 30 % всех используемых лекарственных препаратов. В последние годы эффективность поиска и разработки гормональных препаратов возросла, чему способствовали успехи в установлении пространственной структуры сопряженных с G-белками рецепторов (GPCR) [8, 9]. В 2012 году за достижения в этой области Роберт Лефковиц и Брайан Кобилка были удостоены Нобелевской премии по химии. Значительный прогресс достигнут и в расшифровке структурно-функциональной организации рецепторов-тирозинкиназ и цитокиновых рецепторов [10–12]. Однако для многих рецепторов по-прежнему отсутствуют лиганды, которые могут быть использованы в медицине, что связано с целым рядом факторов — коротким сроком жизни многих гормонов и их аналогов, их иммуногенностью, развитием резистентности тканей-мишеней к их действию, высокой стоимостью, химической нестабильностью. В полной мере это относится к изучаемым в нашей лаборатории рецепторам гипофизарных гликопротеиновых гормонов — лютеинизирующего (ЛГ), фолликулостимулирующего и тиреотропного (ТТГ), которые участвуют в контроле функций репродуктивной системы и щитовидной железы, а также к релаксиновым рецепторам, через посредство которых пептидный гормон релаксин регулирует функции сосудов и их гемодинамические параметры во время беременности [13].

Существенным ограничением для использования многих гормональных препаратов являются вызываемые ими побочные эффекты, что, в основном, связано с низкой селективностью их связывания с рецепторами. Однако даже при условии высокой селективности связывания, когда лиганд взаимодействует только с одним или с несколькими функционально и структурно близкими подтипами рецептора, ответ клетки на гормональное воздействие может заметно отличаться от того, который требуется. Это определяется способностью активированного рецептора взаимодействовать с большим числом трансдукторных и эффекторных белков, что приводит к запуску различных, порой противоположных по конечному эффекту, сигнальных каскадов. Так серотонин и его аналоги активируют 18 подтипов серотониновых рецепторов (СР), локализованных

в различных органах и тканях и сопряженных с множеством эффекторных и регуляторных белков [14]. Даже селективные агонисты СР, например используемые для лечения мигрени суматриптаны, в терапевтических дозах активируют сразу несколько подтипов рецепторов, что неизбежно ведет к побочным эффектам.

Одним из перспективных путей для разработки высоко селективных регуляторов гормональных сигнальных систем, которые обладают направленным действием и лишены многих побочных эффектов, характерных для гормонов и их аналогов, является использование нового, интенсивно развивающегося направления в молекулярной эндокринологии — пептидной стратегии [15–18]. В ее основе лежит синтез пептидов, которые по первичной структуре соответствуют функционально важным участкам сигнальных белков, в первую очередь GPCR. Эти пептиды влияют на функциональную активность гомологичных им сигнальных белков, на их взаимодействие с другими компонентами гормональных сигнальных систем, и регулируют, таким образом, процесс передачи гормонального сигнала в клетку. Поскольку действие пептидов осуществляется в отношении определенных сайтов и участков сигнальных белков, то их воздействие носит точечный характер, что открывает перспективы для избирательного контроля биохимических функций.

Пептиды, производные цитоплазматических петель GPCR

Наиболее впечатляющие успехи в области пептидной стратегии достигнуты при разработке и изучении пептидов, соответствующим функционально важным участкам GPCR. Эти рецепторы являются сенсорами в большинстве гормональных сигнальных систем. Связывание GPCR с гормонами приводит к активации гетеротримерных G-белков и эффекторов, представленных ферментами-генераторами вторичных посредников, такими как аденилатциклаза, фосфолипаза С и фосфатидилинозитол-3-киназа, и ионными каналами, которые в сотни и тысячи раз усиливают первоначальный сигнал и формируют адекватный ответ клетки на гормональное воздействие. GPCR имеют семь пронизывающих плазматическую мембрану гидрофобных участков, внеклеточный N-концевой домен и три внеклеточные петли, ответственные за узнавание и специфическое связывание лиганда, а также три цитоплазматические петли (ЦП) и внутриклеточный С-концевой домен, которые взаимодействуют с G-белками, аррестинами и другими регуляторными и адаптерными белками. Связывание с гормоном приводит к изменению конформации взаимодействующих с G-белками цитоплазматических участков рецептора, что вызывает активацию G-белка. Участки рецептора, взаимодействующие с G-белками, сравнительно небольшие и обычно включают от десяти до двадцати аминокислотных остатков.

В начале 1990-х годов было установлено, что синтетические пептиды, соответствующие ЦП β-адренергических рецепторов, влияют на передачу через них гормонального сигнала и в отсутствие гормона активируют сопряженные с рецепторами сигнальные каскады [19, 20]. Однако наибольший прогресс в создании и практическом использовании GPCR-пептидов, которые селективно регулируют гормональные сигнальные системы в условиях in vitro и in vivo, был достигнут только в последние годы. Отправной точкой стали работы американских ученых из Бостонского Института молекулярной кардиологии, выполненные под руководством Атана Кулиопулоса и опубликованные в 2002 году [21, 22]. Было обнаружено, что модификация GPCR-пептидов гидрофобными радикалами, имитирующими трансмембранные участки рецептора, в значительной степени повышает их биологическую активность и наделяет такие пептиды способностью проникать через плазматическую мембрану и взаимодействовать с внутриклеточными белками-мишенями. Это открыло широкие перспективы для создания на основе модифицированных гидрофобными радикалами GPCR-пептидов, названных пепдуцинами, нового поколения лекарственных препаратов.

В пользу необходимости модифицировать GPCR-пептиды гидрофобными радикалами свидетельствуют результаты наших исследований по изучению модифицированных гидрофобными радикалами пептидов, производных С-концевых участков третьей ЦП релаксинового рецептора 1-го типа, СР 6-го типа и рецепторов ЛГ и ТТГ [23-29]. Присоединение к лизину, расположенному на С-конце этих пептидов, гидрофобного остатка пальмитиновой кислоты многократно усиливало стимуляцию модифицированными пептидами сопряженных с рецепторами G-белков и фермента аденилатциклазы. Повышалась не только эффективность, но и селективность действия модифицированных пептидов — они действовали только на гомологичные им рецепторы, и были активны только в тех тканях, где имеются эти рецепторы. Так модифицированный пальмитатом пептид, соответствующий участку 612–627 рецептора ТТГ, активировал аденилатциклазу и G-белки стимулирующего типа в тканях щитовидной железы, где присутствует гомологичный рецептор, но не влиял

на компоненты аденилатциклазной сигнальной системы в других тканях. Пептид 612–627(Pal) ослаблял регуляторные эффекты ТТГ на G-белки и аденилатциклазу, осуществляемые через рецептор ТТГ, но не оказывал влияния на эффекты других гормонов [28, 29].

Гидрофобные радикалы в молекулах синтезированных нами пепдуцинов по локализации соответствовали шестому трансмембранному участку рецептора. Мы предположили, что такая модификация стабилизирует биологически активную конформацию пептида, как это происходит в полноразмерном рецепторе. Для доказательства этого нами были изучены пептиды, соответствующие С-концевому участку 562–572 третьей ЦП рецептора ЛГ, модифицированные различными по длине и локализации гидрофобными радикалами. Присоединение таких радикалов с N-конца пептида, который в рецепторе граничит с гидрофильными участками третьей ЦП, а также уменьшение длины радикала приводили к снижению или полной потере пептидом биологической активности [30]. Таким образом, нами был сделан вывод, что гидрофобный радикал выполняет несколько функций — стабилизирует биологически активную конформацию пептида, заякоривает его в мембране вблизи белков, мишеней действия пептида, и обеспечивает эффективный транспорт пептида внутрь клетки.

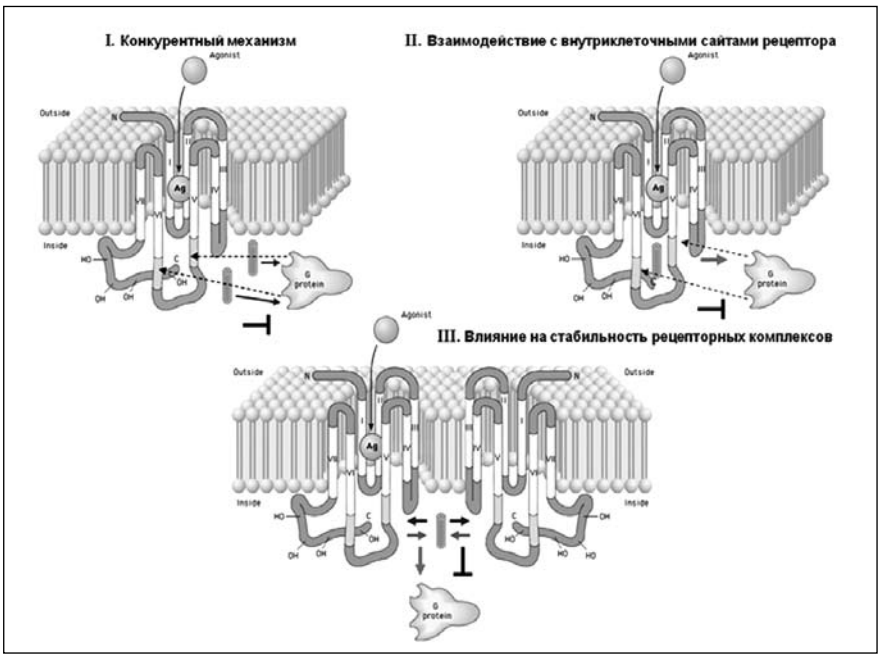
Еще один подход, который позволяет повысить активность GPCR-пептидов, состоит в создании на их основе циклических и димерных конструктов. Группой Гранье в 2004 году был синтезирован циклический пептид, соответствующий третьей ЦП вазопрессинового рецептора 2-го типа, который обладал высокой активностью и имел пространственную структуру, сходную с таковой соответствующего ему участка в вазопрессиновом рецепторе [31]. Нами были синтезированы димерные конструкты пептидов, соответствующих третьей ЦП СР 6-го типа и рецептора ЛГ, которые превосходили по активности мономерные формы пептидов [25, 26]. Однако димеры, как и мономеры, обладали сравнительно низкой способностью проникать через мембрану, даже в том случае, когда содержали значительное число положительно заряженных аминокислот, облегчающих мембранный транспорт. Это ограничивает возможности использования димерных пептидов для разработки лекарственных препаратов. Для решения этой проблемы нами и другими авторами разрабатываются подходы для модификации пептидов мембранно-активными последовательностями, например, поликатионными фрагментами, что в перспективе позволит обеспечить эффективный транспорт через мембрану димерных и олигомерных форм GPCR-пептидов [17, 18, 32]. Следует также отметить, что димерные и олигомерные конструкты GPCR-пептидов могут быть использованы для установления пространственной структуры гидрофильных участков ЦП рецепторов, что до сих пор является одной из наиболее трудноразрешимых задач структурной биологии.

Основываясь на результатах, полученных при изучении GPCR-пептидов, нами предложены три возможные модели их взаимодействия с рецептором и G-белками (рис. 1). Первая модель реализуется в основном для GPCR-пептидов, обогащенных поликатионными мотивами, и состоит в прямом их взаимодействии с отрицательно заряженным С-концевым участком α-субъединицы G-белка. В этом случае действие пептида является низко специфичным, что наблюдалось нами для поликатионных GPCR-пептидов. Следует отметить, что в соответствии с этой моделью действуют поликатионные токсины, такие как мастопаран и мелиттин, компоненты яда пчел и шершней, а также ряд положительно заряженных пептидных аутоиндукторов бактериального происхождения [32, 33].

Вторая модель реализуется для большинства GPCR-пептидов и их производных, модифицированных гидрофобными радикалами. В ее основе способность пептида проникать в цитоплазматический вход трансмембранного канала рецептора и взаимодействовать с комплементарными ему цитоплазматическими участками, что приводит к изменению конформации этих участков и селективной активации G-белка [17, 34, 35]. В этом случае для проявления GPCR-пептидом биологической активности ему требуется взаимодействие с молекулой гомологичного рецептора, что и определяет выявленную нами и другими авторами рецепторную и тканевую специфичность действия GPCR-пептидов. В отсутствие гомологичного рецептора GPCR-пептид либо вовсе не действует на сигнальные каскады, либо осуществляет свое действие не специфично.

Третья модель, фактически, является вариантом второй модели (рис. 1). Известно, что большинство GPCR в функционально активном состоянии образуют димерные и олигомерные комплексы. В формировании таких комплексов ключевую роль играют цитоплазматические участки третьей ЦП и С-концевого домена рецептора. Получены данные о том, что GPCR-пептиды, соответствующие этим участкам в одной субъединице рецепторного комплекса, специфично взаимодействуют с комплементарными им участками другой субъединицы, что приводит к снижению стабильности GPCR-комплекса и изме-

Рисунок 1. Молекулярные механизмы взаимодействия пептидов, производных цитоплазматических петель GPCR, с молекулами гомологичных им рецепторов и □-субъединицами G-белков



нению его функциональной активности [31, 36–38]. Нами показано, что пептид, производный третьей ЦП соматостатинового рецептора (СомР) 2-го типа, повышает активность СомР 1-го типа, но слабо влияет на гомологичный ему СомР 2-го типа [39, 40]. Возможной причиной этого является способность СомР образовывать множество гомо- и гетеродимеров, в составе которых активность рецепторов меняется [38]. В частности, активность СомР 1-го типа в составе гетеродимерного комплекса с СомР 2-го типа сильно снижена, в то время как диссоциация такого комплекса, которую, как мы полагаем, и вызывает изученный нами пептид, приводит к активации СомР 1-го типа. В этом случае GPCR-пептид функционирует, как внутриклеточный агонист.

Пепдуцины, как прототипы лекарственных препаратов

Наиболее важной с практической точки зрения является способность пепдуцинов регулировать биохимические и физиологические процессы in vivo. Исследования в этом направлении только начинаются, но уже достигнуты впечатляющие результаты [17, 34, 35, 41].

Как известно, одной из основных причин инфаркта миокарда и ишемического инсульта является артериальный тромбоз, возникающий вследствие активации тромбоцитов тромбином. Тромбоциты налипают на поврежденные кровеносные сосуды, агрегируют между собой и вызывают выработку тромбина. Свое действие тромбин осуществляет через активируемые протеазами рецепторы (PAR) 1-го и 4-го типов, блокирование которых предотвращает артериальный тромбоз и другие сосудистые патологии, вызванные агрегацией тромбоцитов. В начале 2000-х годов было показано, что пепдуцин P4pal-i1, соответствующей первой ЦП PAR 4-го типа, блокирует эффекты тромбина и селективных агонистов PAR 4-го типа и предотвращает вызываемые ими агрегацию тромбоцитов и окклюзию сонной артерии у экспериментальных животных. Совместное его применение с тромболитиком бивалирудином повышало эффективность действия обоих препаратов и полностью предотвращало развитие артериального тромбоза даже при действии высоких концентраций тромбина [42, 43]. В 2012 году группой Кулиопулоса на основе пепдуцина P1pal-7, производного третьей ЦП PAR 1-го типа, был разработан препарат PZ-128, который с высокой интенсивностью подавлял вызванную тромбином и другими агентами агрегацию тромбоцитов и артериальный тромбоз у морских свинок и обезьян [44]. Лечение им в течение суток полностью восстанавливало функции тромбоцитов. Во время клинических испытаний PZ-128 не было выявлено никаких побочных эффектов — у пациентов с чрескожным коронарным вмешательством он не влиял на кровотечение и показатели свертывания крови. На основании этого был сделан вывод о том, что PZ-128 может стать хорошей альтернативой применяемым в настоящее время низкомолекулярным антагонистам PAR 1-го типа при лечении артериальных тромбозов.

Еще одной областью применения пепдуцинов является использование их для подавления опухо-

левого ангиогенеза — прорастания ткани опухоли кровеносными сосудами, что приводит к угнетению опухолевого роста и метастазирования. Установлено, что процесс опухолевого ангиогенеза усиливается при активации PAR 1-го типа, вследствие чего антагонисты этого рецептора могут рассматриваться как противоопухолевые препараты. Недавно было показано, что препарат PZ-128 подавляет рост клеток рака молочной железы, яичников и легких, в значительной степени снижает выживаемость опухолей [45–47]. Метастазирование рака молочной железы при этом снижается на 88 %, а при совместном применении PZ-128 с противоопухолевым препаратом Taxotere блокируется полностью [46]. Лечение мышей с карциномой яичников препаратом PZ-128 в течение 6 недель (доза 3 мг/кг) на 84–96 % снижало плотность кровеносных сосудов в опухоли и приводило к значительному ухудшению выживаемости раковых клеток [45]. Пепдуцин X1/2pal-i3, производный первой ЦП хемокинового CXCR1/2-рецептора, оказался сопоставимым по активности с бевацизумабом, одним из наиболее эффективных противоопухолевых препаратов. Трехнедельное лечение пепдуцином X1/2pal-i3 мышей с карциномой яичников в 5 раз снижало интенсивность ангиогенеза в опухоли и приводило к ее деградации [48]. Недавно были синтезированы и изучены пепдуцины, производные первой и третьей ЦП хемокинового CXCR4-рецептора, которые подавляли рост и метастазирование лимфом и лимфоцитарного лейкоза. В сочетании с другими противоопухолевыми препаратами, например ретуксимабом, их противоопухолевое действие усиливалось [49]. Таким образом, пепдуцины, производные PAR и хемокиновых рецепторов, характеризуются выраженной противоопухолевой активностью, в основе чего лежат вызываемые ими усиление апоптоза раковых клеток, нарушение их агрегации и хемотаксиса, подавление прорастания опухоли кровеносными сосудами. По эффективности пепдуцины сопоставимы и даже превосходят применяемые в настоящее время противоопухолевые препараты, которые используются для лечения рака молочной железы, яичников и легких, лимфоцитарных лейкозов, других онкологических заболеваний. Важно, что с помощью пепдуцинов удалось расшифровать ранее неизвестные механизмы онкогенеза и метастазирования, доказать вовлеченность в них PAR 1-го типа и ряда хемокиновых рецепторов, что открывает новые возможности для контроля и лечения злокачественных опухолей [50].

Мы сконцентрировали свое внимание на применении пепдуцинов, как селективных регуляторов гормонального статуса организма. Было установлено, что пепдуцин 612–627(Pal), производный третьей ЦП рецептора ТТГ, при интраназальном его введении крысам в дозе 450 мкг/кг достоверно повышает уровень общего и свободного тироксина. Стимулирующий эффект пепдуцина на выработку тиреоидных гормонов был сходным с таковым тиролиберина, рилизинг-фактора ТТГ. В то же время, в отличие от тиролиберина, пепдуцин не вызывал повышения уровня ТТГ, обладающего высоким онкогенным потенциалом [28]. Пепдуцин 612–627(Pal) обладал отчетливо выраженной активностью и при подкожном введении крысам, причем его действие в этом случае выявлялось через два часа после введения, в то время как при интраназальном способе доставки препарата максимальный эффект достигался через сутки. В настоящее время проводятся биологические испытания пальмитоилированного пептида 562–572 рецептора ЛГ. Показано, что введение этого пепдуцина подкожно самцам крыс вызывает у них достоверное повышение уровня тестостерона.

Пептиды, производных G-белков и эффекторов

Исследований по применению пептидной стратегии для изучения и регуляции гетеротримерных G-белков, рецепторных белков, наделенных ферментативной активностью, и эффекторов, генерирующих вторичные посредники, заметно меньше, чем в случае GPCR. Однако в настоящее время имеется достаточно свидетельств того, что пептиды, производные этих сигнальных белков, также могут быть применены для расшифровки их структурно-функциональной организации и молекулярных механизмов действия, для идентификации участков взаимодействия между сигнальными белками и создания высоко селективных регуляторов, действующих на пострецепторных этапах передачи гормонального сигнала [15, 18, 51].

Так многие сигнальные белки, например рецепторные тирозинкиназы и фосфотирозинпротеинфосфатазы, содержат большое число сайтов взаимодействия с белками-партнерами. С помощью синтетических пептидов, структурно соответствующих этим сайтам, были разработаны принципиально новые подходы для количественной и функциональной протеомики и пептидомики, что позволило установить функции каждого такого сайта и те белки, с которыми они взаимодействуют. Исчерпывающее картирование сайтов проведено для рецептора эпидермального фактора роста и родственных ему рецепторов ErbB-семейства. Были синтезированы 94 пептида, содержащие сайты для фосфорилирования по остаткам тирозина рецепторов ErbB-семейства, и с их помощью в молекулах рецепторов был осу-

ществлен скрининг сайтов, ответственных за функциональное взаимодействие с широким спектром сигнальных белков [52]. Многие из сайтов были идентифицированы впервые. Учитывая ключевую роль ErbB-рецепторов в онкогенезе, выяснение молекулярных механизмов их взаимодействия с другими сигнальными белками — один из многообещающих путей разработки новых стратегий для лечения онкологических заболеваний.

Синтезированные нами пептиды, соответствующие С-концевым участкам различных типов α-субъединиц G-белков, были использованы для изучения молекулярных механизмов передачи гормонального сигнала, осуществляемой через GPCR и сопряженные с ними G-белки [53–55]. Применение пептидов, производных α-субъединиц G-белков, позволяет выяснить, какой тип G-белка участвует в исследуемом сигнальном каскаде, поскольку пептид, действуя по конкурентному механизму, блокирует передачу гормонального сигнала, осуществляемую через гомологичный ему G-белок. Комбинируя пептиды можно селективно перекрывать одни сигнальные пути, не затрагивая другие, что обеспечивает избирательную регуляцию внутриклеточных каскадов. В настоящее время нами и другими авторами рассматриваются возможности применения модифицированных гидрофобными радикалами или мембранно-активными последовательностями пептидов, производных α-субъединиц G-белков, для регуляции биохимических и физиологических функций в условиях in vivo.

Перспективы применения пептидной стратегии

Основные перспективы применения пептидной стратегии заключаются в создании на основе синтетических пептидов, соответствующих функционально важным участкам сигнальных белков, прототипов лекарственных форм, которые могут быть использованы для лечения широкого спектра заболеваний. Для этого необходимо таким образом модифицировать структуру пептидов, чтобы они могли проникать через плазматическую мембрану и селективно взаимодействовать с внутриклеточными белками-мишенями. Наиболее перспективным подходом для создания мембранно-активных пептидов является их модификация гидрофобными радикалами, что не только наделяет пептиды способностью проникать через мембрану, но и приводит к повышению их концентрации вблизи белка-мишени. Этот подход успешно апробирован нами и другими авторами для GPCR-пептидов. Однако число высоко эффективных липофильных производных пептидов — пепдуцинов, пока ограничено, что связано с трудностями их синтеза и очистки, а также с их низкой растворимостью в водных растворах, что препятствует их широкому применению в клинической практике. Для решения этих проблем необходима оптимизация первичной структуры пептидов и способов их модификации гидрофобными радикалами, что, однако, не всегда возможно. Хорошей альтернативой модификации гидрофобными радикалами является присоединение к пептидам поликатионных фрагментов и других мембранно-активных последовательностей, а также пришивка пептидов к дендримерным структурам, которые используются в качестве мембранных переносчиков. Такая стратегия уже привела к первым результатам — позволила разработать мембранно-активные пептиды, соответствующие трансмембранным участкам GPCR [56, 57]. Присоединение кластеров положительно заряженных аминокислотных остатков к N- и С-концевым аминокислотам этих GPCR-пептидов приводит к повышению их растворимости в водных растворах, обеспечивает эффективный мембранный транспорт и правильное расположение пептидов в мембране, что позволяет им эффективно взаимодействовать с GPCR.

Полученные результаты показывают, что пепдуцины и другие пептиды, производные сигнальных белков, характеризуются высокой селективностью действия на определенные клеточные мишени. В зависимости от выбранного для синтеза участка сигнального белка, они могут проявлять свойства полных агонистов, частичных агонистов или антагонистов, модулировать активность регуляторных и адаптерных белков, влиять на стабильность олигомерных комплексов. Даже небольшие изменения структуры, как это показано для пепдуцинов, производных активируемых протеазами рецепторов, приводят к изменению их функциональной активности. Все это создает широкие возможности для разработки селективных активаторов, ингибиторов и модуляторов гормональных сигнальных систем на основе пептидов, соответствующих участкам рецепторов и других сигнальных белков.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты № 12–03–31716 и № 12–04–00351).

Литература

1. *Шпаков А.О.* Роль онкогенных G-белков в развитии опухолей эндокринной системы // Вопросы онкологии. — 2001. — Т. 47, № 2. — С. 160–167.

2. *Bunnett N.W., Cottrell G.S.* Trafficking and signaling of G protein-coupled receptors in the nervous system: implications for disease and therapy // CNS Neurol. Disord. Drug Targets. — 2010. — Vol. 9. — P. 539–556.

3. *Gan E.H., Quinton R.* Physiological significance of the rhythmic secretion of hypothalamic and pituitary hormones // Prog. Brain Res. — 2010. — Vol. 181. — P. 111–126.

4. *Sato M., Ishikawa Y.* Accessory proteins for heterotrimeric G-protein: Implication in the cardiovascular system // Pathophysiology. — 2010. — Vol. 17. — P. 89–99.

5. *Шпаков А.О.* Функциональное состояние гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы при сахарном диабете // Проблемы эндокринологии. — 2010. — Т. 56, № 5. — С. 23–29.

6. *Gallagher E.J., LeRoith D.* Minireview: IGF, insulin, and cancer // Endocrinology. — 2011. — Vol. 152. — P. 2546–2551.

7. *Shpakov A.O.* Alterations in hormonal signaling systems in diabetes mellitus: origin, causality and specificity // Endocrinol. Metab. Syndrome. — 2012. — Vol. 1, № 2. — DOI: 2161–1017–1-e106.

8. Granier S., *Kobilka B.* A new era of GPCR structural and chemical biology // Nat. Chem. Biol. — 2012. — Vol. 8. — P. 670–673.

9. *Shoichet B.K* Kobilka B.K. Structure-based drug screening for G-protein-coupled receptors // Trends Pharmacol. Sci. — 2012. — Vol. 33. — P. 268–272.

10. *Lopez A.F., Hercus T.R., Ekert P. et al.* Molecular basis of cytokine receptor activation // IUBMB Life. — 2010. — Vol. 62. — P. 509–518.

11. *Valiathan R.R., Marco M., Leitinger B. et al.* Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression // Cancer Metastasis Rev. — 2012. — Vol. 31. — P. 295–321.

12. *Warnault P., Yasri A., Coisy-Quivy M. et al.* Recent advances in drug design of epidermal growth factor receptor inhibitors // Curr. Med. Chem. — 2013. — Vol. 20. — P. 2043–2067.

13. *Шпаков А.О.* Структурно-функциональная организация рецепторов полипептидных гормонов, содержащих LRR-повторы, и их взаимодействие с гетеротримерными G-белками // Цитология. — 2009. — Т. 51, № 8. — С. 637–649.

14. *Шпаков А.О.* Структурно-функциональная характеристика нейрональных серотониновых рецепторов и молекулярные механизмы их функционального сопряжения с G-белками // Нейрохимия. — 2009. — Т. 26, № 1. — С. 5–18.

15. *Shpakov A.O., Pertseva M.N.* The peptide strategy as a novel approach to the study of G protein-coupled signaling systems // In «Signal Transduction Research Trends» (Ed. N.O. Grachevsky). — Nova Science Publishers Inc, 2007. — P. 45–93.

16. *Шпаков А.О.* Регуляторы гормональных систем на основе пептидов, производных рецепторов // Рос. Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. — 2010. — Т. 96, № 12. — С. 1139–1155.

17. *Shpakov A.O.* GPCR-based peptides: structure, mechanisms of action and application // Global J. Biochem. — 2011. — Vol. 2, № 2. — P. 96–123.

18. *Shpakov A.O.* Signal protein-derived peptides as functional probes and regulators of intracellular signaling // J. Amino Acids. — 2011. — Vol. 2011. — DOI:10.4061/2011/656051.

19. *Palm D., Munch G., Dees C., Heckman M.* Mapping of □-adrenoreceptor coupling domains to G_s-protein by site-specific synthetic peptides // FEBS Lett. — 1989. — Vol. 254. — P. 89–93.

20. *Konig B., Gratzel M.* Site of dopamine D1 receptor binding to G_s protein mapping with synthetic peptides // Biochim. Biophys. Acta. — 1994. — Vol. 1223. — P. 261–266.

21. *Covic L., Gresser A.L., Talavera J. et al.* Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Vol. 99. — P. 643–648.

22. *Covic L., Misra M., Badar J. et al.* Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation // Nat. Med. — 2002. — Vol. 8. — P. 1161–1165.

23. *Шпаков А.О., Перцева М.Н., Гурьянов И.А., Власов Г.П.* Влияние пептидов, производных третьей цитоплазматической петли релаксинового рецептора 1 типа, на стимуляцию релаксином GTP-связывающей активности G-белков // Биол. мембраны. — 2005. — Т. 22, № 6. — С. 435–442.

24. *Shpakov A.O., Gur'yanov I.A., Kuznetsova L.A. et al.* Studies of the molecular mechanisms of action of relaxin on the adenylyl cyclase signaling system using synthetic peptides derived from the LGR7 relaxin receptor // Neurosci. Behav. Physiol. — 2007. — Vol. 37, № 7. — P. 705–714.

25. *Shpakov A.O., Shpakova E.A., Tarasenko I.I. et al.* The peptides mimicking the third intracellular loop of 5-hydroxytryptamine receptors of the types 1B and 6 selectively activate G proteins and receptor-specifically inhibit serotonin signaling via the adenylyl cyclase system // Int. J. Pept. Res. Ther. — 2010. — Vol. 16. — P. 95–105.

26. *Shpakov A.O., Shpakova E.A., Tarasenko I.I. et al.* The influence of peptides corresponding to the third intracellular loop of luteinizing hormone receptor on basal and hormone-stimulated activity of the adenylyl cyclase signaling system // Global J. Biochem. — 2011. — Vol. 2, № 1. — P. 59–73.

27. *Шпаков А.О., Шпакова Е.А., Тарасенко И.И., Деркач К.В.* Рецепторная и тканевая специфичность действия пептидов, производных цитоплазматических участков рецепторов серпантинного типа // Биол. мембраны. — 2011. — Т. 28, № 6. — С. 453–462.

28. *Шпакова Е.А., Шпаков А.О., Чистякова О.В. и др.* Биологическая активность in vitro и in vivo пептидов, соответствующих третьей цитоплазматической петле рецептора тиреотропина // Доклады Академии наук. — 2012. — Т. 443, № 1. — С. 123–126.

29. *Shpakov A.O., Shpakova E.A., Derkach K.V.* The sensitivity of the adenylyl cyclase system in rat thyroidal and extrathyroidal tissues to peptides corresponding to the third intracellular loop of thyroid-stimulating hormone receptor // Current Topics in Peptide & Protein Research. — 2012. — Vol. 13. — P. 61–73.

30. *Шпакова Е.А., Деркач К.В., Шпаков А.О.* Влияние липофильных производных пептида 562–572 рецептора лютеинизирующего гормона на активность аденилатциклазы в семенниках крыс // Бюл. ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова. — 2013. — Прил. 1. — С. 35.

31. *Granier S., Terrillon S., Pascal R. et al.* A cyclic peptide mimicking the third intracellular loop of the V_2

vasopressin receptor inhibits signaling through its interaction with receptor dimer and G protein // J. Biol. Chem. — 2004. — Vol. 279. — P. 50904–50914.

32. *Shpakov A.O.* Natural and synthetic cationic peptides as regulators of hormone-sensitive signaling systems and molecular mechanisms of their action // Current Topics in Peptide & Protein Research. — 2010. — Vol. 11. — P. 1–30.

33. *Шпаков А.О.* Поликатионные пептиды как негормональные регуляторы сигнальных систем // Журн. эвол. биохим. физиол. — 2009. — Т. 45, № 4. — С. 355–367.

34. *Tressel S.L., Koukos G., Tchernychev B. et al.* Pharmacology, biodistribution, and efficacy of GPCR-based pepducins in disease models // Meth. Mol. Biol. — 2011. — Vol. 683. — P. 259–275.

35. *Miller J., Agarwal A., Devi L.A. et al.* Insider access: pepducin symposium explores a new approach to GPCR modulation // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2009. — Vol. 1180. — P. 1–12.

36. *Kaczor A.A., Selent J.* Oligomerization of G protein-coupled receptors: biochemical and biophysical methods // Curr. Med. Chem. — 2011. — Vol. 18. — P. 4606–4634.

37. *Maggio R., Rocchi C., Scarselli M.* Experimental strategies for studying G protein-coupled receptor homo- and heteromerization with radioligand binding and signal transduction methods // Methods Enzymol. — 2013. — Vol. 521. — P. 295–310.

38. *Шпаков А.О.* Соматостатиновые рецепторы и сопряженные с ними сигнальные каскады // Журн. эвол. биохим. физиол. — 2012. — Т. 48, № 4. — С. 329–341.

39. *Шпакова Е.А., Шпаков А.О.* Пептиды, соответствующие цитоплазматическим участкам соматостатиновых рецепторов, с активностью агонистов и антагонистов // Доклады Академии наук. — 2011. — Т. 437, № 1. — С. 128–131.

40. *Шпаков А.О., Шпакова Е.А.* Разработка негормональных регуляторов аденилатциклазной сигнальной системы на основе пептидов, производных третьей цитоплазматической петли соматостатиновых рецепторов // Биомед. химия. — 2012. — Т. 58, Вып. 4. — С. 446–456.

41. *Covic L., Tchernychev B., Jacques S., Kuliopulos A.* Pharmacology and in vivo efficacy of pepducins in hemostasis and arterial thrombosis // In «Handbook of Cell-Penetrating Peptides». — NY: Taylor & Francis, 2007. — P. 245–257.

42. *Derian C.K., Damiano B.P., Addo M.F. et al.* Blockade of the thrombin protease-activated receptor-1 with a small molecule antagonist prevents thrombus formation and vascular occlusion in nonhuman primates // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 2003. — Vol. 304. — P. 855–861.

43. *Leger A.J., Jacques S.L., Badar J. et al.* Blocking the protease-activated receptor 1-4 heterodimer in platelet-mediated thrombosis // Circulation. — 2006. — Vol. 113. — P. 1244–1245.

44. *Zhang P., Gruber A., Kasuda S. et al.* Suppression of arterial thrombosis without affecting hemostatic parameters with a cell-penetrating PAR1 pepducin // Circulation. — 2012. — Vol. 126. — P. 83–91.

45. *Agarwal A., Covic L., Sevigny L.M. et al.* Targeting a metalloprotease-PAR1 signaling system with cell-penetrating pepducins inhibits angiogenesis, ascites, and progression of ovarian cancer // Mol. Cancer Ther. — 2008. — Vol. 7. — P. 2746–2757.

46. *Yang E., Boire A., Agarwal A. et al.* Blockade of PAR1 signaling with cell-penetrating pepducins inhibit Akt survival pathways in breast cancer cells and suppresses tumor survival and metastasis // Cancer Res. — 2009. — Vol. 69. — P. 6223–6231.

47. *Foley C.J., Luo C., O'Callaghan K. e al.* Matrix metalloprotease-1a promotes tumorigenesis and metastasis // J. Biol. Chem. — 2012. — Vol. 287. — P. 24330–24338.

48. *Agarwal A., Tressel S.L., Kaimal R. et al.* Identification of a metalloprotease-chemokine signaling system in the ovarian cancer microenvironment: implications for antiangiogenic therapy // Cancer Res. — 2010. — Vol. 70. — P. 5880–5890.

49. *O'Callaghan K., Lee L., Nguyen N. et al.* Targeting CXCR4 with cell-penetrating pepducins in lymphoma and lymphocytic leukemia // Blood. — 2012. — Vol. 119. — P. 1717–1725.

50. *Sevigny L.M., Austin K.M., Zhang P. et al.* Protease-activated receptor-2 modulates protease-activated receptor-1-driven neointimal hyperplasia // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2011. — Vol. 31. — P. e100-e106.

51. *Шпаков А.О.* Использование пептидной стратегии для изучения функций и структуры сигнальных белков с ферментативной активностью // Цитология. — 2011. — Т. 53, № 8. — С. 632–643.

52. *Schulze W.X., Deng L., Mann M.* Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family // Mol. Systems Biol. — 2005. — Vol. 2005. — DOI: 10.1038/msb4100012.

53. *Шпаков А.О., Гурьянов И.А., Кузнецова Л.А. и др.* Использование С-концевых пептидов □-субъединиц G-белков для исследования их функционального сопряжения с рецепторами биогенных аминов в тканях крыс и моллюсков // Биол. мембраны. — 2004. — Т. 21, № 6. — С. 441–450.

54. *Shpakov A.O., Shipilov V.N., Bondareva V.M.* Sensitivity of adenylyl cyclase signaling system of the mollusk A. cygnea ganglions to serotonin and adrenergic agonists // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2005. — Vol. 1040. — P. 466–468.

55. *Шпаков А.О., Гурьянов И.А., Власов Г.П., Перцева М.Н.* Молекулярные механизмы взаимодействия поликатионных пептидов с рецепторами серпантинного типа и гетеротримерными G-белками в тканях крыс // Журн. эвол. биохим. физиол. — 2006. — Т. 42, № 4. — С. 321–327.

56. *Thévenin D., Lazarova T.* Stable interactions between the transmembrane domains of the adenosine A_{2A} receptor // Protein Science. — 2008. — Vol. 17. — P. 1188–1199.

57. *Lee W.K., Han J.J., Jin B.S. et al.* Functional reconstitution of the human serotonin receptor 5-HT_6 using synthetic transmembrane peptides // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2009. — Vol. 390. — P. 815–820.

ЛАЗЕРНАЯ МИКРОДИССЕКЦИЯ В ТРАНСЛЯЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

А.В. Карпушев[1], А.В. Ревитцер[1], А.А. Худяков[1], С.В. Ахметзянова[2], Р.И. Дмитриева[1]

[1] ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия
[2] Коми филиал государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Кировская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Сыктывкар, Республика Коми, Россия

Карпушев Алексей Валерьевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник группы клеточной биологии; *Ревитцер Алла Вафеевна* — лаборант-исследователь группы клеточной биологии; *Худяков Александр Александрович* — младший научный сотрудник НИЛ Молекулярной Кардиологии; *Светлана Викторовна Ахметзянова* — старший лаборант; *Дмитриева Рената Игоревна* — кандидат биологических наук, руководитель группы клеточной биологии.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: renata.i.dmitrieva@gmail.com (Дмитриева Рената Игоревна).

Резюме

Захватывающая лазерная микродиссекция (ЛМД) позволяет проводить исследования функциональных свойств различных клеточных популяций гетерогенных тканей. Использование ЛМД может внести неоценимый вклад в понимание биологических процессов, лежащих в основе развития заболевания благодаря возможности детектировать изменения в выбранной клеточной популяции, в том числе выявлять мутации, исследовать эпигенетические изменения, изменение профиля эксмпрессии генов, исследовать протеом. Эти исследования могут быть использованы в клинических протоколах для улучшения диагностики и таргетной терапии, развития персонализированной медицины.

Ключевые слова: захватывающая лазерная микродиссекция, геном, транскриптом, протеом, эпигенетика.

LASER-ASSISTED MICRODISSECTION IN TRANSLATIONALRESEARCH

A.V. Karpushev[1], A.V. Revitser[1], A.A. Khudiakov[1], C.V. Akhmetzanova[2], R.I. Dmitrieva[1]

[1] Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia
[2] Komi branch of «Kirov State Medical Academy», Syktyvkar, Komi Republic, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: renata.i.dmitrieva@gmail.com (Renata I. Dmitrieva — PhD., Head of Cell Biology Group).

Abstract

Laser-capture microdissection (LCM) permits to probe functional physiology within specific cell populations in heterogenous tissue. Its selectivity promises to greatly

improve the diagnosis and management of many human diseases and contribute to the understanding of biology of desease by mutation detection, epigenetic alteration assessment, gene expression profiling, proteomics. These analyses could clinically be used as aids to diagnosis, targeted therapy and personalized medicine.

Key words: laser-capture microdissection, genome characterization, proteomics, transcriptom, epigenetic.

Статья поступила в редакцию 15.11.2013, принята к печати 01.12.13.

УДК.57.085.2

Введение

Для выявления молекулярных механизмов возникновения и развития заболеваний необходимо четкое понимание генетических и эпигенетических нарушений внутри определенных клеточных популяций. Так как механизмы развития большинства заболеваний включают взаимодействие между различными типами клеток, необходим поиск возможностей исследования изменений генома, транскриптома и протеома в выбранной клеточной популяции.

Например, гетерогенность опухолевой ткани, состоящей из клеток разного типа, включая клетки стромы и клетки иммунной системы, является общепризнанной проблемой при анализе опухолевых тканей. Необходимость получить для анализа чистую клеточную популяцию обуславливает поиск различных технических подходов к решению этой задачи, в том числе мануальную микродиссекцию окрашенных препаратов ткани, сортировка на проточном цитометре, получение первичных клеточных культур.

Даже мануальная микродиссекция позволяет свести к минимуму загрязнение образца выбранной клеточной популяции «посторонними» клетками. Преимуществами современной лазерной захватвающей микродиссекции (ЛМД) являются возможности контроля интенсивности и направления действия лазерного «ножа» и возможность выбора малых по площади образцов для вырезания что позволяет выделить из образца действительно чистую клеточную популяцию [1]

Возможность изолировать однородные группы клеток или даже единичные клетки с помощью ЛМД способствует выявлению молекулярных характеристик для конкретных патологических поражений и позволяет исследовать новые диагностические и прогностические маркеры различных заболеваний, используя такие современные аналитические технологии, как полимеразная цепная реакции (ПЦР), ПЦР в реальном времени, анализ микрочипов, и протеомные технологии.

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ЛАЗЕРНОЙ МИКРОДИССЕКЦИИ

Микродиссекция использовалась задолго до изобретения лазерной микродиссекции. Лоури и Пасонье первыми провели процедуру количественного биохимического анализа отдельных видов клеток, вырезанных из лиофилизированных тканевых срезов [2]. Процедура требовала навыков свободного использования диссектирующего микроскопа с применением маленьких лезвий, прикрепленных к гибкому скребку. Ручное выделение из зафиксированной формалином ткани было описано Голезом в 1985 году [3]. Он иссекал области интереса для выделения геномной ДНК без захвата стромальной ткани из парафинового блока под прямым зрительным контролем. В 1976 Мейер-Рудж положил начало изобретения лазерной микродиссекции с захватом, используя примитивный УФ лазер [4]. Этот метод требовал громоздкого оборудования. Однако этот инструмент позволял вырезать клеточные субпопуляции из гетерогенных областей более точно, чем любой другой метод.

Эммет-Бак усовершенствовал лазерную микродиссекцию в 1996 в Национальном Институте Здоровья [5]. Их система быстро стала коммерческим продуктом фирмы Arcturus Engineering (Mountain View, CA) и конкуренты скоро стали производить свое оборудование, используя различные стратегии микродиссекции . Каждая из этих основанных на лазере методов позволяли непосредственно выбирать клетки различных типов прямо из выросшей культуры, без ферментативной обработки.

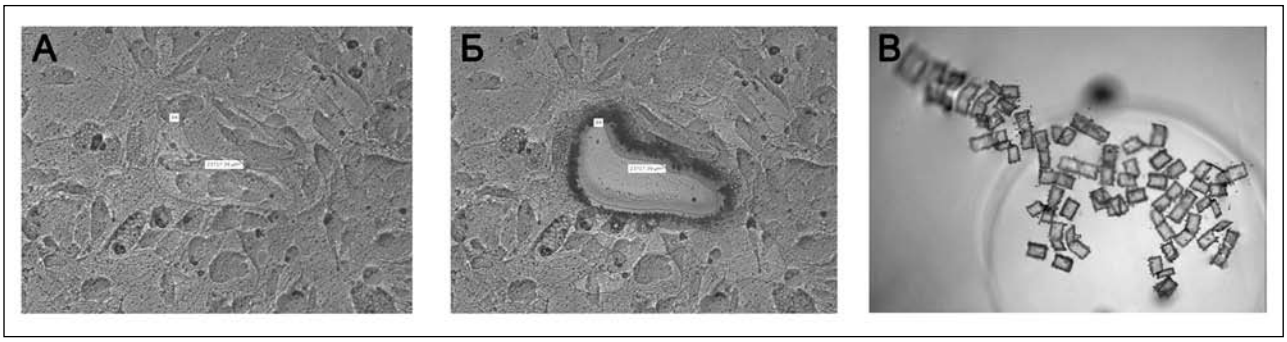
Преимущества и ограничения ЛМД

Наиболее важным преимуществом ЛМД по сравнению с другими методами выделения однородных клеточных популяций являются скорость, точность, универсальность и возможность захвата неповрежденной / немодифицированной клетки [6–8]. Также, технология предоставляет возможность документировать (фотографировать) как захваченные клетки, так и препарат, оставшийся после микродиссекции. Кроме того, клетки разных типов могут быть вырезаны из одного и того же слайда, так как ЛМД не разрушает прилежащие ткани (Рис. 1). ЛМД позволяет выделять клетки, рассеянные среди других клеточных популяций. Образцы, полученные ЛМД могут быть использованы в широком спектре молекулярно-генетических методов диагностики. Кроме того, лазерная система катапультирования является бесконтактной и полученные крупные фрагменты ткани сохраняют морфологию.

Ограничения ЛМД связаны с трудностями, которые определяются оптическим разрешением и дегидратацией препаратов [9].

Иногда бывает невозможно точно выявить нужную популяцию клеток в ткани сложного состава, например, в лимфоидных новообразованиях или при диффузных карциномах [6, 9]. Проблемы такого рода могут быть преодолены путем специальной окраски или иммуногистохимического окрашива-

**Рисунок 1. А. Выделение популяции адипоцитов в смешанной культуре.
Б. Так выглядит слайд после того, как вырезанная область была отстрелена в пробирку для анализа.
В. Так выглядит вырезанный участок в крышке приемника**



ния, при котором окрашивают либо клетки, которые хотят выделить, либо клетки, должны быть изолированы, либо клетки, которых следует избегать.

Также, следует с осторожностью использовать препараты, зафиксированные в формалине и парафиновых блоках: эта процедура может повредить ДНК, РНК и протеины в образце, что может ограничить возможности последующего анализа. Также, возможности последующего анализа, особенно белков, могут быть ограничены небольшими объемами полученных образцов.

Области применения ЛМД

На сегодняшний день ЛМД, по-видимому, является наиболее эффективным инструментом для выделения целевой популяции клеток из гетерогенных тканей.

До недавнего времени главной областью применения лазерной микродиссекции были исследования в области онкологии, однако, ЛМД используют также в судебно-медицинской экспертизе для анализа зафиксированных клеточных образцов и волосяных фолликулов, для исследований в эмбриологии и биологии развития, в исследованиях инфекционных заболеваний, клеточной биологии растений и для количественной оценки сперматогенеза методом ПЦР. В настоящее время технология ЛМД используется в основном для анализа ДНК, РНК, протеинов и микроРНК [1, 6, 10–14].

ЛМД и детекция генетических мутаций

Для детекции мутаций в опухолевой ткани, клетки, подготовленные для анализа должны иметь похожую гистологию и не быть смешаны с клетками иммунной системы и стромальными клетками. Обнаружение и исследование опухолевых мутаций становится все более важным для клинической практики, и здесь ЛМД является незаменимым инструментом, позволяющим получать однородные препараты для выявления генетических изменений, ассоциированных с опухолью. Определенные успехи уже сделаны в этой области. Так, в ходе проекта по исследованию биомаркеров мозга Демут с коллегами [15] проанализировали с использованием клеточной модели транскриптом клеток инвазивной глиомы и их неинвазивных аналогов и выявили белки семейства митоген-активированной протеинкиназы, которые стимулируют инвазивность глиомы и могут быть маркерами неблагоприятного прогноза. Эти результаты также позволяют предположить, что сигнальный путь митоген-активированной протеинкиназы является перспективной мишенью для терапии инвазивной глиомы.

Также, Армстронг с коллегами [16] использовали ЛМД для анализа TP53 мутации в 17 образцах саркоматоидной карциномы уротелия. Для каждого из этих образцов клетки саркоматоидной и эпителиальной опухолей были разделены при помощи ЛМД. В 5 образцах из 17 были обнаружены TP53 точечные мутации в экзонах 5 и 8. В каждом из этих 5 случаев, TP53 точечные мутации были идентичны в эпителиальной и саркоматоидной фракциях. Также, саркоматоидные и эпителиальные компоненты опухоли во всех 17 случаях продемонстрировали согласованную экспрессию p53. Таким образом, авторы убедительно показали, что несмотря на заметные расхождения в фенотипе, оба компонента этой редкой опухоли имеют общий клональный источник [16].

Использование ЛМД в исследовании эпигенетических изменений

В настоящее время признано, что подавление экспрессии генов, вызванное метилированием ДНК, наблюдается на всех стадиях канцерогенеза [17, 18].

Эпигенетическое подавление экспрессии ключевых гены-супрессоров опухолевого роста и белков, отвечающих за репарацию ДНК может приводить к злокачественной трансформации. Аббош с колле-

гами [19] проанализировали состояние метилирования ДНК в 4 часто гиперметилированых генов-супрессоров опухолей в образцах мелкоклеточной карциномы мочевого пузыря и карциномы уротелия у 13 пациентов. Методом ПЦР в реальном времени из было показано гиперметилирование RASSF1 и MGMT и гипометилирование MLH1 и DAPK1 в случаях смешанной и уротелиальноя мелкоклеточной карциномы.

Результаты этого исследования показали, что мелкоклеточная и уротелиальная карциномы имеют общее происхождение и истоки и помогли определить общие закономерности метилирования ДНК некоторых генов-супрессоров опухолей.

Анализ белков

Анализ белков требует большей однородности клеток, так как экспрессия белка зависит и от типа клеток, и от их состояния. Кроме того, для анализа белка требуется большее количество материала, чем для анализа РНК или ДНК: не менее

50000 клеток должно быть вырезано, чтобы обеспечить количество материала, достаточное для проведение 2-мерного электрофореза.

Анализ протеома является дополнением к изучению экспрессии генов, и может обеспечить дополнительную информацию о посттрансляционных модификациях исследуемых белков. Для анализа белков, выделенных из образцов, полученных методом ЛМД, используют такие методы, как вестерн-блоттинга, 2D-PAGE, масс-спектрометрия и секвенирование пептидов [9, 20, 21]. При выполнении анализа белков ряд факторов должен приниматься во внимание: тип исследуемой ткани, характеристики молекулы-мишени, способ выделения и последующего анализа индивидуальных белков. Клеточная неоднородность ограничивает возможности анализа белков, так же, как и анализа ДНК и РНК. Эффективная экстракция белков и предотвращение их деградации имеют решающее значение для успешного анализа после ЛМД. В последнее время были разработаны новые методы экстракции белков, предотвращающие их деградацию из препаратов, зафиксированных в формалине и парафиновых блоках [22–25].

Заключение

Биомедицинские исследования в настоящее время находится на рубеже новой технологической революции. Новые технологии позволяют глубже понять генетические изменения, эпигенетические модели, регуляцию экспрессии генов, регуляцию посттранскрипционных модификаций, протеомных процессов. Это понимание в конечном счете, должно улучшить диагностику и подходы к лечению.

Возможности ЛМД также открывают новые перспективы для исследования клеток в их естественном гетерогенном микроокружении.

Наряду с совершенствованием и удешевлением технологии ЛМД, совершенствуются и методы консервации тканей, в результате чего ранее непригодные для молекулярного анализа образцы становятся доступны для исследований. Технология ЛМД будет в конечном итоге быть использована для диагностики и разработки новых методов лечения доброкачественных и злокачественных заболеваний.

Также, эта технология сможет обеспечить новые подходы для изучения молекулярных свойств нормальных стволовые клеток, раковых стволовых клеток, и исследования механизмов взаимодействий разных клеточных популяций. Таким образом, технология ЛМД может сыграть одну из ключевых ролей в развитии исследований в области анализа межклеточных взаимодействий, клональности, экспрессии генов, протеомики и метаболомики в клеточных субпопуляциях гетерогенных тканей. Применение этой технологии должно внести существенный вклад в развитие медико-биологических и клинических исследований. Объединение ЛМД с современными молекулярными и информационными технологиями обеспечит еще больший потенциал для исследования заболеваний и персонализированной медицины [26].

Литература

1. *Kuhar M., Cheng L. et al.* Laser capture microdissection. In: Cheng L,Zhang D, eds. Molecular Genetic Pathology. 2nd ed. — Totowa, NJ: Humana Press/Springer. — 2008. — P. 141–154.

2. *Lowry O.H., Passonneau J.V. A* Flexible System of Enzymatic Analysis. — New York: Academic Press, 1972.

3. *Goelz S.E., Hamilton S.R., Vogelstein B.* Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. Biochem Biophys Res Commun // 1985. — Vol.130. — P.118–126.

4. *Meier-Ruge W., Bielser W., Remy E. et al.* The laser in the Lowry technique for microdissection of freeze-dried tissue slices // Histochem J. — 1976. — Vol. 8 — P. 387–401.

5. *Emmert-Buck M.R., Bonner R.F., Smith P.D. et al.* Laser capture microdissection // Science. — 1996. — Vol. 274. — P. 998–1001.

6. *Suarez-Quian C.A., Goldstein S.R., Bonner R.F. et al.* Laser capture microdissection: a new tool for the study of spermatogenesis // J. Androl. — 2000. — Vol. 21 — P. 601–608.

7. *Best C.J., Emmert-Buck M.R. et al.* Molecular profiling of tissue samples using laser capture microdissection // Expert Rev. Mol. Diagn. — 2001. — Vol. 1 — P. 53–60.

8. *Lawrie L.C., Curran S., McLeod H.L. et al.* Application of laser capture microdissection and proteomics in colon cancer // Mol. Pathol. — 2001. — Vol. 54 — P. 253–258.

9. *Suarez-Quian C.A., Goldstein S.R., Pohida T. et al.* Laser capture microdissection of single cells from complex tissues // Biotechniques. — 1999. — Vol. 26 — P. 328–335.

10. *Espina V., Heiby M., Pierobon M. et al.* Laser capture microdissection Technology // Expert Rev Mol Diagn. — 2007. — Vol. 7 — P. 647–657.

