



ISSN 2410- 5155 (Online), ISSN 2311- 4495 (Print)

Трансляционная Медицина Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

том 7 №2 / 2020

Фундаментальная медицина
Сердечно-сосудистые заболевания
Эндокринология
Нейронауки
Педиатрия и детская хирургия
Неонатология
Лучевая диагностика
Акушерство и гинекология
Онкология
Гематология

Главный редактор
Академик РАН
Е.В. Шляхто



ПЕТРУ ПЕРВОМУ
ЕКАТЕРИНА ВТОРАЯ
АВГА 1713



ISSN 2410-5155 (Online), ISSN 2311-4495 (Print)

Трансляционная Медицина Translational Medicine

Научно-практический рецензируемый медицинский журнал

том 7 №2 / 2020

Фундаментальная медицина
Сердечно-сосудистые заболевания
Эндокринология
Нейронауки
Педиатрия и детская хирургия
Неонатология
Лучевая диагностика
Акушерство и гинекология
Онкология
Гематология

Главный редактор
Академик РАН
Е.В. Шляхто

**Национальный медицинский
исследовательский центр им. В. А. Алмазова
Министерства здравоохранения Российской Федерации**



ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Е. В. Шляхто

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

А. О. Конради

М. М. Галагудза

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР

Н. А. Смолина

ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ

С. В. Анисимов (Санкт-Петербург)
Е. И. Баранова (Санкт-Петербург)
Е. Р. Баранцевич (Санкт-Петербург)
Т. В. Вавилова (Санкт-Петербург)
А. В. Васильев (Москва)
М. Л. Гордеев (Санкт-Петербург)
Е. Н. Гринёва (Санкт-Петербург)
А. А. Жлоба (Санкт-Петербург)
А. Ю. Зарицкий (Санкт-Петербург)
Э. Э. Звартау (Санкт-Петербург)
Д. О. Иванов (Санкт-Петербург)

М. А. Карпенко (Санкт-Петербург)
Э. В. Комличенко (Санкт-Петербург)
А. А. Костарева (Санкт-Петербург)
Д. С. Лебедев (Санкт-Петербург)
Ю. Б. Лишманов (Томск)
О. М. Моисеева (Санкт-Петербург)
А. О. Недошивин (Санкт-Петербург)
И. Л. Никитина (Санкт-Петербург)
Е. В. Пармон (Санкт-Петербург)
Д. В. Рыжкова (Санкт-Петербург)

**ЧЛЕНЫ МЕЖДУНАРОДНОГО
РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА**

Ж. Бакс (Нидерланды)
Р. Феррари (Италия)
Р. Хельманн (Германия)
Г. Ханссон (Швеция)
Д. Керр (США)
Ж. Массард (Франция)
Б. Ольшанский (США)
М. Орлов (США)
Т. Сейерсен (Швеция)
Г. Сёберг (Швеция)
О. Содер (Швеция)
Т. Сили-Торок (Нидерланды)
Я. Вааге (Норвегия)
Э. К. Айламазян (Санкт-Петербург)
В. Н. Анисимов (Санкт-Петербург)
В. Г. Баиров (Санкт-Петербург)
В. С. Баранов (Санкт-Петербург)
О. А. Беркович (Санкт-Петербург)
Л. А. Бокерия (Москва)
В. Н. Васильев (Санкт-Петербург)
Т. Д. Власов (Санкт-Петербург)
А. Я. Гудкова (Санкт-Петербург)
Е. З. Голухова (Москва)
И. В. Гурьева (Москва)
А. С. Галявич (Казань)
С. Л. Дземешкевич (Москва)
Д. В. Дупляков (Самара)
И. Е. Зазерская (Санкт-Петербург)
Е. В. Заклязьминская (Москва)
А. М. Караськов (Новосибирск)
Р. С. Карпов (Томск)
В. М. Кутузов (Санкт-Петербург)
В. В. Ломиворотов (Новосибирск)
Ю. М. Лопатин (Волгоград)
В. А. Мазурок (Санкт-Петербург)
А. С. Максимов (Санкт-Петербург)
Л. Н. Маслов (Томск)
А. Л. Маслянский
(Санкт-Петербург)
Г. А. Мельниченко (Москва)
В. М. Моисеенко
(Санкт-Петербург)
И. А. Наркевич (Санкт-Петербург)
И. В. Поддубный (Москва)
Е. А. Покушалов (Новосибирск)
В. П. Пузырёв (Томск)
В. А. Ткачук (Москва)
С. В. Сидоркевич
(Санкт-Петербург)
Г. Н. Салогуб (Санкт-Петербург)
В. В. Фадеев (Москва)
В. А. Цырлин (Санкт-Петербург)

Журнал зарегистрирован в Государственном комитете РФ по печати.
Свидетельство о рег. ПИ № ФС77–56793 от 29.01.2014 г.
Журнал включен в Российский индекс научного цитирования

Журнал включен Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации в «Перечень российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук».

Периодичность — 6 выпусков в год. Тираж — 1100 экземпляров.

Тематическая рассылка по специалистам.

Верстка — Л. П. Попова. Корректурa — А. А. Попова

18+

Издательство «ФОНД АЛМАЗОВА»

Адрес: 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

Телефон издательства: +7(812)702–37–16

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

Подписка по каталогу агентства «Роспечать»: подписной индекс 57996

Архив номеров: http://www.almazovcentre.ru/?page_id=20396
http://elibrary.ru/title_about.asp?id=50986

Все права защищены. © 2020.

Полное или частичное воспроизведение материалов, опубликованных в журнале, допускается только с письменного разрешения редакции.

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных материалов

**V. A. Almazov National
Medical Research Centre
Ministry of Health of the Russian Federation**

**EDITOR-IN-CHIEF**

E. Shlyakheto

VICE-EDITORS

A. Konradi

M. Galagudza

TECHNICAL EDITOR

N. Smolina

EDITORIAL BOARD

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| S. Anisimov (Saint-Petersburg) | M. Karpenko (Saint-Petersburg) |
| E. Baranova (Saint-Petersburg) | E. Komlichenko (Saint-Petersburg) |
| E. Barancevich (Saint-Petersburg) | A. Kostareva (Saint-Petersburg) |
| T. Vavilova (Saint-Petersburg) | D. Lebedev (Saint-Petersburg) |
| A. Vasiliev (Moscow) | Yu. Lishmanov (Tomsk) |
| M. Gordeev (Saint-Petersburg) | O. Moiseeva (St. Petersburg) |
| E. Grineva (Saint-Petersburg) | A. Nedoshivin (Saint-Petersburg) |
| A. Zhloba (Saint-Petersburg) | I. Nikitina (Saint-Petersburg) |
| A. Zaritskiy (Saint-Petersburg) | E. Parmon (Saint-Petersburg) |
| E. Zvartau (Saint-Petersburg) | D. Ryzhkova (Saint-Petersburg) |
| D. Ivanov (Saint-Petersburg) | |

MEMBERS**OF THE INTERNATIONAL
EDITORIAL BOARD**

- J. Bax (Netherlands)
R. Ferrari (Italy)
R. Hehlmann (Germany)
G. Hansson (Sweden)
K. David (USA)
G. Massard (France)
B. Olshansky (USA)
M. Orlov (USA)
T. Sejersen (Sweden)
G. Sjöberg (Sweden)
O. Söder (Sweden)
T. Szili-Torok (Netherlands)
J. Vaage (Norway)
E. Aylamazyan (Saint-Petersburg)
V. Anisimov (Saint-Petersburg)
V. Bairov (Saint-Petersburg)
V. Baranov (Saint-Petersburg)
O. Berkovich (Saint-Petersburg)
L. Bokeria (Moscow)
V. Vasiliev (Saint-Petersburg)
T. Vlasov (Saint-Petersburg)
A. Gudkova (Saint-Petersburg)
E. Golukhova (Moscow)
I. Gurieva (Moscow)
A. Galyavich (Kazan)
S. Dzemeshevich (Moscow)
D. Duplyakov (Samara)
I. Zazerskaya (Saint-Petersburg)
E. Zaklyazminskaya (Moscow)
A. Karaskov (Novosibirsk)
R. Karpov (Tomsk)
V. Kutuzov (Saint-Petersburg)
V. Lomivorotov (Novosibirsk)
Yu. Lopatin (Volgograd)
V. Mazurok (Saint-Petersburg)
A. Maksimov (Saint-Petersburg)
L. Maslov (Tomsk)
A. Maslyanskiy (Saint-Petersburg)
G. Melnichenko (Moscow)
V. Moiseenko (Saint-Petersburg)
I. Narkevich (Saint-Petersburg)
I. Poddubniy (Moscow)
E. Pokushalov (Novosibirsk)
V. Puzyrev (Tomsk)
V. Tkachuk (Moscow)
S. Sidorkevich (Saint-Petersburg)
G. Sologub (Saint-Petersburg)
V. Fadeev (Moscow)
V. Tsyrlin (Saint-Petersburg)

Journal is registered in State Committee for Publishing of the Russian Federation.
Certificate of registration. ПИ № ФС77-56793 on 29.01.2014
The Journal is included in the Russian Citation Index

The journal is listed among Russian peer-reviewed scientific journals approved
by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education
and Science for the publication of major scientific results of theses
for academic degrees of Doctor and Candidate of Sciences.

Periodicity — 6 issues per year. Edition 1100 copies.

Distribution to specialists.

18+

Make-up — L. P. Popova. Proofreader — A. A. Popova

Publisher «ALMAZOV FOUNDATION»

Address: 197341, Saint-Petersburg, Akkuratova str. 2

Tel.: +7(812)702-37-16

Manuscript submission and correspondence with authors,
advertising and subscription —

e-mail: bulleten@almazovcentre.ru

Subscription on catalogue of Rospechat agency: index 57996

Archive: http://www.almazovcentre.ru/?page_id=20396
http://elibrary.ru/title_about.asp?id=50986

All rights reserved. © 2020.

Full or partial reproduction of materials printed in journal is allowed by the written
permission of publisher.

Editors accept no responsibility for the content of advertising materials.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENT

НЕВРОЛОГИЯ

NEUROLOGY

- 6** Лепёхина А. С., Пospelova М. Л.,
Ефимцев А. Ю., Левчук А. Г., Труфанов Г. Е.,
Алексеева Т. М., Писковацков Д. В.
**ГОЛОВНАЯ БОЛЬ НАПРЯЖЕНИЯ.
СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ, НОВЫЕ
АСПЕКТЫ ЭТИОПАТОГЕНЕЗА,
ВОЗМОЖНОСТИ НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИИ,
НЕМЕДИКАМЕНТОЗНЫЕ МЕТОДЫ
ЛЕЧЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

- 6** Lepekhina A. S., Pospelova M. L.,
Efimtsev A. Yu., Levchuk A. G., Trufanov G. E.,
Alekseeva T. M., Piskovatskov D. V.
**TENSION HEADACHE. STATE OF
THE PROBLEM, NEW ASPECTS OF
ETIOPATHOGENESIS, NEUROIMAGING
POSSIBILITIES, NON-DRUG TREATMENT
METHODS (REVIEW)**

ЭНДОКРИНОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

METABOLIC DISEASES

- 12** Перминова А. А.
**ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ
И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ВРОЖДЕННОГО ГИПЕРИНСУЛИНИЗМА
(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

- 12** Perminova A. A.
**PATHOPHYSIOLOGICAL AND
MORPHOLOGICAL ASPECTS OF CONGENITAL
HYPERINSULINISM (REVIEW)**

РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА

REGENERATIVE MEDICINE

- 21** Семенова Д. С., Костина А. С.,
Мустаева А. М., Клаузен П. Е., Добрынин М. А.,
Боярская Н. В., Домбровская Ю. А.,
Малашичева А. Б., Енукашвили Н. И.
**NOTCH-ЗАВИСИМАЯ АКТИВАЦИЯ
ОСТЕОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК
ПЕРИОДОНТА**

- 21** Semenova D. S., Kostina A. S.,
Mustaeva A. M., Klauzen P. E., Dobrynin M. A.,
Boyarskaya N. V., Dombrovskaya Yu. A.,
Malashicheva A. B., Enuakashvily N. I.
**NOTCH-DEPENDENT ACTIVATION OF
PERIODONTAL CELLS OSTEOGENIC
POTENTIAL**

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

EXPERIMENTAL STUDIES

- 33** Чечеткин А. В., Алексеева Н. Н.,
Старицына Н. Н., Киселева Е. А., Гришина Г. В.,
Тарковская Л. Р.
**ИЗУЧЕНИЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ
СВОЙСТВ ТРОМБОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ
ХРАНЕНИЯ ИХ В ДОБАВОЧНОМ РАСТВОРЕ,
СОДЕРЖАЩЕМ ФУМАРАТ НАТРИЯ**

- 33** Chechetkin A. V., Alekseeva N. N.,
Staritsyna N. N., Kiseleva E. A., Grishina G. V.,
Tarkovskaya L. R.
**THE STUDY OF MORPHOFUNCTIONAL
PROPERTIES OF PLATELETS IN THE PROCESS
OF STORING THEM IN ADDITIVE SOLUTION
CONTAINING SODIUM FUMARATE**

- 42** Королев Д. В., Шумило М. В.,
Истомина М. С., Шулмейстер Г. А., Горшков А. Н.,
Крутиков А. Н.
**СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ КОЛЛОИДНОГО
СЕРЕБРА И СТАБИЛИЗАЦИЯ ИХ
НЕСКОЛЬКИМИ СПОСОБАМИ ДЛЯ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ
ФОРМАХ НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

- 42** Korolev D. V., Shumilo M. V.,
Istomina M. S., Shulmeijster G. A., Gorshkov A. N.,
Krutikov A. N.
**SYNTHESIS OF COLLOIDAL SILVER
NANOPARTICLES AND THEIR STABILIZATION
IN SEVERAL WAYS FOR EXTERNAL
APPLICATIONS**

СОДЕРЖАНИЕ

52 Торопова Я. Г., Моторина Д. С., Горшкова М. Н., Гареев К. Г., Королев Д. В., Мужикян А. А.
ВЛИЯНИЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ КРЫСАМ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА С РАЗЛИЧНЫМИ ОБОЛОЧКАМИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ И МОРФОЛОГИЮ ЭНДОТЕЛИЯ И НА АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС

65 Цырлин В. А., Плисс М. Г., Кузьменко Н. В.
ВЕГЕТОТРОПНЫЙ И ЭМОЦИОНАЛЬНО-ПОВЕДЕНЧЕСКИЙ ЭФФЕКТЫ МОКСОНИДИНА У НОРМОТЕНЗИВНЫХ КРЫС

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

73 Мосоян М. С., Федоров Д. А., Айсина Н. А., Гилев Е. С.
КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ: РОБОТ-АССИСТИРОВАННАЯ РЕЗЕКЦИЯ ПОЧКИ ПО ПОВОДУ КРУПНОЙ ОПУХОЛИ (T2)

CONTENT

52 Toropova Y. G., Motorina D. S., Gorshkova M. N., Gareev K. G., Korolev D. V., Muzhikyan A. A.
THE EFFECT OF INTRAVENOUS ADMINISTRATION TO RATS OF MAGNETITE NANOPARTICLES WITH VARIOUS SHELLS ON THE FUNCTIONAL STATE AND MORPHOLOGY OF THE ENDOTHELIUM AND ON ANTIOXIDANT STATUS

65 Tsyrlin V. A., Pliss M. G., Kuzmenko N. V.
VEGETOTROPIC AND EMOTIONAL-BEHAVIORAL EFFECTS OF MOXONIDINE IN NORMOTENSIVE RATS

CASE REPORT

73 Mosoyan M. S., Fedorov D. S., Aysina N. A., Gilev E. S.
CASE REPORT: ROBOT-ASSISTED PARTIAL NEPHRECTOMY IN PATIENT WITH LARGE TUMOR (T2)

ГОЛОВНАЯ БОЛЬ НАПРЯЖЕНИЯ. СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ, НОВЫЕ АСПЕКТЫ ЭТИОПАТОГЕНЕЗА, ВОЗМОЖНОСТИ НЕЙРОВИЗУАЛИЗАЦИИ, НЕМЕДИКАМЕНТОЗНЫЕ МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Лепёхина А. С.¹, Поспелова М. Л.¹, Ефимцев А. Ю.¹, Левчук А. Г.¹,
Труфанов Г. Е.¹, Алексеева Т. М.¹, Писковацков Д. В.²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии
и репродуктологии имени Д. О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Лепёхина Анна Станиславовна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: anna20.04.1994@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 15.01.2020
и принята к печати 09.04.2020.

Резюме

Перспективы применения методов функциональной магнитно-резонансной томографии в диагностике когнитивных и психоневрологических нарушений у пациентов с головными болями напряжения достаточно широки, так как позволяют более подробно изучить патогенез вышеописанных расстройств. На сегодняшний день показана эффективность немедикаментозных методов лечения, а именно остеопатических методов коррекции в лечении пациентов с головными болями напряжения. Остается открытым вопрос разработки общепринятой методики диагностики и лечения, включающей применение немедикаментозных методов лечения, нейровизуализационной объективизации и определения состояния функциональных связей головного мозга для более точной диагностики и прогнозирования эффективности лечения. В данном обзоре литературы сделано обобщение современных представлений об этиопатогенезе головной боли напряжения (в том числе изучение функциональных связей головного мозга) и имеющихся данных о клинической эффективности остеопатической коррекции.

Ключевые слова: головная боль напряжения, коннектом, остеопатическая коррекция, функциональные связи.

Для цитирования: Лепёхина А.С., Поспелова М.Л., Ефимцев А.Ю. и др. Головная боль напряжения. Состояние проблемы, новые аспекты этиопатогенеза, возможности нейровизуализации, немедикаментозные методы лечения (обзор литературы). Трансляционная медицина. 2020;7(2): 6–11. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-2-6-11.

TENSION HEADACHE. STATE OF THE PROBLEM, NEW ASPECTS OF ETIOPATHOGENESIS, NEUROIMAGING POSSIBILITIES, NON-DRUG TREATMENT METHODS (REVIEW)

Lepekhina A. S.¹, Pospelova M. L.¹, Efimtsev A. Yu.¹, Levchuk A. G.¹, Trufanov G. E.¹, Alekseeva T. M.¹, Piskovatskov D. V.²

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Lepekhina Anna S.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

E-mail: anna20.04.1994@yandex.ru

Received 15 January 2020; accepted 09 April 2020.

Abstract

The prospects for the use of functional magnetic resonance imaging methods in the diagnosis of cognitive and neuropsychiatric disorders in patients with tension headaches are quite wide, as they allow a more detailed study of the pathogenesis of the above disorders. To date, the effectiveness of osteopathy in the treatment of patients with tension headaches has been shown. It remains an open question to develop a generally accepted method of diagnosis and treatment, including the use of complementary therapies, neuroimaging objectification and determination of the state of functional connections of the brain for more accurate diagnosis and prediction of treatment effectiveness. The present review summarizes the current ideas about the etiopathogenesis of tension headache (including the study of the functional connections of the brain) and available data on the clinical efficacy of osteopathic correction.