11. *Cheng L., MacLennan G.T., Zhang S. et al.* Laser capture microdissection analysis reveals frequent allelic losses in papillary urothelial neoplasm of low malignant potential of the urinary bladder // Cancer. — 2004. — Vol. 101 — P. 183–188.

12. *McCarthy R.P., Zhang S., Bostwick D.G. et al.* Molecular genetic evidence for different clonal origins of epithelial and stromal components of phyllodes tumor of the prostate // Am. J. Pathol. — 2004. — Vol. 165 — P. 1395–1400.

13. *Cheng L., Gu J., Ulbright T.M. et al.* Precise microdissection of human bladder carcinomas reveals divergent tumor subclones in the same tumor // Cancer. — 2002. — Vol. 94 — P. 104–110.

14. *Standaert D.G. et al.* Applications of laser capture microdissection in the study of neurodegenerative disease // Arch. Neurol. — 2005. — Vol. 62 — P. 203–205.

15. *Demuth T., Reavie L.B., Rennert J.L. et al.* MAP-ing glioma invasion: mitogen-activated protein kinase kinase 3 and p38 drive glioma invasion and progression and predict patient survival // Mol. Cancer Ther. — 2007. — Vol. 6 — P. 1212–1222.

16. *Armstrong A.B., Wang M., Eble J.N. et al.* TP53 mutational analysissupports monoclonal origin of biphasic sarcomatoid urothelialcarcinoma (carcinosarcoma) of the urinary bladder // Mod. Pathol. — 2009. — Vol. 22 — P. 113–118.

17. *Jones P.A., Baylin S.B.* The epigenomics of cancer // Cell. — 2007. — Vol. 128 — P. 683–692.

18. *Jones P.A., Baylin S.B. et al.* The fundamental role of epigenetic events in Cancer // Nat. Rev. Genet. — 2002. — Vol. 3 — P. 415–428.

19. *Abbosh P.H., Wang M., Eble J.N. et al.* Hypermethylation of tumor suppressor gene CpG islands in small cell carcinoma of the urinary bladder // Mod. Pathol. — 2008. — Vol. 21 — P. 355–362.

20. *Maitra A., Gazdar A.F. et al.* Tissue microdissection and processing // Cancer Treat Res. — 2001. — Vol. 106 — P. 63–84.

21. *Simone N.L., Paweletz C.P., Charboneau L. et al.* Laser capture microdissection: beyond functional genomics to proteomics // Mol. Diagn. — 2000. — Vol. 5 — P. 301–307.

22. *Rodriguez-Rigueiro T., Valladares-Ayerbes M., Haz-Conde M. Et al.* A novel procedure for protein extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues // Proteomics. — 2011. — Vol. 11 — P. 2555–2559.

23. *Scicchitano M.S., Dalmas D.A., Boyce R.W. et al.* Protein extraction of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue enables robust proteomic profiles by mass spectrometry // J. Histochem. Cytochem. — 2009. — Vol. 57 — P. 849–860.

24. *Xie R., Chung J.Y., Ylaya K. et al.* Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections // J. Histochem. Cytochem. — 2011. — Vol. 59 — P. 356–365.

25. *Roulhac P.L., Ward J.M., Thompson J.W. et al.* Microproteomics:quantitative proteomic profiling of small numbers of lasercapturedcells // Cold Spring Harb Protoc. — 2011. — pdb.prot5573. doi: 10.1101/pdb.prot5573.

26. *Liang Cheng, Shaobo Zhang, Gregory T. MacLennan et. al.* Laser-assisted microdissection in translational research: theory, technical considerations, and future applications // 2013. — Vol. 21, № 1. — P. 31–47.

КОНТАКТНАЯ ТВЕРДОФАЗНАЯ ГЕМОМОДУЛЯЦИЯ

С.И. Кузнецов[1], Н.В. Буркова[1, 2], А.И. Тюкавин[1, 2]

[1] ФБГУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Кузнецов Сергей Иванович — доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник НИЛ системного кровообращения Института экспериментальной медицины ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России; *Буркова Наталья Владимировна* — доктор биологических наук доцент, ведущий научный сотрудник НИЛ системного кровообращения Института экспериментальной медицины ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, доцент кафедры физиологии и патологии ГБОУ ВПО СПХФА Минздрава России; *Тюкавин Александр Иванович* — доктор медицинских наук профессор, заведующий НИЛ системного кровообращения Института экспериментальной медицины ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, заведующий кафедрой физиологии и патологии ГБОУ ВПО СПХФА Минздрава России.

Контактная информация: СПХФА, ул. Профессора Попова 14, Санкт-Петербург, Россия, 197376. Тел. (812) 234–19–42. E-mail: nburk@list.ru (Буркова Наталья Владимировна).

Резюме

Эфферентная терапия гемосорбентами широко используются в различных областях практической медицины. В тоже время, представления о регуляторных и исполнительныхмеханизмах лечебного действия этой технологии во многом не ясны и они не ограничиваются элиминационными эффектами гемосорбционных препаратов. Проанализированы основные гуморальные и клеточные реакции организма,обусловленные непосредственным контактом цельной крови с твердой поверхностью гемосорбционных препаратов. Показана возможность использования активационных эффектовгемоконтактных процедур для повышениярезультативности консервативной терапии пациентов с критической ишемии нижних конечностей.

Ключевые слова: эфферентные методы терапии, контактная гемомодуляция, малообъемная гемоперфузия, критическая ишемия нижних конечностей.

SOLID-PHASE CONTACT HEMOMODULATION

S.I. Kuznetsov[1], N.V. Burkova[1, 2], A.I. Tyukavin[1, 2]

[1] V. A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia
[2] St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, Prof. Popova street, 14, Saint-Petersburg, Russia, 197376 Tel. +7 (812) 234–19–42. E-mail: nburk@list.ru (Natalya V. Burkova — Doctor of Biology, Associate Professor, Leading Researcher in Laboratory of Systemic Circuit, V. A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Associate Professor in Department of Physiology and Pathology, Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy).

Abstract

Efferent therapy by hemosorbents is widely used in various areas of the applied medicine. However, nature of regulatory mechanisms of medical actions of this technology is not clear in many aspects, and it didn't limit by elimination effects of hemosorption drugs. The basic humoral and cellular reactions of an organism caused

УДК.577.27

by direct contact of the intact blood with solid surface of the hemosorption drugs are analyzed. Possibility of use of activation effects of hemocontact procedures in order to enhance the efficiency of conservative treatment of the patients with critical chronic limb ischemia is shown.

Key words: efferent therapy techniques, contact hemomodulation, small-volume hemoperfusion, critical chronic limb ischemia.

Статья поступила в редакцию 05.11.13, принята к печати 11.11.13.

Контактная твердофазная гемомодуляция — процесс каскадной активации гуморальных и клеточных регуляторных и исполнительных систем организма при соприкосновении крови с поверхностью гемоконтактных препаратов. В результате активация гуморальных систем в крови накапливаются промежуточные и конечные продукты ферментативного катализа, а также появляются «информационные» макромолекулы различных классов. Продукты ферментативного катализа и сигнальные молекулы опосредуют активацию клеток крови и эндотелия и далее — клеточных элементов тканей перфузируемого региона. Твердофазная контактная гемомодуляция изменяет общий эффекторно-регуляторный профиль крови, а также функциональное состояние органов и тканей организма в целом [1, 2].

Контактная активация белков плазмы крови. Основным триггером активации «системы белков контактной активации плазмы крови», ранее классифицируемой как инициирующее звено системы свертывания крови по «внутреннему пути», является фактор Хагемана (фактор XII). Он активируется на коллагеновых структурах поврежденных участков, а также на любой химическичужеродной поверхности, включая гемоконтактные препараты (гемосорбенты) и поверхности перфузионных устройств. Помимо фактора Хагемана система контактной активации включает еще два профермента — прекалликреин (фактор Флетчера) и фактор XI (предшественник плазменного тромбопластина), а также прокофактор — высокомолекулярный кининоген (ВК). Активная форма фактора Хагемана (XIIa) «запускает» калликреин-кининовую систему через прекалликреин, с генерацией на выходе большого количества сильнодействующих биоактивных кининов (брадикинин); через C1s активирует систему комплемента с появлением в кровотоке активных пептидов хемотаксического толка (C3a,C5a); через проактиватор плазминогена «включает» фибринолиз. Наряду с этим включаются механизмы внутрисосудистого свертывания крови и образуются активированные фибринопептиды [3, 4].

Взаимодействие продуктов активации гуморальных систем с клетками является следующим этапом развития активационных процессов в крови. Так фактор XII взаимодействует с нейтрофилами, моноцитами, гепатоцитами и клетками эндотелия, (пре)калликреин — с нейтрофилами и моноцитами. ВК реагирует со всеми основными типами защитных клеток, причем клетки-мишени для ВК могут нести как индивидуальные рецепторы для его различных форм (ВК, ВКа) — эндотелиальные клетки, так и «приобретенные» рецепторы — такие как мембраносвязанный тромбоспондин на нейтрофилах и макрофагах [5]. В результате этого даже при блокировании дальнейших ферментативных каскадов плазмы активации только одной системы контактной активации достаточно для инициации клеточных компонент активационных процессов в крови.

Сосудистые эффекты гемоконтактной процедуры определяются соотношением генерированных вазоконстрикторов и вазодилятаторов, а также числом и качеством типов экспрессированных на эндотелиальных и гладкомышечных клетках рецепторов.

Активация калликреин-кининовой системы опосредует продукцию пептидов с выраженными вазодилататорными эффектами (брадикинин, каллидин, Т-кинин, Lys-брадикинин и др.). Наряду с этим калликреин запускает систему ренин-ангиотензина и активирует ангиотензин-превращающий фермент (АПФ), который не только превращает ангиотензин I в ангиотензин II, но и способствует деградации брадикинина, снижая тем самым вазодилятационный потенциал активированной крови. Сосудорасширяющий эффект кининов реализуется через соответствующие рецепторы (в частности — B_2), расположенные на эндотелиальных клетках, и образование эндотелиальныхфакторов (оксид азота — NO, эндотелиальный гиперполяризующий фактор -EDNF, простациклин и др.). Тот же брадикинин экспрессируется в разных клетках, в том числе на нейтрофилах, макрофагах, тромбоцитах, фибробластах, эндотелиальных клетках [6].

Активация метаболизма арахидоновой кислоты по монооксигеназному цитохром-Р450-зависимому пути ведет к образованию веществ с противоположным действием на сосуды — вазодилатирующим (EDHF — эндотелиальный гиперполяризующий фактор) и вазоконстрикторным (20-HETE- 20-гидроксиэйкозатетраеновая кислота).Метаболические превращения арахидоновой кислоты по циклооксигеназному пути сопровождается появлением мощного вазодилататора простациклина и вазоконстриктора тромбоксанаA_2. Липооксигеназный путь метаболизма арахидоновой кислоты приводит к образованию лейкотриенов, также участвующих в регуляции сосудистого тонуса [7].

Регуляторные пептиды. Помимо обозначенных выше вазодилятаторов выраженным сосудорасширяющим эффектом обладают пептиды адреномедуллин и проадреномедуллин-N-терминаль-20-пептид (ПАМП); натрийуретические пептиды (A,B,C) (для сосудистого регулирования наибольшее значение имеет натрийуретический пептид С, образующийся в эндотелии); пуриновые основания (АТФ, АДФ, УТФ, УДФ), источником которых являются тромбоциты, эндотелиальные и другие клетки.

К субстанциям, обладающим сосудосуживающим эффектом можно отнести эндотелины — три пептида, влияющих на тонус гладкомышечных клеток сосудов. Наиболее выраженным сосудосуживающим действием обладает эндотелин I , который не накапливается, а быстро синтезируется в эндотелии под действием адреналина, ангиотензина II, вазопрессина, тромбина, цитокинов. Эффекты эндотелина I на сосудистую стенку не однозначные и во многом зависят от того, на какие рецепторы и клетки он действует [8].

Оксид азота (NO) является универсальным регулятором и эффектором физиологических функций. Это основной эндотелиальный фактор релаксации сосудов, медиатор нервной, иммунной и других систем организма. Существуют конститутивные и индуцибельные NO-синтазы. Именно через индуцибельнуюNO-синтазу осуществляется влияние на сосудистый тонус и кровоснабжение тканей. Она быстро экспрессируется под воздействием экзогенных (бактериальные продукты) и эндогенных (цитокины, активные формы кислорода и другие макромолекулы) агентов на эндотелиальных, гладкомышечных, иммунокомпетентных и других клетках, что обеспечивает синтез большого количества NO. Через механизмы NO-релаксации опосредуются сосудистые эффекты многих биоактивных молекул. Ацетилхолин, гистамин, эндотелин I, ангиотензин II, брадикинин, вазопрессин, эстрогены, тромбин, АДФ, серотонин усиливают синтез NO. Значительный вклад в экспрессию индуцибельной NO-синтазы вносят компоненты цитокиновой сети, особенно провоспалительного толка — ИЛ-1, ФНОα, ИФНγ и другие [9, 10].

Цитокины. В клинических и экспериментальных исследованиях установлено, что контакт крови с чужеродными материалами (гемосорбенты, мембраны диализных аппаратов, внутренние поверхности аппаратов искусственного кровообращения и другие), сопровождается индукцией провоспалительных цитокинов ИЛ-1, ИФН-α, ИФН-γ. Индукция ИЛ-1 привносит разбалансировку в работу цитокиновой системы и отражается на всех ее звеньях и компонентах. ИЛ-1 индуцирует продукцию колониестимулирующих факторов (CSF), ИЛ-6, ИЛ-2, ФНО-α и их рецепторов (gp130, CD25, TNF-R75), ингибирует продукцию ИЛ-4. Помимо этого усиливается образование протромбина, антитромбина III, плазминогена, активатора плазминогена тканевого типа (t-PA) и его ингибиторов (PAI).

Генерация интерфероновразличных типов, обусловленная контактом крови с сорбционными поверхностями препаратов, приводит к изменениям спектра цитокинов, значительно усиливая эффекторный потенциал крови. Существует прямая и обратная связь между синтезом ИФН-γ и ИЛ-2, которые играют регуляторную роль по отношению друг к другу. Известна взаимосвязь ИФН-γ и ИЛ-4, имеющих отношение к индукции Tx_1 и Tx_2 соответственно. Отношение Tx_1 и Tx_2 на уровне выработки цитокинов взаимоингибирующее. Эти отношения опосредуются через ИФН-γ и ИЛ-10. Именно ИЛ-10 подавляет функции макрофагов, уменьшая продукцию ими супероксидных и нитроксидных радикалов, а также противовоспалительных цитокинов, в том числе и ИФН-γ. Противоположным эффектом в отношении ИФН-γ обладает ИЛ-13, который индуцирует синтез ИФН-γ ЕК-клетками, однако, ингибирует ответ ЕК на ИЛ-2 [11]. Таким образом, цитокины, включая и ИФН различных типов, создают усиление эффекторно-регуляторного потенциала крови после гемоконтактной процедуры.

Антибактериальная активность. Механизмом, повышающим бактерицидный потенциал организма, является образование большого количества противомикробных агентов эндогенного происхождения. Нейтрофилы обладают готовым набором биоцидных продуктов антибиотического действия. Кроме того, они же являются единственными клетками, у которых могут активироваться и функционировать специализированные системы генерации активных форм кислорода (АФК), вносящие значительный вклад в противомикробную защиту.

Механизмы защиты от инфекции подразделяют на кислородзависимые и кислороднезависимые. Кислородзависимым механизмом является индукция клетками активных форм кислорода (АФК).
Активные формы кислорода, оксид азота, производные окиси азота являются очень токсическими молекулами, которые способны уничтожать патогенные микроорганизмы и опухолевые клетки. Помимо токсических эффектов активные метаболиты кислорода выполняют в организме функции, которые включают изменение иммунореактивности, модуляцию цитокиновой сети, регуляцию апоптоза, воздействие на каскады трансдукции внешних сигналов [12].

Клетки собственного организма менее устойчивы к действию биоцидных факторов лейкоцитов, и уничтожение патогенных микроорганизмов может сопровождаться повреждением собственных тканей. Такое повреждение тканей может носить как прямой, так и опосредованный характер. При прямом повреждении АФК действуют на сами клетки организма, а при опосредованном повреждении — повреждающий эффект осуществляется соединениями, модифицированными АФК. АФК могут активировать латентные формы коллагеназы и желатиназы нейтрофилов, а также подавлять активность универсального ингибитора протеиназ — α_2-макроглобулина и полиспецифического ингибитора сериновых протеиназ — α_1-антитрипсина, усиливая протеолитические процессы в очаге воспаления.

Помимо кислородзависимых систем в гранулах нейтрофилах присутствуют катионные белки и полипептиды, эффекты которых напрямую не связаны с кислородом. Антимикробную функцию выполняют миелопероксидаза, лактоферрин, лизоцим, дефенсины и другие высокомолекулярные соединения [13]. Миелопероксидаза (МПО) выступает как кислородзависимый биоцидный фактор, но одновременно она является катионным белком. МПО обладает слабой антимикробной активностью, которая существенно возрастает в присутствии H_2O_2 и одного из анионов галоидов (I^-, Cl^-, Br^-). Другим противомикробным агентом гранулярного аппарата нейтрофилов является лактоферрин (ЛФ). Антимикробная функция этого белка связана с его способностью формироватькомплексоны, прочно связывающие и транспортирующие катионы металлов переменной валентности (Fe^{+3}, Cu^{+2}, Zn^{+2} и др.). ЛФ создает дефицит микроэлементов, связывая ионы металлов из среды и с поверхности оболочек микроорганизмов, тем самым лишая возможности использовать микробами ионы металлов в функционировании дыхательной цепи, каталаз, пероксидаз и других ферментов.

Лизоцим, являясь катионным белком, разрушает мукополисахаридный комплекс клеточной стенки бактерий в комплексе с другими антимикробными факторами нейтрофилов (МПО-система, дефенсины, сериновые протеазы и другие). Ксериновымпротеиназамс выраженным антимикробным эффектомотносятся серпроцидины — катепсинG, эластаза, протеиназа-3, азуроцидин. Низкая субстратная специфичность катепсинаG позволяет ему катализировать разнообразные белки (казеин, фибрин, фибриноген, компоненты комплемента — C1, C3, C4, C5, коллаген, протеогликаны), что и определяет его важную биологическую роль в физиологических и патологических процессах. Антимикробное действие катепсинаG существенно не зависит от его протеолитической активности.
Эластаза — фермент с широкой специфичностью по отношению к белковым субстратам. Он расщепляет эластин, коллаген, фибрин и фибриноген, компоненты комплемента (C3,C5), кининогены, гемоглобины и протеогликаны. Эластаза сама по себе является слабым антимикробным фактором. Однако она повышает чувствительность микробной клетки к воздействию МПО-системы, катепсинаG. Азуроцидин — катионный антибактериальный белок локализован в азурофильных гранулах нейтрофилов. В кооперации с эластазой и катепсином G он избирательно активен в отношении грамотрицательных бактерий. Азуроцидин активнее действует в кислой среде, независимо от фазы развития и уровня метаболизма клеток-мишеней.

Катионные полипептиды нейтрофилов с высокой антибактериальной активностью получили название дефенсины. Антибактериальная активность дефенсинов связана с электростатическим взаимодействием положительно заряженного полипептида с отрицательно заряженными компонентами клеточной оболочки микроорганизма, приводящим к разрушению мембраны и нарушениямметаболизма микробной клетки.

Помимо антимикробных функцийлизосомальные катионные белки и пептиды принимают участие в других гуморально-клеточных кооперативных взаимодействиях. Лактоферрин усиливает адгезивность, хемокинез и дыхательный взрыв нейтрофилов, а также подавляет продукцию гранулоцит-моноцит колониестимулирующего фактора (GMCSF) моноцитами и макрофагами, Азуроцидин служит хемоаттрактантом для моноцитов. Протеиназа-3 способствует агрегации и дегрануляции тромбоцитов. Комплекс катепсинаG с α_1-антихимотрипсином стимулирует продукцию цитокинов. Катепсин G и эластаза способны в очаге

воспаления генерировать вазоактивные соединения путем активации калликреин-кининовой, ренин-ангиотензиновой и других гуморальных систем. Регуляторные функции проявляют и дефенсины. Дефенсины человека HNP-1 и HNP-2 повышают хемотаксическую активность моноцитов, их способность дегранулировать тучные клетки. Они принимают участие в регуляции процессов агрегации и секреции тромбоцитов. Дефенсины поддерживают функционально значимый уровень ИЛ-1 в крови при стрессе, ингибируют секрецию ИФН-γ и ИЛ-6 лейкоцитами крови, а также стимулируют продукцию ИЛ-8 эпителиальными клетками респираторного тракта.

Клиническое применение метода твердофазной контактной гемомодуляции. В эффектах твердофазной контактной гемомодуляции задействован широкий спектр регуляторных и исполнительных механизмов, которые могут быть направленны на повышение неспецифической резистентности при самых разнообразных видах патологии.

Одним из способов контактной гемомодуляции, применяемых в клинической практике, является малообъемная гемоперфузия (МОГ). Применение МОГ у пациентов скритической ишемией нижних конечностей позволяет снизитьинтенсивность болей в покое, уменьшитьвоспалительный отек голени и стопы, а также ускорить эпителизацию язв на стопе. После МОГ в пораженной конечности происходитувеличение кровотока и повышение температура конечности. Эти и другие клинические эффекты МОГ связаны с увеличением суммарной концентрации нитратов и нитритов в крови, а также суменьшением концентрации провоспалительных цитокинов в крови (ИЛ-8, ИЛ-1β, ИФН-γ) и увеличением содержания цитокина противовоспалительного действия (ИЛ-10). Дополнение стандартных методов консервативной терапии МОГприводило к снижениючисла высоких ампутаций в сроки до 6 месяцев от момента выписки с 68 % до 34 %, а отдаленная летальность пациентов уменьшилась на 14,6 % [14, 15].

Таким образом, твердофазная контактная гемомодуляция индуцирует системный воспалительный ответ (SIRS) различной выраженности, а также компенсаторные противовоспалительные реакции (CARS). Каждый из этих процессов несет в себе биологическую целесообразность и может быть использован для оптимизации эффективности традиционных методов лечения гнойно-некротических заболеваний. Вместе с тем избыточность реакций регуляторных и исполнительных систем организма связанная с гемоконтактной гемомодуляцией может стать триггером расстройств, опосредующих тяжелые нарушения гомеостаза. Контактная гемомодуляция методом малообъемной гемоперфузии основана на индукции биологически активных аутологичных макромолекул и активированных клеток и их целевой доставке в патологически измененные органы или ткани сосудистых региона организма. Использование именно цельной крови при проведении данной процедуры позволяет усиливать активационный потенциал и разнообразить спектр биологически активных молекул.

Литература

1. *Кузнецов С.И.* Практические аспекты принципа твердофазной контактной активации крови // Успехи соврем. естествознания. — 2006. — № 2. — С. 31–32.

2. *Буркова Н.В., Кузнецов С.И., Тюкавин А.И.* Эффекты малообъемной перфузии крови, активированной гемосорбентами // Вестник СПб МАПО. — 2011. — Т. 3, № 3. — С. 43–51.

3. *Kahner B.N., Shankar H., Murugappan S. et al.* Nucleotid receptor signaling in platelets // J. Thromb. and Haemost. — 2006. — Vol. 4, № 11. — P. 2317–2326.

4. *Яровая Г.А., Блохина Т.Б., Нешкова Е.А.* Контактная активация протеолитических систем плазмы крови. Новые концепции о механизмах активации и биорегулирующих функциях // Лабораторная медицина. — 2008. — № 9. — С. 19–26.

5. *Хаитов Р.М.* Иммунология: структура и функции иммунной системы: учебное пособие. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 280 с.

6. *Яровая, Г. А.* Калликреин-кининовая система: новые факты и концепции (обзор) // Вопросы медицинской химии. — 2001. — № 1. — С. 20–39.

7. *Campbell W.B., Falck J.R.* Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors // Hypertension. — 2007. — Vol. 49, № 3. — P. 590–596.

8. *Патарая С.А., Преображенский Д.В., Сидоренко Б.А., Масенко В.П.* Биохимия и физиология семейства эндотелинов // Кардиология. — 2000. — Т. 88. — С. 78–85.

9. *Манухина Е.Б., Малышев И.Ю.* Роль оксида азота в развитии и предупреждении дисфункции эндотелия // Вестн. Витеб. гос. мед. ун-та. — 2003. — Т. 2, № 2. — С. 5–17.

10. *Warren M.C., Bump E.A., Medeiros D., Braunhut S.J.* Oxidativ stress-induced apoptosis of endothelial cells // Free Radic Biol. and Med. — 2000. — Vol. 29, № 6. — P. 537–547.

11. *Симбирцев А.С.* Цитокины — новая система регуляции защитных реакций организма // Цитокины и воспаление. — 2002. — Т. 1. № 1. — С. 9–16.

12. *Янковский О.Ю.* Токсичность кислорода и биологические системы (эволюционные, экологические и медико-биологические аспекты). — СПб: Игра, 2000. — 294 с.

13. *Кокряков В.Н.* Биология антибиотиков животного происхождения. — СПб.: Наука, 1999. — 162 с.

14. *Буркова Н.В., Знаменский Г.М., Кузнецов С.И.* Динамика антиоксидантной активности крови при лечении термических поражений нижних конечностей // Медицина экстремальных ситуаций. — 2007. — Vol. 19, № 1. — С. 21–26.

15. *Буркова Н.В., Кузнецов С.И., Нохрин С.П.* Активация крови как способ коррекции нарушений регионарного кровотока при критической ишемии нижних конечностей // Бюллетень ФЦСКиЭ им. В.А. Алмазова. — 2011. — С. 30–35.

ЗАБОЛЕВАНИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

А.О. Шпаков[1], П.А. Карпова[2], М.Ф. Баллюзек[2]

[1] ФГБУ науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
[2] ФГБУ здравоохранения «Санкт-Петербургская клиническая больница» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Александр Олегович Шпаков — доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии; *Полина Анатольевна Карпова* — врач-эндокринолог, аспирант; *Марина Феликсовна Баллюзек* — доктор медицинских наук, профессор, заместитель главного врача по медицинской части, заведующая отделением кардиологии.

Контактная информация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» Российской академии наук, пр. Тореза, д. 44, Санкт-Петербург, 194223. Тел.: 8 (812) 552–31–17; факс: 8 (812) 552–30–12. E-mail: *alex_shpakov@list.ru (Шпаков Александр Олегович).*

Резюме

У пациентов с сахарным диабетом 1-го (СД1) и 2-го типов (СД2) значительно чаще, чем в остальной популяции, выявляются заболевания щитовидной железы (ЩЖ), в первую очередь аутоиммунный тиреоидит (АИТ). Сочетание АИТ с СД1 классифицируют как самостоятельное заболевание — аутоиммунный полигландулярный синдром 3-го типа. В обзоре суммированы и проанализированы данные об эпидемиологии и диагностике заболеваний ЩЖ у больных СД1 и СД2, влиянии на развитие заболеваний ЩЖ таких факторов, как генетическая предрасположенность, продолжительность СД, пол и возраст пациентов, обсуждаются патогенетические механизмы, вовлеченные в развитие АИТ и рака ЩЖ у пациентов с СД.

Ключевые слова: антитела к тиреопероксидазе, аутоиммунный тиреоидит, рак щитовидной железы, сахарный диабет, тиреотропный гормон, щитовидная железа.

THE DISEASES OF THYROID GLAND IN THE PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS

A.O. Shpakov[1], P.A. Karpova[2], M.F. Balluzek[2]

I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia
Saint-Petersburg Hospital, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, pr. Thorez 44, Saint-Petersburg, 194223. Tel.: 8 (812) 552–31–17; fax: 8 (812) 552–30–12. E-mail: alex_shpakov@list.ru (Alexander O. Shpakov — Dr.Sci.Biol, Head of the Laboratory of Molecular Endocrinology).

Abstract

In patients with diabetes mellitus of the types 1 (T1DM) and 2 (T2DM) the diseases of the thyroid gland (TG), autoimmune thyroiditis (AIT) in particular, occur more often compared with the general population. The combination of AIT and T1DM is considered as a distinct disease — autoimmune polyglandular syndrome type 3. In the review the data on epidemiology and diagnostics of thyroid diseases in patients with T1DM and T2DM,

УДК.616.44:616.379-008.64

on influence of the factors, such as genetic susceptibility, diabetes duration, sex, and age of the patients, on the thyroid diseases are summarized analyzed, and the pathoigenetic mechanisms involving in the development of AIT and thyroid cancer in diabetic patients are discussed.

Key words: thyroperoxidase antibody, autoimmune thyroiditis, thyroid cancer, diabetes mellitus, thyroid-stimulating hormone, thyroid gland.

Статья поступила в редакцию 02.02.2013, принята к печати 28.09.2013.

Введение

Сахарный диабет (СД) и заболевания щитовидной железы (ЩЖ) являются наиболее распространенными эндокринными патологиями, между которыми, как показали исследования последних лет, существует тесная взаимосвязь. Еще в 1980-е годы появились данные о том, что у пациентов с СД 1-го типа (СД1) существенно повышен риск развития заболеваний ЩЖ, в частности аутоиммунного тиреоидита (АИТ) [1, 2]. В дальнейшем было показано, что встречаемость АИТ и субклинических гипо- и гипертиреоидных состояний у пациентов с СД1, в особенности у детей, намного превышает таковую в остальной популяции [3, 4]. В среднем около трети пациентов с СД1 имеют выраженные нарушения функций ЩЖ. У пациентов с СД 2-го типа (СД2) встречаемость заболеваний ЩЖ также достоверно выше, чем в остальной популяции, но различия в этом случае не столь значительны, как при СД1 [5, 6]. В основе высокой встречаемости заболеваний ЩЖ у пациентов с СД1 и СД2 лежат многие факторы, в том числе генетические. Так обнаружено, что некоторые генные мутации, которые ассоциированы с развитием СД, с высокой частотой выявляются и у пациентов с АИТ [7–11].

Изучение патогенетических механизмов развития АИТ и других дисфункций ЩЖ у пациентов с СД, а также поиск эффективных путей для лечения заболеваний ЩЖ при СД являются одной из актуальных проблем современной эндокринологии. Своевременная диагностика и лечение заболеваний ЩЖ у пациентов с СД улучшает у них гликемический контроль, нормализует микроциркуляцию крови, снижает риск развития сердечнососудистых заболеваний и других осложнений СД. Показано, что повышение уровня тиреоидных гормонов в условиях ассоциированного с СД1 гипертиреоза приводит к усилению всасывания глюкозы в кишечнике, интенсифицирует гликогенолиз и глюконеогенез, повышает выброс глюкозы печенью, ослабляет функциональную активность инсулиновой сигнальной системы, что, в конечном итоге, в еще большей степени усугубляет сильно выраженную гипергликемию, характерную для СД1 [12]. Вследствие этого, у диабетических больных с повышенным уровнем T_4 ухудшается гликемический контроль и развивается кетоацидоз [13]. Манифестный гипертиреоз приводит к развитию тахикардии, аритмии, застойной сердечной недостаточности и систолической артериальной гипертензии, что является наиболее частой причиной смерти диабетических больных [14, 15]. Гипотиреоидные состояния, в первую очередь АИТ, напротив, подавляют выброс глюкозы печенью, снижают глюконеогенез, снижают уровень глюкозы в крови и провоцируют, таким образом, гипогликемические эпизоды. У детей и подростков с СД1, имеющих субклинический гипотиреоз с повышенным уровнем ТТГ и нормальным уровнем тиреоидных гормонов, гипогликемические состояния встречаются намного чаще и протекают тяжелее, чем у диабетических больных без нарушений функций ЩЖ [16]. Субклинический гипотиреоз, как и СД2, обычно сопровождается ожирением, инсулиновой резистентностью, дислипидемией, атеросклерозом, для него характерен повышенный уровень общего холестерина, триглицеридов, ЛПНП-холестерина и аполипопротеина В, и пониженный уровень ЛПВП-холестерина [17, 18]. Еще тридцать лет назад было установлено, что лечение диабетических пациентов с гипотиреозом тиреоидными препаратами приводит к частичному восстановлению у них липидного обмена и улучшает ряд других метаболических показателей [19]. Контроль функций ЩЖ необходим в послеродовом периоде у женщин с СД1, поскольку у них значительно чаще, чем у рожениц без СД диагностируется послеродовой тиреоидит — аутоиммунное заболевание, развивающееся в первый год после беременности [20]. Современному состоянию проблемы взаимосвязи между СД и заболеваниями ЩЖ посвящен настоящий обзор.

Сахарный диабет 1-го типа

В 1980 году Grey и соавторы первыми показали, что у больных СД1 значительно чаще встречается субклинический гипотиреоз с повышенным уровнем ТТГ и нормальным содержанием тиреоидных гормонов [1]. Среди мужчин с СД1 субклинический гипотиреоз был выявлен у 6 % пациентов, среди женщин — у 17 %. Дальнейшие

исследования продемонстрировали еще более высокую встречаемость гипотиреоидных состояний, в частности, обусловленных АИТ, у пациентов с СД1 — в среднем в 2–5 раз выше, чем в остальной популяции [3, 21–24]. Риск возникновения АИТ у пациентов с СД1 существенно выше у лиц женского пола, повышается с увеличением возраста пациентов и продолжительности СД1, что справедливо как для взрослого, так и для детского контингента больных [3, 21–23, 25–27]. Имеются некоторые этнические особенности развития АИТ при СД1. Так, например, показано, что если среди больных СД1 детей, жителей Европы и Африки, около 17 % имеют антитела к специфическим белкам ЩЖ — тиреопероксидазе (ТПО) и тиреоглобулину (ТГ), то среди детей, жителей Кавказа, этот показатель достигает 50 % [27, 28]. Следует отметить, что наличие антител к ферменту ТПО, участвующему в синтезе тиреоидных гормонов, и к белку ТГ, непосредственному предшественнику тиреоидных гормонов, является важнейшим диагностическим показателем развития аутоиммунных процессов в ЩЖ, которые в дальнейшем переходят в АИТ.

Одно из самых масштабных исследований по гипотиреоидным состояниям у больных СД1 было выполнено Kordonouri и коллегами, которые обследовали 7097 пациентов в возрасте до 20 лет. Они показали, что 1530 из них (21.6 %) имеют положительную реакцию на антитела к ТПО и ТГ [3]. Встречаемость анти-ТПО и анти-ТГ у пациентов с СД1 повышалась с увеличением возраста и продолжительности заболевания и была достоверно выше у лиц женского пола. У пациентов с СД1, имеющих антитела к ТПО и ТГ, было в значительной степени повышено содержание ТТГ. Так у пациентов с положительной реакцией на антитела к ТПО концентрация ТТГ в среднем составила 3.34 мкЕД/мл и была в среднем на 82 % выше, чем у пациентов с отрицательной реакцией на них [3]. У пациентов, имеющих оба типа антител, анти-ТПО и анти-ТГ, концентрация ТТГ была еще выше — в среднем 4.55 мкЕД/мл. Сходные результаты были получены и другими авторами, изучавшими развитие АИТ у детей с СД1 [23]. Предполагается, что присутствие обоих антител — анти-ТПО и анти-ТГ, свидетельствует о более выраженных нарушениях в ткани ЩЖ. В случае присутствия только одного типа антител наибольшие дисфункции ЩЖ и связанное с этим повышение уровня ТТГ наблюдали при положительной реакции на анти-ТПО, которые являются более специфичными маркерами аутоиммунной патологии ЩЖ [3].

Сравнительно недавнее исследование пациентов с СД1 в возрасте от одного до 21 года показало, что 15.5 % из них имеют анти-ТПО и анти-ТГ, причем среди лиц женского пола встречаемость антител была вдвое выше (21.9 %), чем среди лиц мужского пола (11.5 %) [29]. Через 6 лет после постановки диагноза СД1 встречаемость антител среди лиц женского и мужского пола составила 30 и 15 %, соответственно, что свидетельствует о возрастании заболеваемости АИТ при увеличении продолжительности СД1. У 8.1 % больных СД1 был выявлен клинический гипотиреоз, причем все они имели положительную реакцию на антитела к ТПО и ТГ. Средний интервал между постановкой диагноза СД1 и обнаружением анти-ТПО и анти-ТГ составил 1.7 года, между началом СД1 и развитием клинически выраженного гипотиреоза — 3.3 года. Показано, что пик развития АИТ обычно приходится на пубертатный период [29].

В пользу повышения встречаемости антител при увеличении продолжительности СД1 свидетельствуют и данные Kakleas и соавторов, которые, изучая больных СД1 детей, показали, что при СД1 продолжительностью до трех лет анти-ТГ, анти-ТПО и анти-ТГ+анти-ТПО выявляются у 3.1, 9.2 и 3.0 % пациентов, при продолжительности заболевания от 3 до 6 лет — у 3.1, 15.6 и 3.1 %, при продолжительности заболевания более 6 лет — у 28.3, 30.4 и 26.0 %, соответственно [23]. В возрастных группах 5–10 лет, 10–15 лет и старше 15 лет анти-ТГ были выявлены у 2.9, 6.5 и 22.2 %, анти-ТПО — у 8.8, 11.3 и 25.0 % пациентов, причем у 55–60 % детей с положительной реакцией на оба типа антител был диагностирован клинически выраженный АИТ [23, 30].

Показана положительная корреляция между развитием АИТ у пациентов с СД1 и уровнем антител к глютаматдекарбоксилазе, которые являются маркером аутоиммунного поражения поджелудочной железы [23]. У пациентов, имеющих положительную реакцию на антитела к глютаматдекарбоксилазе, аутоиммунные заболевания ЩЖ развивались в два раза чаще, чем у пациентов с отрицательной реакцией на них [22]. В свою очередь, у пациентов с СД1 или латентным аутоиммунным СД, имеющих положительную реакцию на антитела к ТПО и ТГ, существенно чаще обнаруживались антитела к глютаматдекарбоксилазе в сравнении с пациентами, не имеющими антител к белкам ЩЖ, причем титр антител к глютаматдекарбоксилазе в первом случае был значительно выше [31]. В этой связи следует отметить, что мишенями антител к глютаматдекарбоксилазе являются не только поджелудочная железа, но также и фолликулярные клетки ЩЖ, вследствие чего эти антитела могут быть вовлечены в аутоиммунное поражение тканей ЩЖ, в том числе при СД1 [32].

В условиях АИТ наблюдается инфильтрация ЩЖ Т-лимфоцитами, что приводит к нарушению ее функционирования, и важную роль в этом процессе играют провоспалительные цитокины. Получены данные о том, что у детей с СД1, имеющих антитела к ТПО и ТГ, достоверно повышен уровень интерлейкина-2 [33]. Это свидетельствует о нарушениях функций Т-лимфоцитов при СД1, что может являться одним из патогенетических механизмов развития АИТ. Необходимо отметить, что при АИТ, который не связан с СД1, также отмечается повышение уровня ряда провоспалительных факторов, в том числе интерферона-γ и фактора некроза опухолей-α, причем наблюдается положительная корреляция между титром антител к ТПО и числом Т-лимфоцитов, продуцирующих провоспалительные факторы [34]. При исследовании крыс линии BioBreeding (BB) со спонтанным аутоиммунным СД1 и АИТ также было выявлено значительное повышение экспрессии провоспалительных цитокинов — интерферона-γ и интерлейкина-12, причем их уровень в β-клетках поджелудочной железы и в фолликулярных клетках ЩЖ крыс возрастал по мере прогрессирования заболевания [35].

У детей с СД1 в сочетании с субклиническим гипотиреозом при уровне ТТГ выше 10 мкЕД/мл отмечали отставание в росте и физическом развитии в сравнении с детьми с СД1, имеющих нормальный или незначительно повышенный уровень ТТГ [36]. Заместительная терапия тиреоидными гормонами приводила к снижению концентрации ТТГ и восстановлению скорости роста, но такое лечение было эффективным только для детей с СД1, находящихся в препубертатном периоде. Это указывает на то, что ранняя диагностика АИТ у детей с СД1 и их лечение тиреоидными гормонами позволяют предотвратить у них задержку роста и физического развития.

Поскольку причинами обоих заболеваний — СД1 и АИТ являются аутоиммунные реакции, в которые вовлечены Т-лимфоциты, то закономерным представляется определяющая роль генетических факторов в их развитии [11]. Среди генетических маркеров СД1 и АИТ — гены тканевой совместимости HLA, в частности аллели HLA-DR3 и HLA-DR4. Следует отметить, что аллель HLA-DR3 ассоциирован с такими аутоиммунными заболеваниями ЩЖ, как АИТ, диффузный токсический зоб (болезнь Грейвса) и послеродовой тиреоидит. У пациентов с СД1 и АИТ с высокой вероятностью встречается полиморфизм генов CTLA4 (хромосома 2q33), PTPN22 (1p13), IFIH1 (2q24), CD25 (10p15), C12orf30 (12q24), ERBB3 (12q13), PTPN2 (18p11), KIAA0350 (16p13), CD226 (18q22), INS (11p15), FCRL3 (1q23) и гена, кодирующего рецептор ТТГ (14q31) [37]. Среди перечисленных генов наиболее важен ген CTLA4, который кодирует цитотоксичный Т-лимфоцитарный антиген А-4 и экспрессируется в Т-лимфоцитах. Цитотоксичный Т-лимфоцитарный антиген А-4 ответственен за активацию Т-лимфоцитов, и мутации в кодирующем его гене CTLA4 приводят к изменению его функциональной активности, следствием чего является вовлечение Т-лимфоцитов в аутоиммунный процесс [38]. Другим кандидатом на ключевую роль в развитии СД1 и АИТ является ген PTPN2, кодирующий фермент протеинфосфотирозинфосфатазу-2, негативный регулятор внутриклеточных сигнальных каскадов в Т-лимфоцитах [8].

Сахарный диабет 2-го типа

Несмотря на существенные различия в этиологии и патогенезе СД1 и СД2, частота развития дисфункций ЩЖ при СД2 также достоверно выше, чем в остальной популяции [4, 11]. При обследовании 1112 пациентов с СД2 было установлено, что признаки гипотиреоза имеют 7.1 % из них, в то время как в популяции лиц без этого заболевания только 4.8 %. Различия между диабетической и недиабетической группами были в наибольшей степени выражены у пациентов в возрасте старше 65 лет, а также у тех из них, у кого была диагностирована диабетическая макроангиопатия [6]. Мексиканские исследователи обследовали 1848 пациентов с СД2 и 3313 недиабетических пациентов и показали, что среди больных СД2 встречаемость гипотиреоза составляет 5.7 %, в остальной популяции — 1.8 % [39]. Установлено, что, как и в случае СД1, вероятность возникновения гипотиреоза выше у женщин с СД2, повышается с увеличением возраста и продолжительности заболевания, выше у лиц с повышенным артериальным давлением и положительно коррелирует с индексом инсулиновой резистентности [40, 41].

Показано, что среди пациентов, у которых сочетаются СД2 и гипотиреиодные состояния, существенно чаще (32.8 %) встречаются тяжелые формы диабетической ретинопатии — тяжелой непролиферативной диабетической ретинопатии и пролиферативной диабетической ретинопатии, в сравнении с эутиреиодными пациентами с СД2 (19.6 %). Получены данные о том, что гипотиреоидные пациенты с СД2 имеют повышенный риск развития сердечнососудистых заболеваний и нефропатии [5]. Все эти данные указывают на необходимость тщательного скрининга пациентов с СД2 в отношении возможной патологии ЩЖ, что позволит избежать негативного сценария развития полиэндокринопатий, сочетающих СД2 с дисфункциями ЩЖ.

Сахарный диабет и рак щитовидной железы

Вопрос о причинно-следственных взаимосвязях между СД и раковыми заболеваниями ЩЖ в настоящее время до конца не решен. Получены многочисленные свидетельства того, что у женщин с СД2 заболеваемость раком ЩЖ достоверно выше, чем в остальной популяции [42–44]. У мужчин с СД2 встречаемость рака ЩЖ повышена в меньшей степени и, как правило, достоверно не отличается от таковой для недиабетических пациентов [43, 45, 46]. Необходимо отметить, что при СД2 повышен риск развития ряда других онкологических заболеваний, в частности рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы и неходжкинских лимфом [47–51]. Наряду с более высокой встречаемостью рака ЩЖ у пациентов с СД2, само заболевание у них проходит более агрессивно, сопровождается интенсивным метастазированием и более высокой смертностью. При наблюдении в течение пяти лет больных СД2 с высокодифференцированным раком ЩЖ у 24.6 % из них было обнаружено прогрессирование опухоли, что на 41 % превосходит этот показатель у пациентов без СД2 [52]. Пяти-, десяти- и двадцатилетняя выживаемость пациентов с высокодифференцированным раком ЩЖ в группах с СД2 и без СД2 составила 82.2 и 94.9 %, 72.9 и 91.4 %, 36.5 и 61.3 %, соответственно.

Основными факторами, которые могут быть вовлечены в развитие рака ЩЖ у пациентов с СД2, являются увеличение индекса массы тела, повышение уровня инсулина и ТТГ, длительное воздействие на организм повышенного уровня глюкозы и триглицеридов, острый дефицит витамина D, использование антидиабетических препаратов — инсулина и производных сульфонилмочевины [44, 53]. Несмотря на то, что заболеваемость раком ЩЖ у пациентов с СД1 практически не изучена, для этой формы СД также характерно наличие некоторых факторов, которые могут спровоцировать развитие рака ЩЖ. Среди них транзиторное повышение уровня инсулина вследствие неадекватной инсулиновой терапии, сильно выраженная гипергликемия, окислительный стресс, нарушения липидного обмена, а также повышение уровня ТТГ, что, как отмечалось выше, является следствием АИТ, ассоциированного с СД1.

Наиболее важным фактором, провоцирующим рак ЩЖ, является повышенный уровень ТТГ, который выявляется у значительной части пациентов с сочетанием СД и АИТ. Этот гипофизарный гормон действует на фолликулярные клетки ЩЖ и запускает в них сигнальные каскады, которые участвуют в регуляции их роста и дифференцировки [54, 55]. Повышение уровня инсулина также может запускать процессы канцерогенеза в ЩЖ, поскольку инсулин обладает мощным митогенным действием на фолликулярные клетки ЩЖ, осуществляя его как через собственные рецепторы, так и через рецепторы родственного ему инсулиноподобного фактора роста-1, и, наряду с этим, инсулин усиливает регуляторные эффекты ТТГ [56]. Подтверждением этого являются работы, в которых установлена прямая взаимосвязь между гиперинсулинемией, являющейся следствием инсулиновой резистентности при СД2, и повышением заболеваемости раком ЩЖ [57, 58]. В пользу канцерогенности инсулина свидетельствуют данные о том, что лечение диабетических пациентов инсулином и особенно его пролонгированными аналогами приводит к повышению риска возникновения онкологических заболеваний [59]. Определенный вклад в повышение уровня ТТГ и инсулина вносит значительное снижение содержания витамина D, которое наблюдается у 70 % больных СД [53]. Снижение концентрации витамина D приводит к снижению активности деиодиназы-2, которая осуществляет превращение T_4 в T_3. Снижение уровня T_3 по механизму обратной связи повышает содержание ТТГ, а также ослабляет экспрессию глюкозного транспортера GLUT-4 в мышечной и жировой тканях, что приводит к инсулиновой резистентности и, как следствие, к повышению уровня инсулина [53].

Заключение

Поскольку пациенты с СД1 и СД2 имеют повышенный риск развития заболеваний ЩЖ, в первую очередь АИТ, необходим постоянный скрининг у них функционального состояния ЩЖ, что позволит своевременно диагностировать субклинические формы этих заболеваний. Для этого необходимо ультразвуковое обследование ЩЖ и оценка таких биохимических показателей, как концентрация ТТГ, свободного T_4 и анти-ТПО. Kadiyala и соавторы в своей обзорной статье, опубликованной в 2010 году [4], указывают на то, что эутиреоидных пациентов с СД1 без дисфункций со стороны ЩЖ, следует ежегодно обследовать на содержание ТТГ, эутиреоидных пациентов с СД2 — ежегодно в том случае, когда уровень ТТГ выше 2 мкЕд/мл или отмечается положительная реакция на анти-ТПО, или каждые 3–5 лет, если уровень ТТГ ниже 2 мкЕд/мл и отсутствуют антитела к ТПО. При разработке стратегий лечения СД необходимо принимать во внимание тот факт, что длительное повышение концентрации инсулина, либо вследствие умеренной гиперинсулинемии при СД2, либо вследствие

неадекватной инсулиновой терапии при обоих типах СД, может стать одним из факторов, вызывающих рак ЩЖ. Важно также отметить, что вовремя не распознанные заболевания ЩЖ могут приводить к повышению заболеваемости пациентов с СД сердечнососудистыми заболеваниями, в основе чего лежит тесная взаимосвязь между функционированием сердечнососудистой системы и состоянием гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси. Наконец, патогенетические механизмы развития аутоиммунных повреждений β-клеток поджелудочной железы и тканей ЩЖ сходны с таковыми для других аутоиммунных заболеваний, которые с высокой частотой диагностируются у пациентов с СД. Обнаружено, что от 5 до 10 % больных СД1 страдают аутоиммунными гастритами, от 2.6 до 4 % — злокачественной анемией, около 4 % — глютеновой болезнью, 0.5 % — болезнью Аддисона [60]. Вследствие этого, ранняя диагностика и своевременное лечение возникающих при СД аутоиммунных заболеваний ЩЖ может быть одним из эффективных подходов для снижения риска развития других аутоиммунных заболеваний в условиях диабетической патологии.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 8486).

Литература

1. *Gray R.S., Borsey D.Q., Seth J. et al.* Prevalence of subclinical thyroid failure in insulin-dependent diabetes // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1980. — Vol. 50. — P. 1034–1037.

2. *Mouradian M., Abourizk N.* Diabetes mellitus and thyroid disease // Diabetes Care. — 1983. — Vol. 6. — P. 512–520.

3. *Kordonouri O., Klinghammer A., Lang E.B. et al.* Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes // Diabetes Care. — 2002. — Vol. 24. — P. 1346–1350.

4. *Kadiyala R., Peter R., Okosieme O.E.* Thyroid dysfunction in patients with diabetes: clinical implications and screening strategies // Int. J. Clin. Pract. — 2010. — Vol. 64. — P. 1130–1139.

5. *Chen H.S., Wu T.E., Jap T.S. et al.* Subclinical hypothyroidism is a risk factor for nephropathy and cardiovascular diseases in Type 2 diabetic patients // Diabet. Med. — 2007. — Vol. 24. — P. 1336–1344.

6. *Díez J.J., Iglesias P.* An analysis of the relative risk for hypothyroidism in patients with Type2 diabetes // Diabet. Med. — 2012. — Vol. 29. — P. 1510–1514.

7. *Barker J.M.* Clinical review: Type 1 diabetes-associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2006. — Vol. 91. — P. 1210–1217.

8. *Huber A., Menconi F., Corathers S.* Joint genetic susceptibility to type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis: from epidemiology to mechanisms // Endocrine Reviews. — 2008. — Vol. 29. — P. 697–725.

9. *Dittmar M., Kahaly G.J.* Genetics of the autoimmune polyglandular syndrome type 3 variant // Thyroid. — 2010. — Vol. 20. — P. 737–743.

10. *Dora J.M., Machado W.E., Rheinheimer J. et al.* Association of the type 2 deiodinase Thr^{92}Ala polymorphism with type 2 diabetes: case-control study and meta-analysis // Eur. J. Endocrinol. — 2010. — Vol. 163. — P. 427–434.

11. *Duntas L.H., Orgiazzi J., Brabant G.* The Interface between thyroid and diabetes mellitus // Clin. Endocrinol. (Oxf.). — 2011.

12. *Potenza M., Via M.A., Yanagisawa R.T.* Excess thyroid hormone and carbohydrate metabolism // Endocr. Pract. — 2009. — Vol. 15. — P. 254–262.

13. *Bhattacharyya A., Wiles P.G.* Diabetic ketoacidosis precipitated by thyrotoxicosis // Postgrad. Med. J. — 1999. — Vol. 75. — P. 291–292.

14. *Franklyn J.A., Sheppard M.C., Maisonneuve P.* Thyroid function and mortality in patients treated for hyperthyroidism // JAMA. — 2005. — Vol. 294. — P. 71–80.

15. *Collet T.H., Gussekloo J., Bauer D.C. et al.* Subclinical hyperthyroidism and the risk of coronary heart disease and mortality // Arch. Intern. Med. — 2012. — Vol. 172. — P. 799–809.

16. *Mohn A., Di Michele S., Di Luzio R. et al.* The effect of subclinical hypothyroidism on metabolic control in children and adolescents with Type 1 diabetes mellitus // Diabet. Med. — 2002. — Vol. 19. — P. 70–73.

17. *Roos A., Bakker S.J., Links T.P. et al.* Thyroid function is associated with components of the metabolic syndrome in euthyroid subjects // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2007. — Vol. 92. — P. 491–496.

18. *Garduño-Garcia Jde J., Alvirde-Garcia U., López-Carrasco G. et al.* TSH and free thyroxine concentrations are associated with differing metabolic markers in euthyroid subjects // Eur. J. Endocrinol. — 2010. — Vol. 163. — P. 273–278.

19. *Gray R.S., Smith A.F., Clarke B.F.* Hypercholesterolemia in diabetics with clinically unrecognised primary thyroid failure // Horm. Metab. Res. — 1981. — Vol. 13. — P. 508–510.

20. *Stagnaro-Green A.* Approach to the patient with postpartum thyroiditis // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2012. — Vol. 97. — P. 334–342.

21. *Holl R.W., Bohm B., Loos U. et al.* Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus // Horm. Res. — 1999. — Vol. 52. — P. 113–118.

22. *De Block C.E., De Leeuw I.H., Vertommen J.J. et al.* Beta-cell, thyroid, gastric, adrenal and coeliac autoimmunity and HLA-DQ types in type 1 diabetes // Clin. Exp. Immunol. — 2001. — Vol. 126. — P. 236–241.

23. *Kakleas K., Paschali E., Kefalas N. et al.* Factors for thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus // Ups. J. Med. Sci. — 2009. — Vol. 114. — P. 214–220.

24. *Piątkowska E., Szalecki M.* Autoimmune thyroiditis in children and adolescents with type 1 diabetes // Pediatr. Endocrinol. Diabetes Metab. — 2011. — Vol. 17. — P. 173–177.

25. *Kordonouri O., Hartmann R., Deiss D. et al.* Natural course of autoimmune thyroiditis in type 1 diabetes: association with gender, age, diabetes duration, and puberty // Arch. Dis. Child. — 2005. — Vol. 90. — P. 411–414.

26. *Barker J.M., Yu J., Yu L. et al.* Autoantibody 'subspecificity' in type 1 diabetes // Diabetes Care. — 2005. — Vol. 28. — P. 850–855.

27. *Mantovani R.M., Mantovani L.M., Alves Dias V.M.* Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: Prevalence and risk factors // J. Pediatr. Endocrinol. Metab. — 2007. — Vol. 20. — P. 669–675.

28. *Burek C.L., Rose N.R., Guire K.E., Hoffman W.H.* Thyroid autoantibodies in black and in white children and adolescents with type 1 diabetes mellitus and their first degree relatives // Autoimmunity. — 1990. — Vol. 7. — P. 157–167.

29. *Severinski S., Banac S., Severinski N.S. et al.* Epidemiology and clinical characteristics of thyroid dysfunction in children and adolescents with type 1 diabetes // Coll. Antropol. — 2009. — Vol. 33. — P. 273–279.

30. *Karavanaki K., Kakleas K., Paschali E. et al.* Screening for associated autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus (T1DM) // Horm. Res. — 2009. — Vol. 71. — P. 201–206.

31. *Jin P., Huang G., Lin J. et al.* High titre of antiglutamic acid decarboxylase autoantibody is a strong predictor of the development of thyroid autoimmunity in patients with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults // Clin. Endocrinol. (Oxf.). — 2011. — Vol. 74. — P. 587–592.

32. *Barova H., Perusicova J., Hill M. et al.* Anti-GAD-positive patients with type 1 diabetes mellitus have higher prevalence of autoimmune thyroiditis than anti-GAD negative patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus // Physiol. Res. — 2004. — Vol. 53. — P. 279–286.

33. *Wang X.M., Chen C., Dong G.P. et al.* Detection of thyroid antibodies in children with type 1 diabetes mellitus // Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. — 2012. — Vol. 14. — P. 38–41.

34. *Karanikas G., Schuetz M., Wahl K. et al.* Relation of anti-TPO autoantibody titre and T-lymphocyte cytokine production patterns in Hashimoto's thyroiditis // Clin. Endocrinol. (Oxf.). — 2005. — Vol. 63. — P. 191–196.

35. *Zipris D.* Evidence that Th1 lymphocytes predominate in islet inflammation and thyroiditis in the BioBreeding (BB) rat // J. Autoimmun. — 1996. — Vol. 9. — P. 315–319.

36. *Chase H.P., Garg S.K., Cockerham R.S. et al.* Thyroid hormone replacement and growth of children with subclinical hypothyroidism and diabetes // Diabet. Med. — 1990. — Vol. 7. — P. 299–303.

37. *Pearce S.H., Merriman T.R.* Genetics of type 1 diabetes and autoimmune thyroid disease // Endocrinol. Metab. Clinics North America. — 2009. — Vol. 38. — P. 289–301.

38. *Howson J.M., Dunger D.B., Nutland S. et al.* A type 1 diabetes subgroup with a female bias is characterized by failure in tolerance to thyroid peroxidase at an early age and a strong association with the cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 gene // Diabetologia. — 2007. — Vol. 50. — P. 741–746.

39. *Tamez-Pérez H.E., Martínez E., Quintanilla-Flores D.L. et al.* The rate of primary hypothyroidism in diabetic patients is greater than in the non-diabetic population. An observational study // Med. Clin. (Barc.). — 2012. — Vol. 138. — P. 475–477.

40. *Yang G.R., Yang J.K., Zhang L. et al.* Association between subclinical hypothyroidism and proliferative diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients: a case-control study // Tohoku J. Exp. Med. — 2010. — Vol. 222. — P. 303–310.

41. *Ashrafuzzaman S.M., Taib A.N., Rahman R., Latif Z.A.* Prevalence of diabetes among hypothyroid subjects // Mymensingh Med. J. — 2012. — Vol. 21. — P. 129–132.

42. *Inoue M., Iwasaki M., Otani T. et al.* Diabetes mellitus and the risk of cancer: results from a large-scale population-based cohort study in Japan // Arch. Intern. Med. — 2006. — Vol. 166. — P. 1871–1877.

43. *Meinhold C.L., Ron E., Schonfeld S.J. et al.* Non-radiation risk factors for thyroid cancer in the US radiologic technologists study // Am. J. Epidemiol. — 2010. — Vol. 171. — P. 242–252.

44. *Shih S.R., Chiu W.Y., Chang T.C., Tseng C.H.* Diabetes and thyroid cancer risk: literature review // Exp. Diabetes Res. — 2012. — Vol. 2012.

45. *Adami H.O., McLaughlin J., Ekbom A. et al.* Cancer risk in patients with diabetes mellitus // Cancer Causes Control. — 1991. — Vol. 2. — P. 307–314.

46. *Kuriki K., Hirose K., Tajima K.* Diabetes and cancer risk for all and specific sites among Japanese men and women // Eur. J. Cancer Prevention. — 2007. — Vol. 16. — P. 83–89.

47. *Coughlin S.S., Calle E.E., Teras L.R. et al.* Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a large cohort of US adults // Am. J. Epidemiol. — 2004. — Vol. 159. — P. 1160–1167.

48. *Tseng C.H., Chong C.K., Tai T.Y.* Secular trend for mortality from breast cancer and the association between diabetes and breast cancer in Taiwan between 1995 and 2006 // Diabetologia. — 2009. — Vol. 52. — P. 240–246.

49. *Tseng C.H.* Diabetes and risk of prostate cancer: a study using the National Health Insurance // Diabetes Care. — 2011. — Vol. 34. — P. 616–621.

50. *Tseng C.H.* Diabetes and risk of bladder cancer: a study using the National Health Insurance database in Taiwan // Diabetologia. — 2011. — Vol. 54. — P. 2009–2015.

51. *Tseng C.H.* Diabetes and non-Hodgkin's lymphoma: analyses of prevalence and annual incidence in 2005 using the National Health Insurance database in Taiwan // Ann. Oncology. — 2012. — Vol. 23. — P. 153–158.

52. *Chen S.T., Hsueh C., Chiou W.K., Lin J.D.* Disease-specific mortality and secondary primary cancer in well-differentiated thyroid cancer with type 2 diabetes mellitus // PLoS One. — 2013. — Vol. 8.

53. *Aschebrook-Kilfoy B., Sabra M.M., Brenner A. et al.* Diabetes and thyroid cancer risk in the National Institutes of

Health-AARP Diet and Health study // Thyroid. — 2011. — Vol. 21. — P. 957–963.

54. *Haymart M.R., Repplinger D.J., Leverson G.E. et al.* Higher serum thyroid stimulating hormone level in thyroid nodule patients is associated with greater risks of differentiated thyroid cancer and advanced tumor stage // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2008. — Vol. 93. — P. 809–814.

55. *Boelaert K.* The association between serum TSH concentration and thyroid cancer // Endocrine-Related Cancer. — 2009. — Vol. 16. — P. 1065–1072.

56. *Pisarev M.A.* Interrelationships between the pancreas and the thyroid // Curr. Opin. Endocrinol. Diab. Obesity. — 2010. — Vol. 17. — P. 437–439.

57. *Rezzonico J.N., Rezzonico M., Pusiol E. et al.* Increased prevalence of insulin resistance in patients with differentiated thyroid carcinoma // Metab. Syndrome Rel. Dis. — 2009. — Vol. 7. — P. 375–380.

58. *Gursoy A.* Rising thyroid cancer incidence in the world might be related to insulin resistance // Med. Hypoth. — 2010. — Vol. 74. — P. 35–36.

59. *Smith U., Gale E.A.* Does diabetes therapy influence the risk of cancer? // Diabetologia. — 2009. — Vol. 52. — P. 1699–1708.

60. *Van den Driessche A., Eenkhoorn V., Van Gaal L., De Block C.* Type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome: a clinical review // Neth. J. Med. — 2009. — Vol. 67. — P. 376–387.

ИЗМЕНЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ ГОРМОНОВ И ГУАНИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ НА АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ У САМЦОВ КРЫС С 30-ти СУТОЧНЫМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫМ ДИАБЕТОМ

А.О. Шпаков, К.В. Деркач, О.В. Чистякова, И.В. Мойсеюк, В.М. Бондарева

ФГБУ науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Александр Олегович Шпаков — заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии, доктор биологических наук; *Кира Викторовна Деркач* — научный сотрудник, кандидат биологических наук; *Оксана Викторовна Чистякова* — старший научный сотрудник, кандидат биологических наук; *Ирина Викторовна Мойсечюк — аспирант; Вера Михайловна Бондарева* — ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук.

Контактная информация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» Российской академии наук, пр. Тореза, д. 44, Санкт-Петербург, 194223. Тел.: 8 (812) 552–31–17; факс: 8 (812) 552–30–12. E-mail: alex_shpakov@list.ru *(Шпаков Александр Олегович).*

Резюме

Предполагается, что одной из причин осложнений сахарного диабета 1-го типа (Т1СД) являются нарушения функциональной активности аденилатциклазной сигнальной системы (АЦСС), которые возникают на ранних стадиях заболевания. Цель работы состояла в изучении активности фермента аденилатциклазы (АЦ) и сопряженных с ней G_s- и G_i-белков, компонентов АЦСС, и их чувствительности к гормонам в мозге, миокарде и семенниках крыс с 30-ти суточной стрептозотоциновой моделью Т1СД, который вызывали одноразовой инъекцией животным стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг. Активность АЦ и ГТФ-связывание G-белков определяли во фракциях плазматических мембран, выделенных из мозга, миокарда и семенников крыс с помощью радиоизотопных методов. В миокарде и семенниках диабетических крыс снижался базальный уровень ГТФ-связывания, базальная и стимулированная гуаниновыми нуклеотидами, биогенными аминами и полипептидными гормонами активность АЦ, что указывает на ослабление сопряженных с G_s-белками сигнальных каскадов в этих тканях, причем выявленные изменения характеризовались гормональной и рецепторной специфичностью. В мозге ослаблялись только стимулирующие АЦ и ГТФ-связывание эффекты гормонов — серотонина, релаксина и PACAP-38. Изменения в АЦ сигнальных каскадах, сопряженных с G_i-белками, выявлялись во всех изученных тканях и для различных гормонов, ингибиторов АЦ, что свидетельствует о снижении функций G_i-белков при Т1СД. Таким образом, на ранних стадиях экспериментального Т1СД возникают нарушения в функционировании АЦСС, что может вызывать осложнения со стороны нервной, сердечно-сосудистой и репродуктивной систем и должно учитываться при диагностике и лечении Т1СД.

Ключевые слова: аденилатциклаза, миокард, мозг, семенники, соматостатин, стрептозотоциновый диабет.

THE ALTERATION OF THE REGULATORY EFFECTS OF HORMONES AND GUANINE NUCLEOTIDES ON ADENYLYL CYCLASE ACTIVITY IN MALE RATS WITH 30-DAY STREPTOZOTOCIN DIABETES

A.O. Shpakov, K.V. Derkach, O.V. Chistyakova, I.V. Moyseyuk, V.M. Bondareva

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia

УДК.577.17:612.084

Corresponding author: I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, pr. Torez 44, Saint-Petersburg, 194223. Tel.: 8 (812) 552–31–17; fax: 8 (812) 552–30–12. E-mail: alex_shpakov@list.ru (Alexander O. Shpakov — Dr.Sci.Biol, Head of the Laboratory of Molecular Endocrinology).

Abstract

Background. It is assumed that one of the causes of the complications of type 1 diabetes mellitus (T1DM) is the change in functional activity of the adenylyl cyclase signaling system (ACSS) that occur in the early stages of the disease. **Objective.** The aim of the work was to study the activity of the enzyme adenylate cyclase (AC) and G_s- and G_i-proteins coupled to them, the components of ACSS, and their sensitivity to hormones in the brain, myocardium and testes of rats with 30-day streptozotocin model of T1DM. **Design and methods.** T1DM was induced by a single injection of streptozotocin at a dose of 65 mg/kg. AC activity and GTP-binding of G-proteins were studied in the plasma membranes isolated from the brain, myocardium and testes of rats using radioisotope technique. **Results.** In the myocardium and testes of diabetic rats the basal level of GTP-binding and the basal and guanine nucleotide-, biogenic amine- and polypeptide hormone-stimulated AC activity were decreased, which indicates a weakening of G_s-protein-coupled signaling pathways in these tissues. These changes were hormone and receptor specific. In the brain the stimulating AC and GTP-binding effects of hormones — serotonin, relaxin and PACAP-38, were decreased. The alterations in AC signaling cascades coupled with G_i-proteins were identified in all investigated tissues and in the case of different hormones, AC inhibitors, which shows a decline in the functions of G_i-proteins in T1DM. **Conclusion.** Thus, at early stages of experimental T1DM there are the abnormalities in the functioning ACSS, which may cause the complications in the nervous, cardiovascular, and reproductive systems and should be considered in diagnostics and treatment of T1DM.

Key words: adenylyl cyclase, myocardium, brain, testes, somatostatin, streptozotocin diabetes.

Статья поступила в редакцию 10.11.13, принята к печати 15.11.13.

Введение

В основе осложнений сахарного диабета 1-го типа (Т1СД) лежат метаболические нарушения и окислительный стресс, а также изменения функциональной активности гормональных сигнальных систем, которые возникают уже на ранних стадиях заболевания [1–5]. Однако как сами эти изменения, так и факторы, которые их вызывают, в настоящее время изучены недостаточно. Предполагается, что на начальном этапе заболевания в гормональных сигнальных системах возникают адаптационные изменения, которые в дальнейшем становятся необратимыми вследствие длительного воздействия сильно выраженной гипергликемии, абсолютной или относительной инсулиновой недостаточности, окислительного стресса и вызванных неадекватной инсулиновой терапией гипогликемических состояний. Наиболее распространенными осложнениями Т1СД являются заболевания нервной, сердечно-сосудистой и репродуктивной систем [3, 6–8]. Физиологические и биохимические функции этих систем в значительной степени контролируются гормонами, регулирующими ферменты аденилатциклазу (АЦ) и цАМФ-зависимую протеинкиназу. Вследствие этого, изучение функционального состояния аденилатциклазной сигнальной системы (АЦСС), включающей гормональный рецептор, гетеротримерный G-белок стимулирующего (G_s) или ингибирующего (G_i) типа и фермент АЦ, в условиях диабетической патологии дает возможность выявить те молекулярные причины, которые приводят к нарушению гормональной сигнализации и развитию осложнений Т1СД. При этом необходимо комплексно исследовать сигнальные пути, ведущие как к стимуляции АЦ, так и к ее ингибированию, поскольку, как было установлено нами ранее, изменения функциональной активности АЦСС в условиях сахарного диабета характеризуются рецепторной и гормональной специфичностью [9, 10].

Цель работы состояла в изучении функциональной активности АЦСС и ее регуляции гормонами в мозге, миокарде и семенниках крыс со стрептозотоциновой моделью Т1СД продолжительностью 30 дней. Т1СД вызывали однократной обработкой животных стрептозотоцином в дозе 65 мг/кг. Изучали широкий спектр гормональных агентов — биогенных аминов их синтетических аналогов и полипептидных гормонов, которые действуют на АЦ стимулирующим, через G_s-белки, и ингибирующим, через G_i-белки, способом, и являются ключевыми регуляторами нервной, сердечно-сосудистой и репродуктивной систем.

Материалы и методы

Для экспериментов были взяты шестимесячные самцы крыс Wistar, которые содержались в стандарт-

ных условиях и на стандартном рационе. Стрептозотоциновый Т1СД вызывали внутрибрюшинным введением крысам стрептозотоцина (Sigma, США), растворенного в 0.9 % растворе NaCl, подкисленного лимонной кислотой (pH 4.5), в дозе 65 мг на кг веса. Животные контрольной группы получали подкисленный физиологический раствор в том же объеме, но без стрептозотоцина. У обработанных стрептозотоцином крыс уже на третьи сутки развивались выраженная гипергликемия и глюкозурия. Измерение уровня глюкозы проводили в цельной крови, полученной из хвостовой вены животных, с помощью тест-полосок One Touch Ultra (США) и глюкометра фирмы Life Scan Johnson & Johnson (Дания). Измерение содержания глюкозы в моче проводили с помощью тест-полосок Combi-Screen (Германия). Концентрацию инсулина в сыворотке крови животных измеряли с использованием наборов Rat Insulin ELISA (Mercodia A.B., Швеция).

Были сформированы две группы самцов крыс: контрольная (группа К, n = 8) и диабетическая (Д, n = 11). Вес тела, содержание глюкозы и инсулина были измерены перед началом эксперимента, через 10 и 30 дней после обработки крыс стрептозотоцином (Табл. 1). Животные из групп К и Д были декапитированы через 30 дней после начала эксперимента. Три крысы из группы Д умерли в течение первых пяти дней, вследствие чего ко времени декапитации число диабетических животных снизилось до 8.

В биохимических экспериментах использовали изопротеренол, норадреналин, серотонин, 8-гидрокси-2-дипропиламинотетралина гидробромид (8-OH-DPAT), хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), соматостатин, питуитарный АЦ-активирующий полипептид-38 (PACAP-38), форсколин и гуанилилимидодифосфат (GppNHp), полученные из фирмы Sigma-Aldrich (США), 5-нонилокситриптамин (5-HOT) и 5-хлор-2-метил-3-(1,2,3,6-тетрагидро-4-пиридинил)-1*H*-индол (EMD-386088) — из фирмы Tocris Cookson Ltd. (Великобритания). Релаксин-2 был любезно предоставлен профессором John Wade (Университет Мельбурна, Австралия). Для определения активности АЦ использовали меченый [α-^{32}P]-АТФ (4 Ки/ммоль), который был получен из ОАО «Реакторные материалы» (Изотоп, Россия). Для определения ГТФ-связывающей активности G-белков использовали β,γ-имидо[8-^{3}H]-гуанозин-5'-трифосфата аммонийную соль ([8-^{3}H]-GppNHp) (5 Ки/мМ) производства фирмы «Amersham» (Англия), а также нитроцеллюлозные фильтры тип HA, 0.45 мкм, фирмы «Millipore» (США).

Фракции плазматических мембран из желудочков сердца диабетических и контрольных крыс выделяли, как описано ранее [11]. Миокард отделяли от предсердий, жира и сердечных клапанов, промывали охлажденным физиологическим раствором, измельчали и гомогенизировали с помощью Политрона в 20 объемах охлажденного до 4°C 40 мМ Tris-HCl буфера (pH 7.4), содержащего 5 мМ $MgCl_2$, 320 мМ сахарозу и ингибиторы протеаз (буфер А). Гомогенат центрифугировали (480 *g*, 10 мин), осадок отбрасывали, супернатант центрифугировали (27 500 *g*, 20 мин), полученный осадок ресуспендировали в буфере А без сахарозы и центрифугировали в том же режиме.

Фракции синаптосомальных мембран из тканей мозга крыс выделяли, как описано ранее [12]. Кору больших полушарий, стриатум и гиппокамп гомогенизировали с помощью Политрона в буфере А (4°C), полученный гомогенат центрифугировали (1000 *g*, 10 мин), осадок отбрасывали, супернатант снова центрифугировали (9 000 *g*, 20 мин), осадок ресуспендировали в буфере А без сахарозы и повторно центрифугировали (35 000 *g*, 10 мин).

Для выделения тестикулярных мембран измельченные ткани семенников крыс гомогенизировали

Таблица 1

ВЕС ТЕЛА, УРОВНИ ГЛЮКОЗЫ И ИНСУЛИНА В КРОВИ КОНТРОЛЬНЫХ КРЫС И ЖИВОТНЫХ СО СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫМ ДИАБЕТОМ (*M* ± *SD*)

Показатели	До начала эксперимента	10-й день	30-й день
	Контрольные крысы (n = 8)		
Вес тела, г	256 ± 7	259 ± 7	270 ± 7
Глюкоза, мМ	4.4 ± 0.4	4.6 ± 0.4	4.7 ± 0.4
Инсулин, нг/мл	2.2 ± 0.3	2.1 ± 0.2	2.0 ± 0.2
	Диабетические крысы (в начале эксперимента n = 11, через 10 и 30 дней после обработки стрептозотоцином n = 8)		
Вес тела, г	261 ± 8	220 ± 9	207 ± 12
Глюкоза, мМ	4.5 ± 0.4	18.4 ± 3.4	16.7 ± 5.4
Инсулин, нг/мл	2.3 ± 0.3	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1

Таблица 2

БАЗАЛЬНАЯ И СТИМУЛИРОВАННАЯ GPPNHP И ФОРСКОЛИНОМ АКТИВНОСТЬ АЦ (ПМОЛЬ ЦАМФ/МИН НА МГ БЕЛКА) И БАЗАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ГТФ-СВЯЗЫВАНИЯ (ПМОЛЬ [8-^{3}H]-GPPNHP/МГ БЕЛКА) В ТКАНЯХ КРЫС С 30-ТИ СУТОЧНЫМ Т1СД В СРАВНЕНИИ С ЭТИМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ У КОНТРОЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ (*M* ± *SD*)

Группа крыс	Активность аденилатциклазы			ГТФ-связывание
	Базальная активность	GppNHp, 10^{-5} M	Форсколин, 10^{-5} M	Базальный уровень
Мозг				
Контроль	25.6 ± 3.5	67 ± 7 (100)#	155 ± 10 (100)	4.4 ± 0.5
Диабет	24.1 ± 2.7	58 ± 7 (82) *(↓)	139 ± 8 (89) *(↓)	4.2 ± 0.4
Миокард				
Контроль	24.2 ± 2.4	88 ± 6 (100)	172 ± 8 (100)	3.6 ± 0.3
Диабет	28.9 ± 0.9 *(↑)	67 ± 4 (60) *(↓)	165 ± 10 (92)	2.9 ± 0.4 *(↓)
Семенники				
Контроль	20.2 ± 2.4	42 ± 3 (100)	106 ± 7 (100)	2.7 ± 0.5
Диабет	11.4 ± 1.3 *(↓)	23 ± 3 (53) *(↓)	78 ± 5 (78) *(↓)	1.8 ± 0.4 *(↓)

Примечание: # — в скобках приведены стимулирующие АЦ эффекты негормональных агентов, в процентах. Стимулирующие АЦ эффекты GppNHp и форсколина (оба — 10^{-5} M) в контроле приняты за 100 %. * — различия между контрольными и диабетическими крысами достоверны при $P < 0.05$.

на холоде в 40 мМ Tris-HCl-буфере, pH 7.5, содержащем 5 мМ $MgCl_2$, 10 % (w/v) сахарозу и ингибиторы протеаз (буфер Б). Гомогенат центрифугировали (1500 *g*, 10 мин), осадок отбрасывали и супернатант повторно центрифугировали (20000 *g*, 30 мин). Полученный осадок ресуспендировали в буфере Б без сахарозы и центрифугировали в том же режиме.

Активность АЦ определяли, как описано ранее [12]. Реакционная смесь (50 мкл) содержала 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 5 мМ $MgCl_2$, 0.1 мМ цАМФ, 1 мМ АТФ, 1 мкКи [α-^{32}P]-АТФ, 20 мМ креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы и 25–100 мкг мембранного белка. Реакцию проводили в течение 12 минут при 37 °C, начинали добавлением фракции мембран и останавливали 100 мкл 0.5 М HCl. Пробы кипятили (6 мин) и нейтрализовали кислоту 100 мкл 1.5 М имидазола. Образовавшийся [^{32}P]-цАМФ отделяли на колонках с оксидом алюминия, используя в качестве элюента 8 мл 10 мМ имидазол-HCl буфера (pH 7.4). Элюат собирали в сцинтилляционные флаконы и считали радиоактивность на счетчике LS 6500 (Beckman Instruments Inc., США). Каждое измерение проводили в трех независимых экспериментах в трех параллельных пробах, результаты представляли в пмоль цАМФ/мин на мг мембранного белка.

Определение ГТФ-связывания проводили с помощью мечения G-белков [8-^{3}H]-GppNHp, как описано ранее [13]. Реакционная смесь (50 мкл) содержала 25 мМ HEPES-Na буфер (pH 7.4), 1 мМ ЭДТА, 5 мМ $MgCl_2$, 100 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреитола, 1 мкМ GppNHp, 0.1 % бычьего сывороточного альбумина, 0.5–1 мкКи [8-^{3}H]-GppNHp. Реакцию начинали добавлением 50–100 мкг мембранного белка и проводили при 30°C в течение 45 мин. После инкубации реакционную смесь разбавляли 100 мкл промывающего буфера (20 мМ K^+/Na^+-фосфатного буфера, pH 8.0), содержащего 0.1 % Lubrol-PX. Образцы фильтровали под вакуумом через нитроцеллюлозные фильтры с размером пор 0.45 мкм (тип HA). В дальнейшем фильтры промывали три раза 2 мл промывающего буфера и сушили. Связанную с фильтром радиоактивность определяли в сцинтилляторе с помощью счетчика LKB 1209/1215 RackBeta (Швеция). Для определения неспецифического связывания в пробы добавляли 10 мМ GppNHp. Специфическое связывание GppNHp определяли, как разность между общим и неспецифическим связыванием. Результаты представляли в пмоль [8-^{3}H]-GppNHp на мг мембранного белка.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы ANOVA. Данные представлены в виде *M* ± *SD* трех независимых экспериментов. Различия между значениями активности АЦ и специфическим ГТФ-связыванием во фракциях плазматических мембран, выделенных из тканей диабетических и контрольных животных, оценивали как достоверные при $P < 0.05$.

Результаты

Базальная активность АЦ в условиях Т1СД в семенниках снижалась на 44 %, в миокарде повышалась на 19 %, в мозге не менялась. Стимули-

рующий АЦ эффект GppNHp, негидролизуемого аналога ГТФ, активирующего G_s-белок, снижался в миокарде и семенниках диабетических крыс, но сохранялся в мозге. Соответствующий эффект форсколина, который активирует каталитический сайт АЦ, ослаблялся в семенниках диабетических животных, но слабо менялся в миокарде и мозге (табл. 2). Эти данные указывают на то, что в изученных тканях диабетических крыс нарушаются функции G_s-белков, через которые гормональные рецепторы стимулирующим способом сопряжены с АЦ, в то время как каталитические функции АЦ снижаются только в семенниках. Уровень ГТФ-связывания в отсутствие гормонов у диабетических крыс достоверно снижался в миокарде и семенниках и практически не менялся в мозге (табл. 2), что также указывает на ослабление функций G_s-белков.

В мозге диабетических крыс были снижены стимулирующие АЦ и ГТФ-связывание эффекты серотонина, релаксина и PACAP-38, в меньшей степени изменены соответствующие эффекты дофамина, селективного агониста серотонинового рецептора (СР) 6-го типа EMD-386088 и агониста СР 1А- и 7-го типов 8-OH-DPAT (Табл. 3). В сравнении с контролем прирост активности АЦ, вызванный серотонином, релаксином и PACAP-38 снижался при Т1ДМ на 54, 63 и 69 %, соответственно. В миокарде диабетических крыс снижались стимулирующие АЦ и ГТФ-связывание эффекты селективного β-агониста изопротеренола, неселективного α/β-агониста норадреналина и релаксина, причем наиболее выраженные различия между эффектами гормонов в контроле и при Т1СД отмечались в случае релаксина. В тестикулярных мембранах, выделенных из семенников диабетических животных, были в значительной степени снижены стимулирующие эффекты гонадотропина и PACAP-38 на активность АЦ и ГТФ-связывание, которые при диабете в случае АЦ составили 38 и 67 % от величины таковых в контроле. Полученные данные указывают на нарушения в сопряженных с G_s-белками сигнальных каскадах в условиях стрептозотоцинового Т1СД и на рецепторную и тканевую их специфичность.

Во всех изученных тканях диабетических крыс был ослаблен ингибирующий АЦ эффект соматостатина, в миокарде — эффект α/β-агониста норадреналина, в мозге — соответствующие эффекты бромокриптина, агониста D_2-дофаминовых рецепторов, и селективного агониста СР 1В-подтипа 5-HOT (Табл. 4). В еще большей степени при Т1СД снижалась стимуляция гормонами, ингибиторами АЦ, базального уровня ГТФ-связывания, что связано с понижением способности этих гормонов активировать G_i-белки. Ингибирующие АЦ эффекты соматостатина в мозге, миокарде и семенниках диабетических крыс были снижены в сравнении с контролем на 27, 17 и 57 %, стимуляция соматостатином ГТФ-связывания в тех же тканях — на 32, 31 и 68 %, соответственно. Ингибирующий АЦ эффект 5-HOT в мозге диабетических крыс был сни-

Таблица 3

СТИМУЛЯЦИЯ ГОРМОНАМИ АКТИВНОСТИ АЦ И ГТФ-СВЯЗЫВАНИЯ В ТКАНЯХ ДИАБЕТИЧЕСКИХ И КОНТРОЛЬНЫХ КРЫС (M ± SD)

Гормон	Повышение активности АЦ над уровнем базальной активности #		Повышение ГТФ-связывания над базальным уровнем ##	
	Контроль	Диабет	Контроль	Диабет
Мозг				
Серотонин, 10^{-5} M	65 ± 6	30 ± 5*	4.9 ± 0.5	2.4 ± 0.3*
EMD-386088, 10^{-5} M	22 ± 3	17 ± 4*	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.3
8-OH-DPAT, 10^{-5} M	19 ± 3	15 ± 2*	1.8 ± 0.2	1.5 ± 0.4*
Дофамин, 10^{-5} M	27 ± 4	26 ± 5	3.2 ± 0.4	2.8 ± 0.3
Релаксин, 10^{-8} M	51 ± 4	19 ± 5*	2.7 ± 0.4	1.2 ± 0.3*
PACAP-38, 10^{-7} M	42 ± 4	13 ± 3*	1.9 ± 0.2	0.8 ± 0.2*
Миокард				
Изопротеренол, 10^{-5} M	73 ± 7	64 ± 4*	2.9 ± 0.5	2.5 ± 0.5
Норадреналин, 10^{-5} M	50 ± 3	42 ± 4*	3.3 ± 0.3	2.3 ± 0.3*
Релаксин, 10^{-8} M	109 ± 5	57 ± 3*	3.2 ± 0.5	1.6 ± 0.3*
Семенники				
ХГЧ, 10^{-8} M	118 ± 10	45 ± 7*	2.3 ± 0.4	0.6 ± 0.2*
PACAP-38, 10^{-7} M	46 ± 3	31 ± 4*	1.1 ± 0.2	0.7 ± 0.1*

Примечание: * — различия между контрольными и диабетическими крысами достоверны при $P < 0.05$. #, пмоль цАМФ/мин на мг мембранного белка, ## пмоль [8-^{3}H]-GppNHp/мг мембранного белка.

Таблица 4

ИНГИБИРУЮЩИЕ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗУ ЭФФЕКТЫ ГОРМОНОВ В ТКАНЯХ ДИАБЕТИЧЕСКИХ И КОНТРОЛЬНЫХ КРЫС И СТИМУЛЯЦИЯ ИМИ ГТФ-СВЯЗЫВАНИЯ (*M* ± *SD*)

Гормон	Ингибирование стимулирующего АЦ эффекта форсколина #		Повышение ГТФ-связывания над базальным уровнем ##	
	Контроль	Диабет	Контроль	Диабет
Мозг				
5-HOT, 10^{-5} M	66 ± 3	85 ± 4*	2.2 ± 0.3	0.6 ± 0.2*
Бромокриптин, 10^{-5} M	73 ± 3	85 ± 3*	1.5 ± 0.3	0.9 ± 0.2*
Соматостатин, 10^{-6} M	59 ± 3	74 ± 4*	2.5 ± 0.3	1.7 ± 0.2*
Миокард				
Норадреналин, 10^{-5} M	59 ± 4	64 ± 5*	2.8 ± 0.3	2.4 ± 0.4*
Соматостатин, 10^{-6} M	55 ± 3	67 ± 3*	1.6 ± 0.2	1.1 ± 0.2*
Семенники				
Соматостатин, 10^{-6} M	72 ± 3	88 ± 5*	0.8 ± 0.2	0.3 ± 0.1*

Примечание: * — различия между контрольными и диабетическими крысами достоверны при $P < 0.05$. #, процент от стимулирующего АЦ эффекта форсколина (10^{-5} M), который в отсутствие гормона принят за 100 %, ## пмоль [8-^{3}H]-GppNHp/мг мембранного белка.

жен в сравнении с контролем на 56 %, стимуляция ГТФ-связывания — на 73 %. Эти результаты свидетельствуют о значительном ослаблении передачи ингибирующего АЦ сигнала в различных по генезу и функциям тканях диабетических крыс.

Обсуждение

В последние годы появилось много свидетельств о тесной взаимосвязи между возникновением нарушений в гормональных сигнальных системах на ранних стадиях Т1СД и дальнейшим развитием осложнений этого заболевания [1, 4, 5, 14]. Однако информация о таких нарушениях охватывает лишь небольшой круг сигнальных систем, гормонов, тканей и моделей экспериментального Т1СД. В связи с этим проведенное нами исследование, которое посвящено изменениям, возникающим на ранних стадиях стрептозотоцинового Т1СД в АЦСС, и охватывает широкий спектр гормонов и тканей существенно расширяет имеющиеся в настоящее время представления о молекулярных причинах осложнений Т1СД.

В мозге крыс с Т1СД обнаружено ослабление как стимулирующих, так и ингибирующих активность АЦ гормональных сигналов. Изменения в стимулирующих АЦ сигнальных каскадах характеризуются гормональной и рецепторной специфичностью, в то время как регулируемые различными по природе гормонами ингибирующие АЦ каскады ослабляются примерно в одинаковой степени. Так стимулирующие АЦ эффекты EMD-386088 и 8-OH-DPAT, которые активируют сопряженные с G_s-белками СР 6-го и 7-го типов, при Т1СД снижались слабо, в то время как АЦ эффект серотонина. неселективного агониста СР, снижался более чем в два раза. Эти результаты свидетельствует о том, что при Т1СД в мозге диабетических крыс в основном ослабляются функции сопряженных с G_s-белками СР 4-го типа, которые наряду с СР 6-го и 7-го типов являются мишенями действия серотонина. Ослабление функционирования серотонинергической системы мозга при стрептозотоциновом Т1СД является ключевым фактором, вызывающим характерное для этой модели заболевания нарушение когнитивных функций [4, 7]. Значительное снижение стимулирующих АЦ эффектов релаксина и PACAP-38, которое было более выражено в сравнении с таковым серотонина, как мы полагаем, лежит в основе нарушений роста, регенерации и дифференцировки нейрональных и глиальных клеток мозга (PACAP-38), а также нарушений микро- и макроциркуляции крови в диабетическом мозге (релаксин). При этом стимулирующий АЦ эффект дофамина при Т1СД не менялся, а незначительное снижение стимуляции дофамином ГТФ-связывания, как мы полагаем, связано с ослаблением функции G_i-белков, которые также являются мишенями его действия, в пользу чего свидетельствуют наши данные о существенном ослаблении ингибирующего активность АЦ и стимулирующего ГТФ-связывание эффектов бромокриптина, агониста G_i-сопряженных D_2-дофаминовых рецепторов.

В миокарде диабетических крыс было выявлено отчетливо выраженное нарушение функций АЦСС, что выражалось в повышении базальной активности АЦ, снижении базального уровня ГТФ-связывания, снижении стимуляции фермента гуаниновыми нуклеотидами, а также в ослаблении

регуляции АЦСС адренергическими агонистами и пептидными гормонами, причем в наибольшей степени при этом снижались регуляторные эффекты полипептидных гормонов — релаксина и соматостатина. Чувствительность АЦ к адренергическим агонистам менялась не столь значительно, что, вероятно, связано с усилением в сердечной мышце диабетических крыс адаптационных процессов, направленных на компенсаторное восстановление в них функций регулируемой адренергическими агонистами АЦСС, в основе чего, как мы полагаем, лежит повышение экспрессии и изменение их паттерна α- и β-адренергических рецепторов. Существенное ослабление регуляторных эффектов релаксина может вносить значительный вклад в ослабление регуляции расслабления гладкой мускулатуры кровеносных сосудов, а также в дисбаланс сосудосуживающих и сосудорасширяющих влияний гормонов на сердечно-сосудистую систему в условиях Т1СД.

В наибольшей степени при Т1СД снижалась функциональная активность АЦСС в семенниках, о чем свидетельствует снижение базальной активности АЦ и базального уровня ГТФ-связывания, значительное ослабление стимулирующих АЦ эффектов гуаниновых нуклеотидов и форсколина, а также регуляторных эффектов полипептидных гормонов — гонадотропина, PACAP-38 и соматостатина, играющих ключевую роль в функционировании репродуктивной системы. При этом в значительной степени нарушались как стимулирующие, так и ингибирующие АЦ сигнальные каскады, что указывает на снижение активности обоих типов G-белков, G_s и G_i. Другие авторы в предстательной железе и семенных пузырьках крыс с Т1СД обнаружили снижение экспрессии и функциональной активности G_s- и G_i-белков, а также регуляции АЦ адренергическими агонистами и вазоактивным пептидом, функциональным и структурным гомологом PACAP-38 [15], что согласуется с нашими данными о системном ослаблении функций АЦСС в тканях и органах репродуктивной системы диабетических животных.

Таким образом, нами обнаружены изменения функциональной активности компонентов АЦСС в мозге, миокарде и семенниках крыс с 30-ти суточным стрептозотоциновым Т1СД, которые в наибольшей степени были выражены в семенниках. Для изменений в АЦСС, сопряженной с G_s-белками, характерны рецепторная и тканевая специфичность, в то время как изменения в АЦ сигнальных каскадах, сопряженных с G_i-белками, выявляются во всех изученных нами тканях и для различных по природе гормонов, ингибиторов АЦ, что, как мы полагаем, связано со снижением функциональной активности G_i-белков. Полученные нами результаты указывают на возникновение отчетливо выраженных изменений в цАМФ-зависимых сигнальных каскадах на ранних стадиях экспериментального Т1СД, что может быть одной из причин развития осложнений Т1СД со стороны нервной, сердечно-сосудистой и репродуктивной систем и должно учитываться при ранней диагностике, мониторинге и лечении Т1СД.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты № 12–04–00434 и 12–04–32034) и Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 8486).

Литература

1. *Altan V.M., Arioglu E., Guner S., Ozcelikay A.T.* The influence of diabetes on cardiac β-adrenoceptor subtypes // Heart Fail. Rev. — 2007. — Vol. 12. — P. 58–65.

2. *Maiese K., Morhan S.D., Chong Z.Z.* Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus // Curr. Neurovasc. Res. — 2007. — Vol. 4. — P. 63–71.

3. *Dobrin J.S., Lebeche D.* Diabetic cardiomyopathy: signaling defects and therapeutic approaches // Expert. Rev. Cardiovasc. Ther. — 2010. — Vol. 8. — P. 373–391.

4. *Shpakov A., Chistyakova O., Derkach K., Bondareva V.* Hormonal signaling systems of the brain in diabetes mellitus // In: Neurodegenerative Diseases (Ed. by R. C. Chang). — Rijeka, Croati: Intech Open Access Publishera, 2011. — P. 349–386.

5. *Schoeller E.L., Schon S., Moley K.H.* The effects of type 1 diabetes on the hypothalamic, pituitary and testes axis // Cell Tissue Res. — 2012. — Vol. 349. — P. 839–847.

6. *Snell-Bergeon J.K., Wadwa R.P.* Hypoglycemia, diabetes, and cardiovascular disease // Diabetes Technol. Ther. — 2012. — Vol. 14, Suppl. 1. — P. S51–S58.

7. *Sima A.A.* Encephalopathies: the emerging diabetic complications // Acta Diabetol. — 2010. — Vol. 47. — P. 279–293.

8. *La Vignera S., Condorelli R., Vicari E. et al.* Diabetes mellitus and sperm parameters // J. Androl. — 2012. — Vol. 33. — P. 145–153.

9. *Shpakov A.O., Chistyakova O.V., Derkach K.V. et al.* Intranasal insulin affects adenylyl cyclase system in rat tissues in neonatal diabetes // Central Eur. J. Biol. — 2012. — Vol. 7. — P. 33–47.

10. *Shpakov A.O., Derkach K.V., Chistyakova O.V. et al.* The brain adenylyl cyclase signaling system and cognitive functions in rat with neonatal diabetes under the influence of intranasal serotonin // J. Metab. Syndrome. — 2012. — Vol. 1.

11. *Шпаков А.О., Шпакова Е.А., Тарасенко И.И., Деркач К.В.* Рецепторная и тканевая специфичность действия пептидов, производных цитоплазматических участков рецепторов серпантинного типа // Биол. мембраны. 2011. — Т. 28. № 6. — С. 453–462.

12. *Shpakov A.O., Shpakova E.A., Tarasenko I.I. et al.* The peptides mimicking the third intracellular loop of 5-hydroxytryptamine receptors of the types 1B and 6 selectively activate G proteins and receptor-specifically inhibit serotonin signaling via the adenylyl cyclase system // Int. J. Pept. Res. Ther. — 2010. — Vol. 16. — P. 95–105.

13. *Шпаков А.О., Перцева М.Н., Гурьянов И.А., Власов Г.П.* Влияние пептидов, производных третьей цитоплазматической петли релаксинового рецептора 1 типа, на стимуляцию релаксином GTP-связывающей активности G-белков // Биол. мембраны. — 2005. — Т. 22. № 6. — С. 435–442.

14. *Shpakov A.O.* Alterations in hormonal signaling systems in diabetes mellitus: origin, causality and specificity // Endocrinol. Metab. Syndrome. — 2012. — Vol. 1. № 2. — DOI: 2161–1017–1-e106.

15. *Carmena M.J., Clemente C., Carrero I. et al.* G-proteins and β-adrenergic stimulation of adenylate cyclase activity in the diabetic rat prostate // Prostate. — 1997. — Vol. 33. — P. 46-54.

УЧАСТИЕ NA^+,K^+-АТФАЗЫ В КАСКАДНЫХ ПРОЦЕССАХ, ЗАПУСКАЕМЫХ ФАКТОРОМ РОСТА НЕРВОВА

В.А. Пенниайнен[1], А.В. Кипенко[1, 2], Е.В. Лопатина[1, 2], Б.В. Крылов[1]

[1] ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН
[2] ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Пенниайнен Валентина Альбертовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии возбудимых мембран ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, *Кипенко Анна Викторовна* — кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела экспериментальной физиологии и фармакологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, *Лопатина Екатерина Валентиновна* — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела экспериментальной физиологии и фармакологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, *Крылов Борис Владимирович* — профессор, доктор биологических наук, заместитель директора, заведующий лабораторией физиологии возбудимых мембран ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Контактная информация: ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, наб. Макарова, д.6, Санкт-Петербург, Россия, 199034. E-mail: evl1112@infran.ru (Лопатина Екатерина Валентиновна).

Резюме

Возможное участие Na^+,K^+-АТФазы в нейрит-стимулирующем эффекте ФРН (80 нг/мл) исследовали в присутствии ингибиторов Na^+, K^+-АТФазы уабагенина (10^{-5} М) или уабаина (10^{-8} М), влияющих в этих концентрациях главным образом на насосную функцию Na^+, K^+-АТФазы. Степень ингибирования роста нейритов сенсорных нейронов спинальных ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов при сочетанном влиянии ФРН и исследуемых агентов соответствовала значению индекса площади (ИП), зарегистрированному при введении в питательную среду одного уабагенина или уабаина. Эти данные свидетельствуют о том, что исследуемые агенты, ингибируя насосную функцию, действуют независимо от влияния ФРН. Специфическая модуляция другой, трансдукторной, функции Na^+, K^+-АТФазы с помощью сердечного гликозида уабаина (10^{-10} М) в концентрации, сопоставимой с эндогенной, приводило к незначительному статистически недостоверному снижению нейрит-стимулирующего эффекта по сравнению с действием одного ФРН. Таким образом, можно заключить, что в каскадных процессах, запускаемых ФРН, не участвует ни насосная, ни трансдукторная функции Na^+, K^+-АТФазы.

Ключевые слова: сердечные гликозиды, уабаин, уабагенин, сенсорные ганглии, фактор роста нервов, Na^+,K^+-АТФаза.

PARTICIPATION OF NA^+, K^+-ATPASE IN THE SIGNALING PATHWAYS TRIGGERRED BY THE NERVE GROWTH FACTOR

V.A. Penniyaynen[1], A.V. Kipenko[1, 2], E.V. Lopatina[1, 2], B.V. Krylov[1]

[1]Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia
[2]Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences, Makarova emb. 6, Saint Petersburg, Russia, 199034. E-mail: evl1112@infran.ru (Ekaterina V. Lopatina — Doctor of biology, Leading Researcher of Department of Experimental Physiology and Pharmacology).

УДК.576.3

Abstract

Possible participation of the Na^+,K^+-ATPase in the neurite-stimulating effect of the NGF (80 ng/ml) was investigated in the presence of ouabagenin (10^{-5} M) or ouabain (10^{-8} M). The agents in these concentrations mainly inhibit the pumping function of Na^+, K^+-ATPase. The combined application of NGF and these agents results in the same effects as independent application of NGF. These results indicate that NGF cascades are not under the control of pumping function of Na^+, K^+-ATPase. Square index was of the same value as it was registered for the separate application of ouabagenin (10^{-5} M) or ouabain (10^{-8} M). The other, the transducer function of Na^+, K^+-ATPase was specifically modulated due to application of low "endogenous" ouabain concentration (10^{-10} M). It results in insignificant decrease of neurite-stimulating effect comparing to independent NGF application. The data obtained indicated that neurite-stimulating effect of NGF is triggered by the independent activation of the NGF cascades and this effect is not coupled to the pumping or to the transducer function of Na^+, K^+-ATPase.

Key words: organotypic culture, sensory neuron ganglia, nerve growth factor, ouabain, ouabagenin, Na^+, K^+-ATPase.

Статья поступила в редакцию 01.11.13, принята к печати 15.11.13.

Одним из ключевых вопросов физиологии является изучение молекулярных механизмов регуляции роста, развития и жизнедеятельности нервных клеток. Особый интерес вызывает исследование Na^+,K^+-АТФазы, которая рассматривается не только как структура, осуществляющая активный транспорт ионов, но и как трансдуктор сигналов [1–4]. Эндогенные кардиотонические стероиды в наномолярных концентрациях участвуют в регуляции процессов клеточного роста и пролиферации [5, 6], запуская в ряде случаев и трансдукторную функцию Na^+,K^+-АТФазы [2]. На жизнедеятельность нервных клеток также оказывают влияние вещества с гуморальным действием, в частности, фактор роста нервов (ФРН) [7, 8].

Целью настоящего исследования было выявить возможное участие Na^+, K^+-АТФазы, ее насосной или трансдукторной функции, в тех каскадных процессах, которые запускаются фактором роста нервов.

Материалы и методы

Исследования проведены на 650 эксплантатах сенсорных ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов, культивируемых в чашках Петри при на подложках из коллагена в CO_2-инкубаторе (Sanyo) в течение 3-х суток при 36,5°C и 5 % CO_2. Питательная среда содержала 45 % раствора Хенкса, 40 % среды Игла с добавлением инсулина (0,5 ед./мл), глюкозы (0,6 %), глютамина (2мМ), гентомицина, 5 % куриного эмбрионального экстракта и 10 % фетальной сыворотки коровы [4]. Контрольные эксплантаты развивались в питательной среде стандартного состава. В экспериментальных чашках в культуральную среду добавляли ФРН, уабагенин и уабаин (реактивы фирмы «Sigma»). Для визуализации объектов использовали микроскоп «Axiostar Plus» (Carl Zeiss) и пакет программ для обработки изображений. Часть эксплантатов окрашивали витальным красителем акридиновым оранжевым (Sigma) и исследовали с помощью лазерного сканирующего микроскопа «LSM 710» (Carl Zeiss). Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Конфокальная микроскопия» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Для количественной оценки роста эксплантатов применяли морфометрический метод. Индекс площади (ИП) рассчитывали как отношение площади зоны роста эксплантата к исходной площади. Контрольное значение ИП принимали за 100 %. Статистическую обработку результатов проводили с помощью *t*-критерия Стъюдента.

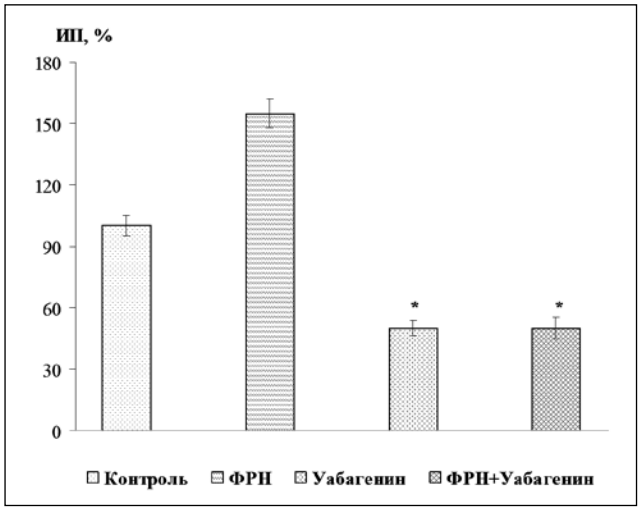
Результаты и их обсуждение

В период с 10-го по 12-ый день эмбриогенеза сенсорные нейроны спинальных ганглиев характеризуются высоким уровнем экспрессии высокоаффинных рецепторов к ФРН и отвечают максимальным ростом нейритов на введение этого фактора в питательную среду [7, 8].

Проведенные исследования показали, что ФРН в диапазоне концентраций 60 — 100 нг/мл стимулирует рост нейритов сенсорных нейронов. ФРН обладает максимальной нейрит-стимулирующей активностью в концентрации 80 нг/мл. В дальнейшем эта концентрация была выбрана для проведения исследования сочетанного действия ФРН и исследуемых агентов. ИП экспериментальных эксплантатов при воздействии ФРН в дозе 80 нг/мл был выше контрольного значения на 55 % (рис. 1).

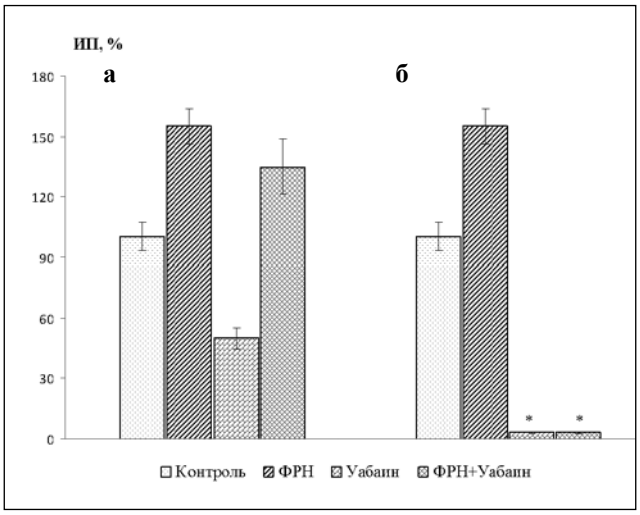
Для того, чтобы разделить возможное влияние насосной и трансдукторной функции Na^+,K^+-

Рисунок 1. Влияние ФРН (80 нг/мл) в присутствии убагенина (10^{-5} М) на рост нейритов сенсорных нейронов спинальных ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов (3-е суток культивирования)



Примечение: по оси ординат — индекс площади эксплантатов (ИП, %). * — достоверные различия относительно контрольных эксплантатов, $p < 0.05$.

Рисунок 2. Изменение индекса площади эксплантатов сенсорных ганглиев 10–12-дневных куриных эмбрионов, культивируемых в среде, содержащей ФРН (80 нг/мл) и уабаин 10^{-10} М (а) или 10^{-8} М (б)



Примечение: по оси ординат — индекс площади эксплантатов (ИП, %). * — различия достоверны относительно контрольных эксплантатов, $p < 0.05$.

АТФазы на рост нейритов при воздействии ФРН, были количественно исследованы нейрит-ингибирующие эффекты уабагенина и уабаина в относительно высоких концентрациях, которые согласно нашим предыдущим исследованиям влияют главным образом на насосную функцию Na^+,K^+-АТФазы [2]. Уабагенин в концентрации 10^{-5} М ингибировал рост нейритов сенсорных ганглиев на 50 %. При сочетанном действии ФРН (80 нг/мл) и уабагенина (10^{-5} М) нейрит-стимулирующий эффект ФРН отсутствовал (рис. 1). ИП был ниже контрольного значения на 50 %, как и в случае воздействия одного уабагенина. Таким образом, сочетанное воздействие исследованных агентов, один из которых блокирует насосную функцию Na^+,K^+-АТФазы, не приводит к их конкуренции. Можно заключить, что в этом случае стимулирующий рост нейритов эффект ФРН обусловлен его влиянием на собственные рецепторы, а не на Na^+,K^+-АТФазу.

Сочетанное действие ФРН (80 нг/мл) и сердечного гликозида уабаина в «эндогенной» концентрации позволило исследовать влияние ФРН не только на насосную, но и на трансдукторную функцию Na^+,K^+-АТФазы (рис. 2, а). Проведенные ранее исследования показали, что уабаин в концентрации 10^{-10} М ингибирует рост нейритов сенсорных ганглиев в среднем на 50 % благодаря его влиянию, главным образом, на трансдукторную функцию Na^+,K^+-АТФазы, а в концентрации 10^{-8} М он полностью блокирует рост нейритов, выключая насосную функцию фермента [2]. Совместное культивирование в среде, содержащей ФРН (80 нг/мл) и уабаин в концентрации, сопоставимой с эндогенной (10^{-10} М), незначительно снижало нейрит-стимулирующий эффект ФРН (рис. 2, а). Сочетанное действие исследованных агентов достоверно не отличалось от влияния одного ФРН. Это незначительное отличие обусловлено, видимо, тем, что даже в «эндогенных» концентрациях уабаин независимо проявляет свой нейрит-ингибирующий эффект благодаря модуляции трансдукторной, функции Na^+,K^+-АТФазы.