Key words: connectom, functional connectivity, osteopathy, tension headache.

For citation: Lepekhina A.S., Pospelova M.L., Efimtsev A.Yu., et al. Tension headache. State of the problem, new aspects of etiopathogenesis, neuroimaging possibilities, non-drug treatment methods (review). Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020;7(2): 6–11. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-2-6-11.

Список сокращений: ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения, ГБН — головная боль напряжения, ХГБН — хроническая головная боль напряжения, фМРТ — функциональная магнитно-резонансная томография, ЭГБН — эпизодическая головная боль напряжения.

Введение

По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), от половины до трех четвертей населения в возрасте от 18 до 65 лет в мире имели головную боль напряжения (ГБН) с клиническими проявлениями по меньшей мере один раз на протяжении последнего года. ГБН, продолжающаяся 15 или более дней ежемесячно, встречается у 1,7–4 % взрослого населения

земного шара [1]. В настоящее время головные боли напряжения являются наиболее частым вариантом головной боли (ГБ), распространенность которых в общей структуре ГБ составляет около 80 %, у 10 % возникает часто, у 2–3 % может быть хронической [2]. Частота встречаемости ГБН в различных популяциях составляет от 30 до 78 %. Например, в исследованиях, проведенных в Екатеринбурге, эпизодические головные боли напряжения (ЭГБН) в течение 1 года определялись в 74,5 % случаев (73 % среди женщин и 77 % среди мужчин) [3]. Результаты популяционного исследования, проведенного в 2009–2011 гг., включавшего опрос в 35 городах и 9 сельских районах России, показали, что распространенность ГБН за 1 год составила 30,8 % [4]. Наиболее

часто встречается эпизодическая форма (1 день с ГБ в месяц и менее), которая не требует лечения; у 37 % популяции эпизоды ГБН отмечаются несколько раз в месяц, у 10 % — еженедельно, 2–3 % имеют хроническую форму, при которой число дней с ГБ составляет 15 и более в месяц. Женщины страдают несколько чаще, чем мужчины. Средний возраст начала ГБН превышает таковой при мигрени и составляет 25–30 лет [5, 6].

Большинство современных исследований посвящено медикаментозному лечению, что увеличивает частоту нежелательных эффектов и лекарственный абзус. При этом уже исходно пациенты с ГБН чаще прибегают к медикаментозному самолечению, редко обращаются за медицинской помощью, что в совокупности на фоне коморбидности и общей комедикации может представлять отдельную проблему.

В связи с этим актуален поиск эффективного сочетания медикаментозного и немедикаментозного подходов при ведении пациентов с головными болями напряжения и отработка новых стратегий диагностики заболевания и эффективности лечения.

Исследования последних 10 лет значительно расширили представление о механизмах развития ГБН и основных звеньях этиопатогенеза. В начале XXI века появилось новое учение о нейрональных связях — коннектомика. С точки зрения коннектома, боль рассматривается как специфический паттерн нейрональной активности, что представляет особую ценность для разработки эффективной тактики ведения пациентов, сочетающей как стандартные медикаментозные подходы, так и немедикаментозные методы лечения.

Существуют данные о применении немедикаментозных методик в лечении хронической головной боли напряжения (ХГБН), в частности остеопатической коррекции [7]. Особый интерес представляет изучение изменений функциональных связей головного мозга (коннективности) у пациентов с ХГБН на фоне проводимых остеопатических техник.

Целью данного обзора было обобщение современных представлений об этиопатогенезе ГБН (в том числе изучение функциональных связей головного мозга) и имеющихся данных о клинической эффективности остеопатической коррекции. Для этого был проведен обзор современных отечественных и зарубежных оригинальных статей, текстов кандидатских и докторских диссертаций по указанной проблематике, 89 % работ опубликовано за последние 15 лет. Общее количество проанализированных источников — 36.

Механизмы формирования головной боли напряжения

Данные исследований подтверждают нейробиологическую природу происхождения ГБН [8]. Основная роль принадлежит периферическим и центральным ноцицептивным механизмам, которые в свою очередь приводят к сенситизации тригеминальных нейронов, снижению болевых порогов и активности антиноцицептивной системы [9]. Формирование дисфункции перикраниальных мышц относится к периферическим механизмам, вызывая их болезненное напряжение (мышечный спазм, мышечно-тонический синдром). Механизм формирования мышечно-тонического синдрома заключается в повторяющемся напряжении мышцы, который является ответом на эмоциональный стресс, что приводит к ее рефлекторному напряжению и, как следствие, приводит к повышению возбудимости ноцицептивных нейронов в структурах центральной нервной системы. Длительное тоническое напряжение мышцы приводит к гипоксии, ацидозу и высвобождению медиаторов воспаления, которые связываясь с соответствующими рецепторами способствуют сенситизации.

Наиболее распространенными факторами, способствующими развитию ГБН, являются эмоциональный стресс и позное напряжение (длительное пребывание головы и шеи в вынужденном положении) [10–14]. Также хронизации болевых эпизодов ГБН способствует избыточное применение обезболивающих препаратов и психические нарушения. Так, доказана связь между нарушениями сна, депрессией, утомляемостью, патологическими изменениями динамики коннектома и хронизацией головной боли напряжения [15, 16].

Пациенты с ХГБН характеризуются не только эмоциональными нарушениями, но также астеническими и когнитивными нарушениями. При сравнении результатов нейропсихологического тестирования у пациентов с ХГБН по сравнению со здоровыми испытуемыми отмечались нарушения памяти и внимания. По мнению авторов, общим звеном в патогенезе когнитивных нарушений и ХГБН может быть изменение пластичности нервной системы [17].

Структурно-функциональные исследования головного мозга у пациентов с ГБН

Современные методы нейровизуализации позволяют оценить не только структурные, но и функциональные нарушения головного мозга. Функциональная МРТ (фМРТ) — это методика, основанная на режиме BOLD («blood oxygenation level dependent»), позволяющем определить акти-

вацию различных зон головного мозга на основании гемодинамических изменений, возникающих в ответ на предъявление того или иного стимула или в покое [14]. Постпроцессинговая обработка данных фМРТ позволяет выявить зоны активации головного мозга на основе определения статистических различий МР-сигнала в период активации по сравнению с периодом покоя. В дальнейшем производится сопоставление полученных результатов с топографией зон активации и клиническими проявлениями [18, 19]. Одним из вариантов фМРТ является выполнение ее в состоянии покоя (фМРТ покоя, *resting state-fMRI*), то есть в отсутствии внешних стимулов. При данном варианте оценивается активность так называемых рабочих сетей головного мозга в состоянии покоя [20, 21].

В современной литературе приводится небольшое число исследований по изучению центральных механизмов патогенеза головной боли напряжения с использованием современных методов нейровизуализации. В настоящее время эти методы только внедряются для исследования когнитивных функций (внимание, скорость психических и психомоторных процессов) и психических расстройств (депрессивные нарушения, нарушения сна, аппетита, сексуальные расстройства), а также для уточнения звеньев этиопатогенеза головных болей напряжения. Считается, что периферические механизмы (повышение тонуса и болевая гиперчувствительность перикраниальной мускулатуры) играют главную роль при эпизодической, а центральные (центральная сенситизация) — при хронической головной боли напряжения. Так, при хронических болевых синдромах центрального генеза большее значение отдается эффективным связям и топологическому принципу, который лежит в основе функционирования коннектома, когда скорость передачи информации определяется не столько анатомическим фактором, сколько местом расположения ключевых точек и структурой коннектома, а не церебральными структурами [22]. Так, при эпизодической ГБН выявлено снижение плотности серого вещества с обеих сторон в области соматосенсорной коры (S1) и увеличение этого показателя в области передней поясной коры и в передних инсулярных отделах, которые исчезают вне болевой фазы. Была отмечена отрицательная корреляция между увеличением плотности серого вещества в области передней поясной коры и наличием у пациентов тревоги и депрессии [23]. При хронической ГБН доказано меняются функциональные связи между левой медиальной орбитофронтальной корой и задними отделами левой поясной извилины, между левой медиальной орбитофронтальной корой и ко-

рой нижних отделов левой височной доли [24].

По данным исследования, в котором проводили функциональную МРТ в покое в сочетании с анализом функциональной коннективности после проведенной мануальной терапии, выполненного Gay C.W. и соавторами, был продемонстрирован положительный эффект лечения после трех различных видов мануальной терапии в виде снижения интенсивности экспериментально вызванной миалгии, данные нейрофизиологические изменения могут быть основным механизмом облегчения боли [25].

Применение немедикаментозных методов лечения, остеопатическая коррекция

Лечение головной боли на сегодняшний день является актуальной и сложной задачей, так как необходимо учитывать не только патофизиологические аспекты ГБН при различных вариантах ее развития, но и факторы, способствующие развитию смешанной ГБ, в связи с чем использование нелекарственных методов лечения различных вариантов ГБН является актуальной задачей [26].

Известно применение краниосакральной техники, которая основана на суставной биомеханике, нейромышечных рефлекторных механизмах и натяжении мембран (миофасциальный аппарат и мембран мозга), принципиальным отличием является использование «врожденной подвижности» тканей, особенно краниосакрального ритма и «первичного респираторного механизма». Применение краниосакральной техники обуславливает устранение причин натяжения мозговых оболочек, способствует ликвородинамике из желудочковой системы в спинномозговой канал, воздействуя на основные звенья патогенеза ГБН (мышечный спазм или мышечно-тонический синдромом, в то время как при ЭГБН большее значение имеют периферические факторы, при ХГБН — центральные, связанные с развитием сенситизации болевых структур) [27].

По мнению зарубежных авторов, немедикаментозные методы лечения предлагают комплексное, персонализированное вмешательство, необходимое для лечения хронической головной боли. Многие интегративные методы лечения показали эффективность и минимальное количество побочных эффектов у пациентов с ХГБН [28].

Существуют данные исследований, в которых отмечается уменьшение интенсивности боли и болевой чувствительности после применения остеопатических техник [29–30]. Выявленные нейрофизиологические изменения, связанные с функциональными изменениями в центральной нервной системе [31–34], могут лежать в основе клинического улучшения.

Заключение

В настоящий момент как в русскоязычной, так и в зарубежной литературе практически отсутствуют полноценные исследования по изучению структурно-функциональных изменений головного мозга у пациентов с головными болями напряжения. Однако перспективы применения методов функциональной магнитно-резонансной томографии в диагностике изменений функциональных связей между различными отделами головного мозга (функциональной коннективности) у данной группы пациентов достаточно широки, так как они позволяют более подробно изучить патогенез вышеописанных расстройств.

Остается открытым вопрос разработки общепринятой методики диагностики и лечения, включающей применение остеопатических техник, нейровизуализационной объективизации и определения состояния функциональных связей головного мозга для более точной диагностики и прогнозирования эффективности лечения.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. WHO documentation center. Fact sheets. Headache disorders. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/headache-disorders> [Документационный центр ВОЗ. Головные боли Электронный ресурс: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/headache-disorders>].
2. Steiner TJ, Paemeleire K, Jensen R. European principles of management of common headache disorders in primary care. М.: ООО «ОГГИ. РП», 2010. р.56. In Russian [Стайнер Т.Д., Паймелейер К., Йенсен Р. Европейские принципы ведения пациентов с наиболее распространёнными формами головной боли в общей практике. Практическое руководство для врачей. М.: ООО «ОГГИ. РП», 2010. с.56].
3. Lebedeva ER, Kobzeva NR, Tsypushkina TS, et al. Prevalence of headaches in medical University students according to the new international classification of headaches 3 revision. Ural medical journal = Ural'skij medicinskij zhurnal. 2014; 3(117):15–20. In Russian [Лебедева Е.Р., Кобзева Н.Р., Цыпушкина Т.С., и др. Распространённость головных болей у студентов медицинского университета согласно новой международной классификации головных болей 3 пересмотра. Уральский медицинский журнал. 2014; 3(117):15–20].
4. Ayzenberg I, Katsarava Z, Sborowski A. et al. The prevalence of primary headache disorders in Russia: a countrywide survey. Cephalgia. 2012; 32 (5):373–381.
5. Osipova VV. Tension-type Headache in the practice of the therapist. Directory of outpatient physician. 2012; 10:70–73. In Russian [Осипова В.В. Головная боль напряжения в практике терапевта. Справочник поликлинического врача. 2012; 10:70–73].
6. Jensen R, Stovner LJ. Epidemiology and comorbidity of headache. Lancet Neurol. 2008; 7:354–361.
7. Miroshnichenko DB, Rachin AP, Mokhov DE. Osteopathic algorithm of treatment for chronic headaches. Practical medicine = Prakticheskaya meditsina. 2017;1(102):114–118. In Russian [Мирошниченко Д.Б., Рачин А.П., Мохов Д.Е. Остеопатический алгоритм лечения хронической головной боли напряжения Практическая медицина. 2017; 1(102):114–118].
8. Olesen J, Goadsby PJ, Ramadan N et al. The Headaches, 3rd edn. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 2006. p. 1169.
9. Silver N. Headache (chronic tension-type). BMJ Clin Evid. 2007; 2007.pii: 1205.
10. Lebedeva ER, Kobzeva NR, Gilev DV, Olesen E. Analysis of the quality of diagnosis and treatment of primary headache in different social groups of the Ural region. Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics. 2015; 1:19–26. In Russian [Лебедева Е.Р., Кобзева Н.Р., Гилев Д.В., Олесен Е. Анализ качества диагностики и лечения первичных головных болей в различных социальных группах Уральского региона. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2015; 1:19–26].
11. Lebedeva ER, Kobzeva NR, Gilev DV, Olesen E. Factors associated with the migraine and tension type headache in three social groups. Ural medical journal. Neurology. = Ural'skij medicinskij zhurnal. Nevrologiya. 2015; 2: 5–14. In Russian [Лебедева Е.Р., Кобзева Н.Р., Гилев Д.В., Олесен Е. Факторы, связанные с развитием мигрени и головных болей напряжения в трех социальных группах. Уральский медицинский журнал. Неврология. 2015; 2(125): 5–14].
12. Migraine, beam headache, tension headache. In: Diseases of the nervous system 3th ed. Moscow: Medicine, 1995: 325–337. In Russian [Мигрень, пучковая головная боль, головная боль напряжения. В кн: Болезни нервной системы 3 издание. М.: Медицина, 1995: 325–337].
13. Osipova VV. Tension Headache: a practical guide for doctors. М.: «ОГГИ. РП», 2009. р 44. In Russian [Осипова В.В. Головная боль напряжения: практическое руководство для врачей. М.: ООО «ОГГИ. РП», 2009. с.44].
14. Greicius MD, Menon V. Default-mode activity during a passive sensory task: uncoupled from deactivation but impacting activation. J Cogn Neurosci. 2004;16(9):1484–1492.
15. Cauda F, Palermo S, Costa T et al. Gray matter alterations in chronic pain: A network-oriented meta-analytic approach. Neuroimage Clin. 2014; 4: 676–686.
16. Wang Z, Yang Q, Chen LM. Abnormal dynamics of cortical resting state functional connectivity in chronic headache patients. Magn Reson Imaging 2017; 36: 56–67.
17. Chutko LS, Surushkina SYu, Rozhkova AV. Cognitive disorders in patients with tension headaches. Russian journal of pain = Rossijskij zhurnal boli. 2015; 1(46): 56. In Russian [Чутко Л.С., Сурушкина С.Ю., Рожкова А.В. Когнитивные нарушения у пациентов с головными болями напряжения. Российский журнал боли. 2015; 1(46):56].
18. Beckmann CF, DeLuca M, Devlin JT, Smith SM. Investigations into resting-state connectivity using independent component analysis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2005; 360(1457): 1001–1013.
19. Biswal BB. Resting state fMRI: a personal history. Neuroimage. 2012; 62 (2): 938–944.

20. Smitha KA, Akhil Raja K, Arun KM, et al. Resting state fMRI: A review on methods in resting state connectivity analysis and resting state networks. *Neuroradiol J.* 2017; 30 (4): 305–317.
21. Greicius MD, Krasnow B, Reiss AL, Menon V. Functional connectivity in the resting brain: a network analysis of the default mode hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100 (1): 253–258.
22. Damulin IV. Systemic Psychoneurology and pain syndromes. *Consilium Medicum.* 2017; 19(9):37–43. In Russian [Дамулин И.В. Системная психоневрология и болевые синдромы. *Consilium Medicum.* 2017; 19(9):37–43].
23. Gay CW, Robinson ME, George SZ, et al. Immediate changes after manual therapy in resting-state functional connectivity as measured by functional magnetic resonance imaging in participants with induced low back pain. *J Manipulative Physiol Ther.* 2014;37(9):614–627.
24. Yang Q, Wang Z, Yang L, et al. Cortical thickness and functional connectivity abnormality in chronic headache and low back pain patients. *Hum Brain Map.* 2017; 38 (4): 1815–1832.
25. Chen B, He Y, Xia L, et al. Cortical plasticity between the pain and pain-free phases in patients with episodic tension-type headache. *J Headache Pain.* 2016; 17 (1): 105.
26. Jahno NN, Parfenov VA, Alekseev VV. Headache. M.: Remedium, 2000. p.150. In Russian [Яхно Н.Н., Парфенов В.А., Алексеев В.В. Головная боль. М.: Ремедиум, 2000. с.150].
27. Amoils S, Amoils S, Lester T, et al. The Positive Impact of Integrative Medicine in the Treatment of Recalcitrant Chronic daily Headache: A Series of Case Reports. *Glob Adv Health Med.* 2014;3(4):45–54.
28. Bigal ME, Lipton RB. The differential diagnosis of chronic daily headaches: an algorithm-based approach. *J Headache Pain.* 2007; 8(5): 263–272.
29. Pascual J, Colas R, Castillo J. Epidemiology of chronic daily headache. *Curr Pain Headache Rep.* 2001; 5(6): 529–536.
30. Silberstein SD. Chronic daily headache. *J Am Osteopath Assoc.* 2005; 105(4 Suppl 2): 23S–29S.
31. Lantéri-Minet M, Duru G, Mudge M, Cottrell S. Quality of life impairment, disability and economic burden associated with chronic daily headache, focusing on chronic migraine with or without medication overuse: a systematic review. *Cephalalgia.* 2011; 31(7): 837–850.
32. Vickers AJ, Cronin AM, Maschino AC et al. Acupuncture for chronic pain: individual patient data meta-analysis. *Arch Intern Med.* 2012; 172(19): 1444–1453.
33. Tepper S, Bigal M, Rapoport A, Sheftell F. Alternative therapies: evidence-based evaluation in migraine. *Headache care.* 2006; 3(2–3): 57–64.
34. Söderberg EI, Carlsson JY, Stener-Victorin E, Dahlöf C. Subjective well-being in patients with chronic tension-type headache: effect of acupuncture, physical training, and relaxation training. *Clin J Pain.* 2011; 27 (5): 448–456.