При введении в питательную среду ФРН (80 нг/мл) и сердечного гликозида уабаина в концентрации (10^{-8} М) наблюдали практически полное ингибирование роста нейритов, как и при воздействии одного уабаина (10^{-8} М) (рис. 2,б). Высокие действующие концентрации уабаина (10^{-8} М) и уабагенина (10^{-5} М) влияют на функцию помпы, а не на трансдукторную функцию Na^+,K^+-АТФазы.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что каскадные процессы, запускаемые фактором роста нервов, не связаны с теми внутриклеточными процессами, которые активируются выключением насосной и (или) благодаря модуляции трансдукторной функции Na^+,K^+-АТФазы.

Работа поддержана грантом РФФИ 11–04–00518-а.

Литература

1. *Крылов Б.В., Дербенев А.В., Подзорова С.А. и др.* Морфин уменьшает чувствительность к потенциалу медленных натриевых каналов // Российский Физиологический журнал. — 1999. — Т. 85, № 2. — С. 225–236.

2. *Lopatina E.V., Yachnev I.L., Penniyaynen V.A., et al.* Modulation of signal-transducing function of neuronal membrane Na^+,K^+-ATPase by endogenous ouabain and low-power infrared radiation leads to pain relief // Medicinal Chem. — 2012. — Vol. 8, № 1. — P. 33–39.

3. *Xie Z.* Ouabain interaction with cardiac Na/K-ATPase reveals that the enzyme can act as a pump and as a signal transducer // Cell Mol. Biol. — 2001. — Vol. 47. — P. 383–390.

4. *Xie Z., Askari A.* Na^+/K^+-ATPase as signal transducer // Eur. J. Biochem. — 2002. — Vol. 269, № 10. — P. 2434–2439.

5. *Bagrov A.Y., Shapiro J.I., Fedorova O.V.* Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets // Pharmacol. Rev. — 2009. — Vol. 61, № 1. — P. 9–38.

6. *Schoner W., Scheiner-Bobis G.* Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. — 2007. — Vol. 293, № 2. — P. C509–C536.

7. *Levi-Montalchini R., Angeletti P. U.* Nerve growth factor // Physiol. Rev. — 1968. — Vol. 48. — P. 534–569.

8. *Rohrer H., Barde Y.-A.* Presence and disappearance of nerve growth factor receptors on sensory neurons in culture // Dev. Biol. — 1982. — Vol. 89. — P. 309–315.

КРАТКОВРЕМЕННАЯ ВЕНТИЛЯЦИЯ КСЕНОНОМ В ПЕРВЫЕ МИНУТЫ РЕПЕРФУЗИИ НЕ ЗАЩИЩАЕТ МИОКАРД КРЫСЫ ОТ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ

Д.Л. Сонин[1, 2], Н.И. Енукашвили[2, 3], Д.В. Королёв[1, 2], М.М. Галагудза[1, 2]

[1] ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» МЗ РФ, филиал 1, Санкт-Петербург, Россия
[3] Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.
[4] НИЦ «Алгоритм», Санкт-Петербург, Россия

Сонин Дмитрий Леонидович — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник НИЛ Метаболизма миокарда Института экспериментальной медицины ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, ассистент кафедры патофизиологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова; *Натэлла Иосифовна Енукашвили* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории морфологии клетки Института Цитологии РАН, НИЦ «Алгоритм»; *Королёв Дмитрий Владимирович* — кандидат технических наук, заведующий НИЛ нанотехнологий ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Галагудза Михаил Михайлович* — доктор медицинских наук, руководитель Института экспериментальной медицины ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, профессор кафедры патофизиологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, ул. Аккуратова, д.2, Санкт-Петербург, 197341. E-mail: sonin_d@mail.ru (Сонин Дмитрий Леонидович).

Резюме

Проведённое экспериментальное исследование на крысах направлено на изучение действия кратковременной ингаляции ксенон-воздушной смеси (70–30 %) на выраженность ишемически-реперфузионного повреждения миокарда. Ингаляции 70 % ксенона начинались с последних трёх минут 30-минутной ишемии миокарда и продолжались первые 3 минуты реперфузии, с последующим возвращением на исходную газовую смесь (30 % кислорода и 70 % азота). Продолжительность вентиляции 70 % ксеноном составила 6 минут. Результаты свидетельствуют о том, что ксенон при кратковременной экспозиции вначале реперфузии не влияет на уровень тропонина крови и размер инфаркта миокарда крысы.

Ключевые слова: ксенон, кардиопротекция, ишемически-реперфузионное повреждение, тропонин.

LACK OF ACUTE CARDIOPROTECTIVE EFFECT FROM SHORT-TERM XENON VENTILATION IN THE FIRST FEW MINUTES OF REPERFUSION OF THE RAT MYOCARDIUM

D.L. Sonin[1, 2], N.I. Enukashvily[3, 4], D.V. Korolev[1, 2], M.M. Galagudza[1, 2]

[1] Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 197341, Saint-Petersburg, Russia
[2] First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Saint-Petersburg, Russia
[3] Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia
[4] Research center «Algorithm», Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratov str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: dsonin1203@yahoo.com. (Dmitry L. Sonin — PhD, senior researcher, laboratory of myocardial metabolism).

УДК.616.12-089:612.084

Abstract

We investigated the effects of xenon postconditioning on ischemia-reperfusion injury in the rat. Animals were ventilated with xenon-oxygen mixture (70–30 %) at the last 3 minutes of 30-minute myocardial ischemia, and the first 3 minutes of reperfusion (6 min total). Before and after the ventilation with xenon, they were ventilated with oxygen-nitrogen mixture (30–70 %). A control group of rats received oxygen-nitrogen mixture only (30–70 %). Xenon did not affect the level of troponin I and mean infarct size which were not significantly different between the groups. Although, the results of this study did not show cardioprotective effect of xenon, further studies will need to be undertaken to investigate cardioprotective potential of xenon.

Key words: Xenon, cardioprotection, ischemia-reperfusion injury, myocardial infarction, troponin.

Статья поступила в редакцию 01.11.13, принята к печати 15.11.13.

Введение

Ранняя реперфузия значительно снижает смертность от инфаркта миокарда (ИМ) и является ведущим методом борьбы с ишемическим повреждением миокарда [1]. Успешно выполненная ранняя реваскуляризация предотвращает некроз 50 % ишемизированного миокарда [2]. Однако, в случае большого объёма повреждения или возникновения феномена постишемического невосстановления кровотока (no-reflow) объём повреждения существенно увеличивается [3]. Недавний ретроспективный анализ 10 крупных исследований, в которых проводилась реваскуляризация миокарда у пациентов с инфарктом миокарда, показал, что у четверти пациентов объем инфаркта после реперфузионной терапии был больше, чем 75 % от зоны риска [2]. Эти результаты дают основания для поиска новых способов терапевтической кардиопротекции, направленных на ограничение ишемически-реперфузионного повреждения и последующего ремоделирования миокарда.

В исследовании зависимости характера болевого синдрома от объёма инфаркта, определённого по уровню маркеров повреждения было показано, что при обширных поражениях степень выраженности болевого синдрома выше [4]. Рекомендации по диагностике и лечению больных острым инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST ЭКГ предписывают в случае кардиалгии как можно скорее и эффективнее купировать болевой синдром. С этой целью применяются наркотические анальгетики, а при их недостаточной эффективности — другие виды анальгезии, включая ингаляционный наркоз. Из последнего наиболее часто используется закись азота (N_2O) [5].

N_2O широко применяется в хирургии в сочетании с наркотическими анальгетиками или ингаляционными анестетиками, за исключением оперативных вмешательств у пациентов с атеросклеротическим поражением коронарного русла из-за возможного негативного влияния на коронарный кровоток и насосную функцию сердца [5, 6]. Этого ограничения нет у ксенона (Xe), который в последние годы широко внедряется в анестезиологическую практику в России и рассматривается как идеальный анестетик во многом благодаря хорошей управляемости, отсутствию токсичности и угнетения сердечно-сосудистой системы [7]. При этом содержание ксенона во вдыхаемой смеси может составлять 70 % [8], а высокие концентрации Xe в крови пациента достигаются уже на второй минуте ингаляции [9]. В недавнем сравнительном исследовании показателей центральной и периферической гемодинамики во время операций у женщин по поводу рака молочной железы, было установлено, что комбинированная Xe-анестезия имеет преимущество перед комбинированной N_2O — анестезией [10]. N_2O постепенно понижала, а Xe повышал сниженную систолическую функцию сердца при мастэктомии у онкологических больных, получивших перед операцией лучевую и химиотерапию.

Известно, что анальгетический эффект Xe более мощный, чем у N_2O [11], хотя и опосредуется, по мнению большинства исследователей, также — блокадой NMDA-рецепторов [7]. Следует отметить, что свойство блокировать NMDA-рецепторы может объяснять экспериментально устанвленные нейропротективные свойства Xe [11]. Это свойство Xe используется в нейрохирургии [10, 11], поскольку известно, что в патогенезе нейронального повреждения активация NMDA-рецепторов играет решающую роль [12].

Несмотря на высокую цену и необходимость приобретения специального наркозного оборудования, Xe востребован в анестезиологии в случаях, когда имеется высокий риск интра- и послеоперационных осложнений. В литературе описаны случаи успешного проведения анестезии при операциях с искусственным кровообращением и у пациентов с тяжёлой сердечной недостаточностью [6, 13]. В экспериментальных исследованиях установлены кардиопротективные свойства Xe, механизм которых

точно не определён [11, 14, 15]. У нескольких видов животных ксеноновая ингаляция, как до ишемии, так и после нее приводила к ограничению выраженности ишемически-реперфузионного повреждения [16]. Особый интерес, с прикладной точки зрения, представляет исследование Preckel et al (2000), в котором было показано, что ингаляция Xe в первые 15 минут реперфузии у кроликов уменьшает объём зоны некроза на 24 % [14]. Трансляционный барьер данного протокола может заключаться в выбранной продолжительности времени ингаляции Xe. Сокращение времени ингаляции может быть оправдана по нескольким причинам, основная из которых — это короткое терапевтическое временное «окно» посткондиционирования, которое начинается сразу от момента реперфузии и длится около одной минуты [1]. В связи с этим возникает вопрос: будет ли эффективен Xe в качестве средства для фармакологического посткондиционирования при кратковременной ингаляции в течение первых минут реперфузии. Цель данной работы заключалась в изучении влияния кратковременной ингаляции ксенон-кислородной смеси (70–30 %) на выраженность ишемически-реперфузионного повреждения миокарда в острых опытах на крысах.

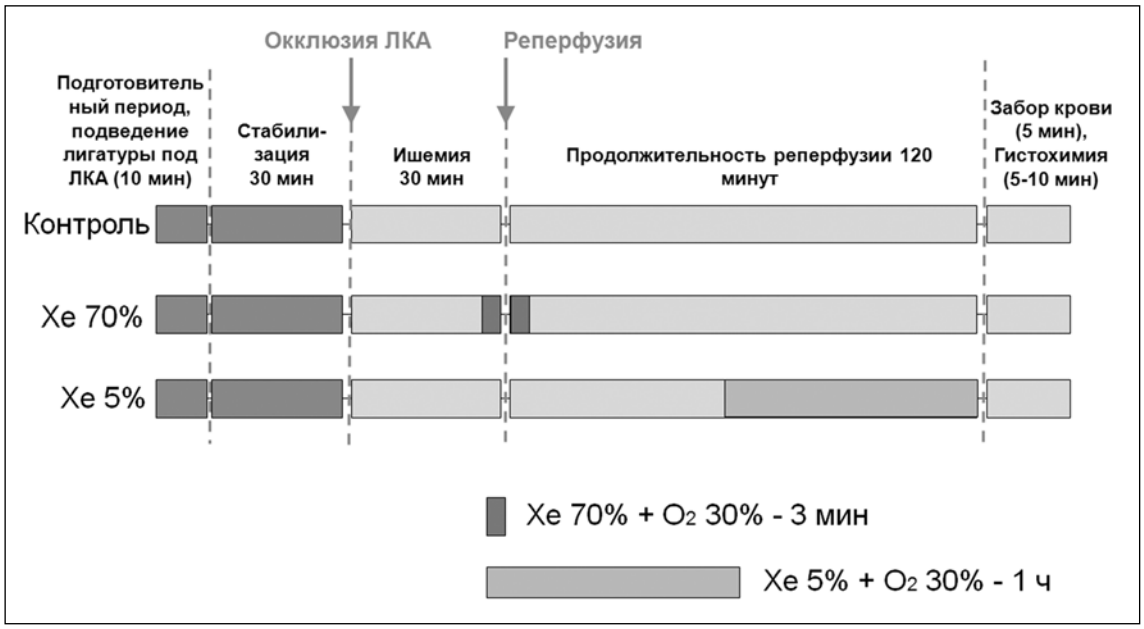
Материалы и методы.

1. **Протокол исследования.** Исследование было проведено на 20 крысах — самцах линии Вистар массой 240–260 г, которые находились на стандартном пищевом рационе и получали воду ad libitum. Животные были рандомизированы на три группы:

1) Контрольная группа (n = 8). В данной группе, как и во всех последующих, осуществлялась 30-минутная окклюзия ЛКА с последующей 2-х часовой реперфузией. 2) Группа «Xe 70 %» (n = 6). Вентиляция ксенон-кислородной смесью (70 % Xe + 30 % O2) начиналась с последних трёх минут 30-минутной ишемии миокарда и продолжалась первые 3 минуты реперфузии (всего 6 минут), с последующим замещением Xe на азот в ингаляционной смеси. 3) Группа «Xe 5 %» (n = 6). Ингаляция смесью Xe 5 %+ O_2 30 %+ 65 % N2 начиналась на втором часе реперфузии и продолжалась 60 минут до окончания реперфузии (см. рис. 1).

2. Метод моделирования локальной ишемии/реперфузии. Животных анестезировали однократным внутрибрюшинным введением тиопентала натрия (60 мг/кг). В течение всего эксперимента животные находились на термостатируемом операционном столике, обеспечивающем поддержание температуры тела на уровне 37,0 ± 0,5°C. После начала искусственной вентиляции через трахеостому (частота дыхания — 60/мин, дыхательный объем — 3 мл/100 г массы тела, CWE-SAR-830/AP, World Precision Instruments, Inc, США) для поддержания анестезии выполняли катетеризацию бедренной вены. Для мониторирования артериального давления (АД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) выделялась и катетеризировалась общая сонная артерия. В артерию вводилась полиэтиленовая трубка (PE-50, Intramedic, США), которая соединялась с миниатюрным датчиком давления (Baxter, США). Гемодинамические параметры регистрировалось на компьютере с помощью программного обеспечения PhysExp (ООО «Кардиопротект», Россия). В ходе экспериментов осуществлялась непрерывная регистрация

Рисунок 1. Протокол исследования



электрокардиограммы (Кардиотехника-ЭКГ-8, ЗАО «Инкарт», Санкт-Петербург).

Для моделирования ИМ у крысы выполнялась левосторонняя торакотомия в четвёртом межреберье слева. Тупым способом вскрывали перикард, определяли локализацию общего ствола левой коронарной артерии (ЛКА), под который с помощью атравматической иглы (6–0) подводили тонкую полипропиленовую лигатуру. Обратимая ишемия миокарда создавалась путём формирования окклюдера из полиэтиленовой трубки (PE-90, Intramedic, США). Концы лигатуры пропускались через окклюдер, чтобы при смещении его вниз лигатура сдавливала ЛКА, а накладывание зажима на окклюдер предотвращало его обратное смещение. Ишемию миокарда инициировали через 30 минут после окончания хирургических манипуляций и стабилизации показателей гемодинамики. Мониторирование гемодинамических параметров проводилась в течение всего эксперимента, а регистрация выполнялась после завершения манипуляций на сердце, непосредственно перед 30-минутной окклюзией, спустя 15 минут после окклюзии, вначале реперфузии (на 5-й минуте) и затем каждые 30 минут до окончания эксперимента.

2. Подготовка плазмы крови для анализа крови на содержание тропонина I. После окончания периода реперфузии у всех животных забирали 1 мл артериальной крови для анализа на содержание тропонина I. Кровь собиралась в вакутейнеры (Vacuette, Greiner Bio-One GmbH, Австрия) и центрифугировалась для получения плазмы крови, которая хранилась до анализа при -20ºС.

Газовый состав крови и кислотно-основное состояние (КОС) оценивались как минимум четыре раза в ходе эксперимента: перед ишемией миокарда, в ходе ишемии, в первые 10–20 минут от начала реперфузии и через 1 час от начала реперфузии. Для определения газов крови и КОС использовался радиометр ABL800 FLEX (Дания).

3. **Методика определения размера анатомической зоны риска и зоны инфаркта.** Оценку размеров анатомической зоны риска и зоны инфаркта производили с помощью методики «двойного окрашивания» синим Эванса и трифенилтетразолием хлоридом (ТТС) (ICN Pharm., США). По завершении реперфузии вокруг ЛКА вновь затягивали лигатуру и внутривенно вводили 3 мл 1 % раствора синего Эванса. После визуализации границы между кровоснабжаемыми и ишемизированными отделами сердце быстро вырезали и готовили пять поперечных срезов одинаковой толщины (2 мм). Изображения базальных поверхностей пяти срезов сканировали для последующего определения площади анатомической зоны риска (Эванс-негативные участки) и неишемизированного миокарда (Эванс-позитивные участки). Расчет площадей осуществляли на компьютере с помощью программы ImageJ (http://rsbweb.nih.gov/ij/). Размер зоны риска определяли отношением площадей Эванс-негативных участков к общим площадям срезов (в процентах). Затем срезы сердца помещали в 1 % раствор ТТС на 15 мин при температуре инкубации 37°С. После чего изображения базальных поверхностей срезов сканировали повторно и рассчитывали площади зоны некроза (ТТС-негативные участки, находящиеся в пределах зоны риска). Размер зоны некроза рассчитывали как отношение площадей ТТС-негативных участков к площадям Эванс-негативных участков (в процентах).

4. Подготовка газовых смесей и их подача в вентилятор. Смеси Хе с кислородом были подготовлены ЗАО «Научные приборы» (Санкт-Петербург). Для предотвращения перегрузки вентилятора (CWE-SAR-830/AP, World Precision Instruments, Inc, США) высоким давлением, редуктор баллона соединялся с вентилятором через автоматический клапан, регулируемый таймером, при этом между вентилятором и автоматическим клапаном (FESTO) располагался резиновый резервуар, служивший накопителем газовой смеси, поступавшей из баллона. Таким образом, газовая смесь поступала в вентилятор не напрямую из баллона, а из резинового резервуара, постоянно пополняемого из баллона через автоматический клапан. При переключении с одной смеси на другую, газы из накопителя быстро удалялись путём сдувания резинового накопителя через отводной кран. Быстрому переключению с одной газовой смеси на другую способствовало предварительное соединение всех необходимых баллонов с готовыми смесями с помощью полиуретановых трубок PUN-H производства FESTO, имеющих разделительные краны. Уровень содержания компонентов газовых смесей оценивался при помощи газового хроматографа производства фирмы Agilent Technologies (США) с масс-спектрометрическим детектором.

Гемодинамические и биохимические данные, а также размеры зон риска и некроза представляли в виде «среднее ± стандартное отклонение». Статистический анализ был выполнен с использованием теста Манна-Уитни. $P < 0.05$ считали достоверным

Результаты

Процентное содержание кислорода в вентилируемых газовых смесях было выбрано на основе результатов пилотных экспериментов, которые выявили преимущества использования кислородно-воздушной смеси при моделировании ИМ у крыс. Установлено, что в условиях искусственной вентиляции лёгких комнатным воздухом АД и ЧСС значительно ниже, чем при вентиляции кислородно-воздушной смесью с объёмным содержанием кислорода 30 %, что соответствует ранним наблюдениям [17]. Согласно литературным источникам, после 30-минутной окклюзии коронарной артерии крысы зона некроза должна составлять 50–60 % от зоны риска [18]. Данные величины были получены в пилотных экспериментах у крыс, которых вентилировали кислородно-воздушной смесью, в то время как у крыс получавших комнатный воздух средний размер инфаркта и уровень тропонина I были существенно меньше.

Гемодинамика. Исходные уровни среднего АД не различались между группами основного этапа исследования (табл. 1). Имеются достоверные различия в исходной частоте сердечных сокращений между контрольной группой и группой «Хе 70», что может говорить о немного более выраженной начальной реакции на наркоз у нескольких животных контрольной группы на момент начала эксперимента. В дальнейшем, до 90-й минуты реперфузии, различий между группами в гемодинамических параметрах не было. Во время реперфузии у всех животных наблюдалось закономерное снижение

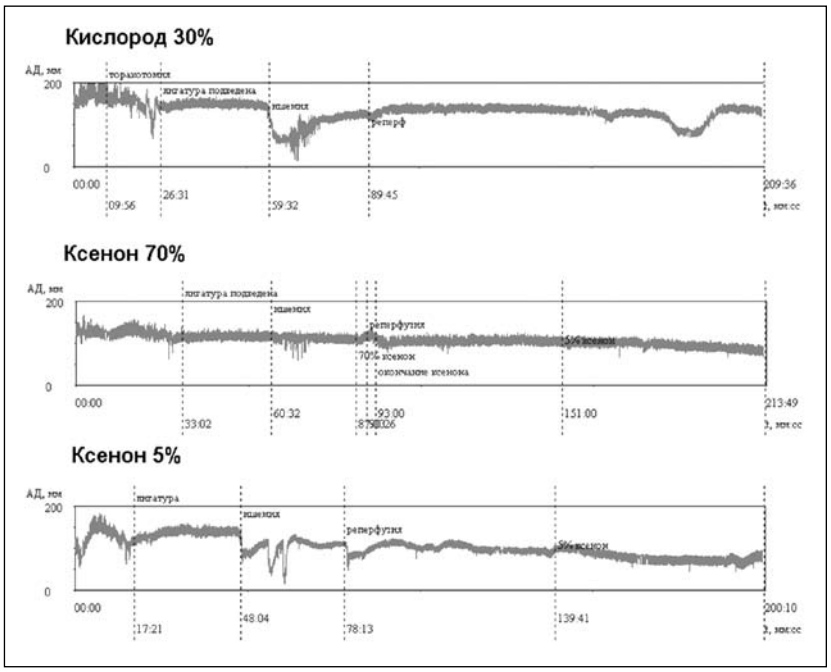
Таблица

ГЕМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ В ХОДЕ ЭКСПЕРИМЕНТА

		Контроль N = 8		Ксенон 70 % N = 6		Ксенон 5 % N = 6	
		АД	ЧСС	АД	ЧСС	АД	ЧСС
Исходные значения		122,9±17,1	360,5±21,6	124,8±19,0	402,3±21,4*	133,6±25,5	401,7±19,2
Ишемия	15 мин.	96,2±24,5	361,1±45,8	102,0±16,6	391,3±40,6	115,7±18,2	367,3±35,0
Реперфузия	5 мин.	106,6±15,8	335,5±46,2	100,7±18,9	374,7±44,3	93,0±23,2	378,5±15,2
	30 мин.	109,4±15,2	339,4±43,4	101,0±20,2	382,3±46,5	102,8±22,6	368,0±10,6
	60 мин.	100,4±18,8	319,5±45,2	99,0±10	369,7±46,2	96,6±20,3	362,0±23,0
	90 мин.	96,5±16,5	308,1±22,1	85,5±12,9	354,2±55,9	73,8±8,0*	320,7±13,3
	120 мин.	85,8±23,4	298,4±40,0	86,7±10,7	363,3±67,8	82,1±25,4	325,0±33,0

Примечание: АД — артериальное давление, ЧСС — частота сердечных сокращений, * — $p < 0,05$ в сравнении с соответствующим значением в группе Контроль

Рисунок 2. Запись артериального давления программно-аппаратным комплексом PhysExp



уровня АД. К 90-й минуте реперфузии в группе «Xe 5 %», на фоне вентиляции Xe, АД снизилось больше, чем в контрольной группе.

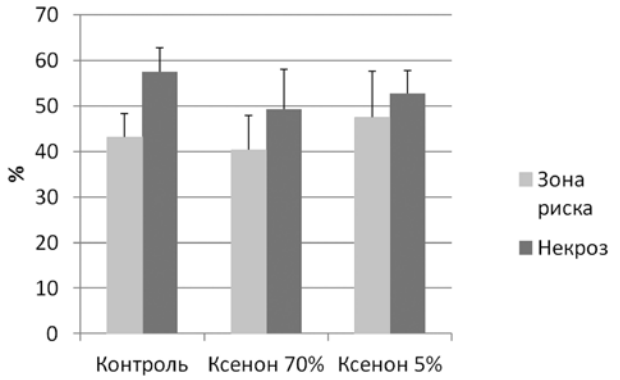
У трёх из шести животных в группе «Xe 70 %» переключение вентиляции на 70 % Xe + 30 % O_2 сопровождалось кратковременным повышением АД на 10 мм рт. ст. (см. рис. 2). Гипертензивная реакция была непродолжительной, и через 3–6 минут АД восстанавливалось до исходных значений.

При мониторировании ЭКГ не было выявлено каких-либо различий в исследуемых группах. Xe не влиял на частоту сердечных сокращений, характер ЭКГ и не вызывал нарушений ритма.

Результаты гистологического анализа

Хотя средний размер зоны риска в группе «Xe 5 %» был немного больше, чем среднее значение этого параметра в двух других группах, достоверно этот параметр не различался между группами: Контроль — 43,20 ± 5,07, «Xe — 70 %» — 40,36 ± 7,56 и «Xe 5 %» — 47,47 ± 10,20. Размеры зоны некроза также не различались между группами (57,53 ± 5,32, 49,33 ± 8,73 и 52,70 ± 5,02, соответственно), что свидетельствует об отсутствии или незначительном влиянии Xe на ишемически-реперфузионное повреждение (см. рис. 3).

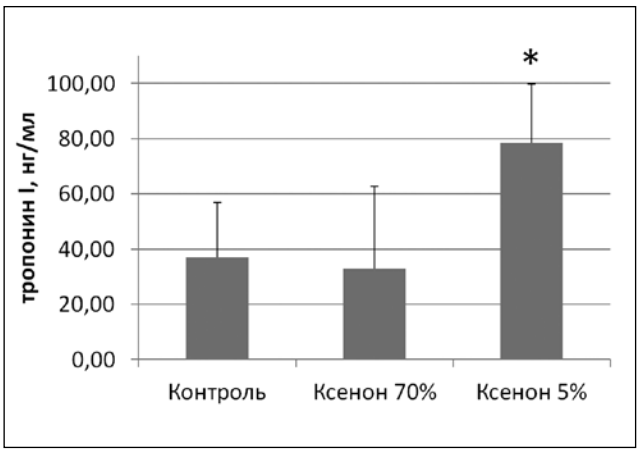
Рисунок 3. Сравнительный анализ зоны риска и зоны некроза



Уровень тропонина I крови и кислотно-основное состояние. Уровень тропонина был достоверно выше в группе «Xe 5 %» по сравнению с двумя другими группами (см. рис. 4). Тогда как между группой Контроль и «Xe 70 %» различий в содержании тропонина крови найдено не было (36,92 ± 19,96, 32,93 ± 29,82 и 78,55 ± 21,26, соответственно).

В ходе экспериментов газовый состав крови и pH у всех животных находились в пределах нормальных значений.

Рисунок 4. Результаты анализа крови на содержание тропонина I



Примечание: * — $p < 0,05$ в сравнении с группой Контроль и Ксенон 70 %.

Обсуждение

Отсутствие различий средних значений зон некроза и уровня тропонина I между контрольной группой и группой «Xe 70 %» свидетельствуют о том, что кратковременная ингаляция Xe-O_2 смеси (70–30 %) в первые три минуты репрефузии не влияет на размер ишемически-реперфузионного повреждения. Полученный нами результат не согласуется с ранее полученным Preckel et al (2000) кардиопротективным эффектом Xe у кроликов. Вероятной причиной данного несоответствия являются видовые различия. Сравнить полученные результаты с аналогичным исследованием у крыс на сегодняшний день не представляется возможным, поскольку это первая работа, описывающая Xe посткондиционирование у крыс *in vivo*.

Хотя в нашем исследовании ингаляция Xe продолжалась не 15 минут, как в работе Preckel et al (2000), а 3 минуты, маловероятно, что именно это различие является причиной неэффективности Xe посткондиционирования у крыс. По данным литературы время, в которое возможно осуществить терапевтическую кардиопротекцию, длится около одной минуты от начала реперфузии [1] и задержка с началом терапевтического воздействия ведёт к неэффективности проводимых мероприятий.

В литературе есть описания инфаркт-лимитирующего эффекта анестезии Xe у свиней [19] и более раннее сообщение о положительном эффекте анестезии Xe на восстановление станированного миокарда у собак [15]. В перечисленных исследованиях животных вентилировали Xe как до, так и после моделирования регионарной ишемии-реперфузии, следовательно, имели место как профилактическое, так и терапевтическое воздействия

Xe, что затрудняет сравнение с настоящим исследованием. Следует отметить, что в исследовании Baumert et al. (2007) прекондиционирование Xe у свиней не оказало инфаркт-лимитирующего эффекта, однако, анестезия Xe, которая продолжалась и после начала реперфузии, обеспечила небольшой, но достоверный инфаркт-лимитирующий эффект [19]. Эти результаты свидетельствуют о возможных различиях в молекулярных механизмах прекондиционирования и посткондиционирования. Кроме того, это исследование выявило видовые различия в реализации ксенонового прекондиционирования. Так, в отличие от свиней, у крыс прекондиционирование Xe было доказано неоднократно разными авторами [16].

Вентиляция 5 % Xe на втором часе реперфузии также не оказала влияния на величину зоны некроза миокарда. Увеличение содержания тропонина I в этой группе возможно вызвано немного большим размером зоны риска, чем в контроле. По этой же причине в группе «Xe 5 %» наблюдалось небольшое, но достоверное снижение среднего АД на 90-й минуте. Такого снижения не было отмечено на протяжении всех двух часов реперфузии в группе «Xe 70 %».

В целом, закономерное снижение среднего АД наблюдалось во всех группах. Ранее было замечено постепенное повышение сократимости миокарда при комбинированной анестезии 65 % Xe у женщин с компрометированным миокардом [10]. В настоящем наблюдении мы не получили различий в уровне АД к концу реперфузии между группой «Xe 70 %» и контрольной группой. Очевидно, стабилизация АД в группе «Xe 70 %» не наступила из-за сравнительно низкой остаточной концентрации Xe в тканях животных в остальное время реперфузии.

Несмотря на то, что в данной работе не получено подтверждения инфаркт-лимитирующего эффекта ксенонового посткондиционирования, необходимы дальнейшие исследования в этом направлении, с учётом возможных видовых различий. Экспериментальные исследования влияния Xe на выраженность ишемически-реперфузионного повреждения могут быть полезными для выбора ингаляционного анестетика в целях дополнительного обезболивания при остром инфаркте миокарда, проведении тромболизиса или чрескожного коронарного вмешательства.

Заключение

Результаты свидетельствуют о том, что кратковременная вентиляция высокой концентрацией Xe в начале реперфузии не влияет на размер ИМ крысы. Однако, учитывая видовые различия в реализации кардиопротективного эффекта Xe, не исключено, что инфаркт-лимитирующей эффект Xe посткондиционирования может быть получен у других видов животных.

Литература

1. *Шляхто Е.В., Петрищев Н.Н., Галагудза М.М. и др.* Кардиопротекция: фундаментальные и клинические аспекты. — СПб.: ООО Студия «НП-Принт», 2013. — 399 с.

2. *Miura T., Miki T.* Limitation of myocardial infarct size in the clinical setting: current status and challenges in translating animal experiments into clinical therapy // Basic. Res. Cardiol. — 2008. — Vol. 103, № 6. — P. 501–513.

3. *Torabi A., Cleland J.G., Khan N.K. et al.* The timing of development and subsequent clinical course of heart failure after a myocardial infarction // Eur. Heart. J. — 2008. — Vol. 29, № 7. — P. 859–870.

4. *Sederholm M., Grøttum P., Kjekshus J. et al.* Course of chest pain and its relation to CK release and ST/QRS vector changes in patients with acute myocardial infarction randomized to treatment with intravenous timolol or placebo // Am. Heart. J. — 1985. — Vol. 110, № 3. — P. 521–528.

5. *Провоторов В.М., Барташевич Б.И., Усков В.М.* Обезболивание при инфаркте миокарда // Российский кардиологический журнал. — 2000. — № 3. — С. 60–64.

6. *Рылова А.В., Соленкова А.В., Лубнин А.Ю. и др.* Успешный опыт ксеноновой анестезии у пациента с дилатационной кардиомиопатией и интрамедуллярной опухолью спинного мозга // Анестезиология и реаниматология. — 2009. № 6. С. 54–58.

7. *Вяткин А.А., Мизиков В.М.* Ксенон в анестезиологии: достоинства и недостатки, реальность и перспективы // Анестезиология и реаниматология. — 2008. — № 5. — С. 103–107.

8. *Cullen S.C., Eger II EI, Cullen B.F. et al.* Observations on the anesthetic effect of the combination of xenon and halothane // Anesthesiology. — 1969. — № 31. — P. 305–309.

9. *Obrist W.D., Thompson H.K. Jr., King C.H. et al.* Determination of regional cerebral blood flow by inhalation of 133-Xenon // Circulation Research. — 1967. — № 20. — P. 124–135.

10. *Николаев Л.Л., Антонов А.А., Буров Н.Е.* Гемодинамика при комбинированной ксеноновой анестезии // Медицинский алфавит. — 2012. — № 3. — С. 81–84.

11. *Генов П.Г., Смирнова О.В., Тимербаев В.Х.* Ксенон для послеоперационного обезболивания. А почему бы и нет? // Анестезиология и реаниматология. — 2011. — № 3. — С. 74–77.

12. *Шпаков А.О., Гурьянов И.А., Кузнецова Л.А. и др.* Использование С-концевых пептидов □-субъединиц G-белков для исследования их функционального сопряжения с рецепторами биогенных аминов в тканях крыс и моллюсков // Биол. мембраны. — 2004. — Т. 21, № 6. — С. 441–450.

13. *Lockwood G.G., Franks N.P., Downie N.A. et al.* Feasibility and safety of delivering xenon to patients

undergoing coronary artery bypass graft surgery while on cardiopulmonary bypass // Anesthesiology. — 2006. — № 104. — P. 458–465.

14. *Preckel B., Müllenheim J., Moloschavij A. et al.* Xenon administration during early reperfusion reduces infarct size after regional ischemia in the rabbit heart in vivo // Anesth. Analg. — 2000. — Vol. 91, № 6. — P. 1327–1332.

15. *Hartlage M.A., Berendes E., Van Aken H. et al.* Xenon improves recovery from myocardial stunning in chronically instrumented dogs // Anesth. Analg. — 2004. — Vol. 99, № 3. — P. 655–664.

16. *Pagel P.S.* Cardioprotection by noble gases // J. Cardiothorac. Vasc. Anesth. — 2010. — № 1. — P. 143–163.

17. *Horstick G., Berg O., Heimann A. et al.* Surgical procedure affects physiological parameters in rat myocardial ischemia: need for mechanical ventilation. // Am. J. Physiol. — 1999. — Vol. 276(2 Pt2). — P. H472–479.

18. *Kerendi F., Kin H., Halkos M.E. et al.* Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors // Basic. Res. Cardiol. — 2005. — Vol. 100, № 5. — P. 404–412.

19. *Baumert J.H., Hein M., Gerets C. et al.* The effect of xenon anesthesia on the size of experimental myocardial infarction // Anesth. Analg. — 2007. — Vol. 105, № 5. — P. 1200–1206.

ЭФФЕКТ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОСТКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ HIF-1α ПРИ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС

Н.С. Щербак[1, 2], М.М. Галагудза[1, 2], О.В. Бещук[1], Д.А. Овчинников[1], Л.Б. Митрофанова[1], Е.Р. Баранцевич[1, 2], Е.В. Шляхто[1, 2]

[1] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия
[2] ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

Щербак Наталия Сергеевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института сердечно-сосудистых заболеваний ПСПбГМУ им. И.П. Павлова; ведущий научный сотрудник лаборатории нанотехнологий Института экспериментальной медицины ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Галагудза Михаил Михайлович* — доктор медицинских наук, руководитель Института экспериментальной медицины ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, профессор кафедры патофизиологии ПСПбГМУ им. И.П. Павлова; *Бещук Ольга Владимировна* — младший научный сотрудник лаборатории патоморфологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Овчинников Дмитрий Александрович* — лаборант-исследователь Института экспериментальной медицины ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Митрофанова Любовь Борисовна* — доктор медицинских наук, заведующая лабораторией патоморфологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Баранцевич Евгений Робертович* — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой неврологии и мануальной медицины ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, заведующий НИО ангионеврологии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Шляхто Евгений Владимирович* — доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, директор ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, заведующий кафедрой факультетской терапии ПСПбГМУ им. И.П. Павлова.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: shcherbakns@yandex.ru (Щербак Наталия Сергеевна).

Резюме

Ишемическое посткондиционирование (ИПостК) — эндогенный способ цитопротекции. Механизмы реализации нейропротективного эффекта ИПостК при глобальной ишемии/реперфузии остаются неизученными. Цель исследования — изучить изменение экспрессии HIF-1α в неокортексе при применении ИПостК при глобальном ишемическом и реперфузионном повреждении головного мозга у крыс. Глобальную ишемию головного мозга моделировали путем окклюзии магистральных сосудов, отходящих от дуги аорты на 10 минут. ИПостК было представлено 3-мя эпизодами по 15-сек/15-сек реперфузии/реокклюзии. Оценивали число жизнеспособных и HIF-1α-позитивных нейронов неокортекса. Показано, что ИПостК приводит к достоверному увеличению числа жизнеспособных и снижению количества HIF-1α-позитивных нейронов неокортекса. Полученные результаты показывают, что ИПостК уменьшает выраженность повреждения неокортекса крыс при глобальной ишемии/реперфузии головного мозга, предположительно, за счет предотвращения апоптоза.

Ключевые слова: ишемическое посткондиционирование, HIF-1α, головной мозга, ишемия-реперфузия, крысы.

УДК.616-005.4:612.084

THE EFFECT OF ISCHEMIC POSTCONDITIONING ON THE EXPRESSION OF HIF-1α IN A GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA-REPERFUSION IN RAT

N.S. Shcherbak[1, 2], M.M. Galagudza[1, 2], O.V. Beshchuk[1], D.A. Ovchinnikov[1], L.B. Mitrofanova[1], E.R. Barantsevich[1, 2], E.V. Shlyakhto[1, 2]

[1] First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Saint-Petersburg, Russia
[2] Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 194341. E-mail: shcherbakns@yandex.ru (Natalia S. Shcherbak — PhD.Sci.Bio, senior researcher, First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg, leading researcher Nanotechnology Institute of Experimental Medicine Almazov Heart, Blood and Endocrnology Centre).

Abstract

Ischemic postconditioning (IPostK) — endogenous way of the cytoprotection. The mechanisms of the neuroprotective effect IPostK in a global ischemia-reperfusion remain unexplored. The purpose of the study — to investigate change in expression of HIF-1α in the neocortex in the application IPostK in a global ischemic and reperfusion injury of the brain in rats. Global cerebral ischemia was modeled by occlusion of major vessels extending from the aorta 10 minutes. IPostK was presented with 3 episodes on 15-sek/15-sek reperfusion/reocclusion. It is shown that IPostK leads to a significant increase in the number of viable and reduction of HIF-1α- positive neurons of the neocortex. The results show that IPostK reduces the severity of damage in rat neocortex global ischemia-reperfusion brain presumably due to prevention of apoptosis.

Key words: ischemic postconditioning, HIF-1α, brain, ischemia-reperfusion rats.

Статья поступила в редакцию 01.11.13, принята к печати 15.11.13.

Глобальная ишемия, развивающаяся при остановке сердца, при возможных интраоперационных осложнениях в виде гипоксии/гипотензии, обструкции дыхательных путей, геморрагическом шоке приводит к серьезным повреждениям головного мозга, с последующим развитием тяжелого неврологического и когнитивного дефицита [1]. В последние годы стратегия предотвращения необратимого повреждения нейронов при глобальной ишемии головного мозга была основана на прерывании механизмов стремительно разворачивающейся эксайтотоксичности, а также направлена на борьбу со свободными радикалами, предотвращение нейровоспаления и ингибирование апоптоза. Однако разработанные методы лечения имели ограниченный успех, что во многом связано с неполным пониманием механизмов гибели нейронов после обратимой глобальной ишемии [2]. Повреждение головного мозга прогрессирует и, в конечном счете, становится необратимым, если не происходит восстановление подачи кислорода. Способность клеток и организма адаптироваться к периодам гипоксии важна для выживания, как в физиологическом, так и в патофизиологическом состоянии [3]. Необходимо отметить, что восстановление кровотока после продолжительной ишемии также способствует дополнительному повреждению клеток, известному как «реперфузионное повреждение» [4]. Сегодня, ишемическое посткондиционирование (ИПостК), представляющее серию коротких ишемических стимулов, выполненных в раннем реперфузионном периоде, рассматривается как адаптивный эндогенный нейропротективный механизм, позволяющий защитить клетки головного мозга от реперфузионного повреждения [5]. Однако молекулярные механизмы реализации нейропротективного эффекта ИПостК до сих пор остаются неизученными.

Глобальная ишемия активирует патологический каскад, индуцируемый гипоксией, который приводит к отеку мозга, клеточной гибели и неврологической дисфункции. Индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1) является важнейшим транскрипционным фактором, отвечающим за регуляцию экспрессии генов при гипоксии и ишемии. Транскрипционный фактор HIF-1 — это фактор, регулирующий экспрессию более чем 200 генов, играющих важную роль в формировании толерантности к ишемии и гипоксии [6]. Молекула транскрипционного фактора HIF-1 представляет собой гетеродимер, состоящий из двух субъединиц — α и β. При нормоксии (pO_2~ 100 мм рт. ст.) α-субъединица HIF-1 подвергается быстрой деградации, что делает активацию HIF-

1α-зависимых генов невозможной. Однако при понижении напряжения кислорода в тканях происходит усиление синтеза белков, которые защищают HIF-1α от убиквитин-протеасомной деградации [6]. При достижении определенной концентрации в клетке, активный димер HIF-1α транслоцируется в ядро, где активирует экспрессию целого ряда кислород-чувствительных генов [7–9]. Повышение активности HIF-1α в ишемизированной ткани или в ткани в состоянии гипоксии может активировать адаптивные механизмы, направленные на выживание клеток [10]. Так, высокие уровни HIF-1α были обнаружены после церебральной ишемии и травмы головного мозга [11, 12], причем это накопление, по результатам ряда исследований может быть связано с активацией апоптоза [13, 14]. Уменьшение реперфузионного повреждения при ИПостК происходит за счет выполнения коротких ишемических стимулов и, следовательно, можно предположить участие HIF-1 в реализации протективного эффекта ИПостК.

Цель исследования — изучить изменение экспрессии HIF-1α в неокортексе при применении ИПостК при глобальном ишемическом и реперфузионном повреждении головного мозга у крыс.

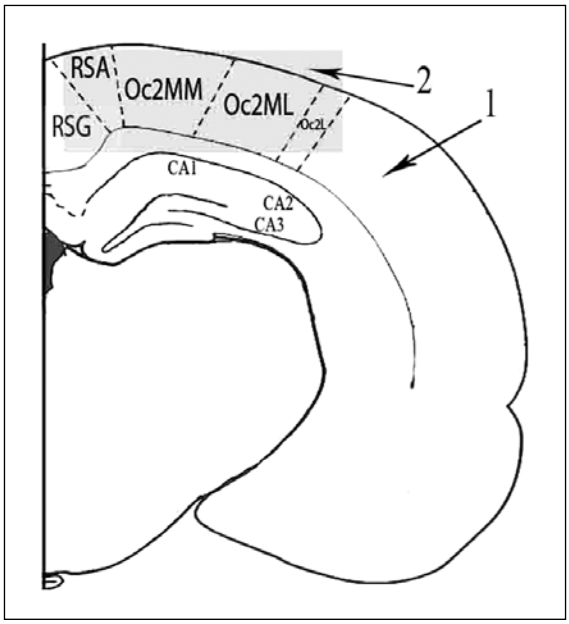
Материалы и методы

Все эксперименты были проведены в соответствии с рекомендациями Этических комитетов ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова и ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова», а также в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального Института Здоровья США № 85–23).

Моделирование ишемического повреждения. Исследование проводилось на крысах — самцах стока Wistar массой 220–250 г (питомник «Рапполово»), содержащихся в условиях 12/12-часового светотемнового режима и получавших стандартный корм и питьевую воду ad libitum. Животных наркотизировали хлоралгидратом (450 мг/кг, внутрибрюшинно). Обратимую глобальную ишемию (ГИ) головного мозга моделировали окклюзией плечеголовного ствола, левой подключичной артерии и левой общей сонной артерии на 10 минут по ранее описанной методике, с применением аппарата искусственной вентиляции легких (SAR830, США) и специально разработанной интубационной трубки [15–17]. ИПостК моделировали путем снятия и наложения микрохирургических зажимов на артерии в раннем реперфузионном периоде согласно выбранному протоколу эксперимента — 3 эпизода по 15-сек/15-сек реперфузии/реокклюзии после 10-минутной ГИ с последующей реперфузией, длительность которой составляла 2 суток. Животные были случайным образом разделены на следующие экспериментальные группы: 1) ложная операция (n = 6); 2) 10-минутная ишемия с последующей реперфузией (n = 8); 3) 10-минутная ишемия + ИПостК с последующей реперфузией (n = 6). Все хирургические вмешательства проводились на термостатируемом операционном столе (TCAT-2LV controller; Physitemp Instruments Inc., Clifton, NJ, USA) при температуре 37,0º ± 0,5ºC. В послеоперационном периоде до момента выхода животных из наркоза их температура также поддерживалась на постоянном уровне за счет внешнего источника тепла.

Гистологический анализ. Гистологический анализ проводили у животных каждой группы, выживших к концу вторых суток. Животных повторно наркотизировали хлоралгидратом, извлекали мозг из полости черепа и нарезали на сегменты, используя фронтальную матрицу для головного мозга мелких грызунов (WPI, США). Сегменты фиксировали 10 % нейтральным формалином и заливали в парафин по общепринятой методике. Фронтальные срезы толщиной 3 мкм, соответствующие стереотаксическому атласу головного мозга крысы (bregma -3,6 ± 0,2 мм) (рис. 1) [18], окрашивали гематоксилином и эозином.

Рисунок 1. Схематичное изображение анализируемой области коры головного мозга (bregma -3,6 ± 0,2 мм) (по *Paxinos G., Watson Ch.*, 1998)**.**



Примечание: 1 — неокортекс; 2 — анализируемая область: retrosplenial granular cortex (RSG) retrosplenial agranular cortex (RSA), occipital cortex, area 2, lateral (Oc2L), occipital cortex, area 2, mediolateral (Oc2ML), occipital cortex, area 2, mediomed (Oc2MM).

Иммуногистохимический анализ. В нейронах неокортекса HIF-1α выявляли иммуногистохимическим двухступенчатым непрямым методом связывания полимерной цепи с первичными неконьюгированными антителами. Гистологические срезы толщиной 3 мкм на предметных стеклах со специальным адгезивным покрытием подвергались депарафинизации в 2 ксилолах и 4 спиртах с убывающей концентрацией от 95,5 % до 70 %. Для устранения эндогенной пероксидазы срезы подвергались обработке 3 % раствором перекиси водорода в течение 5 минут при комнатной температуре. Демаскировка внутритканевых антигенов проводилась в буфере (pH 9,0) при температуре 95–97ºС на водяной бане в течение 30 минут с последующим 20-минутным охлаждением при комнатной температуре. Срезы на предметном стекле обводили гидрофобным карандашом (Elite PAP Pen Diagnostic BioSystems, США) и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре с блокирующей сывороткой (Background Blocker (1X), Diagnostic BioSystems, США) для уменьшения избыточного фонового окрашивания. Далее проводили инкубацию с первичными моноклональными кроличьими антителами к белку HIF-1α (клон EP1215Y, Epitomics, USA) во влажной камере в течение 30 минут при комнатной температуре. Антитела разводились 1:200 на блокирующем растворе (Dako, Дания). После инкубации срезы дважды промывались в Трис-буфере (TBS, Dako, Дания). Далее наносили полимерную систему с вторичными антителами (Histofine Simple Stain MAX PO (multi), Nichrei Biosciences Inc., Япония) и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. По истечении этого времени срезы вновь дважды промывались в Трис-буфере. Для визуализации метки использовали 3,3'-диаминобензидинтетрахлорид (Histofine DAB3S kit Peroxidase Chromogen/Substrate kit, Nichrei Biosciences Inc., Япония), который выявляет пероксидазную активность фермента на полимерной цепи. На заключительном этапе препараты окрашивались гематоксилином. Дегидратацию препаратов осуществляли при помощи двух 95,5 % спиртов, изопропилового спирта и ксилола с последующим заключением срезов в полистирол (BioMount, Италия).

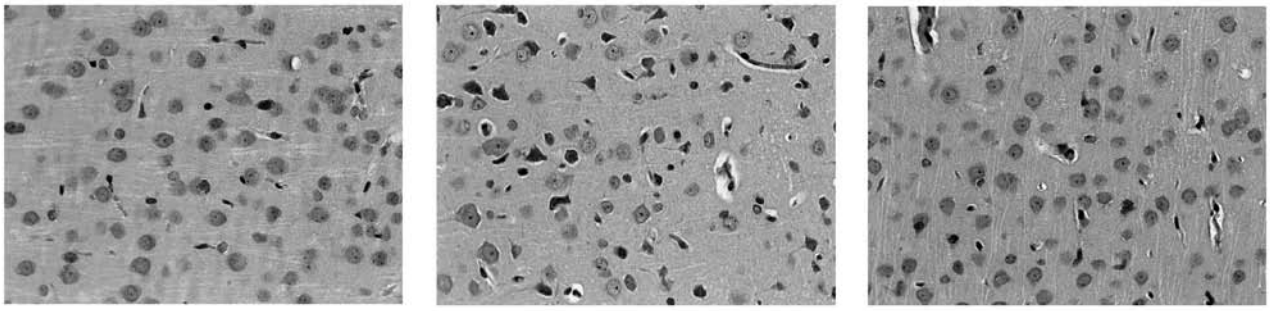
Морфометрический анализ жизнеспособных нейронов и качественное наличие HIF-1α-позитивных нейронов проводили под световым микроскопом ДМ-750 (Leica, Германия). На срезах при увеличении × 400 подсчитывали количество сохранивших жизнеспособность нейронов неокортекса в поле зрения. Полученный показатель пересчитывали на 1 мм^2 коры головного мозга. Клетки считались сохранившими жизнеспособность, если они оставались морфологически неизмененными и содержали в площади среза ядрышко [19]. Проводили качественный анализ HIF-1α-позитивных нейронов неокортекса.

Значимость различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента с использованием программы «STATISTICA 6.0». Различия учитывались как значимые при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В исследовании была применена экспериментальная модель полной глобальной ишемии головного мозга у крыс. Использованная модель позволяла смоделировать ишемическое-реперфузионное повреждение всего головного мозга. Через двое суток после 10-минутной глобальной ишемии головного мозга в анализируемой области неокортекса обнаруживались характерные структурные повреждения клеток. Выявлялись сморщенные гиперхромные с пикнотическими ядрами нейроны, наблюдался перицеллюлярный отек, в отдельных

Рисунок 2. Кора головного мозга крысы через 48 часов после перенесения ложной операции (А), 10-минутной глобальной ишемии (Б), применения ишемического посткондиционирования (В). Окраска гематоксилин-эозин (х400)



А **Б** **В**

клетках обнаруживался хроматолиз и вакуолизация цитоплазмы, отмечалось наличие периваскулярного отека (рис. 2). Отмечалось достоверное снижение числа жизнеспособных нейронов неокортекса при сравнении с ложнооперированными животными (численность жизнеспособных нейронов/мм^2 составляла 286 ± 65 и 664 ± 72, соответственно, P < 0,05). Анализ числа жизнеспособных нейронов проводили спустя 48 часов реперфузионного периода, т. к. известно, что для нейронов характерна отсроченная гибель. Впервые явление отсроченной гибели нейронов было обнаружено для нейронов гиппокампа у песчанок монгольских в 1982 году и подтверждено позднее в многочисленных исследованиях [19]. В нашем исследовании мы анализировали зону неокортекса, соответствующую стереотаксическому атласу головного мозга крысы (bregma -3,6 ± 0,2 мм) [18], включающую следующие области: retrosplenial agranular cortex (RSA), occipital cortex, area 2, lateral (Oc2L), occipital cortex, area 2, mediolateral (Oc2ML), occipital cortex, area 2, mediomed (Oc2MM) (рис. 1). Необходимо отметить, что в ряде исследований изучаемую нами область обозначают как фронтальную область неокортекса [20]. Данная область наряду с зонами гиппокампа является наиболее чувствительной к повреждающему действию гипоксии/ишемии [15, 19–21]. Применение ИПостК после глобальной ишемии приводило к увеличению числа жизнеспособных нейронов в анализируемой области неокортекса крыс по сравнению с животными, у которых ишемические стимулы не применялись (численность нейронов/мм^2 составляла 573 ± 54 против 286 ± 65, соответственно, P < 0,05) (рис. 2). В ряде исследований на разнообразных экспериментальных моделях с различной продолжительностью ишемии/реперфузии головного мозга и применением ишемических стимулов был показан цитопротективный эффект ИПостК [4, 5, 21]. К сожалению, протективный потенциал этого эндогенного механизма до сих пор не применяется в клинической практике. В первую очередь, это связано с тем, что, несмотря на многочисленные исследования, механизмы реализации защитных эффектов в условиях целого организма остаются не до конца изученными. Известно, что ИПостК обладает антиапоптотическим действием и позволяет ограничивать объем некротического повреждения миокарда [2, 3]. Преимущественная гибель клеток головного мозга, путем некроза или апоптоза при ишемическом и реперфузионном повреждении, существенным образом зависит от степени и длительности нарушения мозгового кровотока и области головного мозга [1–3].

В нашей работе иммуногистохимическим методом выявляли экспрессию белка HIF-1α в неокортексе в различных экспериментальных группах. В группе ложнооперированных животных в неокортексе HIF-1α-иммунопозитивных клеток не наблюдалось. Обратимая глобальная ишемия к концу вторых суток реперфузионного периода приводила к наличию достаточного числа HIF-1α-позитивных нейронов в анализируемой области неокортекса. Аналогичные результаты по увеличению HIF-1α-позитивных нейронов в неокортексе наблюдались при ишемии/реперфузии, моделируемой с применением двухсосудистой модели с гипотонией (30–35 мм рт. ст.) [14]. При этом было установлено, что одновременно с увеличением экспрессии HIF-1α наблюдается увеличение экспрессии белков p53, каспаза-9 и каспаза-3. На основании полученных результатов был сделан вывод о связи накопления HIF-1α и активации апоптоза в ткани мозга после глобальной ишемии/гипотензии [14]. В нашем исследовании применение ИПостК приводило к значительному снижению количества HIF-1α-позитивных нейронов в анализируемой области неокортекса. К настоящему моменту существует небольшое количество исследований, направленных на изучение вовлеченности HIF-1α в реализацию цитопротективного эффекта ишемического и фармакологического посткондиционирования. Результаты этих исследований демонстрируют разнонаправленные изменения в экспрессии мРНК и белка HIF-1α в зависимости от вида посткондиционирования и вида анализируемой ткани [22–25]. Так, на модели фокальной ишемии-реперфузии головного мозга крысы, индуцируемой 60-минутной окклюзией общих сонных артерий в комбинации с постоянной окклюзией средней мозговой артерией, изучались механизмы нейропротективного влияния ПостК севофлюраном [22]. В качестве фармакологического ПостК производили применение ингаляционно 2,5 % севофлюрана в течение 60 минут после моделирования постоянной окклюзии средней мозговой артерии и завершения 60-минутной окклюзии общих сонных артерий с последующим 24- и 72-часовым реперфузионным периодом, что приводило к достоверному уменьшению числа поврежденных нейронов в ипсилатеральной области коры головного мозга. При этом наблюдалось увеличение экспрессии мРНК гена HIF-1α в пенумбре к 6 и 24 часам реперфузионного периода. В то же время, к 72 часам реперфузионного периода различий в экспрессии мРНК гена HIF-1α между группами с применением ПостК и без него обнаружено не было [22]. В исследовании на миокарде было установлено, что ишемическое-реперфузионное повреждение приводит к увеличению экспрессии белка HIF-1α при сравнении с

ложнооперированными животными, а применение ИПостК способствует увеличению HIF-1α при сравнении с животными без применения ИПостК, при этом детекцию экспрессии белка HIF-1α проводили при помощи вестерн — блоттинга [23]. В исследованиях ИПостК на желудке и скелетной мышце было обнаружено уменьшение экспрессии как белка, так и мРНК HIF-1α [24, 25].

Глобальная церебральная ишемия является комплексным патологическим процессом, который включает в себя множество сигнальных путей и факторов. Маловероятно, что воздействие на одно звено патологического процесса может предотвратить или уменьшить все развивающиеся повреждения головного мозга. Только многокомпонентный подход может ослабить повреждающее действие ишемии-реперфузии. В качестве такого подхода может рассматриваться ИПостК, которое заложено в организме в процессе эволюции и одномоментно воздействует на весь орган, в частности, головной мозг. В данном исследовании было впервые показано, что применение ИПостК в виде коротких ишемических стимулов, выполненных в раннем реперфузионном периоде, способствует увеличению числа неповрежденных нейронов и уменьшению количества HIF-1α-позитивных нейронов в неокортексе ко вторым суткам реперфузионного периода. На основании полученных результатов можно предположить, что механизм нейропротективного эффекта ИПостК при глобальной ишемии-реперфузии для неокортекса может осуществляться путем подавления апоптоза. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят идентифицировать новые мишени для фармакотерапии церебральных ишемических и репеперфузионных повреждений.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2359.2012.7) и гранта РФФИ № НК 13–04–00793/13.

Литература

1. *Martin L.J.* Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review) // Int. J. Mol. Med. — 2001. — Vol. 7. — P. 455–478.

2. *Martin L.J., Al Abdulla N.A., Brambrink A.M., et al.* Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis // Brain Res. Bull. — 1998. — № 46. — P. 281–309.

3. *Bunn H.F., Poyton R.O.* Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia // Physiol. Rev. — 1996. — Vol. 76. — P. 839–885.

4. *Zhao H., Sapolsky R.M., Steinberg G.K.* Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats // J. Cereb. Blood Flow Metab. — 2006. — Vol. 26, № 9. — P. 1114–1121.

5. *Zhao H., Ren C., Chen X., Shen J.* From rapid to delayed and remote postconditioning: the evolving concept of ischemic postconditioning in brainischemia // Curr Drug Targets. — 2012. — Vol. 13, № 2. — P. 173–187.

6. *Loor G., Schumacker P. T.* Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion // Cell Death Differ. — 2008. — Vol. 15, № 4. — P. 686–690.

7. *Correia S.C., Carvalho C., Cardoso S. et al.* Mitochondrial preconditioning: a potential neuroprotective strategy // Front Aging Neurosci. — 2010. — Vol. 26, № 2. — P. 138.

8. *Hollmann M., Hartley M., Heinemann S.* Ca2+ permeability of KA-AMPAgated glutamate receptor channels depends on subunit composition // Science. — 1991. — Vol. 252, № 5007. — P. 851–853.

9. *Iyer N.V., Kotch L.E., Agani F. et al.* Cellular and developmental control of O2 of hypoxia-inducible factor 1 // Genes & Dev. — 1998. — Vol. 12. — P. 149–162.

10. *Bergeron M., Yu A.Y., Solway K.E., Semenza G.L., Sharp F.R.* Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain // Eur. J. Neurosci. — 1999. — Vol. 11. — P. 4159–4170.

11. *Yu R., Gao L., Jiang S. et al.* Association of HIF-1alpha expression and cell apoptosis after traumatic brain injury in the rat // Chin. J. Traumatol. — 2001. — Vol. 4. — P. 218–221.

12. *Halterman M.W., Federoff H.J.* HIF-1alpha and p53 promote hypoxia-induced delayed neuronal death in models of CNS ischemia // Exp. Neurol. — 1999. — Vol. 159. — P. 65–72.

13. *Goda N., Dozier S.J., Johnson R.S.* HIF-1 in cell cycle regulation, apoptosis, and tumor progression // Antioxid. Redox Signal. — 2003. — Vol. 5. — P. 467–473.

14. *Li Y., Zhou C., Calvert J.W. et al.* Multiple effects of hyperbaric oxygen on the expression of HIF-1 alpha and apoptotic genes in a global ischemia-hypotension rat model // Exp. Neurol. — 2005. — Vol. 191, № 1. — P. 198–210.

15. *Shcherbak N.S., Galagudza M.M., Kuzmenkov A.N. et al.* A new rat model of reversible global cerebral ischemia // Bull. Exp. Biol. Med. — 2012. — Vol. 152. — P. 656–658.

16. *Щербак Н.С., Овчинников Д.А., Кузьменков А.Н. и др.* Изобретение «Способ моделирования глобальной ишемии головного мозга у мелких лабораторных животных» / Патент на изобретение RUS № 2464645 25.11.2010.

17. *Щербак Н.С., Галагудза М.М., Кузьменков А.Н., Овчинников Д.А.* Интубационная трубка для проведения искусственной вентиляции легких у грызунов / Патент на полезную модель RUS № 121389 27.04.2012.

18. *Paxinos G., Watson Ch.* The rat brain in stereotaxic coordinates. — N.Y.: Academic Press, 1998.

19. *Kirino T.* Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia // Brain Res. — 1982. — Vol. 239. — P. 57–69.

20. *Tsuchiya M., Sako K., Yura S., Yonemasu Y.* Cerebral blood flow and histopathological changes following permanent bilateral carotid artery ligation in Wistar rats // Exp. Brain Res. — 1992. — Vol. 89, № 1. — P. 87–92.

21. *Wang J.Y., Shen J., Gao Q. et al.* Ischemic postconditioning protects against global cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats // Stroke. — 2008. — Vol. 39, № 3. — P. 983–990.

22. *Ye Z., Guo Q., Xia P. et al.* Sevoflurane postconditioning involves an up-regulation of HIF-1α and HO-1 expression via PI3K/Akt pathway in a rat model of focal cerebral ischemia // Brain Res. — 2012. — Vol. 1463. — P. 63–74.

23. *Zhao H., Wang Y.,Wu Y.et al.* Hyperlipidemia does not prevent the cardioprotection by postconditioning against myocardial ischemia/reperfusion injury and the involvement of hypoxia inducible factor-1alpha upregulation // Acta Biochim. Biophys Sin (Shanghai). — 2009. — Vol. 41, № 9. — P. 745–753.

24. *Wang T., Leng Y.F., Zhang Y. et al.* Oxidative stress and hypoxia-induced factor 1α expression in gastric ischemia // World J. Gastroenterol. — 2011. — Vol. 17, № 14. — P. 1915–1922.

25. *Liang H.,Yu F.,Tong Z.et al.* Effect of ischemia postconditioning on skeletal muscle oxidative injury, mTOR, Bax, Bcl-2 proteins expression, and HIF-1α/β-actin mRNA, IL-6/β-actin mRNA and caveolin-3/β-actin mRNA expression in ischemia-reperfusion rabbits // Mol. Biol. Rep. — 2013. — Vol. 40, № 1. — P. 507–514.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОТОПРОТЕКЦИИ В УСЛОВИЯХ ФЕНОМЕНА ЗВУКОВОГО ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЯ

С.А. Иванов[1, 2], С.Г. Журавский[1, 2], М.М. Галагудза[1, 2]

[1] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия
[2] ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологи им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Иванов Сергей Александрович — аспирант лаборатории слуха и речи НИЦ ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, младший научный сотрудник вивария Института экспериментальной медицины ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России; *Журавский Сергей Григорьевич* — доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории слуха и речи НИЦ ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, ведущий научный сотрудник НИЛ нанотехнологий Института экспериментальной медицины ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России; *Галагудза Михаил Михайлович* — доктор медицинских наук, руководитель Института экспериментальной медицины ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, профессор кафедры патофизиологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Контактная информация: ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России, ул. Льва Толстого, 6/8, Санкт-Петербург, Россия, 197022. E-mail: serjivanov84@gmail.com (Иванов Сергей Александрович).

Резюме

В обзоре представлены современные данные о патогенезе акустической травмы структур внутреннего уха, а также о молекулярных механизмах формирования повышенной резистентности возбудимых структур улитки, возникающей в условиях звукового прекондиционирования.

Ключевые слова: звуковое прекондиционирование, отопротекция, акустическая травма.

MOLECULAR MECHANISMS OF OTOPROTECTION BY SOUND PRECONDITIONING

S.A. Ivanov[1, 2], S.G. Zhuravskii[1, 2], M.M. Galagudza[1, 2]

[1] First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Saint-Petersburg, Russian Federation
[2] Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russian Federation

Corresponding author: Saint-Petersburg I.P. Pavlov Federal Medical University, Lev Tolstoy str., 6/8, St-Petersburg, Russia, 197022. E-mail: serjivanov84@gmail.com (Sergey A. Ivanov — PhD., student, Laboratory of Hearing and Speech, Core Research Centre First Pavlov State Medical University of St. Petersburg).

Abstract

The review summarizes current data on the mechanisms of acoustic trauma of the inner ear structures as well as the molecular changes underlying the protective phenotype induced by sound preconditioning.

Key words: sound conditioning, otoprotection, noise trauma.

Статья поступила в редакцию 15.11.2013, принята к печати 03.12.2013.

УДК.577.21

Возможности медикаментозного лечения отоневрологической патологии резко ограничены низкой проницаемостью гематолабиринтного барьера (ГЛБ) для ксенобиотиков, включая лекарственные препараты [1]. Известно достаточно много биологически активных веществ (глутатион, супероксиддисмутаза, ингибиторы митоген-активируемых протеинкиназ, факторы роста, агонисты аденозиновых рецепторов и др.), проявляющих явные отопротективные свойства в эксперименте *in vitro*, а также при интракохлеарном введении, но при этом оказывающихся малоэффективными в случае системного использования [2]. В связи с этим значительную актуальность представляет поиск нефармакологических (независимых от ГЛБ) способов воздействия на ткани улитки, поддерживающих ее функциональную активность.

Общие представления о защите тканей от повреждения неспецифичны относительно органа-мишени и характеризуются следующими критериями:

1) Цитопротекция реализуется на этапе, когда возможно упреждение инициирующих гибель клетки событий и ранних молекулярных процессов деструкции [3];

2) Поскольку молекулярные механизмы повреждения характеризуются определенной стадийностью [4], выбор отопротективного средства или методики должен соответствовать характеру патогенетического звена в текущий момент повреждения.

Основным способом достижения цитопротективного эффекта сегодня чаще всего является фармакологическое воздействие, что в отношении улитки хорошо изучено [2, 5]. Однако известны и нефармакологические способы индукции защитного состояния в потенциально повреждаемых органах или тканях, приемлемые для использования в условиях клиники. Речь, в частности, идет о протективном воздействии, организованном по принципам неспецифического биологического феномена прекондиционирования (ПреК) или предвоздействия [6, 7]. Последним называют индуцированную внешним воздействием способность ткани (органа) переносить высокоинтенсивное повреждение после предварительной экспозиции стрессового стимула малой интенсивности. Материальный субстрат феномена ПреК представлен сложным комплексом изменений внутриклеточного молекулярного гомеостаза, прежде всего, негенетической природы (фосфорилирование различных семейств киназ, модуляция трансмембранных ионных токов, посттрансляционная модификация белков и др.) [8–10], а в ряде случаев и более глубоких — генетически опосредованных. Последние связаны с экспрессией ранее неактивных специфичных стресс-протекторных белков [11], что граничит с реакциями долговременной защиты организма, такими как адаптация и компенсаторные приспособления.

Современная история изучения ПреК началась после того, как в 1986 году на модели кратковременной коронарной окклюзии было отмечено немедленное развитие толерантности сердца к последующей более продолжительной ишемии [6]. В дальнейшем явление ПреК было продемонстрировано на экспериментальных моделях повреждения различных органов: сердца [8], головного мозга [12], тонкой кишки, печени [13]. Однако еще задолго до классических экспериментов в кардиологии и неврологии, Miller и соавт. в 1963 г. описали состояние повышения резистентности спирального органа (СО) к шумовой травме, возникавшее после предварительного воздействия шума субповреждающей интенсивности [14]. Сегодня эту работу можно считать первым описанием феномена звукового ПреК (ЗПреК). Следует также отметить, что понятие о «состоянии неспецифически повышенной сопротивляемости», своим смыслом отражающее суть ПреК, впервые было предложено в 50-х годах прошлого столетия в работах советского ученого Н.В. Лазарева, изучавшего фармакологические способы развития адаптации [15].

Цель настоящего обзора — провести анализ молекулярных механизмов формирования резистентности улитки в условиях звукового предвоздействия.

В современных исследованиях ЗПреК изучается с использованием двух основных методических подходов. Первый заключается в продолжительной экспозиции (до 24 дней) перед шумовой травмой непрерывного низкоинтенсивного (например, 81 дБ) акустического сигнала [16–19]. Максимальный протективный эффект наблюдается при условии сохранения порогов остроты слуха к окончанию звукового предвоздействия [20], или же в случае получения временного повышения порогов при создании перерыва (до 3 недель) до полного восстановления слуховой чувствительности перед акустической травмой [20]. Вторым подходом является режим дискретной звуковой стимуляции (в среднем, 6-часовая экспозиция звука в течение 10 дней) с интенсивностью, вызывающей обратимое повышение порогов остроты слуха [21, 22]. Кроме того, показана возможность развития отопротективного эффекта при достаточно короткой экспозиции, составляющей несколько минут [18, 23], а не часов или дней, как в ранее приведенных исследованиях.

Обобщая данные литературы, можно выделить центральные и местные механизмы развития резистентности возбудимых структур в улитке, инициированные умеренной акустической стимуляцией [24–27]. Участие центральных звеньев слухового анализатора в повышении толерантности СО к повреждению опосредовано защитным эффектом эфферентной иннервации улитки [26]. Так, в условиях пересечения оливокохлеарного пучка отмечается полная или частичная утрата защитного действия ЗПреК перед шумовой травмой — отмечается более выраженное необратимое повышение порогов слуха, а также повреждение наружных волосковых клеток (НВК), оцениваемое с помощью отоакустической эмиссии и гистологическим исследованием [26]. Следует также отметить, что эфферентная иннервация участвует в развитии толерантности только на ипсилатеральной стороне. Об этом говорят данные Yamasoba и соавт. [28], не получивших звук-ассоциированных защитных изменений в улитке на стороне механической обтурации наружного слухового прохода.

Большинством исследователей обсуждаются интраорганные механизмы развития протективного фенотипа, которые, по-видимому, являются более простыми для понимания и изучения. К числу молекулярных механизмов эндогенной отопротекции относят ряд неспецифических внутриклеточных регулируемых процессов: повышение активной внутриклеточной антиоксидантной защиты, регуляцию внутриклеточной концентрации Ca^{2+}, экспрессию белков теплового шока, ряда нейротрофических факторов [5, 24, 29, 30].

При рассмотрении механизмов отопротекции, индуцированных ЗПреК, целесообразно разделять возможные мишени звукового повреждения, поскольку среди трех гистогенетически разнородных тканевых элементов внутреннего уха (СО, спиральный ганглий, сосудистая полоска) следует ожидать превалирования различных патогенетических путей повреждения (табл. 1). Так, показано, что в СО одним из важнейших механизмов акустического повреждения является некроз при микро-разрывах мембран [31]. При этом в сосудистой полоске на надклеточном уровне в качестве ведущих механизмов повреждения выступают вазоконстрикция [32] и мононуклеарная инфильтрация [33]. Акустическая травма способствует повреждению нейронов спирального ганглия за счет эксайтотоксичности [34] и резкого избытка оксида азота [35].

В первую очередь, к маркерам внутриклеточного повреждения, а также к универсальным регуляторам внутриклеточных процессов следует отнести активные формы кислорода (АФК) [36]. Неоднократно было показано, что раздражение физиологически адекватным для слухового анализатора (акустическим) стимулом сопровождается ростом АФК в клеточных структурах внутреннего уха [3, 37, 38]. В этих условиях естественной ответной реакцией клеток становится продукция эндогенных факторов антиокислительной защиты, что для улитки показано на примере глутатиона [24, 39, 40], супероксид дисмутазы [41], каталазы [40], пероксидазы [5, 24]. Это позволяет рассматривать звуковое воздействие способом интенсификации антиоксидантного потенциала улитки. Следует отметить, что наибольший прирост активности антиоксидантных ферментов и концентрации их субстратов происходит в сосудистой полоске [24].

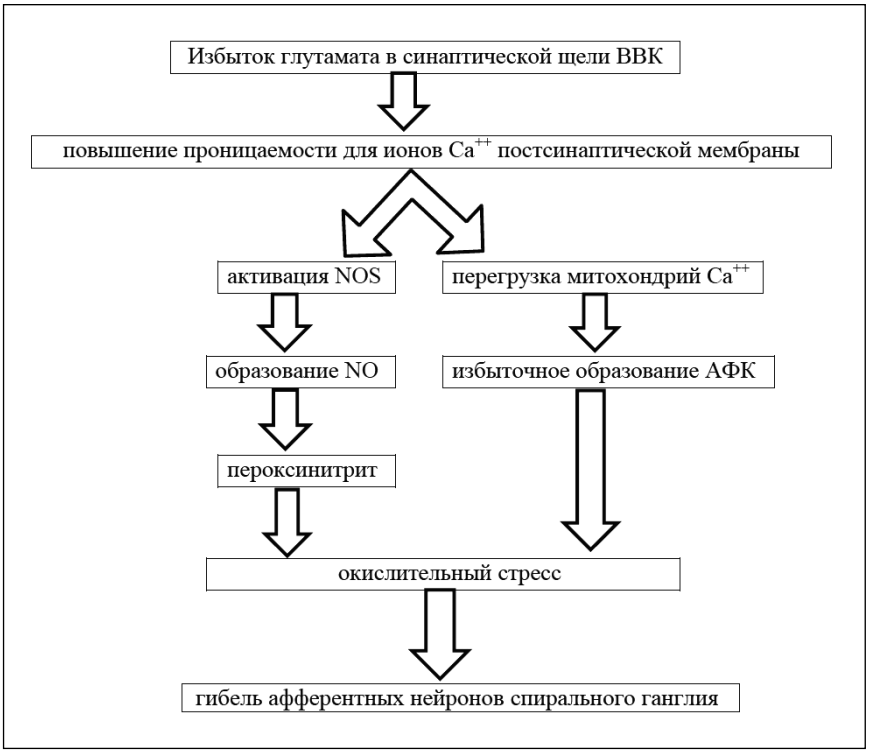
Есть сведения, что повышенная концентрация АФК после интенсивной звуковой стимуляции (белый шум 4 кГц, 120 дБ, 5 часов) сохраняется в течение 14 дней, при этом пики маркеров «окислительного стресса» для различных тканевых элементов улитки оказываются различны. Так, максимум АФК и пероксинитрита для латеральной стенки улитки и пограничных с ней клеток Клаудиуса (ткань сосудистой полоски) наблюдается на 1–2-й день после акустической стимуляции, для клеток Дейтерса — на 3-й день, для волосковых клеток — на 7–10-й день [4]. Наличие отсроченности окислительного стресса в различных кохлеарных тканях

Таблица 1

МЕХАНИЗМЫ АКУСТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СТРУКТУР ВНУТРЕННЕГО УХА

Структуры улитки	Механизмы повреждения	
	Надклеточный уровень	**Внутриклеточный уровень**
Спиральный орган	Некроз при микроразрывах мембран	Окислительный стресс; повышение Ca^{2+} внутри клетки
Спиральный ганглий	–	Эксайтотоксичность; внутриклеточное повышение NO
Сосудистая полоска	Вазоконстрикция; мононуклеарная миграция (асептическое воспаление)	Окислительный стресс (маргинальный эпителий)

Рисунок 1. Схематический путь развития эксайтотоксичности в сенсорных нейронах спирального ганглия



подтверждается наблюдением лечебного эффекта экзогенных антиоксидантов (салицилатов, витамина Е) во «временном окне» от конца первых суток и до 72 часов после звуковой травмы [42], в то время как их введение сразу после звуковой травмы не дает значимого защитного эффекта [3, 43].

С учетом этих данных можно предполагать, что в такой же последовательности происходит активация антиоксидантной защиты в структурах улитки и после звуковой стимуляции субповреждающей (физиологически-адекватной) интенсивности. Так, Yamasoba и соавт. [28] в эксперименте на морских свинках (широкополосный шум, 105 дБ, 5 часов), анализируя сенсорный эпителий, модиолус, латеральную стенку улитки, наблюдали повышение активности глутатиона в первые 2–4 часа (во временном окне окислительного стресса в сосудистой полоске (СП) [4]) только в латеральной стенке с последующей нормализацией его уровня к 6-му часу после шумового воздействия.

Ранний свободнорадикальный ответ именно эпителия СП приобретает особый патогенетический смысл в отношении развития эндогенного защитного состояния уже всей улитки. Гиперпродукция АФК в маргинальных эпителиоцитах при акустической нагрузке, помимо прямого цитотоксического воздействия (в частности, через перекисное окисление липидов), продолжает повреждение уже посредствам запуска неконтролируемого каскада реакций метаболизма арахидоновой кислоты, одним из продуктов которого становится 8-изо-простагландин $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), вызывающий вазоконстрикцию капилляров СП [44]. Интракохлеарная ишемия в условиях интенсивного метаболизма в свою очередь способствует нарастанию интенсивности окислительного стресса, чем формирует «порочный» круг повреждения в тканях внутреннего уха [44]. Из этого следует, что активация антиоксидантной защиты в СП не только устраняет собственный повреждающий потенциал продуктов окислительного стресса, но и предупреждает вторичное развитие ишемии СО. Практическую значимость немедикаментозного повышения эндогенного антиоксидантного потенциала улитки увеличивает то обстоятельство, что экзогенные антиоксиданты способны оказывать лишь частичный защитный эффект, поскольку плохо проникают через плазмалемму [45].

В нервных клетках спирального ганглия (СГ) в условиях акустической нагрузки также происходит развитие окислительного стресса, обусловленное выбросом глутамата в синаптическую щель из базального отдела внутренних волосковых клеток (ВВК). Неконтролируемый ток Ca^{2+} через постсинаптическую мембрану является триггером «неклассического» пути эксайтотоксичности [3, 46, 47] (рис. 1). На схеме видно, что повышение концентрации Ca^{2+} становится одним из ключевых

патогенетических звеньев молекулярного повреждения афферентных волокон слухового нерва.

Кроме того, воздействие интенсивного звука увеличивает уровень свободного Ca^{2+} и в самих волосковых клетках СО [48]. Следует отметить, что кальциевый механизм оказывается универсальным звеном повреждения, вызываемым различными отоагрессивными факторами (аминогликозидными антибиотиками, противоопухолевыми препаратами, перекисью водорода) [49, 50], на что указывает защитное действие в этих условиях блокаторов кальциевых каналов, а также ингибиторов Ca^{2+}-зависимых протеаз [51–55].

Как и звено антиоксидантной системы, гомеостаз Ca^{2+} оказывается объектом модуляции при развитии защитного состояния, вызванного звуковым ПреК. Считается, что снижение уровня внутриклеточного Ca^{2+} в условиях воздействия стимула субповреждающей интенсивности (аналогичного звуковому индуктору ПреК) происходит двумя путями: за счет регулирования механизма его глутамат-индуцированного тока (предотвращение эксайтотоксичности), и, с другой стороны, путем кальций-связывающих белков (кальбиндин, кальсеквестрин, парвальбумин) [5]. Оба этих механизма блокируют проапоптотический эффект высоких концентраций Ca^{2+}. Известно, что экспрессия проапоптотических белков зависит от концентрации внутриклеточного свободного Ca^{2+} и регулируется кальций-зависимыми протеазами (кальцийневрин, кальпаин) [3]. В эксперименте Yamashita и соавт. [27] установили, что интенсивное и продолжительное звуковое воздействие (120 дБ, узкополосный шум 4 кГц, 5 часов) сопровождается экспрессией проапоптотических белков (Bak), в то время как экспозиция гораздо менее интенсивного звукового стимула (100 дБ, узкополосный шум 4 кГц в течение 1 часа), приводящая в итоге только к временному повышению порогов слуха, вызывает накопление антиапоптотических белков (Bcl-xL).

Другим следствием изменения кальциевого гомеостаза является уже специфичное для рецепторных клеток слухового анализатора состояние активации белков семейства цитохалазинов, в частности калбиндина D, задействованного в деполимеризации F-актиновых филаментов наружных волосковых клеток (НВК) [17, 25]. Частичная и при этом потенциально обратимая реконструкция цитоскелета делает НВК более «пластичными», что предотвращает микромеханические повреждения клеточных мембран, вызываемые воздействием звука травматической интенсивности [25].

Еще одним из неспецифических факторов эндогенной отопротекции является семейство белков теплового шока (БТШ), которые индуцируются с защитной целью при различных неблагоприятных условиях (воспаление, инфекция, гипоксия, воздействие тяжелых металлов и др.) [36]. Экспериментально показана экспрессия БТШ в СО при гипертермии, транзиторной ишемии, акустической стимуляции субповреждающей интенсивности [29, 56–58]. В последнем случае в 100–200 раз возрастает экспрессия мРНК БТШ, что коррелирует с развитием состояния резистентности улитки к шумовой травме [59]. В исследовании Altschuler и соавт. [58] крысы с гиперэкспрессией БТШ в условиях ЗПреК оказывались более устойчивы к последующему воздействию шума травмирующей интенсивности в сравнении с контрольными животными с низким уровнем БТШ. В этом же эксперименте максимальная концентрация одного из членов данного белкового семейства — БТШ 72 — наблюдалась в СП и НВК через 6 часов после «озвучивания» при том, что в нейронах спирального ганглия такого нарастания уровня БТШ 72 не отмечалось.

В ряде исследований отопротективный эффект ЗПреК связывают с эффектом глиального нейротрофического фактора (GDNF), уровень экспрессии которого нарастает к 8-му часу после звуковой стимуляции и снижается до нормы в течение последующих 4 часов [30]. Защитный эффект GDNF *in vitro* при акустической травме непродолжителен и сохраняется в течение 2-ух часов после однократного внесения в среду для инкубации ткани СО [60]. Рецептор для GDNF в клетках внутреннего уха не установлен, однако предполагается, что его действие может запускать известные типовые цитопротективные механизмы (повышение активности антиоксидантных систем, регулирование обмена Ca^{2+}, модуляцию программированной клеточной гибели) [3]. Так, отопротективный эффект от введения комбинации антиоксидантов (хелатора железа дефероксамина мезилата с маннитолом) не суммируется и не потенцирует защитное действие изолированного интракохлеарного введения GDNF [61, 62].

В работах последних лет защитный эффект феномена ПреК продемонстрирован для улитки при различных моделях острого сенсоневрального повреждения слухового анализатора: ишемии [63], шумовой травме [64], аминогликозидной [65–67] и цисплатиновой ототоксичности [20, 68]. При этом индукторами эффекта ПреК могут выступать как адекватный, то есть физиологический, а именно акустический [16, 23], так и неадекватный (нефизиологический) раздражитель: малые дозы ототоксических препаратов (салицилаты, петлевые диуретики, аминогликозиды) [67–70], ишемия

в вертебро-базилярном бассейне [63], что доказывает неспецифичность механизмов феномена защитного состояния в отношении факторов, его вызывающих.

В сравнении с другими индукторами звуковой стимул неповреждающей интенсивности, активируя основные защитные клеточные механизмы, делает ЗПреК физиологическим способом достижения состояния неспецифически повышенной резистентности периферического звена слухового анализатора. Это раскрывает определенные перспективы перед звуковым вариантом ПреК как слухосохраняющим воздействием, поскольку звук оказывается уникальным раздражителем в силу, во-первых, своей физиологической адекватности для данного рецепторного органа, и, во-вторых, наличия биологической активности в условиях нефармакологического воздействия. Простая в практическом исполнении методика подачи звукового стимула через головные телефоны может найти применение в профилактике ототоксического повреждения внутреннего уха в условиях лечения противоопухолевыми препаратами (группы цисплатина и др.), когда системное использование отопротекторов недопустимо из-за возможности снижения эффективности терапии основного заболевания.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2359.2012.7)

Литература

1. *Juhn S.K., Robertson D., Papastavros T. et al.* Biochemical aspects of inner ear fluids and possible implications for pharmacological treatment // Scand. Audiol. Suppl. — 1986. — № 26. — P. 7–10.

2. *Rybak L.P., Kelly T.* Ototoxicity: bioprotective mechanisms // Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg. — 2003. — Vol. 11, № 5. — P. 328–333.

3. *Le Prell C.G., Yamashita D., Minami S.B. et al.* Mechanisms of noise-induced hearing loss indicate multiple methods of prevention // Hear. Res. — 2007. — Vol. 226, № 1–2. — P. 22–43.

4. *Yamashita D., Jiang H., Schacht J. et al.* Delayed production of free radicals following noise exposure // Brain Res. — 2004. — Vol. 1019, № 1–2. — P. 201–209.

5. *Felix D., Oestreicher E., eds.* Rational pharmacotherapy of the inner ear. Advances in oto-rhino-laryngology, Vol. 59. Basel: Karger. — 2002. — 168 p.

6. *Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A.* Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium // Circulation. — 1986. — Vol. 74, № 5. — P. 1124–1136.

7. *Galagudza M.M., Blokhin I.O., Shmonin A.A., Mischenko K.A.* Reduction of myocardial ischemia-reperfusion injury with pre- and postconditioning: molecular mechanisms and therapeutic targets // Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets. — 2008, Vol. 8, № 1. — P. 47–65.

8. *Мойбенко А.А., Досенко В.Е., Пархоменко А.Н.* Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца. Киев, 2008. — 518 с.

9. *Петрищев Н.Н., Шляхто Е.В., Власов Т.Д., Галагудза М.М.* Ишемическая адаптация миокарда: патофизиологические механизмы и возможные перспективы практического применения (обзор литературы) // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. — 2001. — Т. 87, № 5. — С. 688–705.

10. *Шляхто Е.В., Нифонтов Е.М., Галагудза М.М.* Ограничение ишемического и реперфузионного повреждения миокарда с помощью пре- и постконди-ционирования: молекулярные механизмы и мишени для фармакотерапии // Креативная кардиология. — 2007. — № 1–2. — С. 75–102.

11. *Bolli R., Li Q.H., Tang X.L. et al.* The late phase of preconditioning and its natural clinical application-gene therapy // Heart Fail. Rev. — 2007. — Vol. 12, № 3–4. — P. 189–199.

12. *Vlasov T.D., Korzhevskii D.E., Polyakova E.A.* Ischemic preconditioning of the rat brain as a method of endothelial protection from ischemic/reperfusion injury // Neurosci. Behav. Physiol. — 2005. — Vol. 35, № 6. — P. 567–572.

13. *Desai K.K., Dikdan G.S., Shareef A. et al.* Ischemic preconditioning of the liver: a few perspectives from the bench to bedside translation // Liver Transpl. — 2008. — Vol. 14, № 11. — P. 1569–1577.

14. *Miller J.D., Watson C.S., Covell W.P.* Deafening effects of noise on the cat // Acta Otolaryngol. Suppl. — 1963. — Vol. 176 — P. 1–91.

15. *Лазарев Н.В., Люблина Е.И., Розин М.А.* Состояние неспецифически повышенной сопротивляемости // Пат. физиол. и эксперим. терапия. — 1959. — Т. 3, Вып. 4. — С. 16–21.

16. *Canlon B., Borg E., Flock A.* Protection against noise trauma by pre-exposure to a low level acoustic stimulus // Hear. Res. — 1998. — Vol. 34, № 2. — P. 197–200.

17. *Canlon B., Borg E., Löfstrand P.* Physiological and morphological aspects to low level acoustic stimulation. In: *Dancer A.L., Henderson D., Salvi R.J. et al.* The Effects of Noise on the Auditory System. — St Louis: Mosby-Year Book Inc, 1992.

18. *Yoshida N., Liberman M.C.* Sound conditioning reduces noise-induced permanent threshold shift in mice // Hear. Res. — 2000. — Vol. 148, № 1–2. — P. 213–219.

19. *Pukkila M., Zhai S., Virkkala J. et al.* The 'toughening' phenomenon in rat's auditory organ // Acta Otolaryngol. — 1997. — Vol. 529 — P. 59–62.

20. *Ryan A.F., Bennett T.M., Woolf N.K. et al.* Protection from noise-induced hearing loss by prior exposure to a nontraumatic stimulus: role of the middle ear muscles // Hear. Res. — 1994. — Vol. 72, № 1–2. — P. 23–28.

21. *Henselman L.W., Henderson D., Subramaniam M. et al.* The effect of 'conditioning' exposures on hearing loss from impulse noise // Hear. Res. — 1994. — Vol. 78, № 1. — P. 1–10.

22. *Subramaniam M., Campo P., Henderson D.* The effect of exposure level on the development of progressive resistance to noise // Hear Res. — 1991. — Vol. 52, № 1. — P. 181–188.

23. *Theneshkumar S., Hatzopoulos S., Lorito G. et al.* The effect of noise conditioning in cisplatin induced ototoxicity. A pilot study // Med. Sci. Monit. — 2009. — Vol. 15, № 7. — P. 17–37.

24. *Jacono A.A., Hu B., Kopke R. et al.* Changes in cochlear antioxidant enzyme activity after sound conditioning and noise exposure in the chinchilla // Hear. Res. — 1998. — Vol. 117, № 1–2. — P. 31–38.

25. *Hu H.B., Henderson D.* Changes in F-actin labeling in the outer hair cell and the Deiters cell in the chinchilla cochlea following noise exposure // Hear. Res. — 1997. — Vol. 110, № 1–2. — P. 209–218.

26. *Zheng X.Y., Henderson D., McFadden S.L. et al.* The role of the cochlear efferent system in acquired resistance to noise-induced hearing loss // Hear. Res. — 1997. — Vol. 104, № 1–2. — P. 191–203.

27. *Yamashita D., Minami S.B., Kanzaki S. et al.* Bcl-2 genes regulate noise-induced hearing loss // J. Neurosci. Res. — 2008. — Vol. 86, № 4. — P. 920–928.

28. *Yamasoba T., Dolan D.F., Miller J.M.* Acquired resistance to acoustic trauma by sound conditioning is primarily mediated by changes restricted to the cochlea, not by systemic responses // Hear. Res. — 1999. — Vol. 127, № 1–2. — P. 31–40.

29. *Lim H.H., Jenkins O.H., Myers M.W. et al.* Detection of HSP 72 synthesis after acoustic overstimulation in rat cochlea // Hear. Res. — 1993. — Vol. 69, № 1–2. — P. 146–150.

30. *Nam Y.J., Stover T., Hartman S.S. et al.* Upregulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the rat cochlea following noise // Hear. Res. — 2000. — Vol. 146, № 1–2. — P. 1–6.

31. Mulroy M.J., Henry W.R., McNeil P.L. Noise-induced transient microlesions in the cell membranes of auditory hair cells // Hear. Res. — 1998. — Vol. 115, № 1–2. — P. 93–100.

32. *Miller J.M., Yamashita D., Minami S. et al.* Mechanisms and prevention of noise-induced hearing loss // Otol. Jpn. — 2006. — Vol. 16, № 2. — P. 139–153.

33. *Hirose K., Discolo C.M., Keasler J.R. et al.* Mononuclear phagocytes migrate into the murine cochlea after acoustic trauma // J. Comp. Neurol. — 2005. — Vol. 489, № 2. — P. 180–194.

34. *Yamasoba T., Pourbakht A., Sakamoto T. et al.* Ebselen prevents noise-induced excitotoxicity and temporary threshold shift // Neurosci. Lett. — 2005. — Vol. 380, № 3. — P. 234–238.

35. *Chen Y.S., Tseng F.Y., Liu T.C. et al.* Involvement of nitric oxide generation in noise induced temporary threshold shift in guinea pigs // Hear. Res. — 2005. — Vol. 203, № 1–2. — P. 94–100.

36. *Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П.* Общая патофизиология (с основами иммунопатологии). СПб. 2008. — 656 с.

37. *Henderson D., Bielefeld E.C., Harris K.C. et al.* The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss // Ear Hear. — 2006. — Vol. 27, № 1. — P. 1–19.

38. *Yamane H., Nakai Y., Takayama M. et al.* Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise-induced acoustic trauma // Eur. Arch. Otorhinolaryngol. — 1995. — Vol. 252, № 8. — P. 504–508.

39. *Yamasoba T., Harris C., Shoji F. et al.* Influence of intense sound exposure on glutathione synthesis in the cochlea // Brain Res. — 1998. — Vol. 804, № 1. — P. 72–78.

40. *Campo P., Subramaniam M., Henderson D.* The effect of 'conditioning' exposures on hearing loss from traumatic exposure // Hear. Res. — 1991. — Vol. 55, № 2. — P. 195–200.

41. *Ohlemiller K.K., McFadden S.L., Ding D.L. et al.* Targeted deletion of the cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase gene (Sod1) increases susceptibility to noise-induced hearing loss // Audiol. Neurootol. — 1999. — Vol. 4, № 5. — P. 237–246.

42. *Yamashita D., Jiang H.Y., Le Prell C.G. et al.* Post-exposure treatment attenuates noise-induced hearing loss // Neuroscience. — 2005. — Vol. 134, № 2. — P. 633–642.

43. *Kopke R.D., Weisskopf P.A., Boone J.L. et al.* Reduction of noise-induced hearing loss using L-NAC and salicylate in the chinchilla // Hear. Res. — 2000. — Vol. 149, № 1–2. — P. 138–146.

44. *Ohinata Y., Miller J.M., Altschuler R.A. et al.* Intense noise induces formation of vasoactive lipid peroxidation products in the cochlea // Brain Res. — 2000. — Vol. 878, № 1–2. — P. 163–173.

45. *White R.J., Reynolds I.J.* Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure // J. Neurosci. — 1996 — Vol. 16, № 18. — P. 5688–5697.

46. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* Ишемия головного мозга. М.: Медицина, 2001. — 328 с.

47. *Dawson V.L., Dawson T.M.* Nitric oxide neurotoxicity // J. Chem. Neuroanat. — 1996. — Vol. 10, № 3–4. — P. 179–190.

48. *Fridberger A., Flock A., Ulfendahl M. et al.* Acoustic overstimulation increases outer hair cell Ca2+ concentrations and causes dynamic contractions of the hearing organ // Proc. Natl. Acad. Sci. USA — 1998. — Vol. 95, № 12. — P. 7127–7132.

49. *Takada A., Schacht J.* Calcium antagonism and reversibility of gentamicin-induced loss of cochlear microphonics in the guinea pig // Hear. Res. — 1982. — Vol. 8, № 2. — P. 179–186.

50. *Mukherjea D., Jajoo S., Whitworth C. et al.* Short interfering RNA against transient receptor potential vanilloid 1 attenuates cisplatin-induced hearing loss in the rat // J. Neurosci. — 2008. — Vol. 28, № 49. — P. 13056–13065.

51. *Ladrech S., Guitton M., Saido T. et al.* Calpain activity in the amikacin-damaged rat cochlea // J Comp Neurol. — 2004. — Vol. 477, № 2. — P. 149–160.

52. *Heinrich U.R., Selivanova O., Feltens R. et al.* Endothelial nitric oxide synthase upregulation in the guinea pig organ of Corti after acute noise trauma // Brain Res. — 2005. — Vol. 1047, № 1. — P. 85–96.

53. *So H.S., Park C., Kim H.J. et al.* Protective effect of T-type calcium channel blocker flunarizine on cisplatin-induced

death of auditory cells // Hear. Res. — 2005. — Vol. 204, № 1–2. — P. 127–139.

54. *Dehne N., Lautermann J., ten Cate W.J. et al.* In vitro effects of hydrogen peroxide on the cochlear neurosensory epithelium of the guinea pig // Hear. Res. — 2000. — Vol. 143, № 1–2. — P. 162–170.

55. *Zhuravskii S.G., Lopotko A.I., Tomson V.V. et al.* Protective effect of calcium channel blocker verapamil on morphological and functional state of hair cells of the organ of Corti in experimental kanamycin-induced ototoxicity // Bull. Exp. Biol. Med. — 2002. — Vol. 133, № 4. — P. 404–407.

56. *Dechesne C.J., Kim H.N., Nowak T.S. et al.* Expression of heat shock protein, HSP72, in the guinea pig and rat cochlea after hyperthermia: Immunochemical and in situ hybridization analysis // Hear. Res. — 1992. — Vol. 59, № 2. — P. 195–204.

57. *Myers M.W., Quirk W.S., Rizk S.S. et al.* Expression of the major mammalian stress protein in the rat cochlea following transient ischemia // Laryngoscope. — 1992. — Vol. 102, № 9. — P. 981–987.

58. *Altschuler R.A., Lim H.H., Ditto J. et al.* Protective mechanisms in the cochlea: Heat shock proteins // In: *Salvi R.J., Henderson D., Fiorino F. et al.* Auditory System Plasticity and Regeneration. Stuttgart, Thieme. — 1996. — P. 202–212.

59. *Yoshida N., Kristiansen A., Liberman M.C.* Heat stress and protection from permanent acoustic injury in mice // J. Neurosci. — 1999. — Vol. 19, № 22. — P. 10116–10124.

60. *Keithley E.M., Ma C.L., Ryan A.F. et al.* GDNF protects the cochlea against noise damage // Neuroreport. — 1998. — Vol. 9, № 10. — P. 2183–2187.

61. *Yamasoba T., Schacht J., Shoji F. et al.* Attenuation of cochlear damage from noise trauma by an iron chelator, a free radical scavenger and glial cell line-derived neurotrophic factor in vivo // Brain Res. — 1999. — Vol. 815, № 2. — P. 317–325.

62. *Shoji F., Yamasoba T., Louis J.C. et al.* GDNF protects hair cell from noise damage // Assoc. Res. Otolaryngol. Abstr. — 1998. — № 21 — P. 539.

63. *Takeda S., Hata R., Cao F. et al.* Ischemic tolerance in the cochlea // Neurosci. Lett. — 2009. — Vol. 462, № 3. — P. 263–266.

64. *Niu X., Canlon B.* Activation of tyrosine hydroxylase in the lateral efferent terminals by sound conditioning // Hear. Res. — 2002. — Vol. 174, № 1–2. — P. 124–132.

65. *Sha S.H., Schacht J.* Salicylate attenuates gentamicin-induced ototoxicity // Lab. Invest. — 1999. — Vol. 79, № 7. — P. 807–813.

66. *Sha S.H., Qiu J.H., Schacht J.* Aspirin to prevent gentamicin-induced hearing loss // N. Engl. J. Med. — 2006. — Vol. 354, № 17. — P. 1856–1857.

67. *Oliveira J.A., Canedo D.M., Rossato M. et al.* Self-protection against aminoglycoside ototoxicity in guinea pigs // Otolaryngol. Head Neck Surg. — 2004. — Vol. 131, № 3. — P. 271–279.

68. *Minami S.B., Sha S.H., Schacht J.* Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced ototoxicity // Hear. Res. — 2004. — Vol. 198, № 1–2. — P. 137–143.

69. *Li G., Sha S.H., Zotova E. et al.* Salicylate protects hearing and kidney function from cisplatin toxicity without compromising its oncolytic action // Lab. Invest. — 2002. — Vol. 82, № 5. — P. 585–596.

70. *Ding D., McFadden S.L., Browne R.W. et al.* Late dosing with ethacrynic acid can reduce gentamicin concentration in perilymph and protect cochlear hair cells // Hear. Res. — 2003. — Vol. 185, № 1–2. — P. 90–96.

ЛАМИНЫ И ЛАМИНОПАТИИ: РОЛЬ В САМООБНОВЛЕНИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ВЗРОСЛОГО ОРГАНИЗМА

А.С. Забирник[1,2], А.Я. Гудкова[3,4], А.Б. Малашичева[3], А.А. Костарева[3]

[1] Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, Харьков, Украина
[2] Лаборатория клеточных биотехнологий «Вирола», Харьков, Украина
[3] ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия
[4] ГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербугский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Забирник Арсений Сергеевич — аспирант Харьковского национального университета им. В.Н. Казарина, научный сотрудник Лаборатории клеточных биотехнологий «Вирола»; *Гудкова Александра Яковлевна* — доктор медицинских наук, заведующая НИЛ кардиомиопатий института сердечно-сосудистых заболеваний ПСПбГМУ, ведущий научный сотрудник НИЛ молекулярной биологии Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Малашичева Анна Борисовна* — кандидат биологических наук, заведущая НИЛ молекулярной кардиологии института Молекулярной биологии и генетики ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Костарева Анна Александровна* — кандидат медицинских наук, директор института Молекулярной биологии и генетики ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: arseny-z@yandex.ru (Забирник Арсений Сергеевич).

Резюме

Ламины — белки, принадлежащие к промежуточным филаментам, формирующие ядерную ламину — протеиновую сеть, расположенную на внутренней поверхности ядерной мембраны. Кроме основной механической функции в последнее время ламинам уделяется все большая роль в функционировании генетического аппарата клетки. Данный обзор посвящен строению и функциям ламиновых белков, а также группе заболеваний человека, вызванных мутациями в гене ламина — ламинопатиям, молекулярно-клеточные механизмы развития которых до сих пор остаются во многом неясными. Отдельное внимание уделено функциям ламинов в функционировании, дифференцировки и самоподдержании стволовых клеток взрослого организма.

Ключевые слова: ламины, ламинопатии, дифференцировка, МСК, LMNA, диференціювання, МСК, LMNA.

LAMINS AND LAMINOPATHIES: THEIR ROLE IN SELF-RENEWAL AND DIFFERENTIATION OF ADULT STEM CELLS

A.Zabirnik[1, 2, 3], A.Ya. Gudkova[3, 4], A. Malashicheva[3], A. Kostareva[3]

[1] V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine
[2] Laboratory of Cellular Biotechnology «Virola», Kharkov, Ukraine
[3] Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia
[4]First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: akostareva@hotmail.com (Anna A. Kostareva — PhD., Director of the Institute of Molecular Biology and Genetics Almazov Heart, Blood and Endocrinology Centre).

УДК.576.3

Abstract

Lamins are intermediate filaments proteins that form the nuclear lamina — a protein meshwork, placed on the inner surface of the nuclear membrane. In addition to its basic mechanical function in the nucleus nowadays lamin is thought to play an increasing role in the functioning of the cell genetic apparatus. This paper describes three points about lamin proteins. First is the structure and functions of lamin proteins, with great attention to lamin A, which is more interesting from the point of view of the development of pathologies and diversity of its functions. A group of human diseases caused by mutations in lamin proteins — laminopathies, molecular- cellular mechanism of which still remains obscure is also discussed here. Special attention is paid to the functioning of lamins in differentiation and self-renewal of stem cells, especially adult stem cells and their role as one of the mechanisms in the formation and development of laminopathies.

Key words: lamin, laminopathies, differentiation, MSC, LMNA.

Статья поступила в редакцию 01.11.13, принята к печати 10.11.13.

В эукариотических клетках ядро отделяется от цитоплазмы с помощью ядерной оболочки, которая состоит из двухслойной ядерной мембраны, ядерной ламины и ядерного порового комплекса. Ядерная ламина — это ячеистая структура, состоящая из белков промежуточных филаментов V типа — ламинов типа А и В. Хотя ранее предполагалось, что ядерная ламина оказывает лишь структурную поддержку мембранам ядерной оболочки, многие экспериментальные данные указывают, что она прямо или косвенно вовлечена и в другие клеточные функции [1]. У позвоночных ламины имеют молекулярную массу 60–80 кДа и разделяются на две группы (А и В) на основании их изоэлектрических точек. Две основные изоформы ламинов типа А позвоночных, ламины А и С, являются производными одного гена (LMNA) и получаются путем альтернативного сплайсинга.

В отличии от ламина В-типа, который экспрессируется во всех клетках перманентно, экспрессия ламинов А-типа регулируется в процессе онтогенеза (Schatten et al. 1985). Экспрессия Ламина А/С в большинстве немышечных органов начинается только после рождения. Клетки же гемопоэтических линий экспрессируют только ламины В-типа [2].

Функции ламинов

Регуляция ядерной формы и механической стабильности.

Некоторые из функций ядерной ламины аналогичны таковым у белков промежуточных филаментов цитоскелета, которые участвуют в определении и поддержании формы клеток их и механических свойств [3]. Кроме того, клетки экспрессирующие мутантные ламиновые белки часто содержат деформированные ядра [4]. Существует доказательство того, что ядерные ламины связаны с цитоскелетом через комплекс белков, известных как LINC комплекс. В этом комплексе интегральные белки внутренней ядерной мембраны Sun1 и Sun2 взаимодействуют с белками внешней ядерной мембраны несприном-1, несприном -2, и несприном-3а, в пространстве между внутренней и внешней ядерной мембранами. Тогда как белки Sun связываются с ламинами, несприны ассоциированы и с микрофиламентами и промежуточными филаментами цитоскелетов через прямые связи с актином и плектином. Другой ламин-связывающий белок внутренней ядерной мембраны, эмерин, связывает непосредственно с изоформами несприна, обеспечивая дополнительную связь между ламинами и цитоскелетом [5].

Организация хроматина и регуляция экспрессии генов.

Существенная потеря периферического гетерохроматина в ядрах клеток, экспрессирующих одну из мутантных форм ламина (прогерин) в подчеркивает важную роль ламина в модификации и/или организации хроматина [6]. Взаимодействие хроматина с ламином, прямое или косвенное, имеет значительное влияние на эпигенетические модификации гистонов, и именно ламинсвязанные микродомены в ядре могут регулировать модификации хроматина [7]. В ядерной ДНК обнаружены протяженные участки хромосом размером 0.1–10 Mb, с которыми связываются ламины. Они называются ламин-асссоциированными доменами(LAD) и характеризуются низкими плотностью генов и уровнем их экспрессии [8]. Взаимодействие ламинов с хроматином может быть опосредованного либо их прямым связыванием с гистонами, либо со специфическими последовательностями ДНК в регионах MARs/SARs [9]. Ламины могут регулировать транскрипцию хроматина путем организации последнего в активные и неактивные кластеры. Как правило, ассоциация регионов LAD с ламиной и

транслокация хромосом к периферии ядра связана с репрессией генов. Такие процессы, например, характерны для дифференцировки стволовых клеток, где ламина играет существенную роль в транскипционной активации генов [10].

Роль ламинов в клеточном цикле и дифференцировке. Дефицит ламина А или экспрессия мутантного ламина А ведет к массиву пролиферативных дефектов из-за ареста клеточного цикла и/или преждевременного старения. Существует доказательство того, что ламины А/С участвует в регуляции сигнального пути pRb/E2F, который ответственен за переход G1/S клеточного цикла [11]. Достаточно давно показана ключевая роль ламинов и в других, связанных с клеточным циклом процессах — опухолевом перерождении, приобретении клетками менее дифференцированного фенотипа, апоптозе. Множество аспектов в дисфункции ядерной ламины в опухолевых клетках, роли в развитии рака, и месте ламинов в онкологии подробно описана, в частности, в работе [12]. Исследователи проводят связь между процессами, характерными для ламинопатий и апоптозом, клеточным старением, нарушением энергетического обмена, показанными в исследованных клетках — хондроцитах.

Данные о вовлечении ламинов в регуляцию клеточного цикла и различной экспресии в процессе развития, свидетельствуют о том, что ламины также принимают важнейшее участие в регуляции клеточной дифференцировки. Кроме того, доказательством участия ламина в регуляции дифференцировки служат события, происходящие в случае прогерий, мио- и липодистрофий, вызванных мутациями ламина А/С, что также будет показано ниже.