Информация об авторах:

Лепёхина Анна Станиславовна, ординатор кафедры лучевой диагностики и медицинской визуализации, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;
 Поспелова Мария Львовна, д.м.н., ведущий научный сотрудник НИЛ неврологии и нейрореабилитации, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;
 Левчук Анатолий Геннадиевич, младший научный сотрудник НИЛ лучевой визуализации, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;
 Ефимцев Александр Юрьевич, ведущий научный сотрудник НИЛ лучевой визуализации, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;
 Труфанов Геннадий Евгеньевич, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник НИО лучевой диагностики, заведующий кафедрой лучевой диагностики и медицинской визуализации, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;
 Алексеева Татьяна Михайловна, д.м.н., заведующий кафедрой неврологии и психиатрии, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;
 Писковацков Дмитрий Валентинович, врач-остеопат, ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д. О. Отта».

Author information:

Lepekhina Anna S., Resident of the Department of Radiology and Medical Imaging, Almazov National Medical Research Centre;
 Pospelova Maria L., Dr. Sci., Leading Researcher of Neurology and Neurorehabilitation Scientific Research Department, Almazov National Medical Research Centre;
 Levchuk Anatoly G., Junior Researcher of the Laboratory of Radiation Imaging, Almazov National Medical Research Centre;
 Efimtsev Alexander Yu., PhD, Leading Scientific Researcher of the Laboratory of Radiation Imaging, Almazov National Medical Research Centre;
 Trufanov Gennady E., Dr. Sci., Prof., Chief Researcher of the Research Department of Radiology, Head of the Department of Radiology and Medical Imaging, Almazov National Medical Research Centre;
 Alekseeva Tatyana M., Dr. Sci., Head of the Department of Neurology and Psychiatry, Almazov National Medical Research Centre;
 Piskovatskov Dmitry V., Osteopathic Doctor, Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproduction named after D. O. Otto.

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВРОЖДЕННОГО ГИПЕРИНСУЛИНИЗМА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Перминова А. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Перминова Анастасия Аркадьевна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: perminova_aa@almazovcentre.ru

*Статья поступила в редакцию 30.01.2020
и принята к печати 19.03.2020.*

Резюме

Врожденный гиперинсулинизм является одной из наиболее частых причин гипогликемии у детей в возрасте до 1 года. При отсутствии адекватной фармакологической коррекции гипогликемических приступов возможно развитие необратимых изменений в центральной нервной системе с последующей инвалидизацией таких больных. Однако из-за неэффективности консервативной терапии во многих случаях требуется хирургическое вмешательство, объем которого зависит от формы заболевания. Но вследствие несовершенства методов предоперационной диагностики, дифференциальная диагностика между очаговой и диффузной формами врожденного гиперинсулинизма производится интраоперационно патологоанатомами. В связи с тем, что патоморфология поджелудочной железы при врожденном гиперинсулинизме остается малоизученной, гистологическая и дальнейшая иммуногистохимическая диагностика представляет значительные трудности.

В данном обзоре представлены имеющиеся в литературе данные о гистологической, гистохимической и иммуногистохимической характеристике эндокринной части поджелудочной железы, которые могут оказаться полезными в ходе дальнейшего изучения врожденного гиперинсулинизма. В частности, подробно изложены существующие на сегодняшний день подходы к морфологической классификации и интраоперационной гистологической диагностике различных форм врожденного гиперинсулинизма. Кроме того, дано подробное описание экспрессии факторов транскрипции NeuroD1, Nkx2.2 и Isl1 в ткани поджелудочной железы при иммуногистохимическом исследовании. Описан профиль иммуногистохимического окрашивания в поджелудочной железе дофаминовых и соматостатиновых рецепторов, а также соматостатина и хромогранина А.

Объединенные в этом обзоре данные многочисленных исследований способны помочь в дальнейшем поиске решений диагностических и терапевтических проблем, связанных с врожденным гиперинсулинизмом.

Ключевые слова: врожденный гиперинсулинизм, гиперинсулинемическая гипогликемия, гиперинсулинизм, иммуногистохимия, незидиобластоз, островки Лангерганса, патоморфология поджелудочной железы.

Для цитирования: Перминова А.А. Патологические и морфологические аспекты врожденного гиперинсулинизма (обзор литературы). Трансляционная медицина. 2020; 7(2): 12–20. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-2-12-20.

PATHOPHYSIOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL ASPECTS OF CONGENITAL HYPERINSULINISM. REVIEW

Perminova A. A.

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Perminova Anastasiia A.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

E-mail: perminova_aa@almazovcentre.ru

Received 30 January 2020; accepted
19 March 2020.

Abstract

Congenital hyperinsulinism is one of the most common causes of hypoglycemia in infants. In the absence of adequate pharmacological correction of hypoglycemic attacks, the development of irreversible changes in the central nervous system with the subsequent disability of such patients is possible. Due to the ineffectiveness of conservative therapy, in many cases surgical intervention is required. However, due to the imperfection of pre-operative diagnosis, pathologists intraoperatively perform the differentiation between focal and diffuse forms of congenital hyperinsulinism. But the pancreatic pathology with congenital hyperinsulinism remains poorly understood, therefore histological and further immunohistochemical diagnosis presents significant difficulties.

This review presents data on the histological, histochemical, and immunohistochemical characteristics of the endocrine pancreas, which may be useful in the further studies of congenital hyperinsulinism. In particular, we describe in detail the current approaches to morphological classification and intraoperative histological diagnosis of various forms of congenital hyperinsulinism. In addition, we give a detailed description of the expression of transcription factors NeuroD1, Nkx2.2 and Isl1 in pancreatic tissue during immunohistochemical study. Also, we describe the profile of immunohistochemical staining of dopamine and somatostatin receptors, as well as somatostatin and chromogranin A.

The data of numerous studies combined in this review can help researchers in the further search for solutions to the diagnostic and therapeutic problems associated with congenital hyperinsulinism.

Key words: congenital hyperinsulinism, immunohistochemistry, hyperinsulinaemic hypoglycaemia, hyperinsulinism, nesidioblastosis, pancreatic islets, pathology of pancreas.

For citation: Perminova A.A. Pathophysiological and morphological aspects of congenital hyperinsulinism. Review. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020; 7(2): 12–20. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-2-12-20.

Введение

Врожденный гиперинсулинизм представляет собой группу клинически, генетически и морфологически гетерогенных расстройств, характеризующихся нарушением регуляции инсулиновой секреции, которое приводит к развитию выраженной персистирующей гипогликемии [1]. Персистирующая гипогликемия, в свою очередь, может приводить к повреждению коры головного мозга с последующей инвалидизацией. Ранее в отношении врожденного гиперинсулинизма использо-

вался морфологический термин «незидиобластоз» [2], однако гистологическую картину незидиобластоза можно наблюдать в поджелудочной железе не только при врожденном гиперинсулинизме, но и у здоровых детей в возрасте до 1 года. Другой термин, «персистирующая гиперинсулинемическая гипогликемия у младенцев (в ориг. — infancy)» [3], тоже не является удачным, поскольку у пациентов с врожденным гиперинсулинизмом гипогликемия может быть связана не с абсолютным избытком инсулина в плазме крови, а с недостаточным пода-

влиянием его секреции в условиях низкого уровня гликемии [4].

Врожденный гиперинсулинизм является относительно редкой патологией: в европейской популяции он встречается приблизительно у 1 из 27 000–50 000 новорожденных детей, хотя в отдельных популяциях с большим числом близкородственных браков (например, в Саудовской Аравии) частота встречаемости этого заболевания может достигать 1:2500 [5].

На сегодняшний день известно, что к возникновению врожденного гиперинсулинизма приводят мутации в 4-х группах генов. Это гены, кодирующие: 1) компоненты АТФ-зависимого калиевого канала (*ABCC8* и *KCNJ11*); 2) компоненты других каналов или белков-переносчиков (*SLC16A1*, *CACNA1D*, *KCNQ1*); 3) ферменты (*GLUD1*, *GCK*, *HADH*, *UCP2*, *PGM1*, *HK1*, *PMM2*); 4) факторы транскрипции (*HNF4A*, *HNF1A*, *FOXA2*) [6]. Продукты всех вышеуказанных генов задействованы в разных звеньях регуляции инсулиновой секреции β -клетками поджелудочной железы, поэтому выявление мутаций в этих генах является одним из важных аспектов предоперационной диагностики врожденного гиперинсулинизма.

Наряду с выявлением генетических мутаций, в диагностике врожденного гиперинсулинизма не менее важную роль играет морфологическое исследование поджелудочной железы, поскольку его результаты определяют тактику, а следовательно, и эффективность дальнейшего лечения.

Гистологическая характеристика и морфологическая классификация

Описанные G. F. Laidlaw [2] в 1938 г. изменения поджелудочной железы в виде увеличения в размерах островков Лангерганса и незначительного нарушения гистоархитектоники с формированием длинных полос эндокринной ткани в настоящее время признаны нормальным этапом развития ткани поджелудочной железы в раннем постнатальном периоде [7].

I. McQuarrie в 1954 г. [8] при первом описании «идиопатической спонтанно возникающей гипогликемии у младенцев» в биопсийном материале поджелудочной железы не обнаружил каких-либо значимых патологических изменений, кроме некоторого просветления ядер β -клеток.

С тех пор представления о гистопатологии врожденного гиперинсулинизма существенно изменились и расширились.

На сегодняшний день принято выделять три гистологические формы врожденного гиперинсулинизма: диффузную, очаговую (аденоматозную) и атипичную (мозаичную) [9]. Очаговая форма ха-

рактеризуется гиперплазией β -клеток и слиянием островков Лангерганса в ограниченной области поджелудочной железы; при этом за пределами пораженного участка островки имеют нормальное строение, но несколько уменьшаются в размерах. В случае диффузной формы врожденного гиперинсулинизма гиперплазия β -клеток наблюдается в большинстве островков Лангерганса. Для атипичной формы характерен морфологический мозаицизм в виде сосуществования двух типов островков: крупных островков с крупными β -клетками с увеличенными ядрами и мелких островков с мелкими β -клетками с небольшими ядрами. При атипичной форме может поражаться часть поджелудочной железы, но, в отличие от очаговой формы, аденоматозная гиперплазия эндокринной ткани отсутствует [10].

Диффузная форма составляет 60–70 % случаев врожденного гиперинсулинизма, очаговая — 30–40 %, атипичная — около 10 % [9, 11].

Недавно было установлено, что у пациентов с очаговой формой врожденного гиперинсулинизма выраженность клинической картины может отличаться в зависимости от наличия или отсутствия капсулы вокруг очага поражения: при наличии соединительнотканной капсулы дебют заболевания наступал позже и хирургическое лечение оказывалось более результативным по сравнению с теми пациентами, у которых капсула вокруг очагов аденоматозного поражения отсутствовала [12].

Дифференциальная диагностика между различными гистологическими формами врожденного гиперинсулинизма принципиально важна уже на этапе предоперационного обследования, поскольку от этого напрямую зависит объем хирургического лечения и дальнейший прогноз: в случае очаговой формы резекция измененных участков поджелудочной железы приводит к излечению, в то время как при диффузной форме требуется субтотальное удаление ткани поджелудочной железы с последующей пожизненной заместительной терапией инсулином и ферментами [13].

Несмотря на использование ПЭТ-КТ с ^{18}F -DOPA для визуализации пораженных участков поджелудочной железы при врожденном гиперинсулизме [14], точная дифференциальная диагностика между его очаговой и диффузной формами возможна только при гистологическом исследовании. Но вследствие зависимости хирургической тактики от формы врожденного гиперинсулинизма проводить эту дифференциальную диагностику требуется уже на этапе срочного интраоперационного гистологического исследования замороженных срезов.

Однако в связи с тем, что в замороженных микропрепаратах крайне плохо визуализируются обычные для парафиновых срезов различия между экзо- и эндокринной частями поджелудочной железы, требуется четкий морфологический признак, который позволил бы эти части различать (чтобы определять их архитектуру и соотношение в исследуемом микропрепарате) либо сразу отличать одну форму гиперинсулинизма от другой. В качестве одного из таких признаков некоторые исследователи предлагают строение ядер: считается, что только для диффузной формы врожденного гиперинсулинизма характерны полиморфные, гиперхромные, увеличенные в 2–3 раза по сравнению с нормой, ядра β -клеток [15]. При этом не все увеличенные ядра β -клеток оказываются Ki-67-позитивными, что говорит о том, что такие изменения могут быть не связаны с пролиферативными процессами [15]. Однако, как показывает практика, увеличенные гиперхромные ядра эндокринных клеток практически с одинаковой частотой встречаются как при диффузной, так и при очаговой форме врожденного гиперинсулинизма.

Таким образом, требуется другой, более достоверный, критерий (или критерии), который позволил бы проводить дифференциальную диагностику между диффузной и очаговой формами врожденного гиперинсулинизма при интраоперационном гистологическом исследовании.

Гистохимия

До того времени, как иммуногистохимический метод исследования получил широкое распространение в клинической практике, существовал ряд гистохимических окрасок, позволявших выявлять эндокринную и экзокринную части поджелудочной железы. Однако все эти окраски были разработаны для парафиновых, а не для замороженных гистологических срезов. Кроме того, некоторые способы гистохимического окрашивания на практике применялись только для исследования тканей поджелудочной железы животных, а не человека.

В частности, для выявления зимогеновых гранул экзокринной части поджелудочной железы применяли азур-эозин, PAS-реакцию и метод Грама-Вейгерта, при этом выявление зимогеновых гранул последними двумя методами оказывалось успешным не во всех случаях [16].

Что касается островков Лангерганса, то для их окрашивания использовали нейтральный генциан, сафранин с кислым фиолетовым, кислый фуксин с метиленовым зеленым, кислый фуксин с толуидиновым синим, медь с гематоксилином, нейтральный генциан с кислым фуксином и пикриновой кислотой [17], оранжевый G с нейтральным этиле-

новым фиолетовым [18], нейтральный этиленовый фиолетовый с Бибрихом алым (Biebrich), а также эозин с метиленовым синим [19]. По данным G. F. Laidlaw, описывавшего незидиобластоз, островковая ткань в поджелудочной железе человека хорошо окрашивалась с помощью кислого фуксина с метиленовым зеленым [2]. Кроме того, есть данные о том, что островковая ткань поджелудочной железы выявляется альдегид-фуксином [20].

В настоящее время для окрашивания замороженных срезов поджелудочной железы человека применяют гематоксилин-эозин или толуидиновый синий, однако такие окраски не позволяют четко разграничить экзокринную и эндокринную части поджелудочной железы и, соответственно, интраоперационно проводить четкую дифференциальную диагностику между очаговой и диффузной формами врожденного гиперинсулинизма [11].

Иммуногистохимические маркеры

На сегодняшний день иммуногистохимический профиль экспрессии ткани поджелудочной железы при врожденном гиперинсулинизме практически не изучен.

1. NeuroD1. Известно, что фактор транскрипции NeuroD1 участвует в дифференцировке, морфогенезе и поддержании клеток центральной нервной системы [21], а также экспрессируется в гипофизе и эндокринных клетках примитивных нейроэктодермальных опухолей [22]. Были получены данные о том, что NeuroD1 присутствует в клетках-предшественниках эндокринной части поджелудочной железы как на этапе ее формирования, так и у взрослых [23]. Известно также, что NeuroD1 участвует в дифференцировке δ - и PP-клеток и подавляет экспрессию соматостатина [24]. Кроме того, установлено, что мыши с нокаутированным геном *NeuroD1* умирают от тяжелой формы сахарного диабета вскоре после рождения, поскольку у них в поджелудочной железе не образуются островки Лангерганса и плохо дифференцируются α - и β -клетки [25]. В последние годы было обнаружено, что одним из механизмов потери β -клеток при сахарном диабете является их дедифференцировка, для которой среди прочего характерно снижение уровня экспрессии NeuroD1 [26]. Недавно было показано, что мутации в гене *NeuroD1* могут приводить к возникновению перманентного неонатального сахарного диабета (при гомозиготных миссенс-мутациях) [27], сахарного диабета 2-го типа (при гетерозиготных инактивирующих миссенс-мутациях) [28] и MODY6-диабета [29].

Однако до сих пор не исследовано, каким образом меняется содержание и активность NeuroD1 в поджелудочной железе при врожденном гиперин-

сулинизме и какую роль вышеозначенные изменения играют в патогенезе данного заболевания.

2. Nkx2.2. Фактор транскрипции Nkx2.2, как и NeuroD1, принимает участие в раннем развитии центральной нервной системы, а также в дифференцировке эндокринных клеток поджелудочной железы [30]. У мышей с нокаутированным геном *NKX2.2* β-клетки не формируются, а количество α- и PP-клеток в островках Лангерганса снижается [31]. В зрелой поджелудочной железе экспрессия Nkx2.2 сохраняется в β-клетках и в некоторых субпопуляциях α- и PP-клеток, но отсутствует в δ-клетках [32]. Подавление экспрессии Nkx2.2 у взрослых мышей приводит к нарушению архитектоники островков Лангерганса и снижению инсулиновой секреции с развитием нарушения толерантности к глюкозе и явного диабета [33]. У людей инактивирующие мутации в гене *NKX2.2* являются причиной перманентного неонатального диабета [34].

При диффузной форме врожденного гиперинсулинизма была обнаружена лишь тенденция к повышению экспрессии Nkx2.2 в δ-клетках [32], в то время как при атипичной форме его экспрессия возрастала в 2 раза за счет увеличения количества соматостатин-позитивных δ-клеток [9]. Кроме того, обнаружено, что увеличение активности тирозинкиназы c-Abl приводит к уменьшению экспрессии Nkx2.2 в β-клетках и снижению выработки инсулина (Nkx2.2 является позитивным регулятором экспрессии гена инсулина) [35].

Nkx2.2 активирует NeuroD1 в эндокринных клетках-предшественниках и поддерживает его экспрессию в зрелых β-клетках островков Лангерганса [36]. Кроме того, Nkx2.2 способен активировать промотор грелина в эндокринных клетках поджелудочной железы [37].

3. Isl1. Связывающий энхансер гена инсулина белок-1 (Isl1 — Insulin enhancer binding protein-1) был открыт в 1990 году. [38]. Этот фактор транскрипции, наряду с NeuroD1 и Nkx2.2, участвует в дифференцировке эндокринных клеток в развивающейся поджелудочной железе, а также в поддержании равновесия между разными типами клеток в зрелом островке Лангерганса [39]. Isl1 экспрессируется во всех эндокринных клетках сформированного островка Лангерганса.