Ламинопатии

Генетические исследования с конца 1990-х годов и до наших дней показали, что мутации LMNA являются причиной более десятка клинических состояний, формирующих хорошо описанные синдромы. В целом, их можно разделить на заболевания, поражающие преимущественно поперечно-полосатые мышцы, жировую ткань, периферические нервы, или множественные ткани в результате прогероидных фенотипов. Эти заболевания характеризуются преимущественным поражением определенных систем организма несмотря на то, что ламины А являются компонентами ядерной ламины практически всех дифференцированных соматических клеток [13]. Несмотря на большое количество выявленных ламин-ассоциированных заболеваний, точный механизм их развития до сих пор не ясен.

Первым заболеванием, впервые связанным с мутацией в гене LMNA, была аутосомальная доминантная мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса (EDMD) [14]. В типичном случае пациенты с EDMD демонстрируют ранние контрактуры локтя, ахиллова сухожилия и задней части шеи, жесткость позвоночника, медленно прогрессирующую мышечную слабость в руках и голенях и дилятационнаую кардиомиопатию (DCM) с ранним проявлением блокады предсердно-желудочковой проводимости. Вскоре после того, как мутации LMNA были показаны причиной EDMD, было установлено, что мутации в этом гене могут вызвать другие наследственные заболевания, поражающие, прежде всего, поперечно-полосатые мышцы: дилятационную кардиомиопатию 1А [15] и конечностно-поясную прогрессирующую мышечную дистрофию 1В (LGMD) [16].

Первоначально предполагалось, что EDMD, DCM 1A и LGMD вызываются различными мутациями LMNA. Тем не менее, фенотипическая вариабельность, скорее всего, вызвана влиянием генов-модификаторов или факторов окружающей среды. В пределах одной семьи разные пациенты могут иметь изолированную кардиомиопатию либо миопатию.

После того, было показано, что мутации LMNA вызывают патологии поперечно-полосатых мышц, важное открытие было сделано в отношении другого моногенного заболевания, поражающего различные ткани — синдрома частичной семейной липодистрофии Дуннигана (FPLD). Липодистрофии — это группа заболеваний характеризующихся отсутствием или уменьшением подкожной жировой ткани. Пациенты с заболеванием FPLD рождаются с нормальным распределением жира, но после наступления половой зрелости развивается аномальное перераспределение жира, сахарный диабет и инсулинорезистентность. Зная, что генетический локус для этого заболевания находится в хромосоме 1q21–22, Cao и Hegele (2000) выдвинули гипотезу, что как и в случае с региональной мышечной потерей в EDMD, региональная дегенерация адипоцитов при FPLD делает LMNA кандидатом на роль первопричины. И действительно, они определили новые миссенс-мутации в 8 экзоне, ведущие к аминокислотной замене R482Q в LMNA, которые сопутствовали с фенотипом липодистрофии в пяти канадских семьях. Интересно, что для еще одной из ламинопатий — семейной липодистрофии Даннигана (FPLD2) — показано наличие у 85 % пациентов гетерозиготной мутации в 482 кодоне с заменой основной аминокислоты на нейтральную.

Спустя несколько лет De Sandre-Giovannoli et al. (2002) провели генетическое картирование в нескольких алжирских семьях с аутосомно-

рецессивной формой болезни Шарко-Мари-Тута 2 типа, и также выявили мутации в LMNA, ведущие к аминокислотным заменам R298C. Пациенты с болезнью Шарко-Мари-Тута 2-го типа, в том числе вызванной мутациями в LMNA, имеют небольшое или отсутствующее снижение нервной чувствительности, потерю больших миелинизированных волокон, и аксональную дегенерацию. Novelli et al. (2002) показали, что мутации LMNA могут вызвать мандибулоакральную дисплазию(MAD), редкое заболевание с поражением костной и хрящевой ткани.

В качестве одного последних фенотипов ламинопатий была описана прогерия Хатчинсона-Гилфорда (HGPS) — редкое заболевание с признаками ускоренного или преждевременного старения [17]. Лица с этим аутосомно-доминантным спорадическим синдромом обычно умирают на втором десятилетии жизни от инфаркта миокарда или инсульта. Другими заметными фенотипическими признаками являются склеротические изменения кожи, контрактуры суставов, выпуклые глаза, уменьшенные челюсти, уменьшение подкожно-жировой клетчатки, выпадение волос, пятнистость кожи, видная сквозь кожу сосудистая сеть, и нарушения роста. В 2003 году Eriksson и его коллеги локализовали ответственный ген на хромосоме 1q, наблюдая за двумя случаями, в которых это хромосомные области были от одного родителя. Затем они показали, что 18 из 20 классических случаев HGPS характеризуются de novo мутацией G608G в 11 экзоне LMNA и другом случае с мутацией G608S [18]. Эти мутации активируют скрытый донорский сайт сплайсинга, в результате чего синтезирутся белок с делецией 50 аминокислот в области карбоксильного конца преламина А. Этот укороченный вариант преламина не проходит последующий процессинг до зрелого ламина А. Другие миссенс-мутации LMNA, не приводящие к нарушению сплайсинга РНК в экзоне 11, также описаны в варианте прогероидных синдромов. Мандибулоакральнэе дисплазии, вызванные мутациями LMNA, как обсуждалось ранее, также имеют прогероидные особенности [19].

Ламины в функционировании и дифференцировке стволовых клеток

Стволовые клетки обладают разной степенью дифференцировочного потенциала — от плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток, которые дают начало всем типам клеток зародыша, до мультипотентных (МСК) и унипотентных (эндотелиальные клетки-предшественники) стволовых клеток взрослого организма, которые могут дифференцироваться в любое из подмножества типов клеток или только один тип клеток специфичных для ткани, из которой они получены, соответственно. Однако последние данные свидетельствуют о том, что многие «унипотентные» стволовые клетки взрослого организма обладают способностью дифференцироваться или трансдифференцироваться в другие типы клеток, отличных от ткани их происхождения [20–22]. В попытке объяснить механизмы развития ламинопатий была выдвинута гипотеза, о том, что нарушение функций тканей преимущественно мезенхимного происхождения может быть результатом нарушения дифференцировки мезенхимных стволовых клеток [23].

Поскольку ламины принимают участие в дифференцировке стволовых клеток взрослого организма, экспрессия мутантной формы ламина — прогерина — ведет к дефектам в популяции мышиных стволовых клеток [24] и дифференцировочном потенциале мезенхимальных стволовых клеток человека, воздействуя на сигнальный путь Notch [25]. Кроме того, было показано участие ламинов А/С в дифференцировке остеобластов, так как подавление экспрессии ламинов ведет к нарушениям остеобластогенеза и ускорению остеокластогенеза в стромальных клетках костного мозга человека [26]. Вышеперечисленные исследования свидетельствуют в пользу того, что ламины А необходимы для постнатального роста, поддержания покоя и дифференцировки взрослых стволовых клеток, в частности мультипотентных мезенхимных стромальных клеток.

Известно, что контроль гомеостаза стволовых клеток в тканях, например, баланс между пролиферацией, дифференцировкой, апоптозом и старением четко связаны с регуляцией репарации и обновления тканей. Было высказано предположение, что сопряженные с заболеваниями мутации ламина А нарушают баланс между пролиферацией и дифференцировкой стволовых клеток взрослого организма, что приводит к менее эффективной регенерации тканей [27]. Так в исследовании на культуре миобластов C2C12 стабильно экспрессирующих ламиновую мутацию R453W, вызывающую EMD, показано что клетки дефектны по экспрессия миогенных маркеров, не выходят из клеточного цикла должным образом и склонны к апоптозу [28]. Процесс дифференцировки также нарушен в миобластах, экспрессирующих другие мутантные ламины, ассоциированные с EMD: G232E, Q294P или R386K [29].

Существует, по крайней мере, три сигнальных пути задействованных в регенерации стволовых клеток взрослого организма, которые связаны с функциями ламина А и его партнерами. Это

сигнальные пути Rb/E2F и Rb/MyoD, путь Wnt/β-катенин, а также TGF-β/Smad-сигналинг. Таким образом, ламины А можно рассматривать как ядерные «сигналинговые рецепторы», которые могут получать и преобразовывать сигналы от внеклеточного матрикса и цитозоля [30]. В контексте старения Wnt сигнальный путь в последнее время был связан с патологическим фиброгенным преобразованием в стареющих саттелитных мышечных клетках в процессе мышечной регенерации [31]. Более того, повышение TGF-β сигналинга посредством МАРК киназы приводит к преждевременному старению человеческих фибробластов [32], который, как известно, вызывают активацию β-катенина [33]. Таким образом, увеличение фиброза в сердце и мышцах больных с мутациями ламина А/С и эмерина могут возникать в результате индукции преждевременного старения в резидентных стволовых клетках в результате нарушенного взаимодействия между этими путями.

Таким образом, утрата нормальной регуляции нескольких путей, способствующих сохранению регенерации стволовых клеток взрослого организма, может приводить к преждевременной повреждению тканей с мутаций ламина А/С. Это ведет к потере защиты от стресса, а также к дефектам в ряде клеточных процессов стволовых клеток взрослого организма и/или их предшественников. Поэтому, ламины А могут рассматриваться как важные модуляторы функций стволовых клеток взрослого организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках ФЦП «Кадры», соглашение No 8105 от 23.10.2012. и гранта РФФИ 14-4-01265.

Литература

1. *Prokocimer M., Davidovich M., Nissim-Rafinia M. et al.* Nuclear lamins: Key regulators of nuclear structure and activities // J. Cell. Mol. Med. — 2009. — № 13. — P. 1059–1085.

2. *Rober R.A., Sauter H., Weber K., Osborn M.* Cells of the cellular immune and hemopoietic system of the mouse lack lamins A/C: distinction versus other somatic cells // J. Cell. Sci. — 1990. — Vol. 95. — P. 587–598.

3. *Goldman R.D., Grin B., Mendez M.G., Kuczmarski E.R.* Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure // Curr. Opin. Cell. Biol. — 2008. — Vol. 20. — P. 28–34.

4. *Goldman R.D., Shumaker D.K., Erdos M.R. et al.* Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome // Proc. Natl. Acad. Sci. — 2004. — Vol. 101. — P. 8963–8968.

5. *Wheeler M.A., Davies J.D., Zhang Q. et al.* Distinct functional domains in nesprin-1a and nesprin-2b bind directly to emerin and both interactions are disrupted in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy // Exp. Cell. Res. — 2007. — Vol. 313. — P. 2845–2857.

6. *Shumaker D.K., Dechat T., Kohlmaier A. et al.* Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging // Proc. Natl. Acad. Sci. — 2006. — Vol. 103. — P. 8703–8708.

7. *Pegoraro G., Kubben N., Wickert U., Gohler H., Hoffmann K., Misteli T.* Ageing-related chromatin defects through loss of the NURD complex // Nat. Cell. Biol. — 2009. — № 11. — P. 1261–1267.

8. *Guelen L., Pagie L., Brasset E. et al.* Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions // Nature. — 2008. — Vol. 453. — P. 948–951.

9. *Mattout A., Goldberg M., Tzur Y., Margalit A., Gruenbaum Y.* Specific and conserved sequences in D mela-nogaster and C elegans lamins and histone H2A mediate the attachment of lamins to chromosomes // J. Cell. Sci. — 2007. — Vol. 120. — P. 77–85.

10. *Szczerbal I., Foster H.A., Bridger J.M.* The spatial repositioning of adipogenesis genes is correlated with their expression status in a porcine mesenchymal stem cell adipogenesis model system // Chromosoma. — 2009. — Vol. 118, № 5. — P. 647–663.

11. *Johnson B.R., Nitta R.T., Frock R.L. et al.* A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation // Proc. Natl. Acad. Sci. — 2004. — Vol. 101. — P. 9677–9682.

12. *Chow K.H., Factor R.E., Ullman K.S.* The Nuclear Envelope Environment and Its Cancer Connections // Nat. Rev. Cancer. — 2012. — № 12. — P. 196–209.

13. *Worman H., Ostlund C., Wang Y.* Diseases of the nuclear envelope // Cold Spring Harbor perspectives in biology. — 2010. — P. 760.

14. *Bonne G., Di Barletta M.R.,Varnous S. et al.* Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy // Nat. Genet. — 1999. — Vol. 21. — P. 285–288.

15. *Fatkin D., MacRae C., Sasaki T. et al.* Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardi-omyopathy and conduction-system disease // N. Engl. J. Med. — 1999. — Vol. 341. — P. 1715–1724.

16. *Muchir A., Bonne G., van der Kooi A.J. et al.* Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B) // Hum. Mol. Genet. — 2000. — № 9. — P. 1453–1459.

17. *Hutchinson J.* Case of congenital absence of hair, with atrophic condition of the skin and its appendages, in a boy whose mother had been almost wholly bald from alopecia areata from the age of six // Lancet. — 1886. — Vol. I. — P. 923.

18. *Eriksson M., Brown W.T., Gordon L.B. et al.* Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-

Gilford progeria syndrome // Nature. — 2003. Vol. 423. — P. 293–298.

19. *Novelli G., Muchir A., Sangiuolo F. et al.* Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C // Am. J. Hum. Genet. — 2002. — Vol. 71. — P. 426–431.

20. *Qian H., Yang Y., Li J., Huang J., Dou K., Yang G.* The role of vascular stem cells in atherogenesis and post-angioplasty restenosis // Ageing. Res. Rev. — 2007. — № 6. — P. 109–127.

21. *Malashicheva A.B., Zabirnik A.S., Smolina N.A., Omelchenko E.A., Dmitrieva R.I., Kostareva A.A.* Lamin A/C mutations change differentiation potential of mesenchymal stem cells // Tsitologiya. — 2013. — Vol. 55, № 5. — P. 313–317.

22. *Bogdanova M.A., Gudkova A. Ya., Zabirnik A. et al.* Nuclear lamins regulate osteogenic differentiation of mesenchimal stem cells // Cell and Tissue Pathology. — 2014. — in press.

23. *Mounkes L.C., Stewart C.L.* Aging and nuclear organization: lamins and progeria // Curr. Opin. Cell. Biol. — 2004. — Vol. 16. — P. 322–327.

24. *Espada J., Varela I., Flores I. et al.* Nuclear envelope defects cause stem cell dysfunction in premature-aging mice // J. Cell. Biol. — 2008. Vol. 181. — P. 27–35.

25. *Scaffidi P., Misteli T.* Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing // Nat. Cell. Biol. — 2008. — № 10. — P. 452–459.

26. *Rauner M., Sipos W., Goettsch C. et al.* Inhibition of lamin A/C attenuates osteoblast differentiation and enhances RANKL-dependent osteoclastogenesis // J. Bone Miner. Res. — 2009. — Vol. 24. — P. 78–86.

27. *Gotzmann J., Foisner R.* A-type lamin complexes and regenerative potential: a step towards understanding laminopathic diseases? // Histochem. Cell. Biol. — 2006. — Vol. 125. — P. 33–41.

28. *Favreau C., Higuet D., Courvalin J.C., Buendia B.* Expression of a mutant lamin A that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy inhibits in vitro differentiation of C2C12 myoblasts // Mol. Cell. Biol. — 2004. — Vol. 24, № 4. — P. 1481–1492.

29. *Parnaik V.K., Manju K.* Laminopathies: multiple disorders arising from defects in nuclear architecture // J. Biosci. — 2006. — Vol. 31. — P. 405–421.

30. *Pekovic V., Hutchison C.J.* Adult stem cell maintenance and tissue regeneration in the ageing context: the role for A-type lamins as intrinsic modulators of ageing in adult stem cells and their niches // J. Anat. — 2008. — Vol. 213. — P. 5–25.

31. *Brack A.S., Conboy M.J., Roy S. et al.* Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis // Science. — 2007. — Vol. 317. — P. 807–810.

32. *Kim E.S., Kim M.S., Moon A.* TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells // Int. J. Oncol. — 2004. — Vol. 25. — P. 1375–1382.

33. *Sato M.* Upregulation of the Wnt/beta-catenin pathway induced by transforming growth factor-beta in hypertrophic scars and keloids // Acta Derm. Venereol. — 2006. — Vol. 86. — P. 300–307.

РОЛЬ ГИПОКСИИ В ПОДДЕРЖАНИИ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ И КОМОРБИДНОСТЯМИ

Р.И. Дмитриева, М.А.Клюкина, С.Н. Козлова, А.Ю. Зарицкий

ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ

Дмитриева Рената Игоревна — кандидат биологических наук, руководитель группы клеточной биологии; *Клюкина Мария Александровна* — лаборант исследователь группы клеточной биологии; *Козлова Светлана Николаевна* — доктор медицинских наук, профессор кафедры внутренних болезней; *Зарицкий Андрей Юрьевич* — доктор медицинских наук, директор Института гематологии.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии имени В.А. Алмазова» МЗ РФ, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: renata.i.dmitrieva@gmail.com (Дмитриева Рената Игоревна).

Резюме

В данной работе мы показали, что культивирование мультипотентных мезенхимных стволовых клеток полученных от пациентов с сердечной недостаточностью и коморбидностями в условиях умеренной гипоксии (5 % O_2) способствует длительному поддержанию высокого уровня пролиферативной активности и одним из возможных молекулярных механизмов отвечающих за поддержание динамики роста КМ-ММСК в культуре при длительном культивировании в условиях гипоксии может являться активация TGFb сигнального пути.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга, гипоксия, сердечная недостаточность, TGF-beta сигнальный путь.

THE ROLE OF HYPOXIA IN MAINTENANCE OF PROLIFERATIVE ACTIVITY OF BONE MARROW MULTIPOTENT MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM PATIENTS WITH HEART FAILURE AND CO-MORBIDITIES

R.I. Dmitrieva, M.A.Klyukina, S.N. Rozlova, A.Yu. Zaritsky

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: renata.i.dmitrieva@gmail.com (Renata I. Dmitrieva — PhD in Biology, Head of Group of Cell Biology).

Abstract

We have demonstrated here that culturing of multipotent mesenchymal stem cells from heart failure patients with co-morbidities in hypoxic conditions (5 % O_2) results in long-term maintenance of a high level of proliferative activity and that the activation of TGFb signaling. Might be responsible for this effect.

Key words: bone marrow multipotent mesenchtymal stromal sells, hypoxia, heart failure, TGF-beta signaling.

Статья поступила в редакцию 01.10.13, принята к печати 15.11.13.

УДК.612.273.2:616.12-008.46

Введение

Для снижения смертности от сердечной недостаточности, а также для сведения к минимуму случаев, когда неизбежна пересадка сердца, необходим поиск новых терапевтических подходов к лечению этого заболевания, направленных на восстановление структуры и функции сердечной мышцы. В качестве нового перспективного терапевтического подхода в последние две декады все чаще рассматривают трансплантацию стволовых клеток, в том числе мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК). Недавние исследования когорты пациентов с сердечной недостаточностью в США показали, что в течение двух последних десятилетий доля пациентов старше 80 лет среди больных СН выросла в два раза, существенно выросло число пациентов с такими коморбидностями, как ожирение, диабет, остеопороз, заболевания почек, заболевания щитовидной железы, гиперхолестеринемия. Употребление лекарственных препаратов выросло более чем на 50 % [1]. Все эти факторы могут оказывать существенное влияние на функциональные свойства ММСК, полученных из тканей пациента СН и ограничивать возможности аутологичной трансплантации. В данной работе нами были исследованы возможности улучшения качества образцов ММСК, полученных из костного мозга таких пациентов.

Материалы и методы

Пациенты: в исследование было включено 34 донора, в том числе 10 пациентов с изолированной сердечной недостаточностью (СН), 15 пациент с сердечной недостаточностью и ожирением (СН+О) и 9 с сердечной недостаточностью, ожирением и диабетом (СН+О+Д). Исследование проводилось в соответствии со стандартами Хельсинской Декларации (1989), всеми пациентами было подписано информированное согласие.

Получение культур КМ-МСК

Аспират костного мозга получали из подвздошной кости донора. Культуру ММСК получали стандартным методом [2]. Выделенные на фикольном градиенте мононуклеарные клетки высевали в культуральные флаконы (300000 на см^2) и культивировали в стандартной среде до получения конфлюэнтной культуры. Этому пассажу присваивали нулевой номер (P0).

Определение времени удвоения популяции (PD)

Хотя при изучении клеток, полученных путем экспансии исходного образца, наиболее удобным методом документирования и систематизации результатов является подсчет пассажей, нормализация результатов по номеру пассажа может оказаться некорректной и привести к неверным выводам. Более корректным является подсчет числа in vitro удвоений популяции клеток [3]. Культуру ММСК получают методом селекции по адгезии и начальное количество ММСК в исходном образце мононуклеаров костного мозга может быть определено при подсчете клоногенных клеток в каждом образце (CFU). Подсчет CFU производится, исходя из предположения, что каждая колония ММСК была образована из одной «родительской» клоногенной клетки. Метод хорошо описан ранее [3], в его основе лежит метод последовательных разведений: суспензию клеток последовательно разводят в два раза в шести рядах 96-луночного культурального планшета таким образом, чтобы в первом ряду было 20000 клеток на лунку, в шестом ряду — 625 клеток на лунку. Через 10 дней культивирования в стандартных условиях определяются лунки, в которых образовались/не образовались колонии ММСК и вычисляется содержание клоногенных клеток в исходном образце. После этого, на каждом пассаже подсчитывается количество клеток и определяется время удвоения популяции и число кумулятивных удвоений популяции in vitro с использованием калькулятора: http://www.doubling-time.com/compute.php.

Анализ экспрессии генов

РНК выделяли стандартным тризольным методом, концентрацию и качество РНК измеряли на спектрофотометре ND-1000 (Thermo Scientific,

Таблица 1

СПИСОК ПРАЙМЕРОВ

ген	F-праймер	R-праймер
TGFbRII	CCTGACTTGTTGCTAGTCATATT	AACGCGGTAGCAGTAGAA
ENG	ATGTCCTCTTCCTGGAGTT	GACACTGCTGTTTACACTGA
ALK1	CGAGTTCGTCAACCACTACT	AGCTGGCCATCTGTTCC
ALK5	TCCGTGAGGCAGAGATTTA	GCTGAGTCCAAGTACCATTG
Activin	ACCAGTCGTCCCAGAATAA	ACAGTAGCAAAGCTGATGAC

США). кДНК синтезировали из 1 мкг тотальной РНК при помощи набора MMLV RT kit (Evrogen, Россия). Уровень экспрессии проводили при помощи метода ПЦР в реальном времени на программируемом амплификаторе 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS SYBR+ROX (Evrogen, Россия). Дизайн праймеров производили с использованием программы PrimerQuest (Integrated DNA Technologies). Список праймеров представлен в таблице 1.

Результаты и обсуждение

Анализ динамики экспансии МСК при разных условиях культивирования

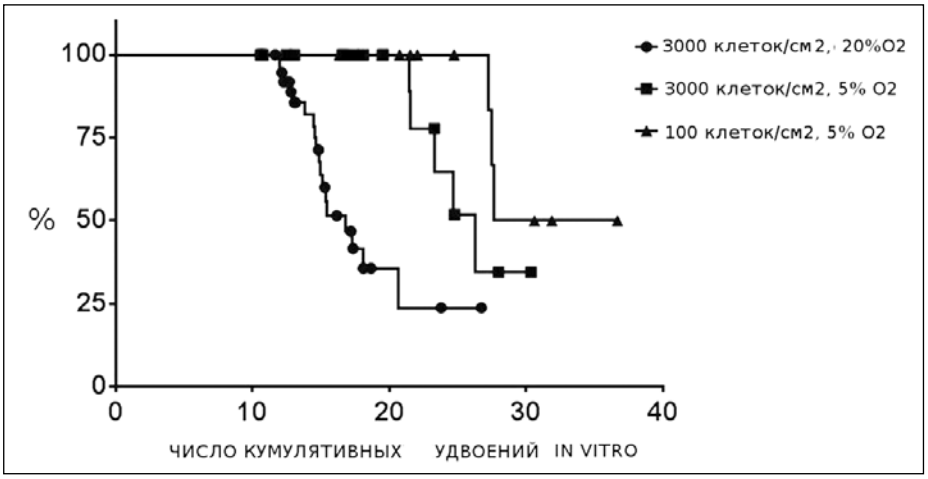
Результаты исследования пролиферативной активности/времени удвоения *in vitro* индивидуальных образцов ММСК, полученных от пациентов с СН при разных условиях ведения культуры были объединены в общий пул и проанализированы с использованием статистического метода Каплана-Майера с целью оценки достоверности различий между группами. Процедура Каплана-Майера обычно используется для анализа времени «жизни» любого объекта или продукта и применяется в основном к так называемым «цензурированным» (или неполным) данным. Возможность цензурирования позволяла нам учитывать в анализе все образцы, включая и те, время удвоения для которых по тем или иным причинам исследовались только на ранних пассажах. Также, в этом методе анализа используется не функция распределения, а так называемая функция выживания, представляющая собой вероятность того, что объект проживет время больше t. Именно функция выживания идеально подходила для анализа продолжительности поддержания высокой пролиферативной активности культуры ММСК *in vitro*: в нашем исследовании мы считали культуру активно пролиферирующей (или «живой») до тех пор, пока время удвоения популяции было не более 36 часов, а «время жизни» культуры оценивали как число кумулятивных удвоений *in vitro,* которые пройдет культура, поддерживая время удвоения не более 36 часов.

На рисунке 1 показано, что вероятность длительного поддержания пролиферативной активности в образцах ММСК, которые получены при высевании 3000 клеток/см^2 в условиях нормоксии существенно ниже, чем для образцов, которые культивировались при высевании 100 клеток/см^2, как в условиях нормоксии, так и в условиях гипоксии. Таким образом, статистический анализ результатов исследования динамики экспансии ММСК при разных условиях культивирования подтвердил наблюдения, сделанные для индивидуальных образцов, о том, что условия культивирования являются важным фактором коррекции изменений/нарушений функциональных свойств ММСК, связанных с индивидуальными особенностями донора и/или пациента.

Роль TGF-β/ENG сигнального пути в поддержании стабильности функциональных свойств образцов ММСК, полученных при ведении культуры в условиях умеренной гипоксии

Результаты исследований механизмов влияния гипоксии на функциональные свойства ММСК можно назвать противоречивыми. Недавно были опубликованы данные, свидетельствуют о том, что

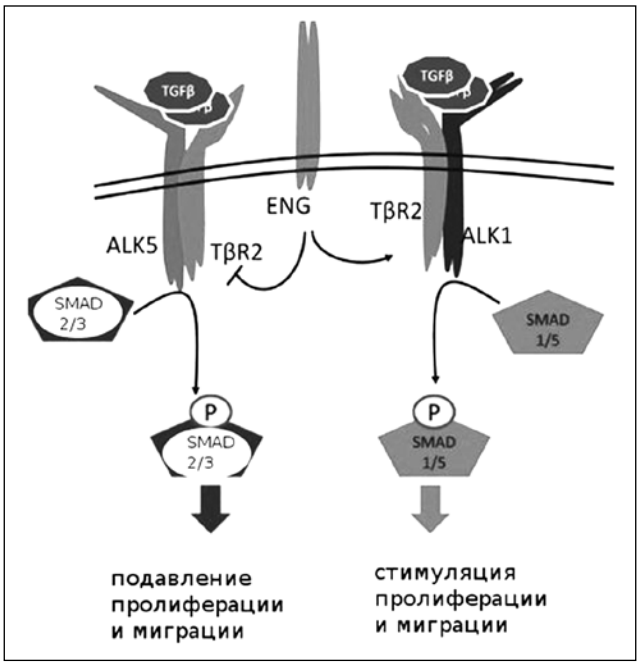
Рисунок 1. Умеренная гипоксия и низкая плотность высевания существенно повышают эффективность экспансии ММСК *in vitro*; Медиана сохранения высокой пролиферативной активности для условий 3000 клеток/см^2, 20 % O^2 — 16,8 кумулятивных удвоений in vitro; для условий 3000 клеток/см^2, 5 % O^2 — 26,3 кумулятивных удвоений in vitro; для условий 100 клеток/см^2, 5 % O^2 — 32,1 кумулятивных удвоений in vitro (p<0,0001 Mantel-Cox test)



молекулярный механизм эффекта гипоксии может быть связан со стимуляцией экспрессии сигнального пути HIF-1 — TWIST (TWIST — фактор, экспрессирующийся в ММСК и участвующий в индукции эпителиально-мезенхимального перехода), что, в свою очередь, предотвращает активацию циклин-зависимого ингибитора киназы 1А (p21) и, соответственно, развитие признаков апоптоза и репликативного старения [4]. В нашем исследовании мы изучали роль TGF-β/ENG сигнального пути в поддержании стабильности функциональных свойств образцов ММСК, полученных при ведении культуры в условиях умеренной гипоксии. Выбор TGFb сигнального пути был обусловлен рядом факторов: известно, что TGF-β участвует в контроле и регуляции регенерации тканей, дифференцировке клеток, пролиферации, апоптоза и поддержании плюрипотентного состояния [4-6]. TGF-β является важным фактором роста, который участвует в регуляции различных клеточных функций на всех фазах процесса регенерации, включая регуляцию синтеза внеклеточного матрикса, экспрессии протеаз, миграции, хемотаксиса, дифференцировки и пролиферации различных типов клеток, ангиогенеза, реэпителизации. Экспрессия TGF-β существенно повышается в поврежденной ткани, когда начинается формирование сокращающейся рубцовой ткани [7]; TGF-β1 участвует в модуляции процесса дифференцировки фибробластов в миофибробласты [8, 9].

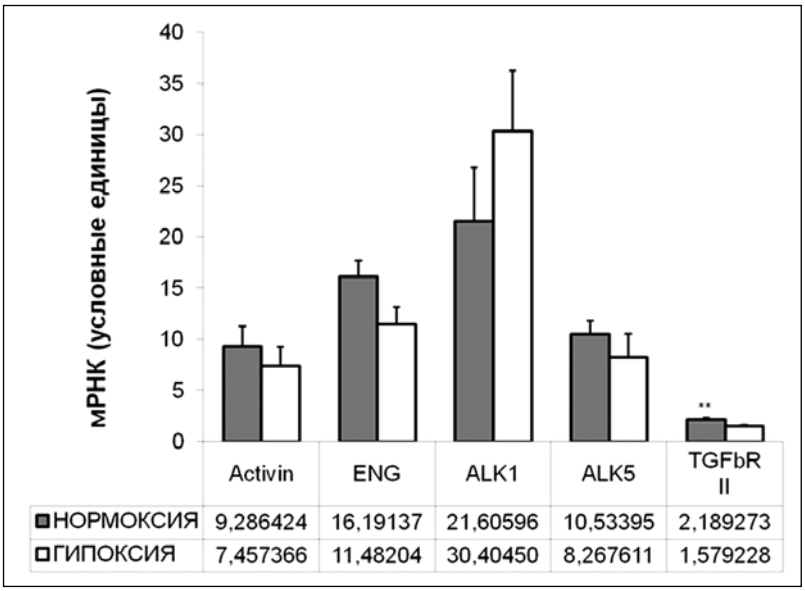
В нашей работе мы исследовали экспрессию комплекса генов TGFb сигнального пути, участвующих в регуляции пролиферации и миграции клеток эндотелия через согласованную систему

Рисунок 2. Механизм регуляции пролиферации и миграции регулируется TGFb через согласованную систему двух комплексов рецепторов TβR11/ALK1 и TβR11/ALK5



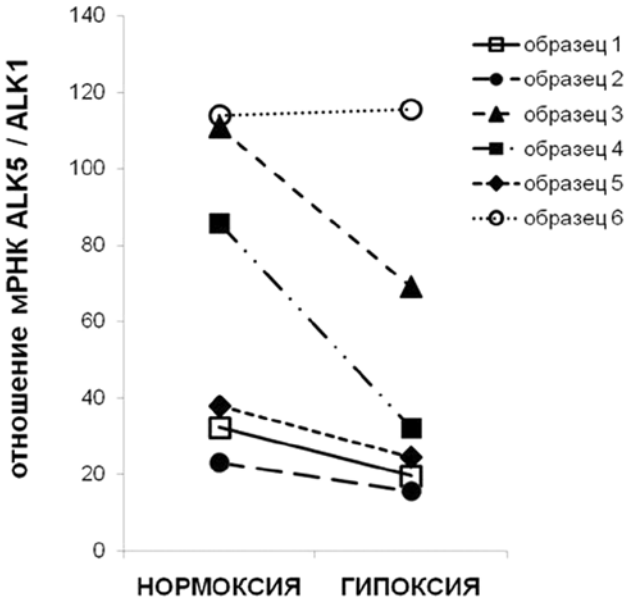
двух комплексов рецепторов TβR11/ALK1 и TβR11/ALK5 [10], предположив, что похожие механизмы регуляции могут работать и для ММСК (рисунок 2), поскольку экспрессия всех компонентов этого сигнального каскада была продемонстрирована для ММСК ранее [11]. Оказалось, что в условиях умеренной гипоксии экспрессия ENG, ALK1, ALK5 существенно не менялась, а экспрессия TGFbR2 даже была незначительно, но достоверно ($p<0,01$) снижена (Рисунок 3). Однако, баланс экспрессии

Рисунок 3. Влияние гипоксии (5 % O_2) на экспрессию ENG, ALK1, ALK5, TGFbR2 и Activin в МСК (n=6; **p<0,01)



ALK/ALK5 смещается в пользу сигнального каскада, который регулируется комплексом TGF β R2/ALK1 (Рисунок 4), стимулирующим пролиферативную активность, что, может свидетельствовать о том, что в ММСК костного мозга работает механизм стимуляции пролиферации и миграции, схожий с механизмом, показанным ранее для клеток эндотелия и данный механизм может быть вовлечен в поддержание стабильной пролиферативной активности ММСК в условиях умеренной гипоксии.

Рисунок 4. Изменение баланса экспрессии ALK1/ALK5 в индивидуальных образцах ММСК при изменении условий культивирования



Дальнейшие исследования необходимы для подтверждения роли этого сигнального пути в ММСК, в том числе исследование активности комплексов SMAD1/5 и SMAD2/3.

Заключение

Таким образом, в ходе выполнения работы на данном этапе нами было показано, что культивирование МСК в условиях умеренной гипоксии (5 % O_2) не только способствует длительному поддержанию высокого уровня пролиферативной активности, но и способствует поддержанию/сохранению функциональных свойств МСК; активация TGFb сигнального пути может являться одним из возможных молекулярных механизмов отвечающих за поддержание динамики роста и мультипотентного состояния КМ-ММСК в культуре при длительном культивировании в условиях умеренной гипоксии.

Благодарности

Работа поддержана Министерством здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Госконтракт № К-32-НИР/111-3) в рамках программы Союзного государства «Стволовые клетки» и Авторы выражают благодарность сотрудникам клинических подразделений Центра Гудковой А.Я., Сазоновой Ю.В. и Моторину Д.В. за организацию сбора клинического материала.

Литература

1. *Wong C.Y., Chaudhry S.I., Desai M.M. et al. Trends in Comorbidity, Disability, and Polypharmacy in Heart Failure // The American Journal of Medicine. — 2011. — Vol. 124. — P. 136–143.*

2. *Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al.* Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells // Science. — 1999. — Vol. 284. — P. 143–147.

3. *Dmitrieva R.I., Minullina I.R., Bilibina A.A. et al.* Bone Marrow — and Subcutaneous Adipose Tissue — Derived Mesenchymal Stem Cells: Differences and Similarities // Cell Cycle. — 2012. — Vol. 11, № 2. — P. 377–383.

4. *Tsai C.C., Chen Y.J., Yew T.L. et al.* Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST // *Blood. — 2011. — Vol. 117, № 2. — P. 459–469.*

5. *Kitisin K., SahaT., BlakeT. et al.* TGF-beta signaling in development // Sci. STKE. — 2007. — P. cm1.

6. *WatabeT., Miyazono K.* Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation // Cell Res. — 2009. — Vol. 19. — P. 103–115.

7. *Pera M.F., Tam P.P.* Extrinsic regulation of pluripotent stem cells // Nature. — 2010. — Vol. 465. — P. 713–720.

8. *Tian Y., Tang S., Luo S.* A study on the expressions and the correlation of TGF-beta and alpha-SMA in scars // Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi. — 2000. — Vol. 16. — P. 75–77.

9. *Garrett Q., Khaw P.T., Blalock T.D. et al.* Involvement of CTGF in TGF-{beta}1- stimulation of myofibroblas tdifferentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2004. — Vol. 45 — P. 1109–1116.

10. *Bertolino P., Deckers M., Lebrin F. et al.* Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders // Chest. — 2005. — Vol. 128. — P. 585S–590S.

11. *Van Meetren L.A., Dijke P.* Regulation of endothelial cell plasticity by TGF-β // Cell Tissue Res. — 2012. — Vol. 347, № 1. — P. 177–186.

МОДЕЛИРОВАНИЕ МИКРООКРУЖЕНИЯ КЛЕТОК ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА В ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ

В.В. Стругов[1], С.В. Жук[1], Р.Ш. Бадаев[1], П.А. Бутылин[1], А.Ю. Зарицкий[1, 2]

[1] ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ
[2] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ

Стругов Владимир Владимирович — аспирант, младший научный сотрудник Института гематологии ФГБУ «ФЦСКЭ имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ; *Жук Сергей Владимирович* — научный сотрудник Института гематологии ФГБУ «ФЦСКЭ имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ; *Бадаев Ренат Шамильевич* — клинический ординатор отделения химиотерапии онкогематологических заболеваний с блоком трансплантации костного мозга ФГБУ «ФЦСКЭ имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ; *Бутылин Павел Андреевич* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института гематологии ФГБУ «ФЦСКЭ имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ; *Зарицкий Андрей Юрьевич* — доктор медицинских наук, профессор, директор Института гематологии ФГБУ «ФЦСКЭ имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии имени В.А. Алмазова» МЗ РФ, ул. Аккуратова, д. 2, г. Санкт-Петербург, Россия, 197341. Тел.: (812) 702–37–65, e-mail: recbcd@ya.ru (Стругов Владимир Владимирович).

Резюме

Под клеточным микроокружением обычно понимается совокупность физико-химических и биологических факторов, тем или иным способом воздействующих на клетки в заданных условиях. В настоящее время имеется множество доказательств активного участия микроокружения в патогенезе различных злокачественных новообразований, в частности гемопоэтического происхождения. Среди всех онкогематологических заболеваний хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) выделяется ярко выраженной и относительно хорошо изученной зависимостью трансформированных клеток от локального микроокружения. Наиболее важным для патофизиологии ХЛЛ, по-видимому, является микроокружение лимфатических узлов, в котором опухолевые клетки способны активно пролиферировать. Ключевым компонентом данного микроокружения являются Т-лимфоциты, экспрессирующие в активированном состоянии CD40L. Создание искусственных моделей опухолевого микроокружения in vitro позволяет изучать особенности биологии лейкозных клеток, в том числе механизмы преодоления цитостатического эффекта антилейкемических препаратов.

Ключевые слова: ХЛЛ, хронический лимфолейкоз, микроокружение, CD40, бендамустин.

MODELS OF CLL CELLS MICROENVIRONMENT IN LYMPHATIC NODES

V.V. Strugov., S.V. Zhuk, R.S. Badaev., P.A. Butylin., A.Yu. Zaritskey

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: recbcd@ya.ru (Vladimir V. Strugov — researcher of hematology institute).

УДК.612.014.3

Abstract

Cellular microenvironment is usually defined as a complex of physical, chemical and biological factors interacting with target cells under characterized conditions. Current evidence shows an active participation of microenvironment in the pathogenesis of different malignant disorders, particularly of hematopoietic origin. Among all hematological malignancies chronic lymphocytic leukemia (CLL) is perhaps the most remarkable and studied example of leukemic cells dependency on local microenvironment. It is conceivable that the microenvironment of lymph nodes (LN) is most important for disease pathophysiology as it effectively stimulates leukemic cell proliferation. The key component of such microenvironment is represented with activated T-lymphocytes, which express CD40L. In vitro models of such microenvironment are useful for dissection of biological peculiarities of leukemic cells, e.g. mechanisms of antileukemic therapy evasion.

Key words: CLL, chronic lymphocytic leukemia, microenvironment, CD40, bendamustine.

Статья поступила в редакцию 01.11.13, принята к печати 20.11.13.

Введение

ХЛЛ — злокачественное лимфопролиферативное заболевание, проявляющееся накоплением трансформированных В-лимфоцитов в костном мозге, периферической крови и вторичных лимфоидных органах. Данные исследований кинетики опухолевого клона in vivo указывают на то, что основным местом пролиферации клеток ХЛЛ являются так называемые «псевдофолликулы» в периферических лимфатических узлах, содержащие примесь неопухолевых клеток, в частности активированных Т-лимфоцитов [1–3].

В настоящее время накоплено большое количество указаний на то, что Т-лимфоциты не являются пассивными соседями лейкозных клеток, а активно участвуют в патогенезе заболевания, формируя защитное и стимулирующее микроокружение [4]. Наличие активного взаимодействия между клетками ХЛЛ и Т-лимфоцитами подчеркивает характерный профиль генной экспрессии лейкозных клеток [5, 6] и зависимость результатов ксенотрансплантации клеток ХЛЛ от наличия примеси донорских Т-лимфоцитов в трансплантате [6, 7].

Потенциальное участие Т-лимфоцитов в индукции локальной резистентности клеток ХЛЛ к спонтанному и индуцированному апоптозу имеет непосредственное отношение к клинике, поскольку таким образом формируется химиорефрактерный фенотип заболевания.

По нашим представлениям одним из наиболее важных элементов межклеточного взаимодействия в системе Т-лимфоцит — трансформированный В-лимфоцит при ХЛЛ является связывание и активация CD40. В данной статье проводится анализ многочисленных экспериментов, изучающих биологические последствия активации CD40 в клетках ХЛЛ, и приводятся результаты собственных пилотных экспериментов по моделированию микроокружения лейкозных клеток in vitro.

1. CD40 и CD40L

Поверхностный антиген CD40 был впервые идентифицирован с помощью антител клона S2C6, для которого была показана специфичность к В-лимфоцитам и клеткам карциномы мочевого пузыря [8]. Чуть позже эта же молекула была описана в качестве антигена клона G28-5, связывание с которым приводило к активации В-лимфоцитов [9]. Поиски естественного лиганда CD40 долгое время были безуспешны [10]. В 1992 Lederman с соавт. описали клон 5C8, связывавшийся с неизвестной молекулой на поверхности активированных CD4+ Т-лимфоцитов, причем добавление этих антител в культуру подавляло Th-зависимую активацию В-лимфоцитов [11]. Непосредственно лиганд CD40 (CD40L, CD154) был впервые клонирован из клеточной линии мышиной тимомы E-L4 [12]. Вскоре этим же коллективом был идентифицирован человеческий гомолог[13]. Практически сразу были проведены эксперименты по совместному культивированию В-лимфоцитов с клетками линии CV-1/EBNA, трансфецированными mCD40L и hCD40L, показавшие удобство такого подхода для изучения взаимодействия CD40-CD40L[13].

В настоящее время структура и функции белков CD40 и CD40L относительно хорошо изучены. CD40 — мембранный гликопротеин семейства рецепторов TNF (мол. вес ок. 50 кДа), экспрессирующийся на поверхности В-лимфоцитов практически всех этапов дифференцировки, а также в эпителии, эндотелии и некоторых других типах клеток [14]. CD40L — мембранный белок II типа из семейства TNF (мол. вес ок. 32 кДа), экспрессирующийся на активированных CD4+ Т-лимфоцитах (транзиторно), небольшом количестве CD8+ Т-лимфоцитов, NK-клетках, эозинофилах и тромбоцитах. Связывание CD40 является сигналом для присоединения к цитоплазматическому домену белка различных вспомогательных факторов (TRAF1-3/5/6, Jak3), которые запускают те или иные сигнальные пути

(NFkB, PI3K, MAPK, PLCγ, STAT5), определяющие биологический эффект [15].

Физиологическая роль активации CD40 в нормальных В-лимфоцитах заключается в инициации и поддержании гуморального иммунного ответа, в том числе механизмов В-клеточной памяти. Связывание CD40 с CD40L на поверхности T_{FH}- и T_H-лимфоцитов необходимо для формирования герминативных центров, запуска дифференцировки В-лимфоцитов в плазмобластном направлении, переключения изотипа и продукции антител. Активация CD40 стимулирует выживание, пролиферацию и антиген-презентирующую активность В-клеток, в частности за счет повышения экспрессии CD23, CD27, костимулирующих молекул CD80 и CD88, молекул адгезии ICAM-1 и ICAM-3, рецепторов цитокинов IL-5, IL-7 и IL-4, компонентов MHC I и II типа. Мутации в гене CD40L могут приводить к развитию Х-сцепленного синдрома гиперпродукции IgM, для которого характерно отсутствие герминативных центров и подавление гуморального ответа на Т-зависимые антигены. Нокаут CD40L не влияет на продукцию антител к Т-независимым антигенам [15].

Ярко выраженная способность CD40 активировать В-лимфоциты и возможность ингибировать это взаимодействие с помощью моноклональных антител стимулировали значительный интерес к изучению роли взаимодействия CD40-CD40L в биологии различных В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний. Постоянная экспрессия CD40 была обнаружена на клетках ХЛЛ, волосатоклеточного и пролимфоцитарного лейкозов, клетках Рида-Штернберга, при большинстве В-неходжкинских лимфом, макроглобулинемии Вальденстрема, в части случаев В-острых лимфобластных лейкозов [16]. Фактически изучение физиологических последствий связывания CD40-CD40L в нормальных и трансформированных В-лимфоцитах шло параллельно.

В экспериментах по активации CD40 на первых этапах использовались только стимулирующие антитела в комбинации с IL-4. Последний секретируется активированными Т-лимфоцитами в ответ на связывание CD40L и является одним из медиаторов Т-В клеточного взаимодействия в герминативных центрах. В дальнейшем было показано преимущество «сэндвич-системы», в которой анти-CD40 антитела фиксировались к мышиным фибробластам, искусственно экспрессирующим человеческий CD32 (FcγRII) [17]. Такая система оказалась пригодной для культивирования даже таких медленно пролиферирующих трансформированных клеток, как лимфоциты ВКЛ и ХЛЛ. Именно в ней впервые была описана пролиферация клеток ХЛЛ in vitro [18].

В последующем стала доступна биологически активная растворимая форма рекомбинантного белка. Однако более широкое распространение получили системы с искусственной экспрессией CD40L в различных клеточных линиях. В целом, высокие уровни экспрессии, достигаемые при трансдукции мембранной формы CD40L, обладают наиболее высоким стимулирующим потенциалом. Хотя такой уровень интенсивности сигнала, по всей видимости, мало соответствует физиологическим условиям, получаемые результаты в целом адекватно отражают биологию исследуемых клеток и редко подвергаются сомнению [19, 20]. По этим причинам CD40L-трансфецированные клеточные линии активно использовались для изучения роли Т-В клеточного взаимодействия при ХЛЛ. Публикации характеризуются большим разнообразием вариантов исходных клеточных линий (HeLa/SF [21], HeLa [22, 23], NIH/3T3 [21, 24], Jurkat/D1.1 [25], MRC-5 [26], L [27] и т.д.), однако в работах последних лет преимущественно указываются мышиные фибробласты линий L и NIH/3T3.

2. Активирующий эффект лигирования CD40 при ХЛЛ

Клетки ХЛЛ отвечают на стимуляцию CD40L+IL-4 активацией сигнальных путей ERK, MAPK, JNK, PI3K [28], NFkB (как классического, так и альтернативного [29]). Одновременно индуцируется экспрессия активационных маркеров CD23, CD38 и Zap-70 [27], CD150 [30], костимулирующих молекул CD80 и CD86, фактора адгезии CD54 [26], CD137 [22], компонентов В-клеточного рецептора CD79b и IgM [31], рецепторов TACI и BCMA [32].

Отдельно было изучено влияние активации CD40 на экспрессию изоформ рецептора гуалуроновой кислоты CD44, который участвует в адгезии В-лимфоцитов к элементам внеклеточного матрикса, стромальным элементам и эндотелию. Известно, что на поверхности клеток ХЛЛ CD44 находится в составе крупного надмолекулярного комплекса, в котором также участвуют CD49d, MMP-9 и CD38. Все эти белки играют важную роль в инфильтрации опухолевыми клетками периферических лимфоидных органов.

Eisterer с соавт. выявили повышенную концентрацию растворимой формы CD44 в сыворотке пациентов с более продвинутыми стадиями ХЛЛ и показали секрецию sCD44 клетками ХЛЛ при in vitro стимуляции. При этом использовались, в частности, анти-CD40 антитела, фиксированные на поверхности CD32-экспрессирующих мышиных фибробластов Ltk [33]. Fedorchenko с соавт. описали повышение экспрессии CD44 при стимуляции

клеток ХЛЛ рекомбинантным CD40L в сочетании с IL-4, а также при совместном культивировании лейкозных клеток со стромальной линией NKtert. При этом естественные лиганды CD44 — гиалуроновая кислота и хондроитин сульфат — защищали клетки ХЛЛ от спонтанного апоптоза in vitro [34].

В экспериментах с CD40L-экспрессирующими клетками NIH/3T3 Girbl с соавт. показали повышение экспрессии клетками ХЛЛ альтернативной N-гликозилированной изоформы CD44 после активации CD40. Экспрессия CD44v6 приводила к остановке CCL21-индуцированной миграции опухолевых клеток и прочному прикреплению их к субстрату. По мнению авторов нестимулированные клетки ХЛЛ способны перемещаться в тканевом интерстиции под действием градиента CCL21 до момента контакта с активированным Т-лимфоцитом, после чего смена поверхностного рецептора гуалуроновой кислоты приводит к остановке миграции и заякориванию клеток в зонах, богатых Т-лимфоцитами [35].

Помимо простой фиксации в благоприятном микроокружении CD40-стимулированные клетки ХЛЛ очевидно способны активно на него воздействовать. Так, добавление рекомбинантного CD40L in vitro индуцирует секрецию опухолевыми клетками Т-лимфотропного хемокина CCL22 [2] и ангиогенно-аутокринного фактора VEGF [36].

Как уже было сказано, стимуляция CD40 и IL-4R позволила изучать пролиферацию клеток ХЛЛ in vitro [18, 37]. Рекомбинантный CD40L и антитела к CD40 сами по себе не обладают защитным эффектом [38], но могут стимулировать пролиферацию клеток ХЛЛ при добавлении IL-4 [39], хотя и с меньшей эффективностью, чем белок, фиксированный на мембране. В отсутствии IL-4 в клетках ХЛЛ повышается экспрессия рецептора IL-21, который опосредует проапоптотические сигналы [40]. Добавление другого активирующего цитокина — IL-2 в эту систему не увеличивает выживаемость лейкозных клеток [18, 41].

Некоторые авторы обратили внимание на различие эффекта активации CD40 среди образцов опухолевых клеток, полученных от пациентов с различным клиническим течением заболевания. Так, в экспериментах Willimot с соавт. in vitro пролиферация в системе CD40L-трансфецированные фибробласты + IL-4 была выше у пациентов с более агрессивным течением лейкоза [27]. В так называемой «модели псевдофолликула», предложенной Plander с соавт. (МСК + растворимый CD40L + IL-2 + IL-10), индукция пролиферации наблюдалась только в клетках больных с активной прогрессией заболевания [42]. Наконец, только клетки пациентов с IGHV-немутированным вариантом ХЛЛ делились при добавлении агонистов TLR9 [43], в том числе в сокультуре с CD40L-экспрессирующими фибробластами [29]. С другой стороны, Scielzo с соавт. разделили имеющиеся у них клеточные образцы на CD40L-зависимые и независимые [19], и последние не отвечали активацией на добавление рекомбинантного CD40L, из чего был сделан вывод, что они вероятно менее зависимы от микроокружения в своей способности к выживанию и пролиферации. Авторы даже привели корреляции с клиникой, обнаружив более раннюю прогрессию в CD40L-независимых случаях. Очевидная противоречивость таких результатов, по-видимому, отражает разницу в экспериментальных подходах, например, использовании или отказе от использования IL-4.

3. CD40-индуцированная резистентность к апоптозу при ХЛЛ

Различные системы культивирования, активирующие CD40, активно использовались для моделирования резистентности клеток ХЛЛ к спонтанному и индуцированному апоптозу.

Первым из изученных антиапоптотических факторов, реагирующих на активацию CD40, оказался представитель семейства IAP Survivine, участвующий в ингибировании каспаз и регуляции клеточного цикла. Экспрессия этого фактора in vitro повышалась при добавлении растворимого тримерного белка CD40L [44]. Чтобы подтвердить значимость своего наблюдения, авторы оценили распределение Survivine-экспрессирующих клеток в препаратах биоптированных лимфатических узлов. Было показано, что Survivine+ клетки преимущественно располагаются в псевдофолликулах в окружении Т-лимфоцитов, образуя очаговые скопления при иммуногистохимическом исследовании. При этом экспрессия маркера пролиферации Ki-67 в целом совпадает с локализацией Survivine+ клеток, что указывает на возможную роль этого фактора в опухолевой пролиферации.

В дальнейшем список индуцируемых антиапоптотических факторов расширился за счет Bcl-XL [45, 46], Bfl-1 [29, 46, 47] и Mcl-1 [47, 48]. В дополнение к этому было описано снижение экспрессии проапоптотических факторов Harakiri [46] и Noxa [47, 48]. С другой стороны, стимуляция CD40 вызывает повышение экспрессии и проапоптотических факторов, в частности Bid [49]. В целом, повышенный пул антиапоптотических факторов может объяснять относительно высокую резистентность опухолевых клеток к цитостатическим препаратам в системе CD40L+IL-4 in vitro и в лимфатических узлах in vivo. При этом базальная экспрессия Bcl-2

сама по себе недостаточно защищает от апоптоза лейкозные клетки, находящиеся в периферической циркуляции [47].

Помимо этого было обнаружено, что связывание CD40 вызывает повышение экспрессии в клетках ХЛЛ проапоптотического рецептора Fas-лиганда CD95. Ранние эксперименты показали, что стимулированные клетки сохраняют при этом устойчивость к FasL-индуцированному апоптозу, а значит и к цитотоксическому действию CD8+ Т-лимфоцитов [24]. Это укладывалось в представления о дефекте противоопухолевого иммунитета при ХЛЛ, но не могло объяснить клиническую эффективность различных вариантов генной терапии, направленных на индукцию экспрессии CD40L в опухолевых клетках. В результате многочисленных экспериментов с активацией CD40 in vitro данный феномен был подробно изучен.

Kitada с соавт. связали резистентность с CD40-индуцированным повышением экспрессии ингибитора внешнего пути апоптоза FLIP [24]. Chu с соавт. подтвердили это наблюдение, однако одновременно показали, что выключение FLIP с помощью антисенсного олигонуклеотида само по себе не повышает FasL-чувствительность опухолевых клеток [23]. В качестве дополнительных факторов резистентности были описаны повышение экспрессии ингибитора TNF-сигналинга TRAF1 и снижение экспрессии одного из компонентов проапоптотического комплекса DISC — FADD. Особенностью экспериментов Chu с соавт. было то, что стимуляция опухолевых клеток продолжалась лишь в течение первых 24 часов, после чего клетки перемещались в обычную питательную среду. В такой системе к 4 суткам приобреталась чувствительность к FasL-индуцированному апоптозу, что совпадало с повышением экспрессии FADD и снижением уровня FLIP. Так была описана отсроченная FasL-сенситизация лейкозных клеток, согласующаяся с клиническими наблюдениями. В то же время, вопрос о том, насколько транзиторная 24 часовая стимуляция соответствует условиям in vivo, остается открытым. Например, de Totero с соавт. оценили влияние трехдневной стимуляции CD40 на экспрессию основных компонентов комплекса DISC, в частности FLICE, FAS, FADD и TRADD, и, в противовес Chu с соавт., не обнаружили каких-либо отклонений [50]. С другой стороны, Gricks с соавт. повторно описали индукцию экспрессии FLIP, TRAF1 и BIRC3 [28].

Как уже было сказано выше, связывание CD40 приводит к экспрессии клетками ХЛЛ проапоптотического фактора Bid, который, как предполагается, может опосредовать CD95-индуцированную активацию митохондриального пути апоптоза. Используя 24-часовую активацию Kater с соавт. наблюдали отсроченное повышение экспрессии Bid [51]. Хотя экспрессия антагонистичного по отношению к Bid фактора XIAP на фоне стимуляции не менялась, добавление ингибиторов XIAP приводило к более ранней сенситизации клеток ХЛЛ. Эти результаты дополняет работа Pallasch с соавт., в который описано снижение экспрессии ингибитора Fas-сигналинга TOSO при активации CD40 [52]. Таким образом, чувствительность к FasL может зависеть от внутриклеточного баланса различных про- и антиапоптотических факторов.

4. Использование in vitro активации CD40 для изучения активности антилейкемических препаратов при ХЛЛ

После того, как Walker с соавт. [53] описали повышение устойчивости клеточных линий лимфомы Беркитта к хлорамбуцил-индуцированному апоптозу в системе CD32/анти-CD40/IL-4 и предположили, что им удалось смоделировать защитную нишу опухолевых клеток в лимфатических узлах, появление аналогичных работ для ХЛЛ стало делом времени.

Первым изученным препаратом закономерно стал флударабин (F-ara-A). Romano и Kitada с соавт. показали снижение цитостатической активности F-ara-A при стимуляции опухолевых клеток анти-CD95 антителами и в присутствии 3T3-CD40L клеток [24, 54]. Однако эти результаты были поставлены под сомнение Grdisa с соавт., которые не наблюдали снижения интенсивности флударабин-индуцированного апоптоза при добавлении рекомбинантного CD40L и IL-4 [55]. Более того, de Totero с соавт. описали повышение чувствительности трансформированных лимфоцитов к флударабину в сокультуре с CD40L-экспрессирующими фибробластами [56]. Важно, что в последнем случае клетки сначала обрабатывались F-ara-A и только потом добавлялись к фибробластам, то есть постоянная стимуляция CD40, которая теоретически может происходить in vivo, отсутствовала. В недавних работах Tonino и Jak с соавт. вновь показали, что клетки ХЛЛ высокорезистентны к F-ara-A в присутствии 3T3-CD40L [57, 58]. Однако добавление цисплатина может частично преодолевать защитный эффект [57].

В настоящее время в лечении ХЛЛ флударабин обычно используется в комбинации с моноклональным антителом к CD20 ритуксимабом, поскольку сочетание препаратов обладает более высокой клинической эффективностью. В этой связи интересно, что в присутствии связывающих

античеловеческих антител стимуляция клеток ХЛЛ в 3Т3-CD40L системе усиливает цитостатический эффект ритуксимаба [58]. Аналогичная сенситизация была описана и для анти-CD20 антитела следующего поколения офатумумаба, но не для анти-CD52 антитела алемтузумаб. Авторы не наблюдали активацию каспаз и появление классических морфологических признаков апоптоза при добавлении анти-CD20 антител, однако описали индукцию оксидантного стресса. Цитотоксичность анти-CD20 антитела II типа — GA101 (обинутузумаб) также усиливалась при связывании CD40, однако в отличие от ритуксимаба механизм действия препарата был связан с высвобождением лизосомальных ферментов [59].

Большие надежды в терапии ХЛЛ в настоящее время связываются с появлением таргетных низкомолекулярных ингибиторов антиапоптотических факторов семейства Bcl-2. Один из таких препаратов — ABT-737 в наномолярных концентрациях вызывает апоптоз клеток ХЛЛ in vitro. Vogler с соавт. оценили активность ингибитора ABT-737 в совместной культуре клеток ХЛЛ с CD40L-экспрессирующими мышиными фибробластами [60]. В таких условиях опухолевые клетки приобретали абсолютную нечувствительность к препарату, связанную с 1000-кратным повышением экспрессии Bcl-X_L и BCL2A1 и de novo синтезом этих белков. Эта работа является одним из наиболее ярких примеров актуальности защитного эффекта микроокружения при ХЛЛ.

Ингибиторы сигналинга с В-клеточного рецептора ибрутиниб (PCI-32765) и иделалисиб (GS-1101) обладают высокой антилейкемической активностью и позволяют добиться ремиссии у части рефрактерных больных. Herman с соавт. оценили влияние стимуляции клеток ХЛЛ с помощью рекомбинантного CD40L на in vitro активность иделалисиба [61] и ибрутиниба [62]. Статистически значимого снижения выживаемости стимулированных опухолевых клеток под действием ибрутиниба получено не было. GS-1101 несколько уменьшал протективный эффект активации CD40, но не IL-4. Наблюдаемую клиническую эффективность данных препаратов, тем не менее можно объяснить индуцируемым выходом опухолевых клеток в периферических кровоток.

В определенных экспериментальных условиях мультикиназный ингибитор дазатиниб (спрайсел) сенситизировал CD40-стимулированные опухолевые клетки к флударабину и хлорамбуцилу [63]. Однако в данной работе воздействие цитостатиков оценивалось на опухолевых клетках после удаления последних из сокультуры с 3Т3-CD40L фибробластами. McCaig с соавт. добавляли цитостатики и дазатиниб непосредственно в сокультуру и не наблюдали преодоления резистентности. Лишь ингибитор HSP90 17-DMAG в комбинации с дазатинибом существенно усиливал апоптоз [64]. Аналогичные результаты были получены для другого ингибитора HSP90 — NVP-AUY922 [65]. Эти данные являются еще одной иллюстрацией важности особенностей планирования экспериментов.

Помимо вышеописанных наблюдений моделирование условий микроокружения лимфатических узлов с помощью активации CD40 позволило уточнить механизмы действия и предварительно оценить эффективность многих других препаратов, например ингибиторов NFkB-сигналинга LC-1 [66] и DHMEQ [67], ингибиторов синтеза лейкотриенов MK-886 и BWA4C[30], ингибитора Cdc7/Cdk9 PHA-767491 [68], бортезомиба [63], росковитина[63], безафибрата и медроксипрогестерона [69].

5. Возможное участие оси CD40-CD40L в патогенезе иммунных нарушений при ХЛЛ

Клиницистам хорошо известна повышенная частота развития гематологических аутоиммунных осложнений (АИО) у пациентов с ХЛЛ [70]. Примерно у 5–10 % больных диагностируется аутоиммунная гемолитическая анемия (АИГА) и у 2–5 % — иммунная тромбоцитопения (ИТП) [71]. Несмотря на то, что причины развития этих осложнений в контексте ХЛЛ до сих пор полностью не изучены, существует теория, что одним из провоцирующих факторов может быть экспрессия опухолевыми клетками CD40L [72]. Согласно этой гипотезе, контакт клеток ХЛЛ с аутореактивными нормальными В-лимфоцитами может стимулировать выживание, пролиферацию и дифференцировку последних с запуском продукции аутоантител. С другой стороны, поскольку связывание CD40 на нормальных В-лимфоцитах вне активации BCR может индуцировать апоптоз, в условиях прогрессирующего накопления опухолевых клеток рано или поздно развивается типичная для ХЛЛ гипогаммаглобулинемия. Хотя данная теория не объясняет отсутствие повышения частоты негемических АИО, она хорошо укладывается в тот факт, что большая часть АИГА при ХЛЛ вызывается поликлональными антителами неопухолевого происхождения.

В литературе имеются наблюдения соответствующие и противоречащие этой концепции. Хотя клетки ХЛЛ интенсивно синтезируют мРНК CD40L, поверхностная экспрессия этого белка в большинстве случаев является маргинально низкой

[25, 73]. Индукция экспрессии CD40L в опухолевых клетках, по-видимому, является одним из механизмов действия леналидомида [74]. У пациентов, получающих этот препарат в клинике, отмечается не снижение, а повышение уровня сывороточных иммуноглобулинов и редко развиваются аутоиммунные осложнения. Интересно, что Citores с соавт., хотя и не обнаружили экспрессию CD40L на поверхности лейкозных клеток у своих пациентов, описали появление белка при in vitro культивировании клеток части больных с флударабином, причем практически во всех таких «CD40L+» случаях были выявлены аутоиммунные осложнения ($p < 0.001$) [75]. К сожалению, в статье не указаны сроки развития АИО и предшествующая терапия, а также не оценен эффект других цитостатиков, например, алкилирующих препаратов.

В патогенезе иммунодефицита при ХЛЛ очевидно участвуют и другие факторы. Например, Kneitz с соавт. оценили влияние клеток ХЛЛ на CD40-индуцированную активацию нормальных В-лимфоцитов [76]. Суть эксперимента заключалась в том, что в культуру В-лимфоцитов с CD40L-экспрессирующими клетками (Т-лимфоцитами или трансфецированными мышиными фибробластами) добавлялось возрастающее количество клеток опухоли. Было продемонстрировано дозозависимое подавление активации нормальных В-лимфоцитов клетками ХЛЛ, которое опосредовалось клеточными контактами. Эффект разведения лишь частично объяснял этот феномен, поскольку подавляющая способность клеток, полученных от разных больных, различалась. Хотя фактор, ответственный за наблюдаемое явление, идентифицирован не был, авторы сделали предположение, что данный механизм также может участвовать в генезе гипогаммаглобулинемии при ХЛЛ.

Экспериментальная часть

Учитывая вышесказанное, становится понятной актуальность темы для изучения биологии хронического лимфолейкоза. В рамках выполнения научных проектов Института гематологии ФМИЦ им. В.А. Алмазова с января 2013 г. нами выполнены работы по созданию CD40L-экспрессирующих клеточных линий и проведены пилотные эксперименты по совместному культивированию нормальных В-лимфоцитов и клеток ХЛЛ с генетически модифицированными линиями. Помимо этого, нами получены собственные предварительные данные по in vitro активности некоторых цитостатических препаратов в условиях, моделирующих защитный эффект микроокружения лейкозных клеток in vivo.

1. Материалы и методы

1.1 Клеточные культуры

В экспериментах использовали мононуклеарную фракцию периферической крови больных с критериально подтвержденным диагнозом ХЛЛ (IWCLL 2008), не получавших ранее противолейкозную терапию (N = 5).

Мононуклеарная фракция выделялась из крови больных с помощью сепарации в градиенте фиколла (Панеко, Россия). Нормальные В-лимфоциты были получены из крови здоровых доноров с помощью магнитной сепарации по CD19 (Miltenyi, США). Полученные клеточные популяции криоконсервировались до начала экспериментов.

Клетки линий HeLa, HS-5 и OP9, а также мезенхимные стволовые клетки костного мозга (КМ-МСК) здоровых доноров были получены из локального биобанка. Все культуры проверялись на инфицирование микоплазмами. Клетки культивировались в условиях CO_2 инкубатора в среде αMEM с 10 % FBS и 1 % смесью пенициллина/стрептомицина.

Эксперименты по совместному культивированию проводили в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % FBS, 1 % смеси пенициллин/стрептомицин и 50 ед/мл IL-4 (RnD, США). Начальная концентрация клеток при сокультивировании составляла 200 тыс./мл. При проведении длительных экспериментов суспензию клеток переносили на новый стромальный подслой каждые 4 суток.

1.2 Создание искусственных генетических конструкций

Первичная кодирующая последовательность CD40L была амплифицирована с помощью специфических праймеров CD40L_F1 и CD40L_R1 с использованием кДНК, полученной из мононуклеарной фракции периферической крови здорового донора (последовательность праймеров см. в таблице 1). Полученная последовательность была клонирована в промежуточный вектор pJET1.2.

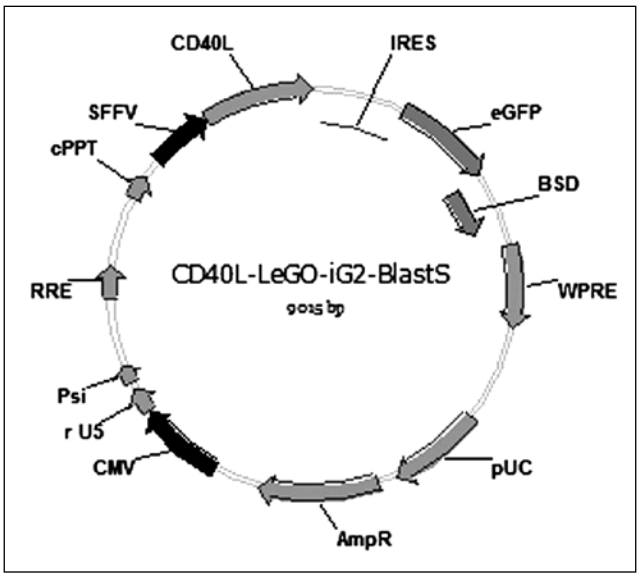
На следующем этапе последовательность CD40L была амплифицирована с помощью праймеров bamH_CD40L_F2 и ecoR_CD40L_R2 и перенесена в лентивирусный вектор с геном устойчивости к бластицидину LeGO-iG2-BlastS, любезно предоставленный Kristoffer Riecken, Гамбург, Германия. Полученный вектор CD40L-LeGO-iG2-BlastS позволяет проводить селекцию клеток, экспрессирующих CD40L (схему вектора смотри на рис. 1). Методика селекции основана на том, что ген бластицидин S деаминазы BSD обеспечивает устойчивость к бластицидину. Поскольку

Таблица 1

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ПРАЙМЕРОВ

CD40L_F1	3'-CTGCCAGAAGATACCATTTC-5'
CD40L_R1	3'-CTGTGCTGTATTATGAAGACTC-5'
bamH_CD40L_F2	3'-AAGGATCCAGC**ATG**ATCGAAACATACA-5'
ecoR_CD40L_R2	3'-TTGAATTCTGACACTGT**TCA**GAGTTTG-5'

Рисунок 1. Схема плазмиды CD40L-LeGO-iG2-BlastS



ген BSD находится в рамке считывания гена eGFP, экспрессия трансгена может быть оценена методом проточной цитометрии.

1.3 Лентивирусная трансдукция

Для создания вируса использовали пакующую систему второго поколения, состоящую из psPAX2 и pMD2.G (предоставлена D. Trono, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Швейцария). pMD2.G кодирует белок вируса везикулярного стоматита VSV-G, нахождение которого в составе вирусной оболочки обеспечивает высокую эффективность заражения различных типов клеток.

Производство лентивирусных частиц осуществляли в клетках линии HEK293. Клетки рассеивали в концентрации 2,5–3,0 × 10^6 клеток на 10 см чашку в среде DMEM с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамина и 20 мкг/мл гентамицина. На следующий день среду меняли на 9 мл свежей с добавлением 25 мкм хлорохина. Трансфекцию проводили кальций-фосфатным методом; смесь плазмид (из расчета 15 мкг вектора с трансгеном, 9,35 мкг psPAX2 и 5,32 мкг pMD2.G на одну чашку) ресуспендировали в Tris-EDTA буфере, содержащем $CaCl_2$, и добавляли к 2x HEPES буферу. Через 15 минут образовавшиеся комплексы ДНК и фосфатов кальция добавляли к клеткам. Через 16 часов меняли среду, после чего каждые 24 часа с чашек собирали супернатанты, содержащие вирусные частицы. Концентрирование вирусных частиц осуществляли ультрацентрифугированием на сахарозной подложке в течение 2 часов при 72.000 g и 4^0C. Полученный осадок вирусных частиц ресуспендировали в DMEM и хранили при -80^0C. Измерение количества трансдукционных единиц осуществлялось по серийному разведению растворов с лентивирусами и последующему заражением известного количества HEK293 клеток. Через 72 часа методом проточной цитометрии измерялся процент клеток, экспрессирующих eGFP. Все эксперименты по трансдукции проводились в условиях МЗ = 10 (множественности заражения). Для увеличения эффективности трансдукции в среду, содержащую вирус, добавляли полибрен (гексадиметрина бромид) до 8 мкг/мл.

Для модификации использовали клетки линий HeLa и OP9, которые в дальнейшем обозначались как CD40L-HeLa и CD40L-OP9.

1.4 Оценка экспрессии генов метод количественной ПЦР

Верификацию экспрессии CD40L проводили на клетках, полученных из суспензии. Для этого часть клеток лизировали (TRI Reagent, Sigma-Aldrich), выделяли РНК в соответствии с рекомендациями производителя, проводили обратную ПЦР (MMLV RT kit, Евроген, Россия) и измеряли экспрессию гена CD40L с использованием специфических праймеров. ПЦР в реальном времени проводили при помощи амплификатора нуклеиновых кислот 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), используя технологию SybrGreen по следующей схеме: 5 мин 95º, затем 40 циклов, включающих 30 с 95ºC, 30 с 60^0C и 30 с 72ºC. Температура отжига всех праймеров составляла 60ºC. Уровень экспрессии каждого из генов нормализовали по уровню экспрессии гена «домашнего хозяйства», кодирующего глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH) по методу ΔΔCt.

1.5 Проточная цитометрия

Данные проточной цитометрии были получены на Guava EasyCyte 8 (EMD Millipore, США). Клетки собирали, фиксировали в 1 % ПФА и хранили до проведения анализа. Для окраски клеток использовали моноклональные антитела, конъюгированные с флюорохромом: CD19-APC и витальный краситель 7-AAD (BD, США). Окраска проводилась в соответствии с рекомендациями производителей.

2. Результаты

2.1 Совместное культивирование нормальных и лейкемических В-клеток на стромальных линиях с экспрессией CD40L

Совместное культивирование мононуклеарной фракции здоровых доноров с CD40L-экспрессирующими клетками в присутствии IL-4 приводило к селективной пролиферации В-лимфоцитов (Рис. 3). К 15 суткам культивирования преобладающей клеточной популяцией в суспензии являлись CD19+ клетки. При культивировании в течение 17 суток количество В-лимфоцитов в культуре увеличивалось в среднем в 2,5 раза (Рис. 4). В то же время, при использовании немодифицированных клеток линии HeLa и КМ-МСК значимого увеличения количества В-лимфоцитов не наблюдалось (Рис. 3А, 3Г). При микроскопическом исследовании в условиях активации CD40 с течением времени наблюдалось формирование агрегатов лимфоидных клеток (Рис. 2). Нами отмечена тенденция к ассоциации таких агрегатов с областями, покрытыми стромальными клетками, что позволяет предполагать активное межклеточное взаимодействие. Таким образом, лигирование CD40 запускает деление нормальных В-лимфоцитов и приводит к увеличению их ассоциации со стромой.

При добавлении к CD40L-HeLa клеткам мононуклеарной фракции периферической крови больных ХЛЛ с течением времени количество клеток в культуре кратно не увеличивалось. Наоборот, на длительных сроках культивирования наблюдалась тенденция к уменьшению общего числа лимфоидных клеток (Рис. 4). Поскольку преобладающей клеточной популяцией в мононуклеарной фракции больных ХЛЛ являлись трансформированные В-лимфоциты, был сделан вывод, что используемая модель микроокружения не является достаточной для in vitro экспансии лейкозных клеток. При этом необходимо отметить, что использованная методика оценки пролиферации является достаточно грубой, вследствие чего полученные результаты не могут свидетельствовать о полном отсутствии клеточного деления. В дальнейшем планируется использование более чувствительных методик, в частности оценки включения 3Н-тимидина.

Сравнение двух полученных CD40L-экспрессирующих линий показало отсутствие достоверных различий в количестве жизнеспособных клеток ХЛЛ при сокультивировании (оценивали количество CD19+ 7-AAD- клеток). При этом использование данных клеточных линий и первичных культур КМ-МСК давало сходные результаты (Рис. 5).

Некоторый прирост числа лейкозных клеток наблюдался при их сокультивировании с клетками линии CD40L-HeLa. Использование CD40L-OP9 не приводило к увеличению количества лейкемических клеток в сокультуре, при этом имелась тенденция к увеличению количества клеток, связанных со стромальным подслоем. Количественный анализ уровня экспрессии CD40L показал более высокую экспрессию белка в клетках CD40L-HeLa в сравнении с CD40L-OP9, несмотря на отсутствие разницы в вирусном векторе и методе селекции клеток на

Рисунок 2. Результаты культивирования нормальных В-лимфоцитов в присутствии немодифицированных (А) и CD40L-экспрессирующих (Б) стромальных клеток в течение 8 дней. Фазовый контраст, x200

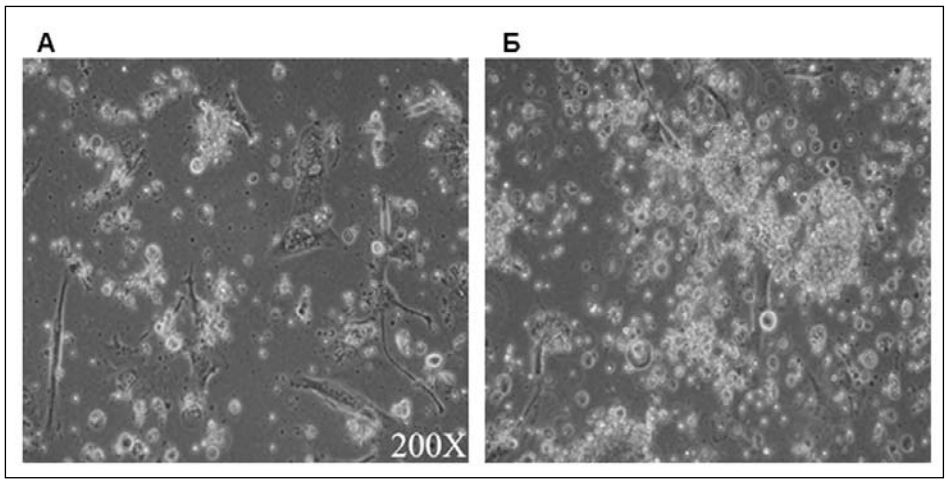


Рисунок 3. Данные проточной цитометрии, полученные после 15 дней культивирования мононуклеаров периферической крови на различных типах стромальных клеток: А-КМ-МСК, Б-HS-5, В- HeLa, Г-CD40L-HeLa. Сокультивирование проводилось в среде RPMI-1640 присутствии IL-4 и циклоспорина А. Для каждого из варрантов указан процент клеток с фенотипом CD45+;CD19+ и общее число клеток после сокультивирования

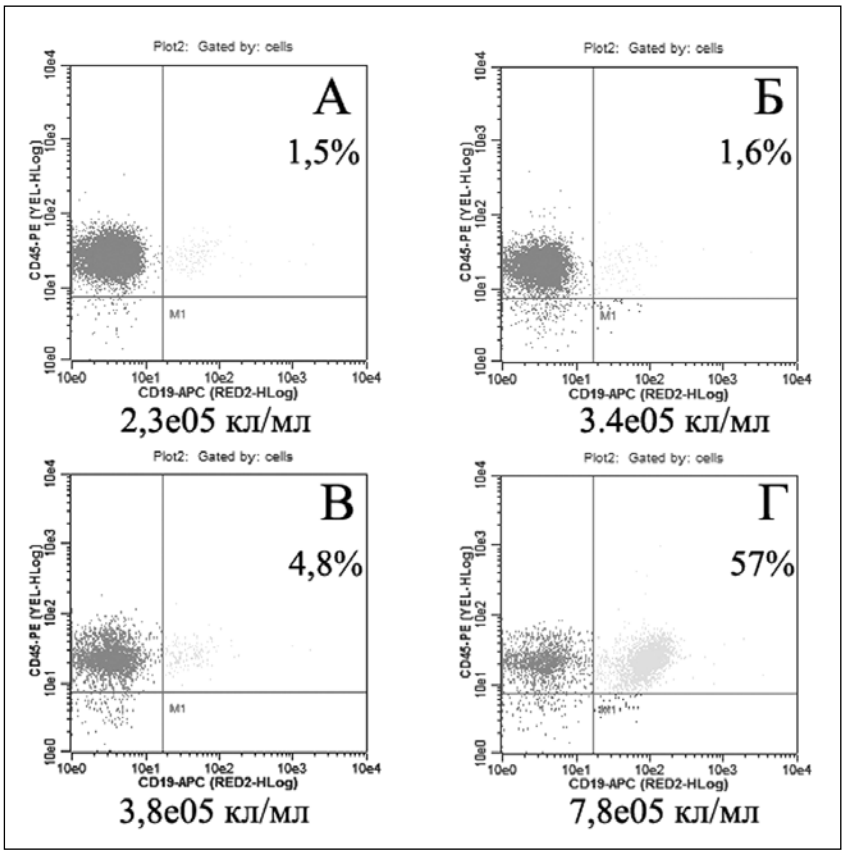


Рисунок 4. Изменение количества CD19+ клеток при культивировании в присутствии CD40L-HeLa в течение 17 дней

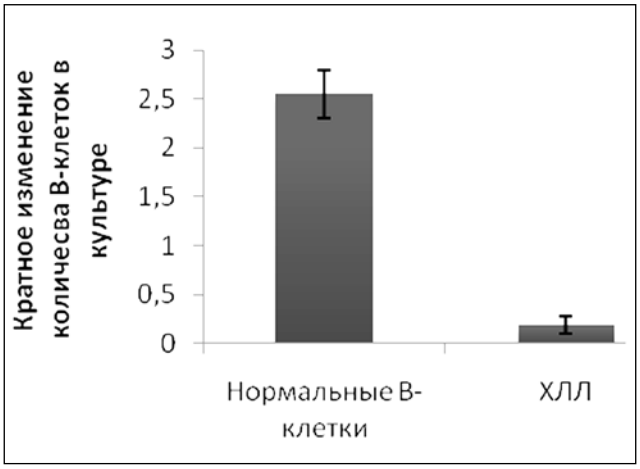
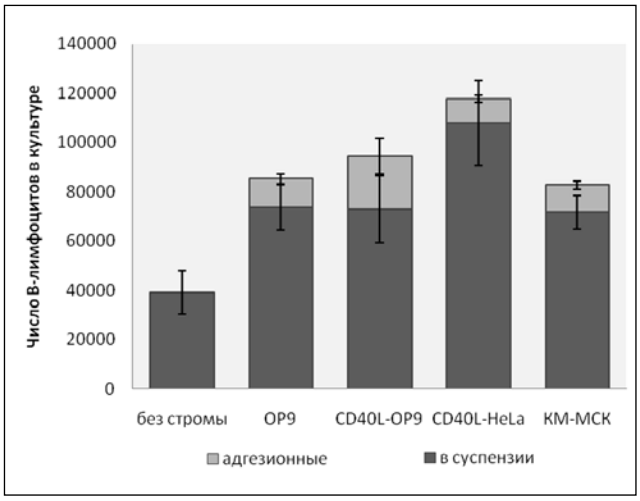


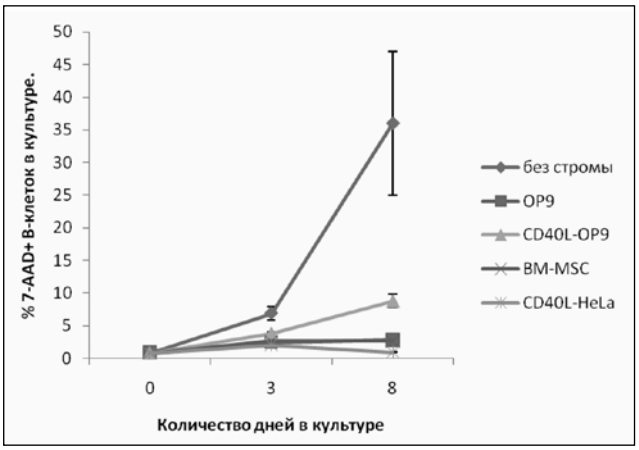
Рисунок 5. Количество CD19+ 7-AAD- клеток после 8 дней сокультивирования с различными стромальными клетками мононуклеарной фракции крови больных ХЛЛ. Отдельно отмечен вклад суспензионной и связанной со стромой фракции. Т-тест: p = 0,0017 (между образцом без стромы и всеми остальными группами); между OP9/cd40lop9/cd40lhela/КМ-МСК статистической разницы нет)



этапе трансдукции (Рис. 6). Интенсивность экспрессии и, соответственно, количество молекул CD40L на поверхности модифицированных клеток теоретически могут влиять на способность активировать В-лимфоциты, что вероятно, является причиной, по которой клетки CD40L-HeLa оказывают более выраженный антиапоптотический эффект на клетки ХЛЛ.

Для всех использованных стромальных клеток была показана способность снижать спонтанный апоптоз клеток ХЛЛ в сокультуре (Рис. 7). Статистически значимых различий в способности поддерживать жизнеспособность лейкозных клеток между линиями OP9, HeLa и различными КМ-МСК выявлено не было. Сокультивирование с CD40L-экспрессирующими клетками значимо не увеличивало выживаемость лейкозных клеток в сравнении с нативными стромальными клетками (Рис. 8). Это несколько противоречит литературным данным и требует дальнейшего уточнения.

Рисунок 7. Процент 7-AAD+ клеток во фракции CD19+ клеток при сокультивировании с различными фидерными клетками. Данные представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего



2.2 Моделирование защитного эффекта микроокружения при воздействии антилейкемических препаратов

Стимуляция CD40 способна приводить к запуску сигналов, направленных на выживание опухолевых клеток. Мы протестировали, как меняется уровень апоптоза в клетках ХЛЛ при стимуляции CD40 и одновременном воздействии фармакологических препаратов, обладающих высокой клинической эффективностью при ХЛЛ. Механизм действия двух выбранных препаратов существенно отличается: бендамустин является алкилирующим соединением, вызывающим повреждения ДНК [77], ибрутиниб — ингибитор киназы Btk, участвующей в сигналинге с В-клеточного рецептора.

В наших экспериментах мы использовали мононуклеарную фракцию периферической крови больных ХЛЛ. У всех больных диагноз хронический лимфолейкоз был подтвержден клинически, больные находили на стадии прогрессии, но не получали терапии. В результате более 95 % лейко-

Рисунок 6. Уровень экспрессии CD40L в трансдуцированных клетках различных линий (количественная ПЦР)

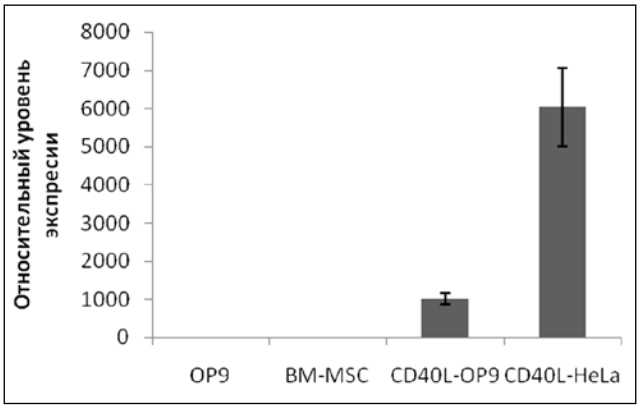


Рисунок 8. 7-AAD и CD19-Ab окраска клеток одного из пациентов после 8 дней культивирования в различных условиях. А — без фидерных клеток, Б — в присутствии клеток OP9, В — в присутствии клеток CD40L-OP9, Г — в присутствии КМ-МСК

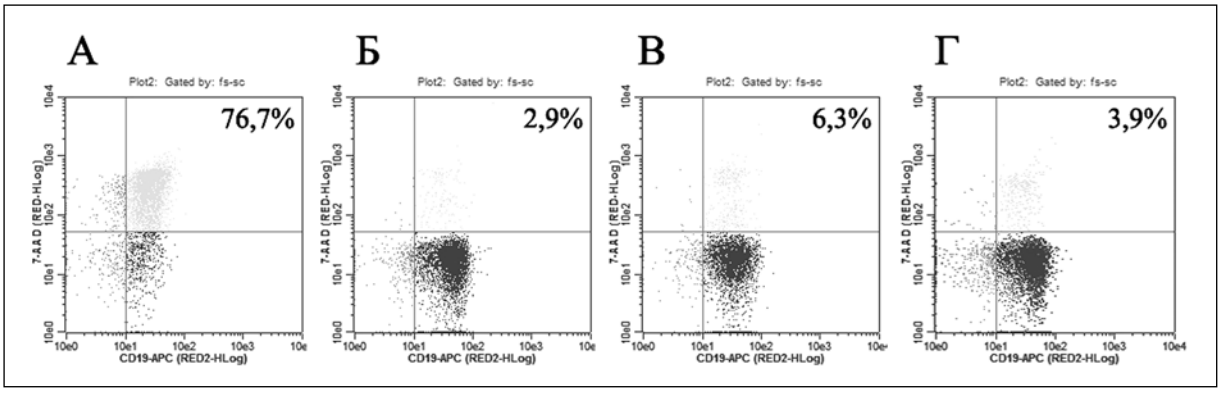


Рисунок 9. Влияния стромальных клеток на выживаемость клеток ХЛЛ в культуре через 48 часов в условиях воздействия бендамустина (30 мкг/мл) и ибрутиниба (100 nM)

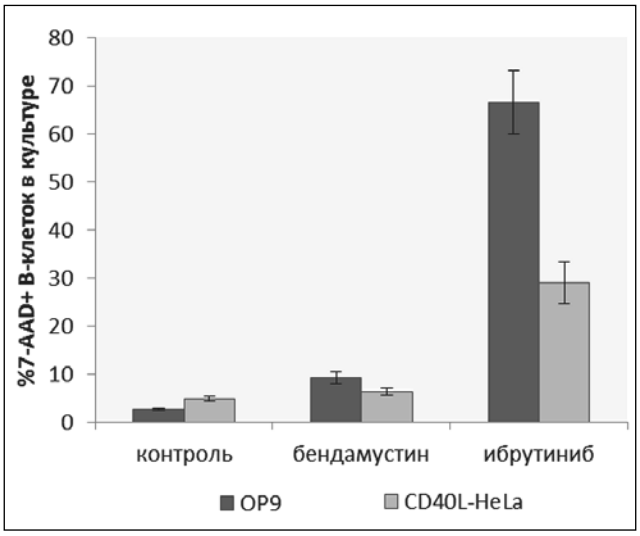
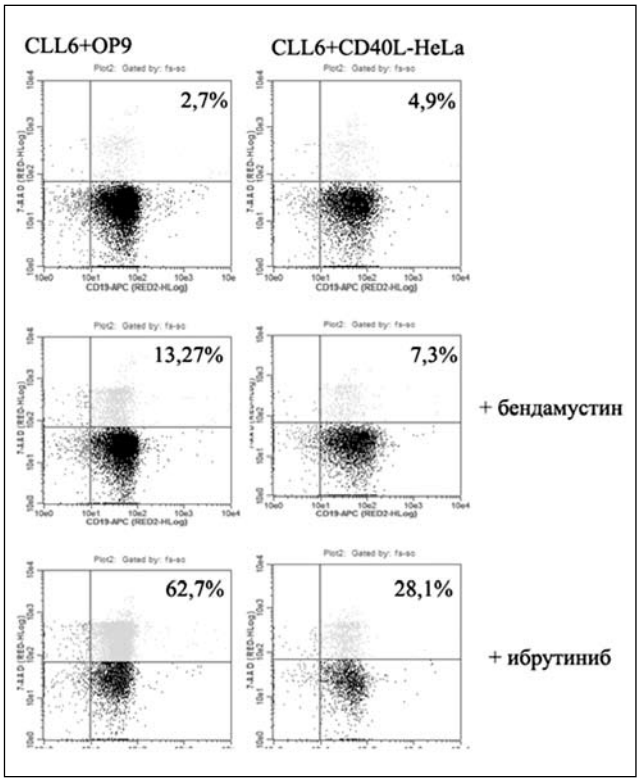


Рисунок 10. Подсчет количества 7-AAD+ CD19+ клеток ХЛЛ после 48-часовой инкубации с бендамустином и ибрутинибом в присутствии фидерных клеток OP9 и CD40L-HeLa



цитов в мононуклеарной фракции были позитивны по маркеру В-лимфоцитов CD19. 2 × 10^5 мононуклеаров периферической крови в 1 мл среды RPMI-1640 с 10 % FBS, антибиотиком и 50 ед/мл IL-4 добавляли в лунку 24 луночного планшета с монослоем фидерных клеток. Через сутки в среду добавляли бендамустин (30 мг/мл) и ибрутиниб (100 nm) до указанной концентрации. Анализ проводили через 48 часов, при этом учитывали процент 7-AAD положительных клеток в общей популяции CD19 положительных клеток.

Проведенные исследования показали, что совместное культивирование лейкозных клеток с линией CD40L-HeLa защищало их от воздействия ибрутиниба в конц. 100 nM.

Клетки линии OP9, не экспрессирующие CD40L, не оказывали значимого защитного эффекта (Рис. 9). Разница в защитной активности между линиями OP9 и CD40L-HeLa была статистически достоверной (p = .000863, Т-тест). Цитотоксическая активность бендамустина in vitro в концентрациях, соответствующих терапевтическим, была ниже ибрутиниба. Стимуляция CD40 также снижала бендамустин-индуцированный апоптоз, однако выраженность данного эффекта была умеренной и не достигала статистической достоверности (p=0,07) (Рис. 10).

Таким образом, можно сказать, что стимуляция CD40 снижает чувствительность к ибрутинибу и бендамустину. Возможные пути уменьшения данного защитного эффекта могли бы усилить цитотоксический эффект препаратов и увеличить эффективность противоопухолевой терапии.

Выводы

Взаимодействие в системе клетки ХЛЛ — активированные Т-лимфоциты, опосредованное главным образом активацией CD40 и CD40L, является важным элементом патогенеза заболевания, который необходимо учитывать в процессе поиска новых эффективных методов терапии. Более детальное изучение механизмов резистентности лейкозных клеток к противоопухолевому иммунитету и цитостатическим препаратам в условиях микроокружения лимфатических узлов является перспективным направлением для дальнейших исследований.

Моделирование защитной ниши ХЛЛ in vitro позволяет выявлять биологически и клинически значимые особенности опухолевых клеток, что иллюстрируется результатами работ по изучению опухолевой пролиферации и резистентности к апоптозу, а также корреляцией лабораторных данных с наличием иммунологических нарушений.

Предварительные результаты проделанной нами работы в целом согласуются с литературными данными. Дальнейшие эксперименты будут направлены на создание более совершенной модели микроокружения и тестирование в ней активности ряда новых антилейкемических препаратов.

Литература

1. *Patten P.E., Buggins A.G., Richards J. et al.* CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment // Blood. — 2008. — T. 111, № 10. — C. 5173–81.

2. *Ghia P., Strola G., Granziero L. et al.* Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22 // Eur. J. Immunol. — 2002. — T. 32, № 5. — C. 1403–13.

3. *Pizzolo G., Chilosi M., Ambrosetti A. et al.* Immunohistologic study of bone marrow involvement in B-chronic lymphocytic leukemia // Blood. — 1983. — T. 62, № 6. — C. 1289–1296.

4. *Абраменко И.В., Крячок И.А.* Взаимодействие лейкемических клеток с микроокружением при хроническом лимфолейкозе: новые аспекты патогенеза и таргетной терапии // Клиническая онкология. — 2012. — Т. 5, № 1. — С. 99–102.

5. *Herishanu Y., Perez-Galan P., Liu D. et al.* The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia // Blood. — 2011. — T. 117, № 2. — C. 563–574.

6. *Os A., Burgler S., Ribes A.P.* Chronic lymphocytic leukemia cells are activated and proliferate in response to specific T helper cells // Cell. Rep. — 2013. — T. 4, № 3. — C. 566–577.

7. *Bagnara D., Kaufman M.S., Calissano C. et al.* A novel adoptive transfer model of chronic lymphocytic leukemia suggests a key role for T lymphocytes in the disease // Blood. — 2011. — T. 117, № 20. — C. 5463–5472.

8. *Paulie S., Ehlin-Henriksson B., Mellstedt H. et al.* A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and B lymphocytes // Cancer Immunol Immunother. — 1985. — T. 20, № 1. — C. 23–28.

9. *Clark E.A., Ledbetter J.A.* Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50 // Proc Natl Acad Sci U S A. — 1986. — T. 83, № 12. — C. 4494–4498.

10. *Clark E.A.* CD40: a cytokine receptor in search of a ligand // Tissue Antigens. — 1990. — T. 36, № 1. — C. 33–36.

11. *Lederman S., Yellin M.J., Krichevsky A. et al.* Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help) // J. Exp. Med. — 1992. — T. 175, № 4. — C. 1091–1101.

12. *Armitage R.J., Fanslow W.C., Strockbine L. et al.* Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40 // Nature. — 1992. — T. 357, № 6373. — C. 80–82.

13. *Spriggs M.K., Armitage R.J., Strockbine L. et al.* Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion // J. Exp. Med. — 1992. — T. 176, № 6. — C. 1543–1550.

14. *van Kooten C., Banchereau J.* CD40-CD40 ligand // J. Leukoc Biol. — 2000. — T. 67, № 1. — C. 2–17.

15. *Elgueta R., Benson M.J., de Vries V.C. et al.* Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system // Immunol Rev. — 2009. — T. 229, № 1. — C. 152–172.

16. *Planken E.V., Willemze R., Kluin-Nelemans J.C.* The role of the CD40 antigen on malignant B cells // Leuk Lymphoma. — 1996. — T. 22, № 3–4. — C. 229–235.

17. *Banchereau J., Rousset F.* Growing human B lymphocytes in the CD40 system // Nature. — 1991. — T. 353, № 6345. — C. 678–679.

18. *Fluckiger A.C., Rossi J.F., Bussel A. et al.* Responsiveness of chronic lymphocytic leukemia B cells activated via surface Igs or CD40 to B-cell tropic factors // Blood. — 1992. — T. 80, № 12. — C. 3173–3181.

19. *Scielzo C., Apollonio B., Scarfo L. et al.* The functional in vitro response to CD40 ligation reflects a different clinical outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia // Leukemia. — 2011. — T. 25, № 11. — C. 1760–1767.

20. *Hayden R.E., Pratt G., Roberts C. et al.* Treatment of chronic lymphocytic leukemia requires targeting of the protective lymph node environment with novel therapeutic approaches // Leuk Lymphoma. — 2012. — T. 53, № 4. — C. 537–549.

21. *Buhmann R., Nolte A., Westhaus D. et al.* CD40-activated B-cell chronic lymphocytic leukemia cells for tumor immunotherapy: stimulation of allogeneic versus autologous T cells generates different types of effector cells // Blood. — 1999. — T. 93, № 6. — C. 1992–2002.

22. *Nakaima Y., Watanabe K., Koyama T. et al.* CD137 is induced by the CD40 signal on chronic lymphocytic leukemia B cells and transduces the survival signal via NF-kappaB activation // PLoS One. — 2013. — T. 8, № 5. — C. 64425.

23. *Chu P., Deforce D., Pedersen I.M. et al.* Latent sensitivity to Fas-mediated apoptosis after CD40 ligation may explain activity of CD154 gene therapy in chronic lymphocytic leukemia // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2002. — T. 99, № 6. — C. 3854–3859.

24. *Kitada S., Zapata J.M., Andreeff M., Reed J.C.* Bryostatin and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia // Br.J. Haematol. — 1999. — T. 106, № 4. — C. 995–1004.

25. *Schattner E. J., Mascarenhas J., Reyfman I.* Chronic lymphocytic leukemia B cells can express CD40 ligand and demonstrate T-cell type costimulatory capacity // Blood. — 1998. — T. 91, № 8. — C. 2689–2697.

26. *Biagi E., Yvon E., Dotti G. et al.* Bystander transfer of functional human CD40 ligand from gene-modified fibroblasts to B-chronic lymphocytic leukemia cells // Hum Gene Ther. — 2003. — T. 14, № 6. — C. 545–559.

27. *Willimott S., Baou M., Huf S. et al.* Regulation of CD38 in proliferating chronic lymphocytic leukemia cells stimulated with CD154 and interleukin-4 // Haematologica. — 2007. — T. 92, № 10. — C. 1359–1366.

28. *Gricks C.S., Zahrieh D., Zauls A.J. et al.* Differential regulation of gene expression following CD40 activation of leukemic compared to healthy B cells // Blood. — 2004. — T. 104, № 13. — C. 4002–4009.

29. *Tromp J.M., Tonino S.H., Elias J.A. et al.* Dichotomy in NF-kappaB signaling and chemoresistance in immunoglobulin

variable heavy-chain-mutated versus unmutated CLL cells upon CD40/TLR9 triggering // Oncogene. — 2010. — T. 29, № 36. — C. 5071–5082.

30. *Runarsson G., Liu A., Mahshid Y. et al.* Leukotriene B4 plays a pivotal role in CD40-dependent activation of chronic B lymphocytic leukemia cells // Blood. — 2005. — T. 105, № 3. — C. 1274–1279.

31. *Minuzzo S., Indraccolo S., Tosello V. et al.* CD40 activation of B-CLL cells is associated with augmented intracellular levels of CD79b and increased BCR expression in a subset of patients // Leukemia. — 2005. — T. 19, № 6. — C. 1099–1101.

32. *Ferrer G., Bosch R., Hodgson K. et al.* B cell activation through CD40 and IL4R ligation modulates the response of chronic lymphocytic leukaemia cells to BAFF and APRIL // Br. J. Haematol. — 2013.10.1111/bjh.12645.

33. *Eisterer W., Bechter O., Soderberg O. et al.* Elevated levels of soluble CD44 are associated with advanced disease and in vitro proliferation of neoplastic lymphocytes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia // Leuk Res. — 2004. — T. 28, № 10. — C. 1043–1051.

34. *Fedorchenko O., Stiefelhagen M., Peer-Zada A.A. et al.* CD44 regulates the apoptotic response and promotes disease development in chronic lymphocytic leukemia // Blood. — 2013. — T. 121, № 20. — C. 4126–4136.

35. *Girbl T., Hinterseer E., Grossinger E.M. et al.* CD40-mediated activation of chronic lymphocytic leukemia cells promotes their CD44-dependent adhesion to hyaluronan and restricts CCL21-induced motility // Cancer Res. — 2013. — T. 73, № 2. — C. 561–570.

36. *Farahani M., Treweeke A.T., Toh C.H., Till K. J. et al.* Autocrine VEGF mediates the antiapoptotic effect of CD154 on CLL cells // Leukemia. — 2005. — T. 19, № 4. — C. 524–30.

37. *Crawford D. H., Catovsky D.* In vitro activation of leukaemic B cells by interleukin-4 and antibodies to CD40 // Immunology. — 1993. — T. 80, № 1. — C. 40–44.

38. *Buske C., Gogowski G., Schreiber K. et al.* Stimulation of B-chronic lymphocytic leukemia cells by murine fibroblasts, IL-4, anti-CD40 antibodies, and the soluble CD40 ligand // Exp Hematol. — 1997. — T. 25, № 4. — C. 329–37.

39. *Jacob A., Pound J. D., Challa A., Gordon J.* Release of clonal block in B cell chronic lymphocytic leukaemia by engagement of co-operative epitopes on CD40 // Leuk Res. — 1998. — T. 22, № 4. — C. 379–382.

40. *de Totero D., Meazza R., Zupo S. et al.* Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells // Blood. — 2006. — T. 107, № 9. — C. 3708–3715.

41. *Soderberg O., Christiansen I., Carlsson M., Nilsson K.* CD40 ligation inhibits IL-2 and SAC+IL-2 induced proliferation in chronic lymphocytic leukaemia cells // Scand. J. Immunol. — 1997. — T. 45, № 6. — C. 706–714.

42. *Plander M., Seegers S., Ugocsai P. et al.* Different proliferative and survival capacity of CLL-cells in a newly established in vitro model for pseudofollicles // Leukemia. — 2009. — T. 23, № 11. — C. 2118–2128.

43. *Longo P. G., Laurenti L., Gobessi S. et al.* The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease // Leukemia. — 2007. — T. 21, № 1. — C. 110–120.

44. *Granziero L., Ghia P., Circosta P. et al.* Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia // Blood. — 2001. — T. 97, № 9. — C. 2777–2783.

45. *Pedersen I. M., Kitada S., Leoni L. M. et al.* Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1 // Blood. — 2002. — T. 100, № 5. — C. 1795–801.

46. *Kater A.P., Evers L.M., Remmerswaal E.B. et al.* CD40 stimulation of B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells enhances the anti-apoptotic profile, but also Bid expression and cells remain susceptible to autologous cytotoxic T-lymphocyte attack // Br J Haematol. — 2004. — T. 127, № 4. — C. 404–15.

47. *Willimott S., Baou M., Naresh K., Wagner S. D.* CD154 induces a switch in pro-survival Bcl-2 family members in chronic lymphocytic leukaemia // Br J Haematol. — 2007. — T. 138, № 6. — C. 721–732.

48. *Smit L.A., Hallaert D.Y., Spijker R. et al.* Differential Noxa/Mcl-1 balance in peripheral versus lymph node chronic lymphocytic leukemia cells correlates with survival capacity // Blood. — 2007. — T. 109, № 4. — C. 1660–1668.

49. *Dicker F., Kater A.P., Fukuda T. et al.* Fas-ligand (CD178) and TRAIL synergistically induce apoptosis of CD40-activated chronic lymphocytic leukemia B cells // Blood. — 2005. — T. 105, № 8. — C. 3193–3198.

50. *de Totero D., Montera M., Rosso O. et al.* Resistance to CD95-mediated apoptosis of CD40-activated chronic lymphocytic leukemia B cells is not related to lack of DISC molecules expression // Hematol J. — 2004. — T. 5, № 2. — C. 152–60.

51. *Kater A. P., Dicker F., Mangiola M. et al.* Inhibitors of XIAP sensitize CD40-activated chronic lymphocytic leukemia cells to CD95-mediated apoptosis // Blood. — 2005. — T. 106, № 5. — C. 1742–1748.

52. *Pallasch C.P., Schulz A., Kutsch N. et al.* Overexpression of TOSO in CLL is triggered by B-cell receptor signaling and associated with progressive disease // Blood. — 2008. — T. 112, № 10. — C. 4213–4219.

53. *Walker A., Taylor S.T., Hickman J.A., Dive C.* Germinal center-derived signals act with Bcl-2 to decrease apoptosis and increase clonogenicity of drug-treated human B lymphoma cells // Cancer Res. — 1997. — T. 57, № 10. — C. 1939–1945.

54. *Romano M.F., Lamberti A., Tassone P. et al.* Triggering of CD40 antigen inhibits fludarabine-induced apoptosis in B chronic lymphocytic leukemia cells // Blood. — 1998. — T. 92, № 3. — C. 990–995.

55. *Grdisa M.* Influence of CD40 ligation on survival and apoptosis of B-CLL cells in vitro // Leuk Res. — 2003. — T. 27, № 10. — C. 951–956.

56. *de Totero D., Tazzari P.L., Capaia M. et al.* CD40 triggering enhances fludarabine-induced apoptosis of chronic lymphocytic leukemia B-cells through autocrine

release of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gama and tumor necrosis factor receptor-I-II upregulation // Haematologica. — 2003. — T. 88, № 2. — C. 148–158.

57. *Tonino S.H., van Laar J., van Oers M.H. et al.* ROS-mediated upregulation of Noxa overcomes chemoresistance in chronic lymphocytic leukemia // Oncogene. — 2011. — T. 30, № 6. — C. 701–713.

58. *Jak M., van Bochove G.G., van Lier R.A. et al.* CD40 stimulation sensitizes CLL cells to rituximab-induced cell death // Leukemia. — 2011. — T. 25, № 6. — C. 968–978.

59. J*ak M., van Bochove G.G., Reits E.A. et al.* CD40 stimulation sensitizes CLL cells to lysosomal cell death induction by type II anti-CD20 mAb GA101 // Blood. — 2011. — T. 118, № 19. — C. 5178–5188.

60. *Vogler M., Butterworth M., Majid A. et al.* Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia // Blood. — 2009. — T. 113, № 18. — C. 4403–4413.

61. *Herman S.E., Gordon A.L., Wagner A.J. et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase-delta inhibitor CAL-101 shows promising preclinical activity in chronic lymphocytic leukemia by antagonizing intrinsic and extrinsic cellular survival signals // Blood. — 2010. — T. 116, № 12. — C. 2078–2088.

62. *Herman S. E., Gordon A. L., Hertlein E. et al.* Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765 // Blood. — 2011. — T. 117, № 23. — C. 6287–6296.

63. *Hallaert D.Y., Jaspers A., van Noesel C.J. et al.* c-Abl kinase inhibitors overcome CD40-mediated drug resistance in CLL: implications for therapeutic targeting of chemoresistant niches // Blood. — 2008. — T. 112, № 13. — C. 5141–9.

64. *McCaig A.M., Cosimo E., Leach M.T. et al.* Dasatinib inhibits B cell receptor signalling in chronic lymphocytic leukaemia but novel combination approaches are required to overcome additional pro-survival microenvironmental signals // Br J Haematol. — 2011. — T. 153, № 2. — C. 199–211.