В опыте на мышах было установлено, что постнатальная потеря функции Isl1 в β-клетках поджелудочной железы приводит к нарушению толерантности к глюкозе и снижению уровня инсулиновой секреции, но при этом не наблюдается значимое уменьшение количества β-клеток или активация их апоптоза [40]. Показано также, что Isl1 напрямую взаимодействует с NeuroD1, активирует про-

мотор гена инсулина [38] и соматостатина [41]. Другими мишенями Isl1 в β-клетках островков Лангерганса являются транскрипционные факторы MafA и Pdx1, а также гены *Glp1r* (рецептора глюконоподобного пептида-1) и *Slc2a2* (глюкозный транспортер) [40]. В исследовании на клеточных культурах обнаружено, что Isl1, взаимодействуя с Pdx1, активирует циклин D1 и вызывает пролиферацию зрелых β-клеток поджелудочной железы [42]. Опыты на мышах показали, что кисспептины через свои рецепторы в поджелудочной железе ингибируют экспрессию Isl1 и секрецию инсулина, причем устранение Isl1 значительно ослабляло эффект кисспептинов на инсулиновую секрецию [43].

У пациентов с сахарным диабетом 2-го типа были обнаружены нонсенс-мутации в гене *ISL-1* [44]. Данные о том, как меняется экспрессия Isl1 в поджелудочной железе при врожденном гиперинсулинизме, на сегодняшний день полностью отсутствуют.

4. Хромогранин А. Будучи маркером нейроэндокринных клеток, хромогранин А обнаруживается в клетках островков и протоков развивающейся поджелудочной железы уже с 8-й недели эмбрионального развития [45]. Нокаутирование гена *Chga* у мышей приводит к нарушению архитектоники островков Лангерганса, снижению функции инсулинпродуцирующих клеток и повышению функции глюкагонпродуцирующих клеток [46].

Хромогранин А — кислый растворимый белок, который участвует в формировании и созревании секреторных гранул нейроэндокринных клеток. В опыте на мышах показано, что дефицит хромогранина А приводит к повышению уровня глюкозоопосредованной инсулиновой секреции [47]. Вместе с тем одним из продуктов протеолиза хромогранина А является пептид панкреастатин, способный паракринно ингибировать секрецию инсулина [48]. Кроме того, панкреастатин вызывает гликогенолиз в печени и липолиз в адипоцитах, а также, возможно, вовлечен в механизмы формирования инсулиновой резистентности.

J. Kunz et al. описывают иммуногистохимическое окрашивание хромогранинном А поджелудочной железы при очаговой и диффузной формах врожденного гиперинсулинизма [20]. Хромогранин А выявлялся во всех типах клеток островка Лангерганса, при этом профиль экспрессии хромогранина А при диффузной форме не отличался от таковой в контрольных образцах с поправкой на плотность расположения островков и их диаметр. При очаговой форме врожденного гиперинсулинизма реакция на хромогранин А была положительна во всем пораженном участке. Таким образом, J. Kunz et al. делают вывод о том, что иммуногистохими-

ческое окрашивание на хромогранин А позволяет хорошо визуализировать как нормальные, так и пораженные участки эндокринной части поджелудочной железы [20]. Н. Yasoshima et al. описали случай врожденного гиперинсулинизма с поражением эктопической части поджелудочной железы, при котором пораженные участки окрашивались как хромогранин А, так и соматостатином [49]. Показано также, что иммуногистохимическая реакция на хромогранин А положительна в клетках инсулиномы [50]. Однако, по данным некоторых исследований, иммуногистохимическое окрашивание на хромогранин А в островках Лангерганса лучше выявляет α -клетки, чем β -клетки [51].

Недавно в опытах на крысах экспрессия хромогранина А была обнаружена в регенерирующих участках поджелудочной железы [52]. Кроме того, у пациентов с хроническим панкреатитом были выявлены скопления клеток, которые окрашивались хромогранин А и при этом не содержали гормонов, из чего авторы сделали вывод о том, что хромогранин А может быть маркером как нейроэндокринных клеток, так и репаративных процессов [53].

5. Дофаминовые рецепторы. Для предоперационной диагностики врожденного гиперинсулинизма используют ПЭТ-КТ с ^{18}F -DOPA, которая позволяет уточнить локализацию очагового поражения поджелудочной железы до хирургической операции [54], однако у некоторых пациентов визуализация расположения пораженного участка оказывается неверной [55]. Несмотря на использование ^{18}F -DOPA в диагностических целях, роль дофаминовой сигнальной системы в патогенезе врожденного гиперинсулинизма остается неизученной.

Вместе с тем есть данные о наличии в островках Лангерганса поджелудочной железы человека дофаминовых рецепторов 1-го (β -клетки), 2-го (α , δ и PP-клетки), 3-го (β -клетки), 4-го (β и PP-клетки) и 5-го (δ -клетки) типов [56]. Известно также, что β -клетки содержат дофамин и секретируют его совместно с инсулином. Дофаминовые рецепторы являются G-белок-сопряженными рецепторами, причем рецепторы 1 и 5-го типов активируют аденилатциклазу и повышают количество цАМФ в клетках, а рецепторы 2, 3 и 4-го типов, наоборот, ингибируют аденилатциклазу и, соответственно, снижают количество цАМФ в клетках [57].

При активации дофаминовых рецепторов 1-го типа, расположенных на поверхности β -клеток, происходит стимуляция высвобождения инсулина; а при активации дофаминовых рецепторов 2-го типа, которые расположены преимущественно на δ -клетках (хотя в меньшем количестве присутствуют и на β -клетках), секреция инсулина, на-

оборот, ингибируется [58]. Внутривенная инфузия дофамина в небольших концентрациях приводит к повышению уровня инсулиновой секреции, в то время как в более высоких концентрациях, наоборот — к ее подавлению [59]. Этот эффект отчасти может быть объяснен активацией α - и β -адренорецепторов в условиях высокой концентрации дофамина [60]. Показано также, что не только сам дофамин, но и агонист дофаминовых рецепторов 2-го типа бромокриптин, подавляет глюкозоопосредованную секрецию инсулина [61].

В последние годы появились данные о том, что в физиологических условиях β -клетки поджелудочной железы захватывают предшественник дофамина L-DOPA (который продуцируется клетками желудочно-кишечного тракта) для пополнения запасов внутриклеточного дофамина. При этом глюкозная нагрузка значительно повышает захват L-DOPA β -клетками, вследствие чего в последних увеличивается интенсивность секреции дофамина, который, в свою очередь, паракринно и аутокринно через связывание с дофаминовыми рецепторами 2 и 3-го типов снижает уровень глюкозоопосредованной инсулиновой секреции [62].

Обнаружено, что под воздействием дофамина в островках Лангерганса снижается количество β -клеток вследствие активации апоптоза и уменьшения числа митозов [63], в то время как под воздействием антагониста дофаминовых рецепторов 2-го типа домперидона, наоборот, происходит увеличение массы β -клеток за счет повышения пролиферативной активности и снижения числа апоптозов в условиях подъема уровня внутриклеточного цАМФ [64].

Стимуляция дофамином своих рецепторов 2-го типа на δ -клетках приводит к ингибированию секреции соматостатина [58], вследствие чего активизируется экзоцитоз инсулина β -клетками. Кроме того, предполагается, что в β -клетках дофаминовые рецепторы 2-го типа могут образовывать гетеродимерные структуры с соматостатиновыми рецепторами, вследствие чего соматостатиновые рецепторы, возможно, модулируют ответ β -клеток на стимуляцию дофамином [58].

6. Соматостатин и его рецепторы. В островках Лангерганса продуцирующие соматостатин δ -клетки составляют всего около 5 % популяции. На поверхности δ -клеток (как и β -клеток) расположены АТФ-зависимые калиевые каналы, которые закрываются в ответ на стимуляцию глюкозой, вследствие чего происходит деполяризация клеточной мембраны и кальций-зависимая секреция соматостатина [65]. Однако в опыте с неметаболизируемым аналогом глюкозы показано, что по крайней

мере часть δ -клеток способна секретировать соматостатин без повышения соотношения внутриклеточного АТФ к АДФ [66]. Вместе с тем уровень экспрессии генов *ABCC8* и *KCNJ11* в δ -клетках так же высок, как и в β -клетках [67]. Таким образом, не исключено, что в патогенезе врожденного гиперинсулинизма имеет значение нарушение работы АТФ-зависимых калиевых каналов не только на поверхности β -клеток, но и на поверхности δ -клеток, что в конечном итоге приводит к нарушению регуляции секреции как инсулина, так и соматостатина.

Соматостатин — пептидный гормон, имеющий 2 активные изоформы: соматостатин-14 и соматостатин-28. В поджелудочной железе δ -клетки секретируют в основном соматостатин-14 [68], который паракринно ингибирует секрецию глюкагона и инсулина. Секреция соматостатина стимулируется не только глюкозой, но и аминокислотами, такими как аргинин и лейцин. Помимо нутриентов, на секрецию соматостатина оказывают влияние паракринные факторы α - и β -клеток. В частности, секретируемые β -клетками совместно с инсулином урокортин 3 и гамма-аминомасляная кислота [69] стимулируют секрецию соматостатина, а также гормоны (глюкагоноподобный пептид-1) и нейромедиаторы внутриостровковых нервных волокон (ацетилхолин) [70]. На поверхности δ -клеток обнаружены рецепторы инсулина и глюкагона, однако характер действия инсулина на секрецию соматостатина остается невыясненным [65]. Возможно также, что β -клетки способны стимулировать δ -клетки посредством щелевидных контактов [70].

Известно 5 типов соматостатиновых рецепторов, ингибирующим образом сопряженных с G-белком [68]. На поверхности α -клеток преобладают соматостатиновые рецепторы 2-го типа. В β -клетках обнаружены соматостатиновые рецепторы 1, 2, 3 и 5-го типов [71]. Все 5 типов рецепторов обладают достаточно высокой аффинностью к соматостатину [71]. Однако синтетические аналоги соматостатина, такие как октреотид и ланреотид, использующиеся для медикаментозного лечения врожденного гиперинсулинизма, имеют наибольшее сродство к рецепторам соматостатина 2 и 5-го типов [68].

Возможно также, что соматостатин способен не только ингибировать секрецию глюкагона и инсулина, но и оказывать влияние на количество β -клеток в островках [65].

Заключение

В последние годы удалось идентифицировать множество мутаций, приводящих к возникновению врожденного гиперинсулинизма. Несмотря

на это, многие звенья патогенеза заболевания остаются до сих пор не изученными, что ограничивает возможности лучевой диагностики и таргетной терапии. Вследствие неэффективности таргетной терапии многие пациенты подлежат хирургическому лечению, определить оптимальный объем которого крайне трудно, поскольку отсутствуют четкие гистологические и гистохимические критерии, которые позволили бы проводить дифференциальную диагностику между очаговой и диффузной формами.

Роль вышеназванных факторов транскрипции (*NeuroD1*, *Nkx2.2*, *Isl1*), соматостатина и его рецепторов, дофаминовых рецепторов, а также хромогранина А в патогенезе различных форм врожденного гиперинсулинизма остается практически неисследованной, что препятствует пониманию патогенеза этого заболевания и разработке эффективной таргетной терапии.

Таким образом, для получения ответов на вышеобозначенные вопросы необходимы дальнейшие исследования.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Автор заявил об отсутствии потенциально го конфликта интересов. / The author declares no conflict of interest.

Благодарности / Acknowledgments

Автор выражает благодарность д.м.н. Митрофановой Любови Борисовне за помощь в подготовке материала.

Список литературы / References

1. De León DD, Stanley CA. Mechanisms of disease: advances in diagnosis and treatment of hyperinsulinism in neonates. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007; 3(1):57–68.
2. Laidlaw GF. Nesidioblastoma, the islet tumor of pancreas. *Am J Pathol.* 1938; 14(2):125–139.
3. Glaser B, Landau H, Smilovic A et al. Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy: long-term treatment with the somatostatin analogue Sandostatin. *Clin Endoc.* 1989; 31:71–80.
4. Stanley CA. Advances in diagnosis and treatment of hyperinsulinism in infants and children. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(11):4857–4859.
5. Mathew PM, Young JM, Abu-Osba YK et al. Persistent neonatal hyperinsulinism. *Clinical Pediatrics (Phila).* 1988; 27(3):148–151.
6. Galcheva S, Demirbilek H, Al-Khawaga S et al. The genetic and molecular mechanisms of congenital hyperinsulinism. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019; 10:111.
7. Sempoux C, Guiot Y, Lefevre A et al. Neonatal hyperinsulinemic hypoglycemia: heterogeneity of the syndrome and keys for differential diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83(5):1455–1461.

8. McQuarrie I. Idiopathic spontaneously occurring hypoglycemia in infants clinical significance of problem and treatment. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. 1954; 87(4):399–428.
9. Han B, Mohamed Z, Estebanez MS et al. Atypical forms of congenital hyperinsulinism in infancy are associated with mosaic patterns of immature islet cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017; 102(9):3261–3267.
10. Houghton J, Banerjee I, Shaikh G et al. Unravelling the genetic causes of mosaic islet morphology in congenital hyperinsulinism. *J Pathol Clin Res*. 2020; 6(1):12–16.
11. Gillis D. Familial Hyperinsulinism. 2003 Aug 19 [Updated 2019 Mar 21]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2020.
12. Craigie RJ, Salomon-Estebanez M, Yau D et al. Clinical diversity in focal congenital hyperinsulinism in infancy correlates with histological heterogeneity of islet cell lesions. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9:619.
13. Lord K, Dzata E, Snider KE et al. Clinical presentation and management of children with diffuse and focal hyperinsulinism: a review of 223 cases. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013; 98(11):1786–1789.
14. Christiansen CD, Petersen H, Nielsen AL et al. 18F-DOPA PET/CT and 68Ga-DOTANOC PET/CT scans as diagnostic tools in focal congenital hyperinsulinism: a blinded evaluation. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2017; 45(2):250–261.
15. Han B, Newbould M, Batra G et al. Enhanced islet cell nucleomegaly defines diffuse congenital hyperinsulinism in infancy but not other forms of the disease. *Am J Clin Pathol*. 2016; 145(6):757–768.
16. Lillie RD. Histopathologic technic and practical histochemistry. Moscow: MIR, 1969. P. 274–279. In Russian [Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: МИР, 1969. С. 274–279].
17. Bensley RR. Studies on the pancreas of the guinea pig. *The American journal of anatomy*. 1911; 12(3):308–311.
18. Martin WB. Neutral stains as applied to the granules of the pancreatic islet cells. *Anat Rec*. 1915; 9:475–481.
19. Bowie DJ. Cytological studies of the islets of Langerhans in a teleost, *Neomaenid griseus*. *Anat Rec*. 1924; 29(1):57–73.
20. Kunz J, Haberland H, Schmidt A et al. Immunhistochemischer Chromogranin A-Nachweis und morphometrische Befunde bei freihkindlicher Nesidioblastose. *Acta Histochem*. 1990; 89(2):131–140.
21. Cho JH, Tsai MJ. The role of BETA2/NeuroD1 in the development of the nervous system. *Molecular Neurobiology*. 2004; 30(1):35–47.
22. Oyama K, Sanno N, Teramoto A et al. Expression of neuro D1 in human normal pituitaries and pituitary adenomas. *Modern Pathology*. 2001; 14(9):892–899.
23. Cerf ME. Transcription factors regulating β -cell function. *European Journal of Endocrinology*. 2006; 155(5):671–679.
24. Itkin-Ansari P, Marcora E, Geron I et al. NeuroD1 in the endocrine pancreas: localization and dual function as an activator and repressor. *Developmental Dynamics*. 2005; 233(3):946–953.
25. Gu C, Stein GH, Pan N et al. Pancreatic β cells require NeuroD to achieve and maintain functional maturity. *Cell Metab*. 2010; 11(4):298–310.
26. Moin ASM, Butler AE. Alterations in beta cell identity in type 1 and type 2 diabetes. *Current Diabetes Reports*. 2019; 19:83.
27. Demirbilek H, Hatipoglu N, Gul U et al. Permanent neonatal diabetes mellitus and neurological abnormalities due to a novel homozygous missense mutation in *NEUROD1*. *Pediatric Diabetes*. 2018; 19(5):898–904.
28. Malecki MT, Jhala US, Antonellis A et al. Mutations in *NEUROD1* are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics*. 1999; 23(3):323–328.
29. Urakami T. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): current perspectives on diagnosis and treatment. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019; 12:1047–1056.
30. Mastracci TL, Wilcox CL, Arnes L et al. *Nkx2.2* and *Arx* genetically interact to regulate pancreatic endocrine cell development and endocrine hormone expression. *Dev Biol*. 2011; 359(1):1–11.
31. Chao CS, Loomis ZL, Lee JE et al. Genetic identification of a novel *NeuroD1* function in the early differentiation of islet α , PP and ϵ cells. *Dev Biol*. 2007; 312(2):523–532.
32. Salisbury RJ, Han B, Jennings RE et al. Altered phenotype of β -cells and other pancreatic cell lineages in patients with diffuse congenital hyperinsulinism in infancy caused by mutations in the ATP-sensitive K-channel. *Diabetes*. 2015; 64(9):3182–3188.
33. Doyle MJ, Sussel L. *Nkx2.2* regulates β -cell function in the mature islet *Diabetes*. 2007; 56(8):1999–2007.
34. Flanagan SE, De Franco E, Lango Allen H et al. Analysis of transcription factors key for mouse pancreatic development establishes *NKX2-2* and *MXN1* mutations as causes of neonatal diabetes in man. *Cell Metabolism*. 2014; 19(1):146–154.
35. Xia CQ, Zhang P, Li S et al. C-Abl inhibitor imatinib enhances insulin production by β cells: c-Abl negatively regulates insulin production via interfering with the expression of *NKx2.2* and *GLUT-2*. *PLoS One*. 2014; 9(5):e97694.
36. Anderson KR, Torres CA, Solomon K et al. Cooperative transcriptional regulation of the essential pancreatic islet gene *NeuroD1* (*beta2*) by *Nkx2.2* and *neurogenin 3*. *J Biol Chem*. 2009; 284(45):31236–31248.
37. Hill JT, Chao CS, Anderson KR et al. *Nkx2.2* activates the ghrelin promoter in pancreatic islet cells. *Mol Endocrinol*. 2010; 24(2):381–390.
38. Karlsson O, Thor S, Norberg T et al. Insulin gene enhancer binding protein *Isl-1* is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature*. 1990; 344(6269):879–882.
39. Guo T, Wang W, Zhang H et al. *ISL1* promotes pancreatic islet cell proliferation. *PLoS One*. 2011; 6(8):e22387.
40. Ediger BN, Du A, Liu J et al. *Isl-1* is essential for pancreatic b-cell function. *Diabetes*. 2014; 63(12):4206–4217.
41. Leonard J, Serup P, Gonzalez G et al. The LIM family transcription factor *Isl-1* requires cAMP response element binding protein to promote somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Biochemistry*. 1992; 89(14):6247–6251.
42. Yang Z, Zhang Q, Lu Q et al. *ISL-1* promotes pancreatic islet cell proliferation by forming an *ISL-1/Set7/9/PDX-1* complex. *Cell Cycle*. 2015; 14(24):3820–3829.

43. Chen J, Fu R, Cui Y et al. LIM-homeodomain transcription factor Isl-1 mediates kisspeptin's effect on insulin secretion in mice. *Mol Endocrinol*. 2014; 28(8):1276–1290.
44. Tanizawa Y, Riggs AC, Dagogo-Jack S et al. Isolation of the human LIM/homeodomain gene islet-1 and identification of a simple sequence repeat polymorphism. *Diabetes*. 1994; 43(7):935–941.
45. Krivova YS, Barabanov VM, Proshchina AE et al. Distribution of chromogranin A in human fetal pancreas. *Bull Exp Biol Med*. 2014; 156: 865–868.
46. Portela-Gomes GM, Gayen JR, Grimelius L et al. The importance of chromogranin A in the development and function of endocrine pancreas. *Regulatory Peptides*. 2008; 151(1–3):19–25.
47. Wollam J, Mahata S, Riopel M et al. Chromogranin A regulates vesicle storage and mitochondrial dynamics to influence insulin secretion. *Cell Tissue Res*. 2017; 368(3):487–501.
48. Tatemoto K, Efendic S, Mutt V et al. Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature*. 1986; 324(6096):476–478.
49. Yasoshima H, Nakata Y, Ohkubo E et al. An autopsy case of pancreatic and ectopic nesidioblastosis *Pathology International*. 2001; 51(5):376–379.
50. Shao S, Zeng Z, Hu S. An observational analysis of insulinoma from 1 single institution. *QJM*. 2018; 111(4):237–241.
51. Portela-Gomes GM, Stridsberg M. Selective processing of chromogranin A in the different islet cells in human pancreas. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2001; 49(4):483–490.
52. Ege B, Dinc T, Kayilioglu SI et al. Expression of nestin and chromogranin in regeneration zones of rat pancreas. *Ann Ital Chir*. 2017; 88:76–81.
53. Moin ASM, Cory M, Choi J et al. Increased Chromogranin A-positive hormone-negative cells in chronic pancreatitis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018; 103(6):2126–2135.
54. Ribeiro MJ, De Lonlay P, Delzescaux T et al. Characterization of hyperinsulinism in infancy assessed with PET and 18F-fluoro-L-DOPA. *J Nucl Med*. 2005; 46(4):560–566.
55. Laje P, States LJ, Zhuang H et al. Accuracy of PET/CT Scan in the diagnosis of the focal form of congenital hyperinsulinism. *J Pediatr Surg*. 2013; 48(2):388–393.
56. Zhang Y, Zheng R, Meng X et al. Pancreatic endocrine effects of dopamine receptors in human islet cells. *Pancreas*. 2015; 44(6):925–929.
57. Beaulieu JM, Espinoza S, Gainetdinov RR. Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. *British journal of pharmacology*. 2015; 172(1):1–23.
58. Bucolo C, Leggio GM, Drago F et al. Dopamine outside the brain: The eye, cardiovascular system and endocrine pancreas. *Pharmacology & Therapeutics*. 2019; 203:107392.
59. Underland LJ, Mark ER, Katikaneni R et al. The impact of dopamine on insulin secretion in healthy controls. *Indian Journal of Critical Care Medicine*. 2018; 22(4):209–213.
60. Ste Marie L, Palmiter RD. Norepinephrine and epinephrine-deficient mice are hyperinsulinemic and have lower blood glucose. *Endocrinology*. 2003; 144(10):4427–4432.
61. Freyberg Z, Aslanoglou D, Shah R et al. Intrinsic and antipsychotic drug-induced metabolic dysfunction in schizophrenia. *Frontiers in Neuroscience*. 2017; 11:432.
62. Farino ZJ, Morgenstern TJ, Maffei A et al. New roles for dopamine D₂ and D₃ receptors in pancreatic beta cell insulin secretion *Mol Psychiatry*. 2019.
63. Garcia Barrado MJ, Iglesias Osma MC, Blanco EJ et al. Dopamine modulates insulin release and is involved in the survival of rat pancreatic beta cells. *PLoS One*. 2015; 10(4):e0123197.
64. Sakano D, Choi S, Kataoka M et al. Dopamine D2 receptor-mediated regulation of pancreatic β cell mass. *Stem cell reports*. 2016; 7(1):95–109.
65. Rorsman P, Huising MO. The somatostatin-secreting pancreatic δ -cell in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2018; 14(7):404–414.
66. Hermansen K, Lindskog S, Åhrén B. Stimulation of somatostatin secretion by 3-O-methylglucose in the perfused dog pancreas. *Int J Pancreatol*. 1996; 20(2):103–107.
67. Adriaenssens AE, Svendsen B, Lam BY et al. Transcriptomic profiling of pancreatic alpha, beta and delta cell populations identifies delta cells as a principal target for ghrelin in mouse islets. *Diabetologia*. 2016; 59(10):2156–2165.
68. Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 1999; 20(3):157–198.
69. Braun M, Ramrachea R, Bengtsson M et al. Gamma-aminobutyric acid (GABA) is an autocrine excitatory transmitter in human pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2010; 59(7):1694–1701.
70. Briant LJB, Reinbothe TM, Spiliotis I et al. δ -cells and β -cells are electrically coupled and regulate α -cell activity via somatostatin. *J Physiol*. 2018; 596(2):197–215.
71. Braun M. The somatostatin receptor in human pancreatic β -cells. *Vitamins & Hormones*. 2014; 95:165–193.

Информация об авторах:

Перминова Анастасия Аркадьевна, аспирант, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Perminova Anastasiia A., PhD Student, Almazov National Medical Research Centre.

NOTCH-ЗАВИСИМАЯ АКТИВАЦИЯ ОСТЕОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК ПЕРИОДОНТА

Семенова Д. С.^{1,2}, Костина А. С.^{1,2}, Мустаева А. М.³,
Клаузен П. Е.¹, Добрынин М. А.², Боярская Н. В.⁵,
Домбровская Ю. А.⁴, Малашичева А. Б.^{1,2}, Енукашвили Н. И.^{2,4}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург,
Россия

³Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Северо-Западный
государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Санкт-Петербург, Россия

⁵Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Российский государственный
педагогический университет им. А. И. Герцена», Санкт-Петербург,
Россия

Контактная информация:

Семенова Дарья Сергеевна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: daria.semenova1994@gmail.com

Статья поступила в редакцию 20.12.2019
и принята к печати 17.05.2020.

Резюме

Актуальность и цель. Стволовые клетки периодонта — перспективный материал для стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. Сигнальный путь Notch является одним из ключевых в отношении поддержания стволовых и дифференцировочных свойств стволовых клеток. Целью данной работы было выяснить, каким образом сигнальный путь Notch влияет на остеогенный потенциал периодонтальных стволовых клеток (СК). **Материалы и методы.** В работе использовали лентивирусную трансдукцию периодонтальных СК, добавляя различные количества вируса (1, 3, 5, 15 MOI), несущего последовательность, кодирующую активированный внутриклеточный домен рецептора Notch1 — NICD. С помощью метода ПЦР в реальном времени анализировали изменения уровней экспрессии остеогенных маркеров (*RUNX2*, *COL1A1*, *OGN*, *POSTN*) в зависимости от силы активации сигнального пути Notch. Мы определяли степень активации Notch, детектируя уровень экспрессии гена-мишени — *HEY1* — через 48 и 120 часов после индукции остеогенной дифференцировки. Используя методику экстракции красителя алizarинового красного, проводили количественную оценку интенсивности минерализации культур периодонтальных СК на финальной стадии остеогенной дифференцировки. **Результаты.** Установлено, что активация сигнального пути Notch ведет к усилению экспрессии остеогенных маркеров уже на ранних этапах индукции остеогенной дифференцировки, что, в свою очередь, приводит к развитию финальной стадии остеогенной дифференцировки, характеризующейся формированием кальцификатов. Более того, чем большее количество лентивирусных частиц было использовано при трансдукции клеток, тем,

соответственно, интенсивнее был изначальный запуск Notch, и в ответ на это мы отмечали более эффективное прохождение процессов остеогенной дифференцировки клеток. **Заключение.** Активация сигнального пути Notch приводит к повышению остеогенного потенциала периодонтальных СК дозозависимым образом и индуцирует в клетках процессы, связанные с накоплением кальцификатов, интенсивность образования которых напрямую зависит от «силы сигнала» Notch. Полученные в данной работе результаты убеждают в том, что Notch способен модулировать остеогенную дифференцировку, влияя на ее эффективность, по-видимому, за счет интенсивности сигнала, передающегося от одной клетки к другой.

Ключевые слова: остеогенная дифференцировка, периодонтальные стволовые клетки, сигнальный путь Notch.

Для цитирования: Семенова Д.С., Костина А.С., Мустаева А.М. и др. Notch-зависимая активация остеогенного потенциала клеток периодонта. Трансляционная медицина. 2020;7(2): 21–32. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-2-21-32.

NOTCH-DEPENDENT ACTIVATION OF PERIODONTAL CELLS OSTEOGENIC POTENTIAL

Semenova D. S.^{1,2}, Kostina A. S.^{1,2}, Mustaeva A. M.^{1,3},
Klauzen P. E.¹, Dobrynin M. A.², Boyarskaya N. V.⁵,
Dombrovskaya Yu. A.⁴, Malashicheva A. B.^{1,2}, Erukashvily N. I.^{2,4}

¹Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

²Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia

³Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

⁴North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

⁵The Herzen State Pedagogical University of Russia, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Semenova Daria S.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: daria.semenova1994@gmail.com

Received 20 December 2019; accepted
17 May 2020.

Abstract

Background and objective. Periodontal stem cells are a promising material for dentistry and maxillofacial surgery. In this work, we sought to find out how Notch signaling pathway affects the osteogenic potential of periodontal ligament stem cells (PDLSC). **Design and methods.** In order to verify this, we used lentiviral transduction of PDLSC, adding various amounts of the virus bearing the activated intracellular domain of the Notch1 receptor, NICD. Using real-time PCR, we analyzed the dependence of changes in the expression levels of osteo-markers (*RUNX2*, *COL1A1*, *OGN*, *POSTN*) on the activation strength of Notch signaling pathway, based on the expression of the target gene — *HEY1*, in the early stages of differentiation, after 48 and 120 hours after induction of osteogenic differentiation. In addition, using the technique of Alizarin red extraction, we were able to quantify the intensity of mineralization of periodontal MSCs at the final stage of osteogenic differentiation. **Results.** We found that activation of Notch signaling pathway leads to increased expression of osteogenic markers in the early stages of osteogenic differentiation induction, which in turn leads to the development of the final stage of osteogenic differentiation, characterized by the formation of calcification. Moreover, the more intensive the initial level of Notch, the stronger and more effective were the processes of osteogenesis. **Conclusion.** In this

work, we showed that activation of Notch signaling pathway leads to an increase in the osteogenic potential of periodontal PDLSC in a dose-dependent manner and induces in the cells processes associated with the accumulation of calcifications, the intensity of formation of which directly depends on the “strength” of Notch signal. The results obtained in this work convince us that Notch is able to modulate osteogenic differentiation, affecting its effectiveness, apparently due to the strength of the signal that is transmitted to the cells.

Key words: Notch signaling pathway, osteogenic differentiation, periodontal stem cells.

For citation: Semenova DS, Kostina AS, Mustaeva AM et al. Notch-dependent activation of periodontal cells osteogenic potential. *Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine*. 2020;7(2): 21–32. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-2-21-32.

Список сокращений: СК — стволовые клетки, CD — кластер дифференцировки (Clusters of Differentiation), GFP — зеленый флуоресцирующий белок (Green Fluorescent Protein), MOI — единицы лентивирусной инфекции, NICD — активированный внутриклеточный домен рецептора Notch1, PDLSC — периодонтальные стволовые клетки (Periodontal Ligament Stem Cells).

Остеогенная дифференцировка является строго регулируемым процессом, осуществляемым специализированными клетками, в том числе остеобластами. Факторы, активирующие широкий спектр генов и клеточных сигнальных путей на ранних стадиях остеогенеза как в норме, так и при патологической кальцификации, остаются предметом активных исследований. Расшифровка ранних механизмов запуска остеогенной дифференцировки важна для потенциальной возможности контролировать данные процессы для индукции остеогенеза, когда необходимо формирование кости, либо же, напротив, для профилактики различных патологических состояний, связанных с эктопической кальцификацией тканей [1].

Стволовые клетки периодонта являются перспективным материалом для применения в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. Эти клетки играют ключевую роль в регенерации периодонтальных тканей: альвеолярной кости, периодонтальных связок и зубного цемента. По своему происхождению эти клетки отличаются от мезенхимных стромальных клеток, они происходят из «нервного гребня», поэтому их часто классифицируют как эктомезенхимные клетки. Эктомезенхимные клетки — это клетки эктодермального происхождения, приобретшие фенотип мезенхимных стволовых клеток в результате эктомезенхимного перехода в эмбриогенезе. Характерной особенностью стволовых клеток периодонта является их способность дифференцироваться

в клетки, синтезирующие зубной цемент, а также в остеобласты. Еще одной чертой стволовых клеток периодонта является их способность к остеогенной дифференцировке вне зависимости от возраста донора. При этом источником для получения таких клеток могут быть молочные зубы во время физиологической смены, удаляемые по ортодонтическим показаниям постоянные зубы (чаще всего третьи моляры), сохранившиеся на них фрагменты тканей периодонта и зубного фолликула, а также фрагменты периодонта, удаляемые во время операций, так называемые «утилизируемые» ткани. Таким образом, все эти особенности делают стволовые клетки периодонта перспективной и уникальной моделью для изучения механизмов остеогенной дифференцировки [2].

Сигнальный путь Notch — эволюционно-консервативный сигнальный путь, который регулирует определение клеточной судьбы, дифференцировку и гомеостаз тканей как в развитии, так и во взрослом организме [3]. Белки Notch представляют собой трансмембранные рецепторы с большим внеклеточным доменом, за которым следует более короткая часть, пронизывающая мембрану, и внутриклеточный домен рецептора (NICD), активирующий транскрипцию. Находясь на поверхности клеточной мембраны, внеклеточный домен рецептора доступен для взаимодействия с лигандами, принадлежащими к Delta (Dll1-4) или Jagged (Jag1 и Jag2) семействам. Эти лиганды экспрессируются на поверхности соседних клеток, и для обеспечения проведения сигнала необходим контакт клетка–клетка. В результате лиганд-рецепторного взаимодействия происходит высвобождение NICD, который перемещается в ядро принимающей сигнал клетки [4–6]. В ядре NICD напрямую связывается с ДНК-связывающим белком CSL (CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1) [7]. Основными транскрипционными мишенями активации Notch считают белки Hes и Hey [8]. Тем не менее спектр

прямых мишеней Notch является весьма широким и тканеспецифичным, включая Snail1, p21, c-Myc, EphrinB2 и Nrarp [9–14].

Интерес к роли сигнального пути Notch в про-остеогенных событиях в процессе развития и заживления кости вырос за последнее десятилетие. Однако интерпретация данных, полученных на различных экспериментальных моделях, таких как трансгенные мыши и клеточные линии разного происхождения, а также использование различных способов активации Notch, приводит к противоречиям во мнениях относительно того, способствует ли активация Notch остеогенной дифференцировке клеток или же, напротив, приводит к угнетению остеогенеза.

Делеция или мутация одного или нескольких генов сигнального пути Notch приводит к развитию тяжелых аномалий скелета у людей и в мышечных моделях [15]. Мутации в генах Jagged-1 (Jag1) или Notch2 вызывают у людей синдром Аладжиля, аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся развитием остеопении и повышением риска возникновения переломов. Доминантно-позитивные активирующие Notch2 мутации вызывают синдром Хайду-Чейни, который также имеет измененный фенотип скелета [15]. На клеточных культурах было показано, что активация сигнального пути Notch может как индуцировать [16–19], так и ингибировать [20–22] дифференцировку и минерализацию остеобластов.

В мышечных клетках преостеобластов Notch подавляет созревание остеобластов путем связывания NICD или генов-мишеней Notch *HES1* и *HEY1* с *RUNX2* [21, 23, 24]. Недавние работы с использованием клеточных моделей показали, что Notch способствует остеогенной дифференцировке [1, 25–29].

Таким образом, такие противоречивые результаты не дают возможности однозначно ответить на вопрос о роли Notch в остеогенной дифференцировке.

Сигнальный путь Notch характеризуется тканеспецифичностью [30, 31]. Чувствительность к дозе гена была показана для сигнального пути Notch в некоторых экспериментальных системах [31], однако данных в сфере остеогенной дифференцировки немного [1].

Целью данной работы было выяснить, каким образом сигнальный путь Notch влияет на остеогенный потенциал периодонтальных стволовых клеток на раннем этапе индукции дифференцировки — после 48 и 120 часов после запуска остеогенеза. Кроме того, необходимо было определить, существует ли дозозависимость влияния акти-

вации Notch на финальную стадию остеогенной дифференцировки, которая характеризуется накоплением кальциевых отложений на модели клеточных линий. Для того чтобы проверить это, мы использовали лентивирусную трансдукцию периодонтальных СК с разным количеством вирусных частиц, несущих последовательность, кодирующую активированный внутриклеточный домен рецептора Notch — NICD. Мы показали, что NICD значительно повышает остеогенный потенциал и минерализацию культур периодонтальных СК дозозависимым образом.

Материалы и методы

Клеточная культура и дифференцировка

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствовали этическим стандартам локального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

В качестве основного материала для исследования были использованы стволовые клетки (СК) периодонта человека. Первичные культуры СК от доноров ($n = 2$) без системных заболеваний и заболеваний периодонта, при отсутствии кариеса выше средней степени, заболеваний пародонта, дентиклей. Средний возраст доноров составлял $15 \pm 3,2$ года. Для каждого донора было получено информированное согласие самого донора (при возрасте > 18 лет) или его представителей (для несовершеннолетних пациентов). Клетки выделяли ферментативным методом из фрагментов периодонтальных связок, срезаемых с удаляемых зубов (третьих моляров, показания к удалению — ретенция и/или дистопия).