65. *Best O.G., Mulligan S.P.* Heat shock protein-90 inhibitor, NVP-AUY922, is effective in combination with fludarabine against chronic lymphocytic leukemia cells cultured on CD40L-stromal layer and inhibits their activated/proliferative phenotype // Leuk Lymphoma. — 2012. — T. 53, № 11. — C. 2314–2320.

66. *Hewamana S., Lin T.T., Jenkins C. et al.* The novel nuclear factor-kappaB inhibitor LC-1 is equipotent in poor prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia and shows strong synergy with fludarabine // Clin Cancer Res. — 2008. — T. 14, № 24. — C. 8102–8111.

67. *Horie R., Watanabe M., Okamura T. et al.* DHMEQ, a new NF-kappaB inhibitor, induces apoptosis and enhances fludarabine effects on chronic lymphocytic leukemia cells // Leukemia. — 2006. — T. 20, № 5. — C. 800–806.

68. *Natoni A., Murillo L.S., Kliszczak A.E. et al.* Mechanisms of action of a dual Cdc7/Cdk9 kinase inhibitor against quiescent and proliferating CLL cells // Mol. Cancer. Ther. — 2011. — T. 10, № 9. — C. 1624–1634.

69. *Hayden R.E., Pratt G., Davies N.J. et al.* Treatment of primary CLL cells with bezafibrate and medroxyprogesterone acetate induces apoptosis and represses the pro-proliferative signal of CD40-ligand, in part through increased 15dDelta12,14,PGJ2 // Leukemia. — 2009. — T. 23, № 2. — C. 292–304.

70. *Moreno C., Hodgson K., Ferrer G. et al.* Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukemia: prevalence, clinical associations, and prognostic significance // Blood. — 2010. — T. 116, № 23. — C. 4771–4776.

71. *D'Arena G., Guariglia R., La Rocca F. et al.* Autoimmune cytopenias in chronic lymphocytic leukemia // Clin Dev Immunol. — 2013. — T. 2013. — C. 730131.

72. *Schattner E. J.* CD40 ligand in CLL pathogenesis and therapy // Leuk Lymphoma. — 2000. — T. 37, № 5–6. — C. 461–472.

73. *Trentin L., Zambello R., Sancetta R. et al.* B lymphocytes from patients with chronic lymphoproliferative disorders are equipped with different costimulatory molecules // Cancer Res. — 1997. — T. 57, № 21. — C. 4940–4947.

74. *Lapalombella R., Andritsos L., Liu Q. et al.* Lenalidomide treatment promotes CD154 expression on CLL cells and enhances production of antibodies by normal B cells through a PI3-kinase-dependent pathway // Blood. — 2010. — T. 115, № 13. — C. 2619–2629.

75. *Citores M.J., Castejon R., Villarreal M. et al.* CD154 expression triggered by purine analogues in vitro: Correlation with treatment response and autoimmune events in chronic lymphocytic leukemia // Exp. Hematol. — 2010. — T. 38, № 3. — C. 165–73.

76. *Kneitz C., Goller M., Wilhelm M. et al.* Inhibition of T cell/B cell interaction by B-CLL cells // Leukemia. — 1999. — T. 13, № 1. — C. 98–104.

77. *Стругов В.В., Стадник Е.А., Зарицкий А.Ю.* Механизм действия и клническая активность нового алкилирующего препарата бендамустин при хроническом лимфолейкозе // Клиническая онкогематология. — 2011. — T. 4, № 3. — C. 217–227.

ОСОБЕННОСТИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С АНЕВРИЗМОЙ ВОСХОДЯЩЕГО ОТДЕЛА ГРУДНОЙ АОРТЫ

А.С. Костина[2], А.А. Шишкова[2], А.А.Костарева[1], А.Б. Малашичева[1]

[1] ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Костина Александра Станиславовна — студентка СПбГУ; *Шишкова Анастасия Алексеевна* — студентка СПбГУ; *Костарева Анна Александровна* — кандидат медицинских наук, директор института Молекулярной биологии и генетики ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Малашичева Анна Борисовна* — кандидат биологических наук, заведующая НИЛ молекулярной кардиологии института Молекулярной биологии и генетики ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Институт Молекулярной биологии и генетики, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: malashicheva_ab@almazovcentre.ru (*Малашичева Анна Борисовна*).

Резюме

Аневризма грудного отдела аорты развивается как результат серии событий, которые приводят к изменению структуры и состава внеклеточного матрикса стенки аорты, и в результате этих изменений происходит растяжение сосудистой стенки. Основными структурными и функциональными клеточными элементами, которые составляют стенку аорты, являются эндотелиальные и гладкомышечные клетки. Аневризма аорты, как правило, сопровождается дисфункцией эндотелия. Целью данной работы было изучение изменений, происходящих в эндотелиальной клеточной популяции у пациентов с аневризмой аорты. Клетки эндотелия аорты получали из фрагмента постоперационной ткани аорты пациентов энзиматическим методом. Контрольные эндотелиальные клетки получали из фрагментов ткани аорты здоровых доноров. Популяции эндотелиальных клеток доноров и пациентов сравнили по морфологии клеток, скорости пролиферации и уровню экспрессии эндотелиальных и гладкомышечных маркеров. Скорость пролиферации эндотелиальных клеток доноров была достоверно выше, чем скорость пролиферации клеток пациентов с аневризмой аорты. При иммуноцитохимической окраске в обеих популяциях выявляли маркер эндотелиальных клеток фактор Виллибрандта, что подтверждает эндотелиальную природу этих клеток. В популяции клеток от пациентов в некоторых клетках выявляли маркер гладкомышечных клеток — гладкомышечный актин, что свидетельствует о том, что в эндотелиальной популяции пациентов присутствуют клетки переходного фенотипа, что может сказываться на функции эндотелия пациентов. Популяции клеток также сравнили по уровню экспрессии генов *ACTA2* (гладкомышечный актин), *VWF* (фактор Виллибранда), *PECAM1* (маркер эндотелиальных клеток) и показали, что уровень *ACTA2* достоверно выше в популяции эндотелиальных клеток пациентов, уровень *VWF* и *PECAM1* достоверно выше в популяции эндотелиальных клеток здоровых доноров. Полученные данные свидетельствуют об изменениях в функциональных свойствах эндотелиальных клеток пациентов с аневризмой аорты по сравнению с клетками здоровых доноров.

Ключевые слова: аневризма восходящего отдела грудной аорты, эндотелиальные клетки аорты человека.

УДК.611.018.74:616.132-007.64

COMPARISON OF AORTIC ENDOTHELIAL CELLS FROM PATIENTS WITH ASCENDING THORACIC AORTIC ANEURYSM AND HEALTHY DONORS

A.S. Kostina, A.A. Shishkova, A.A. Kostareva[1], A.B. Malashicheva,[1, 2]

[1]Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia
[2]First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: malashicheva_ab@almazovcentre.ru (Anna B. Malashicheva — Head of the laboratory of Molecular Cardiology).

Abstract

Thoracic aortic aneurysm development leads to changes in the structure and composition of the extracellular matrix of the aortic wall, and as a result to stretching of the vascular wall. The main structural and functional elements of the aortic wall are endothelial and smooth muscle cells. Aortic aneurysm is usually accompanied by endothelial dysfunction seen in patients. The aim of this work was to study changes in the endothelial cell population in patients with aortic aneurysm. Patients' aortic endothelial cells were obtained from a fragment of postoperative aortic tissue by enzymatic dissociation method. Control endothelial cells were obtained from the aortic tissue fragments of healthy donors. The populations of endothelial cells of donors and patients were compared by cell morphology, proliferation rate and expression level of endothelial and smooth muscle cell markers. The rate of donor cell proliferation was significantly higher than that of patients' cells. Immunocytochemical staining of endothelial marker von Willebrand factor was detected in both populations that confirms endothelial nature of these cells. Smooth muscle actin (SMA), smooth muscle cell marker is detected in certain patients' cells suggesting that endothelial cells of patients may present a transition phenotype associated with the disease. We compared endothelial populations of donors and patients by the level of *ACTA2* (smooth muscle actin) and *VWF* gene expression (Willebrandt factor), and showed that the level of *ACTA2* is significantly higher in the endothelial populations of patients. In contrary, the level of *VWF* is significantly higher in the populations of healthy donors. Our data indicate changes in the functional properties of endothelial cells in patients with aortic aneurysms as compared to the cells of healthy donors. These changes may present pathophysiological mechanisms of thoracic aortic aneurysm and need to be studied further.

Key word: thoracic aortic aneurysm, human aortic endothelial cells.

Статья поступила в редакцию 01.11.13, принята к печати 12.11.13.

Аорта состоит из трёх слоев — тонких наружного (tunica adventitia) и внутреннего (tunica intima), и толстого срединного (tunica media). Основная функция механического растяжения и сопротивления осуществляется за счёт срединного слоя, который состоит из гладкомышечных клеток, способных с одной стороны к сокращению, с другой — к синтезу внеклеточного матрикса, обеспечивающего прочность стенки сосуда. Врожденные дефекты развития аорты и аортального клапана связаны с изменением внеклеточного матрикса и клеточного состава стенки аорты [1, 2].

Основным функциональным элементом стенки аорты считают гладкомышечные клетки. В семейных формах аневризм выявлены мутации в генах, кодирующих белки сократительного аппарата гладкомышечных клеток — гладкомышечный актин (ACTA2), тяжёлая цепь миозина (MYH11) [3–5]. В то же время о функционировании эндотелиальных клеток при аневризме аорты ничего не известно. Это связано, по-видимому, с тем, что эти клетки трудно выделить из тканей пациентов и соответственно трудно изучать. Целью данного исследования было изучение особенностей эндотелиальной популяции клеток, происходящих от пациентов с аневризмой восходящего отдела грудной аорты, сопровождающейся двустворчатым клапаном аорты. Популяции эндотелиальных клеток доноров и пациентов сравнили по морфологии клеток, скорости пролиферации и уровню экспрессии эндотелиальных и гладкомышечных маркеров. Полученные данные свидетельствуют об изменениях в функциональных свойствах эндотелиальных клеток пациентов с аневризмой аорты по сравнению с клетками здоровых доноров.

Материалы и методы

Получение и культивирование эндотелиальных клеток аорты.

Сбор биоптатов аорты проводится при оперативных вмешательствах по поводу аневризмы аорты и, сопровождающейся двустворчатым клапаном аорты в ФМИЦ им. Алмазова, либо либо от здоровых доноров во время мультиорганных заборов для трансплантаций по описанной ранее методике [6]. Все пациенты перед оперативным вмешательством подписали информированное согласие, одобренное локальным этическим комитетом ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова». Были выделены клетки от 5 пациентов и от 5 доноров. Участок ткани помещали в стерильную пробирку, содержащую фосфатно-солевым буфер (ФСБ), и транспортировали в лабораторию. Далее ткань препарировали и проводили выделение эндотелиальных клеток следующим образом. У фрагмента аорты удаляли адвенитицию, затем инкубировали фрагмент в растворе коллагеназы III (1 мкг/мл) в среде ДМЕМ в течение 30 минут и затем механически снимали слой эндотелиальных клеток с фрагмента ткани. Затем промывали 2 раза в растворе ФСБ и помещали в чешку Петри, покрытую раствором 1 % желатина. Культвирование проводили в эндотелиальной среде EGM-2 (Promocell, Германия). На следующий день неприкрепившиеся к пластику клетки отмывали ФСБ, среду заменяли на свежую, и далее клетки культивировали до появления характерных эндотелиальных колоний. Затем клетки пересевали и использовали в экспериментах 2–4 пассажа.

Скорость пролиферации ГМК исследовали методом построения кривых роста.

Иммуноцитохимическая окраска клеток.

Покровные стекла с растущими на них клетками промывали ФСБ 2 раза. Далее фиксировали стекла в 4 % параформальдегиде на ФСБ (Invitrogen, Германия) в течение 10 мин при комнатной температуре. Проводили отмывку ФСБ 3 раза по 5 мин. Далее при внутриклеточном окрашивании проводили пермеабилизацию образцов, для этого стекла инкубировали 5 минут в 0,3 % Тритон X-100 на ФСБ. Проводили отмывку ФСБ 3 раза по 10 минут. Для предотвращения неспецифического связывания стекла с клетками инкубировали в 3 % растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) на ФСБ в течение 30 минут. После этого наносили первичные антитела в концентрации, рекомендованной производителем, разведенные на 1 % БСА, и инкубировали во влажной камере в течение 1 часа при комнатной температуре. В качестве первых антител использовали следующие антитела: антитела против гладкомышечного актина (Sigma), антитела против фактора Виллебранда (Abcam, США). Клетки отмывали от первичных антител в ФСБ 3 раза по 10 минут. Наносили вторичные антитела, меченные флуорохромом, и инкубировали в течение 50 минут в темноте. В качестве вторых антител использовали флуоресцентно-меченные антитела против мыши, меченые флюорохромом Alexa 546 или Alexa 488 goat anti-mouse (BD, США). Отмывали в ФСБ 3 раза по 10 минут и докрашивали ядра 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (Invitrogen, США). Затем образцы промывали 3 раза по 15 мин в ФСБ и заключали в специализированной среде для иммунофлуоресцентных препаратов, Flurescent Mounting Medium (Dako, Дания), сушили в течение 30 минут. Препараты анализировали при помощи флуоресцентного микроскопа Observer.D1 (Carl Zeiss, Германия). Обработка изображения производили в программе Axiovision Rel.4.7 (Carl Zeiss, Германия).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени..

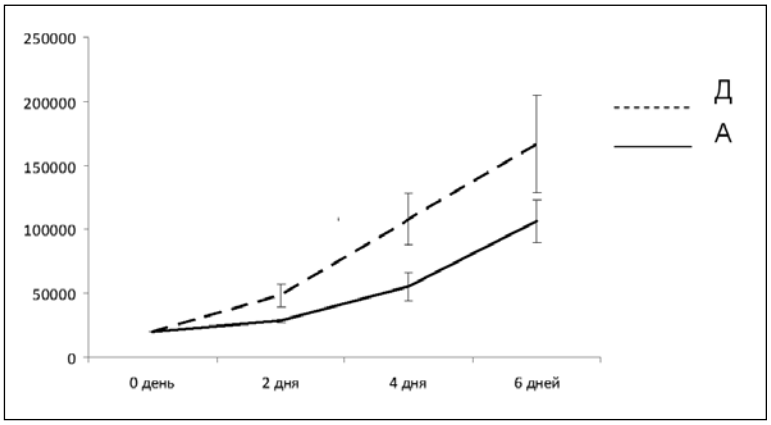
Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили при помощи амплификатора нуклеиновых кислот ABI 7500 (Applied Biosystems, США), используя технологию SYBR GREEN по следующей схеме: 10 мин 95º, затем 47 циклов, включающих денатурацию 15 с при 95ºС и отжиг праймеров с амплификацией 60с при 60ºС. Температура отжига всех праймеров составляла 60ºС. Праймеры для ПЦР в реальном времени подбирали с использованием программы “Oligo 6” (Molecular Biology Insights, США). Рассчитанные количества кДНК каждого из генов нормировали по уровню экспрессии гена «домашнего хозяйства», *GAPDH* и представляли как относительный уровень экспрессии гена, принимая за единицу уровень экспрессии в контрольных клетках.

Для проверки статистической значимости данных использовали парный двухвыборочный *t*-тест Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Нам были неизвестны работы, выполненные на эндотелиальных клетках аорты пациентов с аневризмой восходящего отдела аорты. В то же время нами и другими авторами были показаны функциональные различия между популяциями гладкомышечных клеток пациентов с аневризмой восходящего отдела грудной аорты и клеток здоровых доноров [7]. Кроме того, в последнее время стало понятно, что аневризмы восходящего отдела

Рисунок 1. Сравнение скорости роста эндотелиальных клеток аорты от здоровых доноров и от пациентов с аневризмой



Примечание: по вертикали — количество мРНК соответствующего гена в условных единицам. Условные обозначения: Д-клетки доноров, А — клетки пациентов с аневризмой аорты.

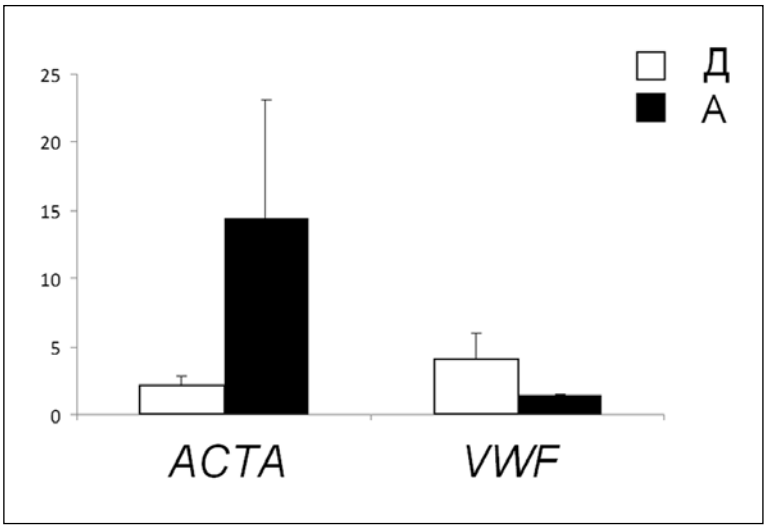
аорты, сопровождающиеся двустворчатым клапаном аорты, возникают по причине наследственных генетических нарушений, и эта группа пациентов более однородная с патогенетической точки зрения по сравнению с группой, в которую входят пациенты с аневризмой, не сопровождающейся пороком аортального клапана [8]. Поэтому в данной работе мы сравнивали эндотелиальные клетки, происходящие от здоровых доноров с клетками, происходящими от пациентов с аневризмой восходящего отдела аорты, сопровождающейся двустворчатым клапаном аорты.

На первом этапе исследования проводили сравнение скорости роста клеток, выделенных от пациентов и от здоровых доноров. Для этого строили кривые роста исследовавшихся культур клеток, измеряя количество клеток каждые 2 дня. Данные представлены на рис. 1.

Из представленных данных видно, что скорость роста эндотелиальных клеток здоровых доноров и пациентов с аневризмой статистически достоверно различается на всём протяжении культивирования.

На следующем этапе мы морфологически охарактеризовали культвируемые эндотелиальные клетки. Морфологически культуры доноров и пациентов практически не различались. При иммуноцитохимической окраске в обеих популяциях выявляли маркер эндотелиальных клеток фактор Виллебранда, что подтверждает эндотелиальную природу этих клеток. В популяции клеток от пациентов в некоторых клетках выявляли маркер гладкомышечных клеток — гладкомышечный актин, что свидетельствует о том, что в эндотелиальной популяции пациентов присутствуют клетки переходного фенотипа.

Рисунок 2. Сравнение экспрессии *ACTA2* (гладкомышечный актин) и *VWF* (фактор Виллебранда)



Примечание: по вертикали — количество мРНК соответствующего гена в условных единицам. Условные обозначения: Д-клетки доноров, А — клетки пациентов с аневризмой аорты.

На следующем этапе мы количественно охарактеризовали популяции эндотелиальных клеток пациентов и доноров в отношении экспрессии *ACTA2* (гладкомышечный актин) и *VWF* (фактор Виллебранда) методом обратной количественной полимеразной цепной реакции (рис. 2).

Из представленных данных видно, что уровень *ACTA2* достоверно выше в популяции эндотелиальных клеток пациентов, уровень *VWF* достоверно выше в популяции эндотелиальных клеток здоровых доноров. Полученные данные свидетельствуют об изменениях в функциональных свойствах эндотелиальных клеток пациентов с аневризмой аорты по сравнению с клетками здоровых доноров.

Работа выполнена при поддержке грантов Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашения: П1062, № 8120.

Литература

1. *Aboulhosn J., Child J.S.* Left ventricular outflow obstruction: subaortic stenosis, bicuspid aortic valve, supravalvar aortic stenosis, and coarctation of the aorta // Circulation. — 2006. — Vol. 114, № 22. — P. 2412–2422.

2. *Della Corte A., Quarto C., Bancone C. et al.* Spatiotemporal patterns of smooth muscle cell changes in ascending aortic dilatation with bicuspid and tricuspid aortic valve stenosis: focus on cell-matrix signaling // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. — 2008. — Vol. 135, № 1. — P. 8–18.

3. *Zhu L., Vranckx R., Khau Van Kien P. et al.* Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus // Nat. Genet. — 2006. — Vol. 38, № 3. — P. 343–349.

4. *Guo D.C., Pannu H., Tran-Fadulu V., Papke C.L., Yu R.K. et al.* Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections // Nat. Genet. — 2007. — Vol. 39, № 12. — P. 1488–1493.

5. *Wang L., Guo D.C., Cao J., Gong L., Kamm K.E. et al.* Mutations in myosin light chain kinase cause familial aortic dissections // Am. J. Hum. Genet. — 2010. — Vol. 12, № 87. — P. 701–707.

6. *Kirschenlohr H.L., Metcalfe J.C., Grainger D.J.* Cultures of proliferating vascular smooth muscle cells from adult human aorta // Human Cell Culture Protocols (Meth. Mol.Med.). — № 24. — P. 319–334.

7. *Kirschenlohr H.L., Metcalfe J.C., Grainger D.J. 1996.* Cultures of proliferating vascular smooth muscle cells from adult human aorta // Human Cell Culture Protocols (Meth. Mol.Med.). — № 24. — P. 319–334.

8. *Костина Д.А, Воронкина И.В., Смагина Л.В. и др.* Исследование функциональных свойств гладкомышечных клеток при аневризме аорты // Цитология. — 2013. — Т. 55, № 10. — С. 727–731.

9. *А.Б. Малашичева, О.М. Моисеева, В.Е. Успенский и др.* TGF-beta в патогенезе восходящего отдела грудной аорты // Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова. — 2013. — № 4. — С. 19–23.

ФАКТОРЫ СВЯЗАННЫЕ С РАЗВИТИЕМ РЕСТЕНОЗА ПОСЛЕ РЕКОНСТРУКТИВНЫХ ОПЕРАЦИЙ НА АРТЕРИЯХ

Б.Б. Кок[1], А.В. Федоров[1], А.А. Костарева[1], В.Н. Вавилов[2]

[1] ФГБУ «Федеральный Центр сердца крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Миндздрава России, Санкт-Петербург, Россия
[2] ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Кок Борис Борисович — младший научный сотрудник НИЛ сосудистой хирургии ФГБУ «ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ; *Федоров Антон Владимирович* — кандидат биологических наук, заведующий НИЛ молекулярно-клеточных механизмов атеросклероза Института молекулярной биологии и генетики ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова; *Костарева Анна Александровна* — кандидат медицинских наук, директор Института молекулярной биологии и генетики ФЦСКиЭ им. акад. В.А. Алмазова; *Вавилов Валерий Николаевич* — заведующий НИЛ сосудистой хирургии ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. E-mail: akostareva@hotmail.com (Костарева Анна Александровна).

Резюме

В настоящем обзоре обсуждаются осложнения связанные с выполнением рекоструктивных операций на артериях, структура осложнений и сроки их возникновения. Рассматриваются данные о ключевых клеточных процессах, тканевых и циркулирующих молекулярных маркерах сопутствующих развитие сужения просвета сосуда в зоне операции.

Ключевые слова: облитерирующие заболевания артерий, рестеноз, биомаркеры.

FACTORS ASSOCIATED WITH THE RESTENOSIS AFTER RECONSTRUCTIVE SURGERY ON THE ARTERIES

B.B. Kok[1], A.V. Federov[1], A.A. Kostareva[1], V.V. Vavilov[2]

[1] Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia
[2] First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 2 Akkuratova str., Saint-Petersburg, Russia, 197341. E-mail: akostareva@hotmail.com (Anna A. Kostareva — PhD., Director of the Institute of Molecular Biology and Genetics Almazov Heart, Blood and Endocrinology Centre).

Abstract

In this review are presented the complications after reconstructive surgery on the arteries, their structure and terms of occurrence. Are considered data on key cellular processes, tissue and circulating molecular markers associated vasoconstriction in the zone operation.

Key words: obliterating arterial disease, restenosis, biomarkers.

Статья поступила в редакцию 02.11.13, принята к печати 12.11.13.

УДК.616.13-089

Заболевания сердечно-сосудистой системы и их осложнения в настоящий момент являются главной причиной смертности населения в Российской Федерации. Облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей страдает около 3 % населения, среди которых критическая ишемия развивается в 35–65 % случаев. Согласно статистике, данная патология выявляется примерно у 5 % населения старше 50 лет, что для Российской Федерации составляет около 2 млн. пациентов [1–3]. Основным и эффективным методом лечения облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей являются хирургические реконструктивные операции [4–6]. Следует отметить значительный рост артериальных реконструкций, только за 2010 год количество операций выросло на 42 % по сравнению с 2009 годом [4].

В различные сроки после операций нередко развиваются осложнения, которые приводят к рецидиву ишемии конечности, и ставят под угрозу не только жизнеспособность оперированной конечности, но и жизнь больного. В современной литературе принято разделять осложнения, возникающие после выполнения реконструктивной операций на магистральных артериях, в зависимости от сроков их развития на три основные группы: ранние, до 3-х месяцев после хирургического вмешательства; средние или так называемые отсроченные, до 1 года; и поздние, спустя 1,5 года и более, после операции [2, 7, 8]. Анализ результатов выполненных реконструктивных сосудистых операций показал, что лидирующее место среди поздних осложнений послеоперационного периода занимает тромбоз зоны реконструкции: 60–90 % в структуре всех осложнений [1, 3, 8]. Основной причиной развития тромбоза является постепенное стенозирование межсосудистых анастамозов. В течение 3 лет осложнение развивается у 20 % оперированных пациентов, и к 5 годам до 42 % [2, 9, 10].

Ведущая роль в развитии сужения просвета и тромбоза в зоне операции, по оценкам различных авторов, принадлежит пролиферации и фенотипической трансформации гладкомышечных клеток (ГМК), а также воспалительным реакциям сосудистой стенки. Репаративные процессы, происходящие в местах пластики артерий после выполненной эндартериоэктомии или стентирования, имеют схожесть в формировании неоинтимы, с последующей её гиперплазией и исходом в рестеноз [7, 11].

На всех этапах развития рестеноза происходит постоянное взаимодействие клеточных элементов неоинтимы друг с другом, с компонентами внеклеточного матрикса и клетками циркулирующими в крови. Наблюдаются активация тромбоцитов, миграция и диапедез лейкоцитов в окружающие сосуд ткани, пролиферация фибробластов и ГМК в зоне анастомоза, активация эндотелиальных клеток предшественников [2, 7, 12]. Одним из методов оценки течения атеросклероза, является изучение морфологической структуры атеросклеротической бляшки, взятой в момент операции. Определенное значение имеют параметры макрофагального присутствия, состояние интимы, характер включений в атеросклеротической бляшке, преобладающий фенотип ГМК, объем васкуляризации атеросклеротической бляшки [13]. При морфологическом исследовании изучается не только весь комплекс элементов атеросклеротической бляшки, но и отдельные клеточные структуры и компоненты внеклеточного матрикса.

В патогенезе стенозирования реконструированных артерий выявляют значимую роль перехода ГМК от сократительного к пролиферативному фенотипу. ГМК приобретают способность к миграции, пролиферации и повышенному синтезу компонентов внеклеточного матрикса. Развитию стеноза, после выполненного оперативного вмешательства в области сосуда, будь то ангиопластика или атерэктомия, способствует повышенная миграционная, пролиферативная и синтетическая способности ГМК [14, 15]. Ключевую роль в модуляции фенотипа гладкомышечных клеток играет регуляторная система с участием транскрипционного фактора миокардин, микроРНК-145 и микроРНК-221 [16, 17].

В нормальной артериальной стенке внеклеточный матрикс, основными компонентами которого являются эластиновые и коллагеновые волокна, формирует каркас сосуда и определяет его эластические свойства, при этом процессы разрушения и синтеза компонентов внеклеточного матрикса находятся в динамическом равновесии [15]. Матриксные металлопротеиназы, в частности MMP2 и MMP9, и их ингибиторы TIMP1 и TIMP2 участвуют в регуляции реорганизации внеклеточного матрикса. В области развития рестеноза наблюдается повышение уровней металлопротеиназ и понижение уровней их ингибиторов [18, 19], что приводит к перестроению внеклеточного матрикса.

Одним из патологических механизмов, приводящих к дальнейшем разрастанию неоинтимы, является недостаточная эндотелизация неоинтимы. Новый эндотелий появляющийся в области зоны пластики сосуда теряет способность к синтезу молекул ингибиторов роста гладкомышечных клеток, и молекул, обладающих антикоагуляционными свойствами и фибринолитическими свойствами [12]. Повышенный уровень металлопротеиназ, приводит

к постоянному контакту элементов неоинтимы с кровью, что приводит к повышению макрофагальной инфильтрации и дополнительной стимуляции перехода ГМК к пролиферативному фенотипу [14]. Следствием этих процессов является разрастание неоинтимы, повторное сужение просвета артерии, значительное увеличение риска развития тромбоза зоны реконструктивной операции.

Ключевую роль в развитии атеросклероза и его осложнений играет лиганд CD40L и его рецептор CD40. Эти молекулы экспрессируются на поверхности Т-клеток, макрофагов и активированных тромбоцитов и способствуют взаимодействию этих клеток. Взаимодействие CD40L и CD40 участвует в модуляции многих клеточных процессов связанных с развитием рестеноза, в частности, активации иммунных клеток, регуляции экспрессии провоспалительных цитокинов, в частности MCP1, и молекул межклеточной адгезии, например VCAM1 и ICAM1, регуляции синтеза компонентов внеклеточного матрикса и белков участвующих в его перестройке, а также формировании тромба [20–23]. Повышение уровней хемоаттрактанта MCP1 и молекулы межклеточной адгезии ICAM1 после выполненного стентирования связано с увеличением моноцитарной инфильтрации в области формирования рестеноза [24]. Возникновению стенотичеких реокклюзий также может способствовать хроническая воспалительная реакция на инородный материал, возникающая в стенке оперированного сосуда [25].

Ряд белков экспрессирующихся в клетках сосудистой стенки обнаруживаются также и в свободной форме в системе циркуляции. Повышение уровней некоторых из этих циркулирующих биомолекул связано с развитием атеросклероза и его осложнений. В частности повышенный уровень циркулирующего CD40L связан с развитием рестеноза и объемом формирующейся гиперплазии неоинтимы [23]. Повышение уровней циркулирующих MMP2 и VCAM1 наблюдается у пациентов с развившимся рестенозом зоны вмешательства после баллонирования коронарных артерий [26]. Повышение уровней циркулирующих металлопротеиназ и снижениение уровня TIMP1 наблюдается у больных с развившимся рестенозом зоны операции после каротидной эндартериоэктомии [27]. Повышение уровней циркулирующих молекул межклеточной адгезии ICAM1 и VCAM1 наблюдается у больных с развившимся рестенозом после стентирования коронарных артерий [24].

Современные представления о молекулярных событиях в поврежденной стенке сосуда, появление новых методов диагностики и лечения до сих пор не позволяют в полной мере решить проблему развития реокклюзии. Это связано не только с недостаточным пониманием основ патогенеза, но и с отсутствием достоверных прогностических критериев и схем. Изучение патогенетических механизмов и поиск молекулярных маркеров развития рестеноза необходимо для усовершенствования методов прогнозирования и профилактики осложнений после реконструктивных операций на артериях нижних конечностей, а так же выявления новых мишеней для лекарственной терапии. Особое внимание должно быть уделено изучению таких ключевых факторов как фенотип ГМК, состояние эндотелия, ремоделирование внеклеточного матрикса, течение воспалительной реакции, а также измениеие уровней циркулирующих маркеров. Результаты таких исследований позволят выделить больных с высоким риском возникновения рестеноза в отдельную группу для своевременного проведения лечебных и профилактических мероприятий как до, так и после выполненной реконструктивной операции.

Литература

1. *Барбараш Л.С., Бурков Н.Н., Кудрявцева Ю.А., Сизова И.Н., Журавлева И.Ю.* Метаболические и хирургические предикторы рестенозов и тромбозов биопротезов в инфраингвинальной позиции // Ангиология и сосудистая хирургия. — 2011. — Т. 17. — С. 29–34.

2. *Кузнецов М. Р., Комов К.В., Тепляков С.А., И.В. Косых, Тугдумов Б.В.* Современное состояние проблемы реокклюзии после реконструктивных операций на артериях таза и артериях нижних конечностей // Ангиология и сосудистая хирургия. — 2009. — Т. 15. — С. 145–149.

3. *Покровский А.В., Догужиева Р.М., Богатов Ю.П, Гольцова Е.Е, Лебедева А.Н.* Отдаленные результаты аорто-бедренных реконструкций у больных бетом 2 типа // Ангиология и сосудистая хирургия. — 2010. — Т. 16. — С. 48–53.

4. *Покровский А.В., Харазов А.Ф.* Состояние сосудистой хирургии в Российской Федерации в 2010 году // Российское общество ангиологов и сосудистых хирургов. — 2011.

5. *Goeau-Brissonniere O., Javerliat I., Khantalin I., Coggia M.* Surgical treatment of critical limb ischemia // Bull. Acad. Natl. Med. — 2006. — Vol. 190. — P. 651–664.

6. *Hirsch A.T., Haskal Z.J., Hertzer N.R. et al.* ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients arterial disease // Circulation. — 2006. — Vol. 113. — P. 463–654.

7. *Швальб П.Г., Калинин Р.Е., Алфёров Ю.В.* Сравнение отдалённых результатов реконструктивных и эндоваскулярных операций у больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей // Ангиология и сосудистая хирургия. — 2008. — Т. 15. — С. 362–363.

8. *Egorova N.N., Guillerme S., Gelijns A. et al.* An analysis of the outcomes of a decade of experience with lower extremity revascularization including limb salvage, lengths

of stay, and safety // J. Vasc. Surg. — 2010. — Vol. 51. — P. 878–885.

9. *Полянцев А.А., Мозговой П.В., Фролов Д.В., Новочадов В.В., Спельчук А.М.* Оценка прогностической значимости морфометрических параметров воспаления сосудистой стенки в отношении отдаленных результатов реконструктивных операций в аорто-подвздошной зоне // Ангиология и сосудистая хирургия. — 2011. — Т. 17. — С. 42–46.

10. *Suwanabol P.A., Kent K.C., Liu B.* TGF-b and restenosis revisited: A Smad Link // Journal Surg. Res. — 2011. — Vol. 167. — P. 287–297.

11. *Zubilewicz T., Wronski1 J., Bourriez A, Terlecki1P., Guinault A-M.* Injury in vascular surgery — the intimal hyperplastic response // Med. Sci. Monit. — 2001. — Vol. 7. — P. 316–324.

12. *Швальб П.Г., Калинин Р.Е., Никифоров А.А.* Системная воспалительная реакция у больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей, с позиции развития послеоперационной гиперплазии интимы // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. — 2008. — Т. 1. — С. 75–79.

13. *Швальб П.Г., Калинин Р.Е.* Сравнительная оценка влияния открытых артериальных реконструкций и эндоваскулярных вмешательств на функциональное состояние эндотелия // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. — 2008. — Т. 1. — С. 44–47.

14. *Cho J., Reidy M.A.* Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smoth muscle cell migration after arterial injury // Circ. Res. — 2002. — Vol. 91. — P. 845–851.

15. *He Q., Spiro M.J.* Isolation of rat heart endothelial cells and pericytes: evaulation of their role in the formation of extracellular matrix components // J. Mol. Cell. Cardiol. — 1995. — Vol. 27. — P. 1173–1183.

16. *Cordes K.R., Sheehy N.T., White M.P. et al.* miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity // Nature. — 2009. — Vol. 460. — P. 705–710.

17. *Liu X., Cheng Y., Zhang S. et al.* A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia // Circ. Res. — 2009. — Vol. 104. — P. 476–487.

18. *Godin D., Ivan E., Johnson C., Magid R.* Remodeling in carotid artery is associated with increased expression of matrix metalloproteinases in mouse blood flow cessation model // Circulation. — 2000. — Vol. 102. — P. 2861–2866.

19. *Kuzuya M., Iguchi A.* Role of MMP in vascular remodeling // Journal of atherosclerotic and thrombosis. — 2003. — Vol. 10. — P. 275–282.

20. *Francois M., Shonbeck U., Bonnefoy J.Y., Pober J.S., Libby P.* Activation of monosyte/macrophage functions related to acute atheroma complications by ligation of CD40 // Circulation. — 1997. — Vol. 96. — P. 396–399.

21. *Kim W.H., Ko Y.G., Kang K.W., Jang Y.* Effects of combination therapy with Celecoxib and Doxycycline on neointimal Hyperplasia and Inflammatory Biomarkers in coronary artery disease patients treated with bare metal stents // Yonsei Med. J.-Jan. — 2012. — Vol. 53. — P. 68–75.

22. *Li G., Sanders M.J., Bevard M.H., Chumley J.W., Galkina E.W., Ley K.* CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leucocyte recruiment, and neointima formation after vascular injury // The American journal of pathology. — 2008. — Vol. 172. — P. 1141–1152.

23. *Mach F., Schnoebeck U., Sukhowa G.K. et al.* Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — Vol. 94. — P. 1931–1936.

24. *Plow E.F., Souza S.E.* A role for intercellular adhesion molecule-1 in restenosis // Circulation. — 1997. — Vol. 95. — P. 1355–1356.

25. *Лазаренко В.А., Бобровская Е.А., Должиков А.А., Пирогов В.Г., Богданова Ю.Г.* Морфологические причины стенотических реокклюзий при артериальных реконструкциях аорты и магистральных артерий нижних конечностей // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». — 2008. — Т. 4.

26. *Allier P.L., Tardif J.C., Gregoire J. et al.* Sustained elevation of serum CD40l levels one month after coronary angioplasty predicts angiographic restenosis // Can. J. Cardiol. — 2005. — Vol. 21. — P. 495–500.

27. *Sapienza P., Borelli V., di Marzo L., Cavallaro A.* MMP and TIMP alterations in asymptomatic symptomatic severe reccurent carotid artery stenosis // European J. Vasc. Endovas. Surg. — 2009. — Vol. 37. — P. 525–530.

ИСТОРИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ 50-летия СОЗДАНИЯ РОССИЙСКОГО КАРДИОЛОГИЧЕСКОГО ОБЩЕСТВА

И.А. Шевченко, А.С. Вершинин

ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ. Санкт-Петербург, Россия

Шевченко Иван Акимович — доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник музея Научно-образовательного центра ФГБУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ; *Вершинин Александр Сергеевич* — кандидат медицинских наук, научный сотрудник музея Научно-образовательного центра ФГБУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава РФ, пр. Пархоменко, д. 15, Санкт-Петербург, Россия, 194156. E-mail: vershinin.aleksanderr@yandex.ru (Вершинин Александр Сергеевич).

Резюме

Цель: привести исторические сведения о создании в стране Всесоюзного кардиологического общества. Изложены медицинские предпосылки организации общества. Инициатором создания общества был академик АМН СССР А.Л. Мясников. Для создания общества Министерство здравоохранения СССР постановило провести учредительную конференцию, на которой принять решение о создании общества. Конференция прошла 1–2 февраля 1963 г. в Ленинграде. После доклада профессора И.А. Рывкина и выступлений в прениях профессора П.Л. Сухинина и кандидата медицинских наук Г.Л. Лемперт, участники конференции единогласно приняли решение о создании Всесоюзного общества кардиологов. Был избран Президиум правления общества из 7 человек, председателем правления избрали академика АМН СССР П.Е. Лукомского, Генеральным секретарём — профессора Е.И. Чазова. На конференции рассматривались также клинические вопросы. Основное внимание было посвящено методам диагностики и лечения инфаркта миокарда. С докладами выступили академик АМН СССР А.Л. Мясников, профессора З.М. Волынский, С.С. Вайль, З.И. Янушкевичус и др.

Ключевые слова: Первая Всесоюзная (учредительная) конференция кардиологов; организация Всесоюзного кардиологического общества.

HISTORICAL ASPECTS OF 50 YEARS FROM RUSSIAN CARDIOLOGY SOCIETY FOUNDATION

I.A. Shevchenko, A.S. Vershinin

Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author: Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, 15 Parhomenko str., Saint-Petersburg, Russia, 194156. E-mail: vershinin.aleksanderr@yandex.ru (Aleksander Sergeevich Vershinin — PhD, researcher of science educational center museum).

Abstract

Aim: Tell about the history of Russian cardiology society foundation in Russia. There are presented medical conditions of Russian cardiology society foundation. Initiator of Russian cardiology society foundation was academic of USSR Academy of medical science A.L. Myasnikov. USSR Ministry of health care decided to hold

УДК.61(091)

a conference about the society foundation. The conference had place in Leningrad on the 1–2 February 1963. After the prof. I.A. Rivkin's report and the speeches of prof. P.L. Suhinin and PhD G.L. Lempert, the conference participants unanimously decided to found the Russian Cardiology Society. There was elected the presidium of the Board from seven persons. The chairman of the Board was elected academic of USSR Academy of medical science P.E. Lykomskoy, the general secretary was elected prof. E.I. Chazov. The clinical aspects were also discussed on the conference. The focus was on the diagnosis and treatment of myocardial infarction. The speakers were academic of USSR Academy of medical science A.L. Myasnikov, prof. Z.M. Volinsky, S.S. Vayl, Z.I. Yanushkevichus and others.

Key words: the first all-union (Constituent) Conference of Cardiology, the foundation of all-union cardiology society.

Статья поступила в редакцию 01.10.2013, принята к печати 11.10.13.

Исполнилось 50 лет со дня создания Российского кардиологического общества (РКО).

1–2 февраля 1963 г. в Ленинграде на заседании первой Всесоюзной (учредительной) конференции кардиологов было принято решение о создании Всесоюзного кардиологического общества (ВКО) [1].

Знак участника первой Всесоюзной кардиологической конференции в Ленинграде, в 1963 г.

Решение о создании ВКО было вызвано несколькими обстоятельствами.

В 50–60-е годы в СССР завершался период послевоенного экономического восстановления страны. Повысился материальный уровень населения. Дальнейшее развитие получило здравоохранение. Были восстановлены и открывались новые лечебно-профилактические учреждения, медицинские и научно-исследовательские институты. Создавались республиканские и региональные научные кардиологические общества.

Однако, несмотря на определенные успехи в области диагностики и лечения многих заболеваний внутренних органов, заболеваемость, инвалидность и смертность продолжали увеличиваться. Наиболее высокий уровень смертности отмечался от сердечно-сосудистых заболеваний [2]. Среди всех заболеваний смертность от болезней сердца и сосудов составляла более 50 % среди общей смертности населения. Вопросы борьбы с сердечно-сосудистыми заболеваниями все чаще обсуждались на заседаниях терапевтических и хирургических научных обществ, на съездах и конференциях. Расширились связи советских ученых и врачей с кардиологами и ведущими зарубежными специалистами. Проблема сердечно-сосудистых заболеваний с учетом их широкой распространённости и тяжёлых последствий становилась общегосударственной [2].

В связи с этим, для координации и эффективного проведения всех видов научной и клинической деятельности возникла необходимость объединения всех отдельных многочисленных республиканских и региональных научных кардиологических обществ в единое Всесоюзное научное кардиологическое общество.

Большую инициативу по созданию Всесоюзного научного кардиологического общества проявил действительный член АМН СССР, профессор А.Л. Мясников. После консультаций с многими видными кардиологами он обратился к министру здравоохранения С.В. Курашову с письмом, в котором обосновал необходимость создания в стране научного общества кардиологов [2].

Следует также отметить, что это обращение было поддержано видным американским кардиологом, президентом Международного общества кардиологов Полем Уайтом, который не скрывал, что его стремление создать в нашей стране кардиологическое общество объясняется не только дружеской поддержкой А.Л. Мясникова, но и необходимостью того, чтобы в Международном обществе кардиологов были представители такой великой страны как СССР.

В ответ на письмо А.Л. Мясникова вышло решение Министерства здравоохранения о создании Организационного комитета учредительной кардиологической конференции во главе с академиком АМН

СССР А.Л. Мясниковым. Провести конференцию А.Л. Мясников предложил в Ленинграде, в городе, который является колыбелью кардиологии в нашей стране, так как в нём работали И.П. Павлов, Н.С. Коротков, Г.Ф. Ланг, Н.Н. Аничков и др. В дальнейшем А.Л. Мясников с гордостью признался, что Ленинград — это его alma mater. В этом городе он сформировался как врач и учёный, там прошли лучшие годы его жизни и в Ленинграде он хочет оставить память о себе, как о создателе общества кардиологов [2].

Организацией конференции занималась Военно-медицинская академия, в частности, ученик А.Л. Мясникова — начальник кафедры военно-морской и госпитальной терапии профессор З.М. Волынский и его сотрудники: А.П. Голиков, Е.Е. Гогин, М.К. Микушкин и др. После продолжительной подготовки наконец-то настал долгожданный день 1 февраля 1963 г., когда в Ленинграде в небольшом конференц-зале Военно-медицинского музея открылась Первая Всесоюзная учредительная конференция кардиологов (см. фото 1).

В её работе приняло участие 274 делегата и 90 гостей из 62 городов всех республик Советского Союза, в том числе 29 действительных членов и членов-корреспондентов АМН СССР, 145 профессоров и докторов наук. Среди делегатов были представители 12 медицинских специальностей, занимающихся сердечно-сосудистой патологией: терапевты, хирурги, невропатологи, физиологи, фармакологи и др (см. конференц-зал, фото 2).

Работа конференции состояла из двух частей — научной и организационной. Вначале рассматривалась научная часть конференции.

Открывая конференцию, председатель организационного комитета проф. А.Л. Мясников подчеркнул исключительную актуальность обсуждения проблемы инфаркта миокарда. Далее он указал на необходимость создания Всесоюзного научного общества кардиологов для мобилизации усилий специалистов многих отраслей медицины на борьбу с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Проф. А.Л. Мясников сделал также программный доклад «Патогенез инфаркта миокарда». Атеросклероз является основной предпосылкой возникновения инфаркта миокарда [3–6]. Однако в развитии этого заболевания следует придавать большое значение состоянию коллатерального кровообращения, свертывающей и антисвертывающей системам крови, а также функциональной физической перегрузке мышцы и особенно нервно-психическому перенапряжению [7].

Проф. С.С. Вайль обратил внимание на необходимость более глубокого изучения изменений миокарда вокруг зоны инфаркта, ибо от состояния миокарда вне этой зоны во многом зависит судьба больного.

Проф. Е.И. Чазов поделился опытом лечения коронарных тромбозов и тромбоэмболических осложнений фибринолизином в сочетании с гепарином [8].

Проф. З.И. Янушкевичус также отметил весьма положительные результаты при лечении фибринолизином больных инфарктом миокарда, с тромбозом нижних конечностей, лёгочных артерий и мезентериальных сосудов.

Действительный член АМН СССР, проф. Б.В. Петровский сообщил о хирургических методах лечения постинфарктных аневризм сердца [9]. Создана классификация постинфарктных аневризм, что имеет важное значение для оценки прогноза и выбора оперативного лечения. Разработаны также показания к операции и некоторые особенности хирургической тактики в зависимости от вида аневризмы. Предложенная докладчиком методика хирургического лечения больных постинфарктной аневризмой даёт удовлетворительные отдалённые результаты и может быть шире использована хирургами.

Доклад проф. З.М. Волынского был посвящён профилактике инфаркта миокарда. Из доклада вытекает, что профилактика инфаркта миокарда является социально-гигиенической проблемой. Касаясь

Фото 1. Здание Военно-медицинского музея

Фото 2. Конференц-зал Военно-медицинского музея

медицинской стороны этой проблемы, докладчик указал на необходимость ранней профилактики атеросклероза, гипертонической болезни [10]. Необходимо также правильно организовать систему оказания врачебной помощи больным в прединфарктном состоянии.

По мнению акад. А.Н. Бакулева только быстрая доставка больного инфарктом миокарда в специализированную клинику может дать хорошие результаты. Действительный член АМН СССР, проф. В.Х. Василенко особо подчеркнул необходимость ранней госпитализации больных инфарктом миокарда и строго индивидуального подхода к транспортировке их в лечебное учреждение. По мнению проф. А.А. Кедрова, распространение положения о том, что нужно транспортировать всех больных инфарктом миокарда, невзирая на тяжесть их состояния, в целом может оказаться очень опасным.

Организационная часть конференции началась с доклада профессора И.А. Рывкина «Организация Всесоюзного кардиологического общества и принятие его устава» [1]. В докладе были представлены убедительные доводы и обоснования о необходимости создания такого научного общества. Докладчик отметил, что советская кардиология достигла определенных успехов. При этом в разработке сложной проблемы кардиологии участвуют не только терапевты и хирурги, но и представители других медицинских специальностей (патологи, биохимики, физиологи, фармакологи и др.). Поэтому инициатива Комитета по сердечно-сосудистой патологии АМН СССР, вошедшего с ходатайством в Министерство здравоохранения СССР о создании Всесоюзного общества кардиологов является правильной и своевременной.

В прениях по организационным вопросам выступили проф. П.Л. Сухинин и кандидат медицинских наук Г.Л. Лемперт, которые поддержали идею создания Всесоюзного общества кардиологов [1].

Делегаты конференции единогласно решили организовать Всесоюзное научное общество кардиологов. Тайным голосованием было избрано правление общества, куда вошли представители различных медицинских специальностей из всех 15 союзных республик. Почётными членами нового общества были избраны: Н.Н. Аничков, В.Н. Виноградов, В.Ф. Зеленин, П.А. Куприянов, Н.Н. Савицкий и Г.Н. Сперанский. Президиум правления общества был избран в следующем составе: З.М. Волынский,С.А. Колесников, П.Е. Лукомский (председатель), А.Л. Мясников, В.В. Парин, Б.В. Петровский, Д.Ф. Чеботарёв. Генеральным секретарём общества был избран профессор Е.И. Чазов.

Основные задачи общества состояли в следующем:

– разрабатывать и внедрять в клиническую практику новые высокоэффективные методы диагностики, лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний;

– снизить заболеваемость и смертность населения от сердечно-сосудистых заболеваний;

– формировать здоровый образ жизни;

– целенаправленно осуществлять первичную и вторичную профилактику заболеваний органов кровообращения и проводить эффективные мероприятия по сохранению и укреплению здоровья населения.

В заключительном слове действительный член АМН СССР проф. А.Л. Мясников отметил, что основные научные результаты конференции хорошо отражены в резолюции. Впервые заявлено, что инфаркт миокарда тесно связан с нарушением функции нервной системы. Описание инфаркта миокарда — достижение нашей отечественной клиники. Диагностика этого заболевания значительно улучшилась. Зафиксировано два типа поражения миокарда: мелко- и крупноочаговое. В последние годы достигнуты значительные успехи в борьбе с кардиогенным шоком, не говоря уже об антикоагулянтной терапии. Сейчас имеются новые средства — фибринолизин (которому принадлежит блестящее будущее), а также аналогичные препараты, лизирующие свежие тромбы и действующие на другие факторы. Профилактика и трудоустройство лиц, перенесших инфаркт миокарда, значительно продвинулись вперёд. Что касается госпитализации при остром инфаркте миокарда, то здесь шаблонный подход должен быть исключён. Хотя у хирургов и имеются достижения по оперативному лечению некоторых форм коронарной недостаточности, в отношении солидных конструктивных операций при остром инфаркте миокарда этого сказать нельзя. Надо отметить, что советская кардиология в изучении проблемы инфаркта миокарда стоит на высоком уровне по сравнению с состоянием кардиологии за рубежом.

В заключение председатель А.Л. Мясников пожелал новому обществу кардиологов плодотворной работы, дружбы между представителями разных специальностей и поблагодарил организационное бюро конференции во главе с проф. З.М. Волынским за чёткую организацию и отличное обеспечение работы конференции [1].

Так завершилась работа Первой Всесоюзной учредительной конференции кардиологов, на которой было организовано Всесоюзное кардиологическое общество. При этом можно считать, что

на этой конференции кардиология наконец-то была признана самостоятельной областью отечественной медицины.

Созданное на Первой Всесоюзной учредительной конференции кардиологов Российское кардиологическое общество в этом году торжественно отмечает своё 50-летие. Историческая роль Первой Всесоюзной учредительной конференции кардиологов состоит в том, что она ярко, как факел, осветила дорогу к победе над заболеваниями сердца и сосудов, тем самым способствовала дальнейшему сохранению и укреплению здоровья, увеличению продолжительности счастливой жизни населения России.

Литература

1. *Голиков А.П., Микушкин М.К.* Первая Всесоюзная (учредительная) конференция кардиологов // Кардиология — 1963. — Т. III, № 3. — С. 91–94.

2. *Чазов Е.И.* Кардиология: ее официальное признание в Советском Союзе // Consilium medicum. Кардиологический вестн. — 2007. — Т. 2, № 2. [Электронный ресурс]. URL: http://old.consilium-edicum.com/media/cardio/07_02/76.

3. *Мясников А.Л.* Холестерин и атеросклероз // Кардиология — 1963. — Т. III, № 1. — С. 3–8.

4. *Лукомский П.Е.* Некоторые вопросы профилактики и лечения атерорсклероза // Клинич. медицина — 1957. — Т. XXXV, № 8. — С. 82–93.

5. *Голиков А.П.* Материалы к изучению обмена липопротеидов при атеросклерозе / Тр. Военно-мед. академии «Актуальные вопросы кардиологии». — Л., Изд-во ВмедА, 1967. — Т. 179. — С. 86–96.

6. *Наумов А.М.* Холестерин крови при сахарном диабете / Тр. Военно-мед.академии «Актуальные вопросы кардиологии». — Л., Изд-во ВмедА, 1967. — Т. 179. — С. 116–123.

7. *Чазов Е.И.* Антигепариновая и антифибринолитическая активность крови больных атеросклерозом // Терапевтич. арх. — 1962. — Т. XXXIV, № 10. — С. 36–40.

8. *Чазов Е. И.* Тромбозы и эмболии в клинике внутренних болезней. — М.: Медицина, 1966. — 264 с.

9. *Петровский Б.В., Козлов И.З.* Аневризмы сердца. — М, Медицина, 1965. — 277 с.

10. *Волынский З.М.* Лечение грудной жабы внутригрудинным введением новокаина с атропином // Терапевтич. арх. — 1954. — Т. XXVII, № 3. — С. 56–62.