Среда для культивирования СК периодонта содержала: альфа-МЕМ (Панэко, Россия), 10 % бычьей сыворотки Hyclone (Gibco, США), 1 % пенициллин/стрептомицин (Invitrogen, США) и 1 % L-глутамин (Invitrogen, США).

Иммунофенотипирование клеток проводили с использованием проточного цитометра Navios (Beckman Coulter) с использованием полупроводниковых диодных лазеров 488 и 638 нм. Использовали следующие панели моноклональных антител (Beckman Coulter) для определения положительных и отрицательных маркеров иммунофенотипа мезенхимных стромальных клеток, характерного и для периодонтальных СК: CD44-FITC/CD73-PE/CD9-PC5/CD105-PC7 и CD34-FITC/CD117-PE/CD14-PC5/CD45-PC7. Гейтирование графиков флуоресценции клеточных маркеров проводили по «живым» клеткам (выделены по параметрам прямого и бокового

светорассеяния и окрашиванию 7-аминоактиномицином). Границы аутофлуоресценции определяли по неокрашенному контрольному образцу.

Для дифференцировки в остеогенном направлении использовали клетки второго-пятого пассажей, находящиеся в логарифмической фазе роста. За сутки до индукции дифференцировки клетки сеяли на 12- или 24-луночные планшеты в необходимой плотности (70×10^3 клеток/см²), трансдуцировали различным количеством лентивирусных частиц (1, 3, 5, 15 MOI). Для запуска остеогенной дифференцировки клеток использовали следующие факторы: 0,1 мкМ дексаметазона, 50 мкМ аскорбиновой кислоты и 10 мМ β -глицеролфосфата (Sigma, США). Дифференцировка клеток проходила в течение 18–21 дня. Смену дифференцировочной среды проводили каждые 3 дня.

В качестве контроля в экспериментах использовали незараженные клетки, в которых была запущена дифференцировка, а также интактные культуры, в которых остеогенная дифференцировка не была индуцирована.

Производство лентивирусных частиц

В основе метода по производству лентивирусных частиц лежит протокол, разработанный в лаборатории Д. Трно и модифицированный в нашей лаборатории [33]. Нарботка лентивирусных частиц осуществлялась в клетках линии HEK293-T. Клетки данной линии культивировали в среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 10 % бычьей сыворотки (Gibco, США), 1 % пенициллин/стрептомицин (Invitrogen, США), 1 % L-глутамин (Invitrogen, США) в инкубаторе с 5 % CO₂ при 37 °C.

Первый этап производства лентивирусных частиц заключался в методе с использованием реагента PEI. К 15 мкг векторной плазмиды, содержащей ген интереса — *NICD*, добавляли 9,73 мкг плазмиды psPAX2 и 5,27 мкг плазмиды pMD2.G, перемешивали и добавляли к 500 мкл DMEM, содержащим 60 мкл PEI. Смесь инкубировали 10–15 минут при комнатной температуре, затем раствор по каплям добавляли к клеткам. Клетки инкубировали в течение 12–17 часов, после чего среду меняли на 7 мл свежей среды. Через сутки проводили концентрирование вирусных частиц путем ультрацентрифугирования, концентрированные таким образом вирусные частицы ресуспендировали в 1 % BSA/PBS и замораживали при –80 °C. Титр вируса определялся по GFP-экспрессирующему вирусу, который производили параллельно с вирусом, несущим ген, кодирующий *NICD*; эффективность трансдукции СК периодонта вирусом, несущим ген GFP, была 85–90 %.

Окраска дифференцированных в остеогенном направлении СК периодонта

На 18–21 день после запуска остеогенной дифференцировки клетки окрашивали красителем ализариновым красным (Sigma, США), который специфически связывается с отложениями фосфата кальция.

Для окраски клеток удаляли среду и промывали клетки PBS, затем фиксировали клетки холодным раствором 70 % этанола и инкубировали в течение 30–60 минут при комнатной температуре. Затем клетки дважды промывали водой и добавляли краситель, клетки инкубировали с красителем в течение 20 минут. После этого краситель удаляли и лунки промывали несколько раз водой. По результатам окраски проводили качественную и количественную оценку интенсивности прохождения остеогенной дифференцировки периодонтальных СК.

Количественная оценка интенсивности остеогенной дифференцировки СК периодонта

В лунки с окрашенными ализариновым красным клетками добавляли раствор 10 % уксусной кислоты, затем инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Количественную оценку проводили спектрофотометрически, для этого отбирали 50 мкл экстракта и измеряли поглощение с использованием спектрофотометра (Biorad, США). Необходимая длина волны проходящего пучка света — 420 нм.

ПЦР в реальном времени

РНК из культивируемых клеток выделяли с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Россия). Тотальная РНК (1 мкг) была обратнo транскрибирована при помощи набора MMLV RT (Евроген, Россия). ПЦР в реальном времени проводили в термоциклере ABI 7500 (Applied Biosystems, США) со следующими температурными условиями: 10 минут при 95 °C, 15 секунд при 95 °C и 1 минуту при 60 °C в течение 40 циклов с охлаждением в конце до 4 °C. Для проведения ПЦР были использованы специфичные прямые и обратные праймеры для генов интереса (*HEY1* F: TGGATCACCTGAAAATGCTG; R: CGAAATCCCAAACCTCCGATA. *RUNX2*: F: GAGTGGACGAGGCAAGAGT; R: GGGTTCCCGAGGTCCATCTA. *COL1A1*: F: GACCTAAAGGTGCTGCTGGAG; R: CTTGTTACCTCTCTCGCCA. *OGN*: F: GGCAATAACACCATTTACCTCCC; R: AGGGTGGTACAGCATCAATGT. *POSTN*: F: CCCAGCAGTTTTGCCCAT; R: TGTGGTGGCTCCCACGAT.) Уровень экс-

прессии исследуемого гена нормализовали по уровню экспрессии референсного гена *GAPDH* (F: AATGAAGGGGTCATTGATGG; R: AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA). Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения 7500 Software v2.0.6 и были получены значения *Ct* для каждого гена. Построение кривой плавления было выполнено, чтобы убедиться, что продукт состоял из одного ампликона. Пороговые и базовые значения флуоресценции были установлены в соответствии с инструкциями производителя (SABiosciences, Qiagen, США). Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения Qiagen (<http://www.sabiosciences.com/pct/arrayanalysis.php>). Изменение уровней экспрессии генов (по сравнению с контрольными образцами) рассчитывали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$. Все эксперименты были выполнены в трех независимых биологических повторах.

Информацию, полученная при помощи метода ПЦР в реальном времени, обрабатывали с использованием программ Microsoft Excel и GraphPad Prism. Данные в результатах представлены в виде среднего по всем проведенным экспериментам.

Иммуноблотинг

Для подтверждения присутствия NICD в СК периодонта использовали стандартный метод иммуноблотинга. Сначала клетки культивировали 48 часов, промывали PBS, затем лизировали в 75 мкл лизирующего буфера (50 mM TrisHCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 % дезоксихолат, 1 % тритон, 0,1 % коктейль ингибиторов протеаз Rouché), инкубировали 30 минут на льду и осаждали на цен-

трифуге (4 °C, 10 минут, 14000 g). К полученному супернатанту добавляли 25 мкл буфера для внесения (4×SDS буфер) с β-меркаптоэтанолом (1,7 мкл). Далее пробы кипятили при 95 °C в течение 5 минут и наносили в 10 % полиакриламидный гель. Электрофорез осуществляли в электрофоретической камере (BioRad, США) при режиме: 20 mA — в концентрирующем геле, 40 mA — в разрывающем геле. Затем пробы переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану, в качестве буфера для переноса использовали трис-глициновый буфер с 20 % метанола, при 100 V в течение одного час. Все последующие отмывки проводили в растворе PBS/0.1 % Tween-20. Для блокирования неспецифического окрашивания использовали раствор 5 % молоко/PBS/0.1 % Tween-20). Мембрану инкубировали с первичными антителами к белку NICD и B-actin (Santa Cruz, США; 1:200) в течение 16 часов при 4 °C и 1 час при комнатной температуре со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (BioRad, США; 1:5000). Детекцию осуществляли с помощью системы усиленной хемилюминесценции (Thermo Scientific, США) на приборе ChemiDoc (BioRad, США).

Результаты

По данным иммунофенотипирования, свыше 95 % клеток экспрессировали поверхностные маркеры CD90⁺/CD105⁺/CD73⁺/CD44⁺/CD45⁻/CD117⁻/CD34⁻ (табл. 1). Таким образом, полученная культура клеток обладала иммунофенотипом, сходным с фенотипом мезенхимных стволовых клеток. Небольшой процент CD117⁺ и CD45⁺ клеток демонстрировал низкую интенсивность флюо-

Таблица 1. Иммунофенотипирование стволовых клеток периодонта
(данные представлены в виде среднего и ошибки среднего по результатам измерений в трех независимо окрашенных пробах)

Поверхностный маркер	Процент позитивных клеток	Интенсивность флуоресценции*
CD90	95,6 ± 1,4	59,7 ± 6,8
CD105	99,2 ± 0,9	117 ± 2,9
CD73	99,2 ± 0,5	336,0 ± 5,4
CD44	99,4 ± 0,6	76,1 ± 5,4
CD45	1,8 ± 0,5	2,07 ± 0,2
CD14	1,2 ± 0,7	2,99 ± 0,4
CD117	2,0 ± 1,1	1,14 ± 0,8
CD34	0	0

Примечание: * — интенсивность флуоресценции представлена в относительных единицах флуоресценции (relative fluorescence units, RFU)

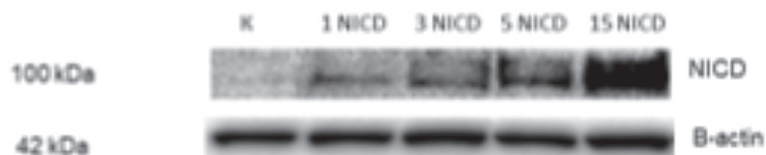


Рис. 1. Выявление экзогенного NICD в недифференцированных СК периодонта, трансдуцированных различными дозами (1, 3, 5, 15 MOI) вируса, несущего последовательность, кодирующую домен NICD. В качестве контроля — детекция белка B-actin. Различные объемы вируса — 1, 3, 5, 15 — соотносятся с показателем количества вирусных единиц (MOI)

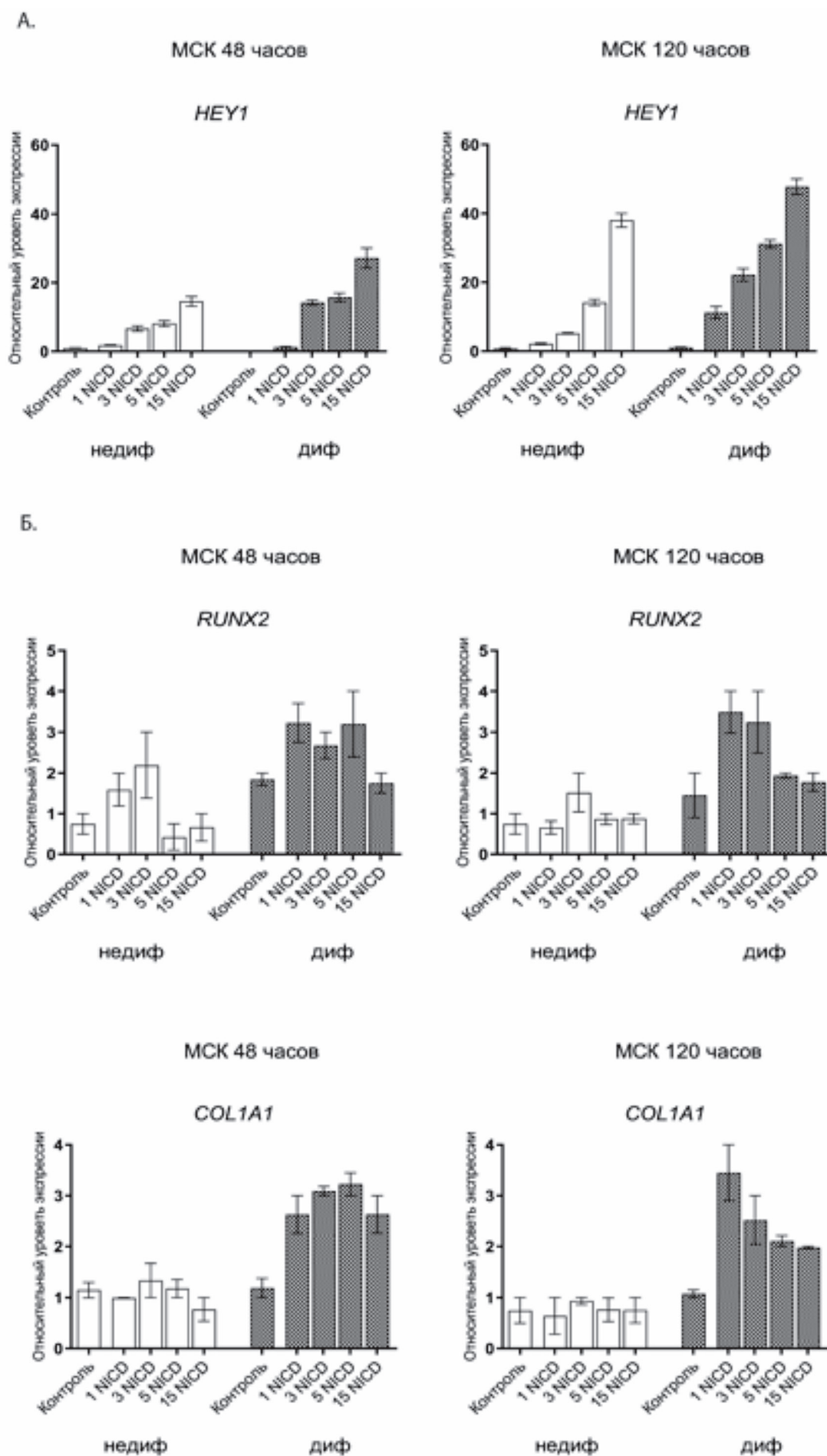
ресценции (1–2 относительных единицы флуоресценции на клетку), поэтому данное окрашивание не может рассматриваться как достоверный результат и может являться артефактом измерения.

Для анализа влияния сигнального пути Notch на остеогенный потенциал стволовых клеток периодонта мы заразили периодонтальные СК лентивирусными частицами, несущими последовательность, кодирующую активированный внутриклеточный домен рецептора Notch1 — NICD. В первую очередь была проведена оценка, действительно ли происходит синтез белка в ответ на введение NICD в недифференцированные клетки. Для того чтобы доказать, что при увеличении количества вносимого в клетки лентивируса в СК периодонта увеличивается экспрессия, а затем и продукция белка NICD, который в свою очередь влияет на запуск транскрипции гена-мишени Notch — *HEY1*, мы заразили клетки различными дозами вируса (1, 3, 5, 15 MOI), несущего последовательность, кодирующую NICD. При помощи иммуноблотинга было показано, что при введении экзогенного NICD синтез белка происходил дозозависимым образом (рис. 1).

Наша гипотеза, основанная на полученных ранее данных о ключевом влиянии активации Notch на процессы остеогенной дифференцировки в мезенхимных стволовых клетках [1], состояла в том, что различное количество вносимых вирусных частиц приводит к дозозависимому усилению остеогенной дифференцировки СК периодонта. Чтобы проверить так ли это, мы заразили клетки различными дозами вируса (1, 3, 5, 15 MOI), несущего последовательность, кодирующую NICD, после чего проанализировали изменения уровней экспрессии остеогенных маркеров в клетках, в которых была запущена остеогенная дифференцировка, и контрольных клетках через 48 и 120 часов после начала эксперимента (рис. 2). Было отмечено дозозависимое усиление экспрессии гена-мишени сигнального пути Notch — *HEY1* в ответ на вне-

сение в клетки большей концентрации вирусных частиц, кодирующих NICD — 1, 3, 5, 15 MOI (рис. 2А). Очевидно, что экспрессия *HEY1* сильнее через 120 часов после индукции остеогенной дифференцировки по сравнению с 48 часами. Кроме того, мы наблюдали, что активация сигнального пути Notch при индукции в клетках остеогенной дифференцировки приводила к усилению уровней экспрессии некоторых остеогенных маркеров — *RUNX2*, *COL1A1*, *OGN*, *POSTN* (рис. 2Б). Уровни экспрессии остеомаркеров через 120 часов после начала дифференцировки были выше, чем через 48 часов, что соответствовало усилению активности сигнального пути Notch в СК периодонта. Таким образом, можно говорить о взаимосвязи между уровнем активации сигнального пути Notch и уровнями экспрессии генов-участников ранних этапов остеогенной дифференцировки периодонтальных СК.

На следующем этапе мы проанализировали влияние активации сигнального пути Notch на интенсивность кальцификации клеток *in vitro*. Мы показали, что внесение в клетки экзогенного NICD при индукции остеогенной дифференцировки приводило к дозозависимому увеличению накопления отложений фосфатов кальция, детектируемых специфическим красителем ализариновым красным (рис. 3А). Для количественной оценки интенсивности минерализации культур периодонтальных СК был использован метод экстракции ализаринового красного уксусной кислотой с последующим спектрофотометрическим измерением полученных экстрактов (рис. 3Б). Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что активация сигнального пути Notch может приводить к усилению экспрессии остеогенных маркеров уже на ранних этапах индукции остеогенной дифференцировки, таким образом участвуя в формировании кальцификатов. Более того, чем сильнее была активация сигнального пути Notch,



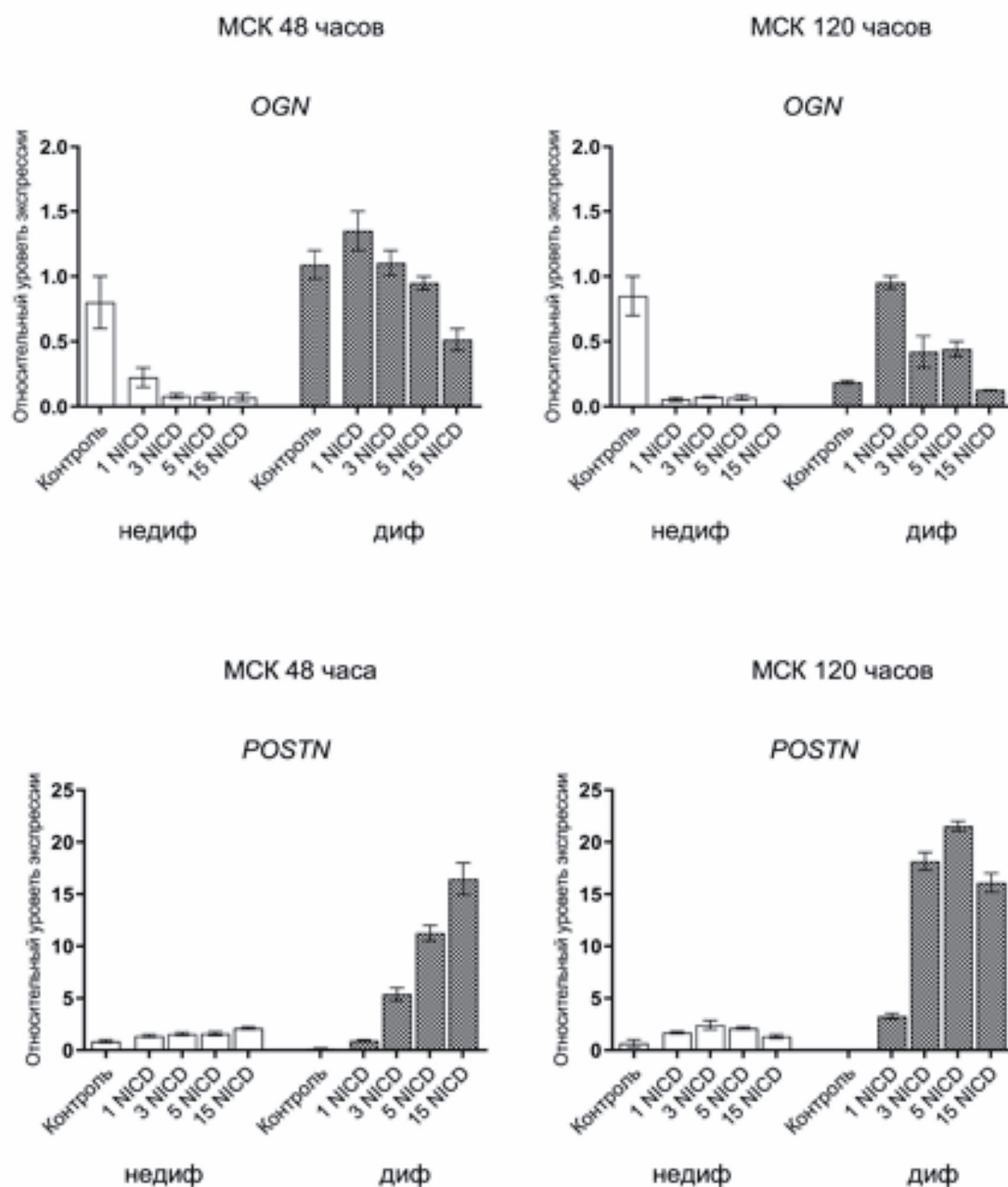
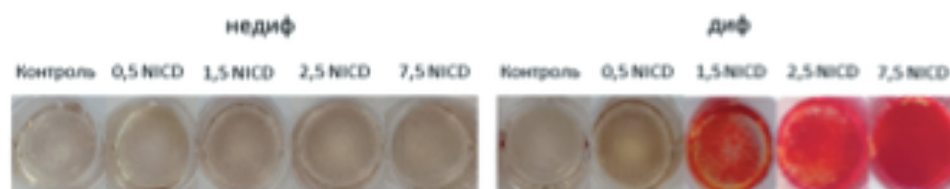


Рис. 2.

NICD дозозависимым образом влияет на остеогенный потенциал СК, полученных из периодонта. СК были трансдуцированы различным количеством лентивирусных частиц, несущих внутриклеточный домен рецептора Notch1 — NICD, после чего через 48 и 120 часов было проведено сравнение уровней экспрессии некоторых генов в контрольных клетках, а также в клетках, в которых была запущена остеогенная дифференцировка. Различные объемы вируса — 1, 3, 5, 15 — соотносятся с показателем количества вирусных единиц (MOI):

А — уровень экспрессии гена-мишени Notch — *HEY1* в контрольных и дифференцированных в остеогенном направлении СК, трансдуцированных различным количеством NICD; Б — уровни экспрессии некоторых остеогенных маркеров (*RUNX2*, *COL1A1*, *OGN*, *POSTN*) в контрольных и дифференцированных в остеогенном направлении СК, трансдуцированных различным количеством NICD

A



Б.

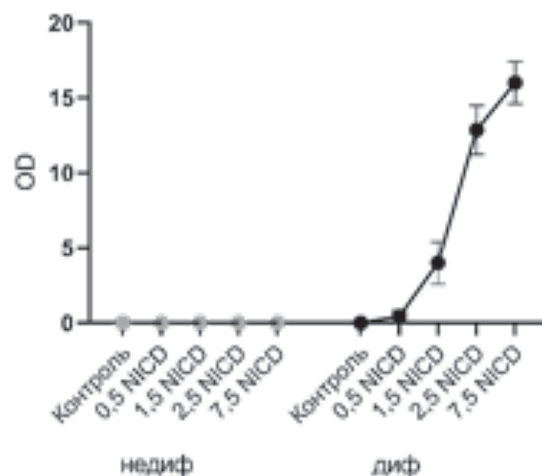


Рис. 3. NICD дозозависимым образом влияет на интенсивность минерализации СК, полученных из периодонта. СК были трансдуцированы различным количеством лентивирусных частиц, несущих внутриклеточный домен рецептора Notch1 — NICD:

А — окрашивание культур периодонтальных СК ализариновым красным через 21 день после трансдукции клеточных культур различными дозами вируса (0,5; 1,5; 2,5; 7,5 MOI), несущего последовательность, кодирующую NICD, при индукции остеогенной дифференцировки и в отсутствие дифференцировки; Б — измерение интенсивности окрашивания ализариновым красным культур СК, трансдуцированных различными количествами вируса, несущего последовательность, кодирующую NICD; длина волны — 420 нм; OD — оптическая плотность

в зависимости от увеличения дозы вносимого лентивируса (1, 3, 5, 15 MOI), тем сильнее и эффективнее проходили процессы остеогенной дифференцировки. Это подтверждают повышенные уровни экспрессии остеомаркеров на начальных этапах остеодифференцировки и интенсивные процессы образования отложений кальция на поздних этапах остеодифференцировки.

Обсуждение

Известно, что роль сигнального пути Notch во многом определяется клеточным окружением. Сигнальный путь Notch опосредует широкий спектр молекулярных событий, протекающих на всех этапах развития организма, таким образом непосредственно участвуя в поддержании его гомеостаза. Потому неудивительно присутствие в литературе множества противоречивых данных о роли и специфике действия сигнального пути Notch [34, 35]. Одни авторы придерживаются мнения, что сигнальный путь Notch подавляет дифференцировку

мезенхимных предшественников в остеобласты и остеокласты, таким образом нарушая согласованный процесс ремодуляции костной ткани, в ходе которого отмечена активность остеобластов, продуцирующих новый матрикс, и остеокластов, резорбирующих костную ткань [34]. В то же время другие исследователи считают, что результатом активации сигнального пути Notch, напротив, может быть индукция остеогенной дифференцировки клеток [1, 25]. Имея опыт работы с различными клеточными культурами и зная о том, что активация и характер влияния сигнального пути Notch зависит от окружения и от модельной системы, используемой в работе, мы ставили своей целью расшифровать механизмы и найти белки, индуцирующие остеогенную дифференцировку в клетках, как при физиологическом образовании кости, так и при патологической кальцификации тканей. На сегодняшний день известно, что механизмы у этих двух процессов сходны и немаловажная роль в них отведена сигнальному пути Notch. Наше исследование,

направленное на изучение влияния Notch на процессы остеогенной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток, полученных из жировой ткани человека, показало, что данный сигнальный путь вовлечен в молекулярные события, связанные с индуцированием и усилением процессов дифференцировки мезенхимных стволовых клеток [1]. Кроме того, исследования, проводимые на интерстициальных клетках аортального клапана человека, дали нам возможность говорить о том, что связанные с Notch процессы играют важную роль в механизмах кальцификации аортального клапана [35].

В данной работе мы показали, что активация сигнального пути Notch приводит к повышению остеогенного потенциала СК периодонта дозозависимым образом и индуцирует в клетках процессы, связанные с накоплением кальцификатов, интенсивность образования которых зависит от уровня активации Notch.

Полученные в данной работе результаты подтверждают, что сигнальный путь Notch регулирует остеогенную дифференцировку, влияя на ее эффективность, по-видимому, за счет силы сигнала, который передается клеткам. В используемой экспериментальной системе это было осуществлено при помощи дозирования количества вносимого лентивируса.

Возможность «управлять» остеогенной дифференцировкой является важной, так как, с одной стороны, в целях регенеративной медицины требуется эффективное наращивание костной ткани, в том числе и при помощи остеогенной дифференцировки СК. С другой стороны, нежелательная остеогенная дифференцировка и кальцификация тканей является основой патогенеза многих сердечно-сосудистых заболеваний (склеротические заболевания сосудов, миокарда, кальцификация аортального клапана), и возможность предотвращать такую дифференцировку при помощи модуляции клеточных сигналов, в том числе сигнального пути Notch, является актуальной задачей медицины. Учитывая разнонаправленность влияния сигнального пути Notch в разных тканях организма, использование релевантной модельной системы роли сигнального пути Notch определяется поставленной научной задачей. Полученные данные позволяют утверждать, что сигнальный путь Notch участвует в определении соотношения стволовых и дифференцированных клеток в популяции периодонтальных стволовых клеток. Более того, под влиянием остеогенных стимулов сигнальный путь Notch индуцирует и способствует усилению остеогенной дифференцировки СК периодонта.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Благодарности / Acknowledgments

Исследование выполнено при поддержке грантов РФФИ 19-29-04082, 19-315-90051.

Список литературы / References

1. Semenova D, Bogdanova M, Kostina A, et al. Dose-dependent mechanism of Notch action in promoting osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 2019;379(1):169–179
2. Trubiani O, Pizzicannella J, Caputi S, et al. Periodontal Ligament Stem Cells: Current Knowledge and Future Perspectives. *Stem Cells Dev.* 2019;28(15):995–1003.
3. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, et al. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature.* 1999;398(6727):518–522.
4. Hori K, Sen A, Artavanis-Tsakonas S. Notch signaling at a glance. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 10):2135–2140.
5. Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature.* 1998; 393(6683):382–386.
6. Jarriault S, Brou C, Logeat F, et al. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature.* 1995; 377(6547):355–358.
7. Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families: Multiple effectors of the notch signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2003; 194(3):237–255.
8. Grego-Bessa J, Luna-Zurita L, del Monte G, et al. Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Dev Cell.* 2007; 12(3):415–429.
9. Krebs LT, Deftos ML, Bevan MJ, Gridley T. The Nrarp gene encodes an ankyrin-repeat protein that is transcriptionally regulated by the notch signaling pathway. *Dev Biol.* 2001;238(1):110–119.
10. Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, et al. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J.* 2001; 20(13):3427–3436.
11. Sahlgren C, Gustafsson M V, Jin S, et al. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(17):6392–6397.
12. Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, et al. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev.* 2004; 18(1):99–115.
13. Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, et al. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev.* 2006; 20(15):2096–2109.
14. Canalis E. Notch in skeletal physiology and disease. *Osteoporos Int.* 2018;29(12):2611–2621.
15. Ugarte F, Ryser M, Thieme , et al. Notch signaling enhances osteogenic differentiation while inhibiting adipogenesis in primary human bone marrow stromal cells. *Exp Hematol.* 2009; 37(7):867–875.
16. Shimizu T, Tanaka T, Iso T, et al. Notch signaling pathway enhances bone morphogenetic protein 2 (BMP2) responsiveness of Msx2 gene to induce osteogenic

differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2011;286(21):19138–19148.

17. Doi H, Iso T, Sato H et al. Jagged1-selective notch signaling induces smooth muscle differentiation via a RBP-Jkappa-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2006; 281(39):28555–28564.

18. Tezuka K-I, Yasuda M, Watanabe N, et al. Stimulation of Osteoblastic Cell Differentiation by Notch. *J Bone Miner Res.* 2002; 17(2):231–239.

19. Bai S, Kopan R, Zou W, et al. NOTCH1 regulates osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblast lineage cells. *J Biol Chem.* 2008; 283(10):6509–6518.

20. Hilton MJ, Tu X, Wu X, et al. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nat Med.* 2008; 14(3):306–314.

21. Shindo K, Kawashima N, Sakamoto K et al. Osteogenic differentiation of the mesenchymal progenitor cells, Kusa is suppressed by Notch signaling. *Exp Cell Res.* 2003; 290(2):370–380.

22. Engin F, Yao Z, Yang T et al. Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nat Med.* 2008; 14(3):299–305.

23. Salie R, Kneissel M, Vukevic M, et al. Ubiquitous overexpression of Heyl transcription factor leads to osteopenia and chondrocyte hypertrophy in bone. *Bone.* 2010; 46(3):680–694.

24. Liu P, Ping Y, Ma M, et al. Anabolic actions of Notch on mature bone. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(15):2152–2161.

25. Cao J, Wei Y, Lian J et al. Notch signaling pathway promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by enhancing BMP9/Smad signaling. *Int J Mol Med.* 2017; 40(2):378–388.

26. Liao J, Wei Q, Zou Y et al. Notch Signaling Augments BMP9-Induced Bone Formation by Promoting the Osteogenesis-Angiogenesis Coupling Process in Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Cell Physiol Biochem.* 2017; 41(5):1905–1923.

27. Liao J, Yu X, Hu X, et al. lncRNA H19 mediates BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) through Notch signaling. *Oncotarget.* 2017; 8(32):53581–53601.

28. Cui J, Zhang W, Huang E, et al. BMP9-induced osteoblastic differentiation requires functional Notch signaling in mesenchymal stem cells. *Lab Invest.* 2019; 99(1):58–71.

29. Andersson ER, Sandberg R, Lendahl U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development.* 2011; 138(17):3593–3612.

30. Yamamoto S, Schulze KL, Bellen HJ. Introduction to Notch signaling. *Methods Mol Biol.* 2014; 1187:1–14.

31. Guruharsha KG, Kankel MW, Artavanis-Tsakonas S. The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat Rev Genet.* 2012; 13(9):654–666.

32. Malashicheva A, Kanzler B, Tolkunova E et al. Lentivirus as a tool for lineage-specific gene manipulations. *Genesis.* 2007; 45(7):456–459.

33. Canalis E. Notch signaling in osteoblasts. *Sci Signal.* 2008;1(17):pe17.

34. Regan J, Long F. Notch signaling and bone remodeling. *Curr Osteoporos Rep.* 2013; 11(2):126–129.

35. Kostina A, Shishkova A, Ignatieva E, et al. Different Notch signaling in cells from calcified bicuspid and tricuspid aortic valves. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;114:211–219.

Информация об авторах:

Семенова Дарья Сергеевна, лаборант-исследователь, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; младший научный сотрудник, ИИЦ РАН;

Костина Александра Станиславовна, младший научный сотрудник, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; старший научный сотрудник, ИИЦ РАН;

Мустаева Аделия Маратовна, студент, СПбГУ;

Клаузен Полина Евгеньевна, младший научный сотрудник, ИИЦ РАН;

Добрынин Михаил Алексеевич, младший научный сотрудник, ИИЦ РАН;

Боярская Надежда Владимировна, студент, РГПУ им. А. И. Герцена;

Домбровская Юлия Андреевна, к.м.н., ассистент кафедры стоматологии общей практики, ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России;

Малашичева Анна Борисовна, к.б.н., заведующий НИЛ молекулярной кардиологии Института молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; заведующий НИЛ регенеративной биомедицины, ИИЦ РАН;

Енукашвили Нателла Иосифовна, к.б.н., заведующий НИЛ некодирующей ДНК, ИИЦ РАН; старший научный сотрудник НИЛ клеточных технологий, ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России.

Author information:

Semenova Daria S., Technician, Almazov National Medical Research Centre; Junior Researcher, Institute of Cytology;

Kostina Aleksandra S., Junior Researcher, Almazov National Medical Research Centre; Senior Researcher, Institute of Cytology;

Mustaeva Adeliia M., Student, Saint Petersburg State University;

Klauzen Polina E., Junior Researcher, Institute of Cytology;

Dobrynin Mikhail A., Junior Researcher, Institute of Cytology;

Boyarskaya Nadezhda V., Student, The Herzen State Pedagogical University;

Dombrovskaya Yulia A., PhD, Department of General Dentistry, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov;

Malashicheva Anna B., PhD, Head of the Laboratory of Molecular Cardiology, Almazov National Medical Research Centre; Head of the Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology;

Enukashvili Natella I., PhD, Head of Laboratory of non-coding DNA, Institute of Cytology; Senior Researcher, Laboratory of Cellular Technologies, North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov.

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ТРОМБОЦИТОВ В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ ИХ В ДОБАВОЧНОМ РАСТВОРЕ, СОДЕРЖАЩЕМ ФУМАРАТ НАТРИЯ

Чечеткин А. В., Алексеева Н. Н., Старицына Н. Н., Киселева Е. А.,
Гришина Г. В., Тарковская Л. Р.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Алексеева Наталья Николаевна,
ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России,
2-я Советская ул., д. 16, Санкт-Петербург,
Россия, 191024.
E-mail: labprep@mail.ru

Статья поступила в редакцию 20.03.2020
и принята к печати 22.04.2020.

Резюме

Актуальность. Повышение качества концентрата тромбоцитов путем выбора адекватной среды для хранения выделенных тромбоцитов является актуальной проблемой службы крови. **Цель работы.** Изучение метаболической активности, жизнеспособности тромбоцитов и их агрегационных свойств при хранении концентрата тромбоцитов в добавочном растворе, содержащем фумарат натрия. **Материалы и методы.** Объектом исследования являлись донорские концентраты тромбоцитов (КТ). КТ получали от доноров, прошедших необходимое обследование. В работе использованы биохимические, гематологические и коагулологические методы исследования. **Результаты.** При проведении исследований получены достоверные результаты лучшей сохранности тромбоцитов к 9 дню их хранения в фумаратсодержащем добавочном растворе (ДРФ) по сравнению с коммерческим раствором SSP+ (Франция). Установлено, что при практически одинаковом содержании глюкозы в сравниваемых растворах в день заготовки КТ, концентрация глюкозы к 9 дню наблюдения в ДРФ оказалась достоверно выше, чем в SSP+. При этом определялось неизменно более низкое содержание лактата в ДРФ по сравнению с раствором SSP+. По своей агрегационной активности тромбоциты, заготовленные в ДРФ, не уступали КТ, хранившимся в SSP+. **Заключение.** Разработанный состав добавочного раствора позволяет увеличить срок хранения тромбоцитов до 9 суток, что важно для более экономичного и эффективного использования этого компонента крови в целях коррекции тромбоцитопении различной этиологии.

Ключевые слова: глюкоза, добавочный раствор, концентрат тромбоцитов, лактат, митохондриальный метаболизм, фумарат, хранение тромбоцитов.

Для цитирования: Чечеткин А.В., Алексеева Н.Н., Старицына Н.Н. и др. Изучение морфофункциональных свойств тромбоцитов в процессе хранения их в добавочном растворе, содержащем фумарат натрия. Трансляционная медицина. 2020; 7(2): 33–41. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-2-33-41.

THE STUDY OF MORPHOFUNCTIONAL PROPERTIES OF PLATELETS IN THE PROCESS OF STORING THEM IN ADDITIVE SOLUTION CONTAINING SODIUM FUMARATE

Chechetkin A. V., Alekseeva N. N., Staritsyna N. N., Kiseleva E. A., Grishina G. V., Tarkovskaya L. R.

Russian Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of Federal Medical-Biological Agency, Saint-Petersburg, Russia

Corresponding author:

Alekseeva Nataliya N.,
Russian Research Institute of Hematology
and Blood Transfusion of Federal Medical-
Biological Agency,
2 Sovetskaya str., 16, Saint-Petersburg,
Russia, 191024.
E-mail: labprep@mail.ru

Received 20 March 2020; accepted 22 April 2020.

Abstract

Background. Improving the quality of platelet concentrate by choosing an adequate medium for storing isolated platelets is a relevant problem of a blood function. **Objective.** The study of metabolic activity, platelet viability and their aggregation properties during storage of platelet concentrate in an additive solution containing sodium fumarate. **Design and methods.** The object of the study was donor platelet concentrates (PC). PC was obtained from donors who passed necessary examinations. Biochemical, hematological and coagulological research methods were utilized in carrying out the study. **Results.** During the research, reliable evidence was obtained on the best preservation of platelets by 9 days of their storage in a fumarate-containing additive solution (FCAS) as compared to storage in a commercial SSP+ solution (France). It was found that with practically the same glucose content in the compared solutions on the day of PC preparation, the glucose concentration by 9th day of observation was significantly higher in the FCAS than in the SSP+ solution. Furthermore, the FCAS was determined to have a consistently lower lactate content as compared to the SSP+ solution. In regard to their aggregation activity, the platelets prepared in the FCAS were not inferior to the platelets stored in the SSP+. Based on the results of the study, a methodology has been developed to obtain additive solution containing sodium fumarate. **Conclusion.** The developed composition of the additive solution allows to increase the shelf life of platelets up to 9 days, which is important for a more economical and effective use of this blood component in order to correct thrombocytopenia of various etiologies.

Key words: additive solution, glucose, fumarate, lactate, mitochondrial metabolism, platelet concentrate, platelet storage.

For citation: Chechetkin AV, Alekseeva NN, Staritsyna NN et al. The study of morphofunctional properties of platelets in the process of storing them in additive solution containing sodium fumarate. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020;7(2): 33–41. (In Russ.) DOI:10.18705/2311-4495-2020-7-2-33-41.

Список сокращений:

АДФ — аденозиндифосфат, АТФ — аденозинтрифосфат, ДР — добавочный раствор, ДРФ — добавочный раствор с фумаратом натрия, КТ — концентрат тромбоцитов, ЛТС — лейкотромбослой, МА — максимальная амплитуда агрегации тромбоцитов, мосм/л — миллиосмоль на литр, осмолярность раствора, MPV — средний объем тромбоцитов, pH — отрицательный логарифм концентрации

водородных ионов, SSP+ — добавочный раствор для заготовки и хранения тромбоцитов.

Введение

Переливание концентрата тромбоцитов (КТ) является необходимой мерой коррекции тромбоцитопении различного генеза. Качество КТ обусловлено рядом факторов, в том числе средой хранения (плазма или добавочный раствор). Поиск возможностей

повышения качества концентрата тромбоцитов путем выбора адекватной среды для хранения этого компонента крови является актуальной проблемой службы крови [1, 2]. В настоящее время срок годности КТ в добавочном растворе (ДР) не превышает 5–7 суток, что создает определенные логистические трудности в его заготовке и клиническом использовании. За рубежом проводятся активные исследования по созданию добавочных растворов, позволяющих увеличить срок годности этого компонента крови. Обсуждается вопрос о целесообразности использования в составе ДР веществ, позволяющих восполнить в среде хранения дефицит источников энергии, стабилизаторов мембран, регуляторов метаболизма и прочего [2–5]. Как известно, энергообеспечение клеток является одним из главных факторов их жизнеспособности. Вместе с тем все методы заготовки КТ включают изъятие тромбоцитов из кровеносного русла и ресуспендирование их в среде, не содержащей переносчиков кислорода. Это приводит к снижению обеспечения клеток кислородом. Хранение КТ в газопроницаемых контейнерах, что является неременным требованием, лишь снижает, но не устраняет недостаток O_2 . Возникающая гипоксия может являться причиной нарушений окислительного метаболизма в клетках с последующим развитием энергодефицита. Тромбоциты, как и многие другие клетки организма, способны генерировать АТФ двумя путями — анаэробно и аэробно. Баланс между цитозольными и митохондриальными реакциями окисления зависит не только от физиологической активности тромбоцитов, но и от условий их хранения [6]. Согласно данным литературы, один из субстратов цикла Кребса — фумарат натрия — способен поддерживать синтез АТФ как в анаэробных, так и в аэробных условиях, оказывая благоприятное влияние на митохондриальный метаболизм клеток печени и миокарда при гипоксии [7]. В связи с этим представляет интерес оценка действия фумарата натрия на жизнеспособность тромбоцитов в процессе их хранения. Однако в обширной литературе, посвященной составу ДР, мы не встретили описания использования антигипоксантов в их составе. В связи с этим научное исследование, посвященное изучению морфофункционального состояния тромбоцитов при хранении их в ДР, содержащем фумарат натрия, может способствовать повышению качества КТ и увеличению срока его хранения, что является весьма актуальным для службы крови.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись КТ, полученные от доноров крови, подписавших инфор-

мированное согласие на проведение процедуры. Комплектование и обследование доноров проводили в соответствии с требованиями нормативных документов. КТ выделяли из лейкотромбослая (ЛТС) донорской крови с последующим пулированием 3 доз ЛТС на центрифуге для автоматического разделения компонентов крови TAKSIPLKIT, TERUMO. Отбор образцов донорских тромбоцитов осуществлялся в контейнеры-спутники. КТ помещали в перемешиватель для тромбоцитов AP-48L и хранили при температуре от 20 до 24 °С в течение всего периода проведения исследований. При заготовке компонента использовали добавочный раствор для хранения КТ, содержащий один из естественных антигипоксантов — фумарат натрия (ДРФ) или коммерческий раствор SSP+ (MacoPharma, Франция). Состав и технология получения ДРФ были разработаны в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России. Соотношение донорской плазмы и добавочных растворов составляло 1:3 (30 % аутологичной плазмы и 70 % SSP+ или ДРФ). Средняя концентрация тромбоцитов при заготовке в обеих группах КТ составила $7,85 \pm 0,27 \times 10^{11}$, средний объем КТ — 292 ± 9 мл. Изучены 15 образцов КТ, заготовленных на SSP+, и 15 образцов компонента, заготовленного с использованием ДРФ. Добавочный раствор SSP+ в настоящее время является наиболее известным и широко применяемым, поэтому он был использован в качестве среды сравнения при оценке эффективности ДРФ.

Биохимические исследования и определение значения pH проводили на биохимическом анализаторе Radiometer ABL-800 (Дания). Концентрацию клеток в КТ определяли на гематологическом анализаторе Medonik M-10 (Швеция). Агрегационные свойства тромбоцитов оценивали по методу Борна на анализаторе агрегации АТ-02 (Россия). При изучении морфофункционального состояния тромбоцитов анализировалось количество клеток, их объем, изменение биохимических показателей среды и значения pH в процессе хранения тромбоцитов в течение 9 дней, а также их агрегационная способность в динамике с такими индукторами, как коллаген, ристоцетин, АДФ.

Результаты работы были обработаны с использованием критерия Стьюдента. Уровень достоверности был принят равным 0,05. Статистический анализ выполнен с помощью программ Microsoft Excel 2019 MSO. При построении диаграмм были выбраны линейная, экспоненциальная или полиномиальная линии тренда в зависимости от величин аппроксимации R^2 в каждом конкретном случае.

Результаты

В настоящем исследовании проводилась оценка морфофункционального состояния тромбоцитов при заготовке их в фумаратсодержащем растворе в сравнении с сохранностью КТ в растворе SSP+.

Изменения числа тромбоцитов в растворах ДРФ и SSP+, рассчитанные в процентах по отношению к 0 дню хранения, показаны на рисунке 1. Количество клеток в растворе ДРФ к 9 дню хранения составило $94,1 \pm 1,8 \%$ от исходного, в растворе SSP+ $86,7 \pm 2,6 \%$ ($p < 0,05$).

Средний объем тромбоцита (MPV) незначительно увеличивался по мере возрастания сроков хранения в обоих растворах. Однако достоверные различия в размерах кровяных пластинок были выявлены уже в день заготовки КТ и составили $7,3 \pm 0,2$ мкм в ДРФ против $8,0 \pm 0,2$ мкм в растворе SSP+ ($p < 0,05$). К 9 дню хранения значение этого показателя возросло до $8,9 \pm 0,6$ мкм для раствора ДРФ, для раствора SSP+ до $9,8 \pm 0,2$ мкм ($p < 0,05$). Вместе с тем выявленные изменения размеров тромбоцитов укладывались в границы физиологической нормы.

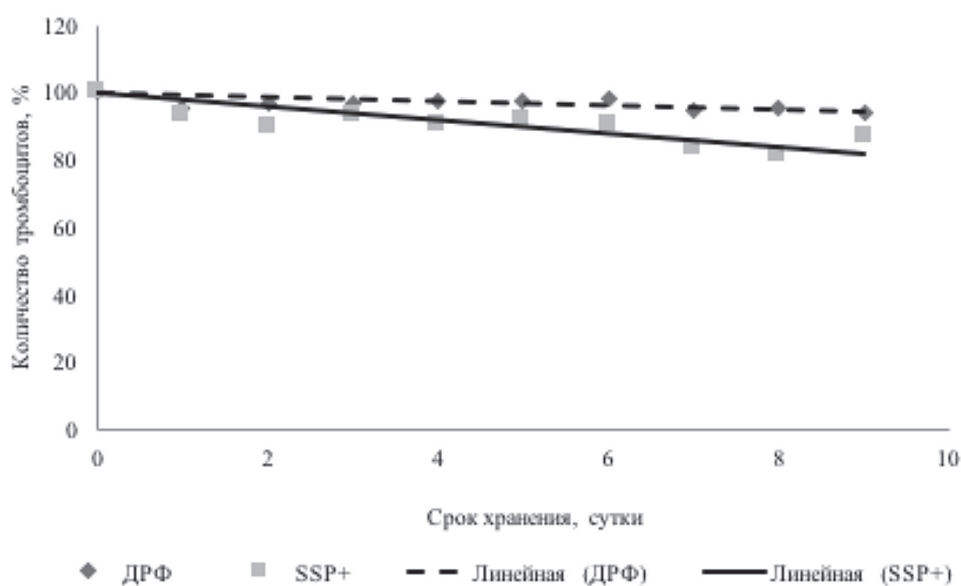


Рис. 1. Количество тромбоцитов (%) в добавочных растворах SSP+ и ДРФ в процессе хранения

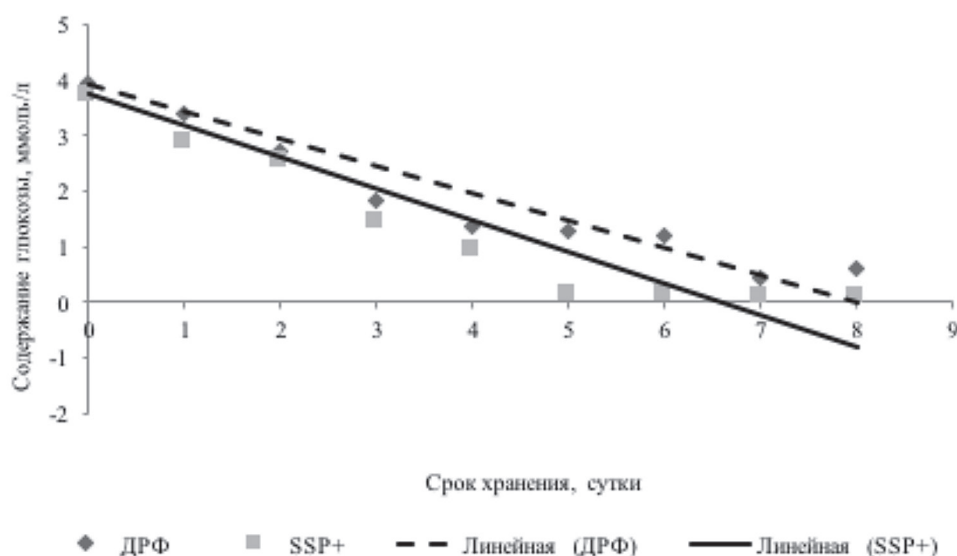


Рис. 2. Содержание глюкозы (ммоль/л) в добавочных растворах SSP+ и ДРФ в процессе хранения тромбоцитов

Содержание глюкозы в исследуемых средах в день заготовки было практически одинаковым ($3,94 \pm 0,23$ ммоль/л в ДРФ и $3,73 \pm 0,23$ ммоль/л в SSP+) и снижалось в течение первых трех дней хранения примерно с одинаковой скоростью (рис. 2). Однако, начиная с 5 дня хранения, наблюдались существенные отличия в уровне глюкозы. На 5 день хранения в растворе SSP+ осталось $0,13 \pm 0,03$ ммоль/л глюкозы, а в ДРФ — $1,27 \pm 0,61$ ммоль/л ($p < 0,05$). В дальнейшем концентрация глюкозы в растворе SSP+ к концу хранения сни-

жалась до $0,10 \pm 0,00$ ммоль/л, в ДРФ до $0,60 \pm 0,34$ ммоль/л ($p < 0,05$).

Содержание лактата в исследуемых добавочных растворах уже с первых дней хранения было разным: в ДРФ $6,20 \pm 0,70$ ммоль/л, в SSP+ $7,87 \pm 0,76$ ммоль/л ($p < 0,05$). С увеличением срока хранения эти различия нарастали. Уровень лактата к 6 дню наблюдения составил $9,84 \pm 1,90$ ммоль/л в ДРФ, в SSP+ $14,45 \pm 0,44$ ммоль/л ($p < 0,05$). К 9 дню хранения концентрация лактата в растворе ДРФ возросла до $11,86 \pm 0,13$

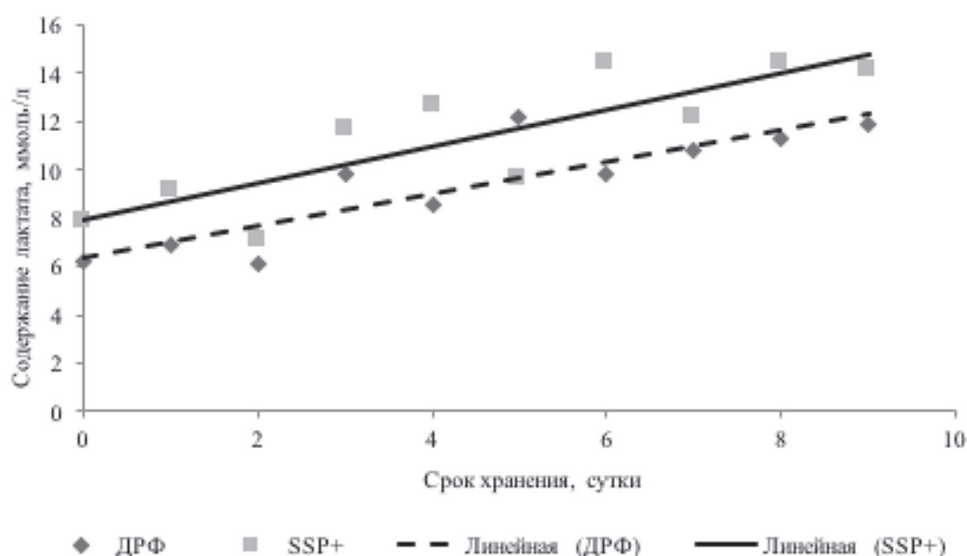


Рис. 3. Содержание лактата (ммоль/л) в добавочных растворах SSP+ и ДРФ в процессе хранения тромбоцитов

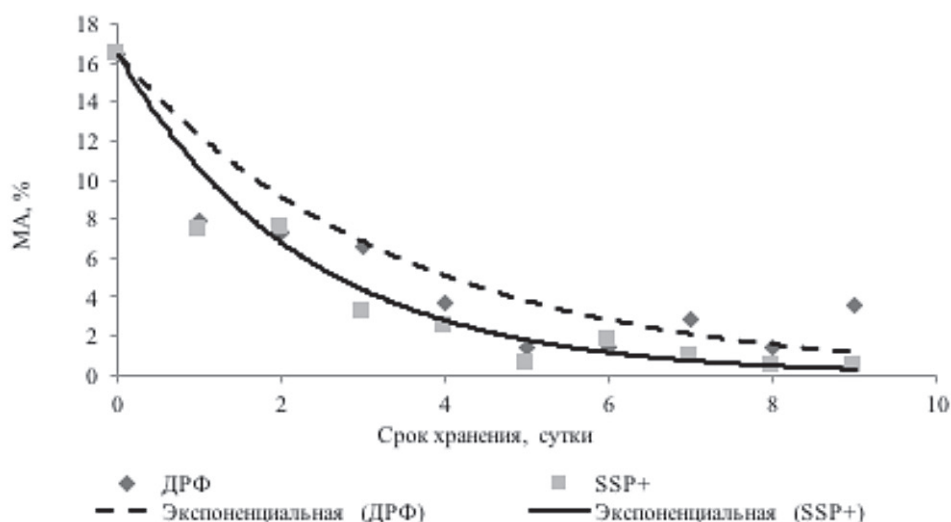


Рис. 4. Агрегация тромбоцитов, МА (%), в процессе хранения в добавочных растворах SSP+ и ДРФ. Индуктор агрегации — АДФ, 15 мкмоль/л

ммоль/л, а в растворе SSP+ до $14,16 \pm 1,74$ ммоль/л (рис. 3).

Значение pH во время хранения тромбоцитов в сравниваемых растворах менялось незначительно: в ДРФ от $7,17 \pm 0,02$ в начале хранения до $7,09 \pm 0,06$ к 9 дню, а в SSP+ в те же сроки наблюдения — от $7,07 \pm 0,04$ до $7,13 \pm 0,01$.

При исследовании агрегационных свойств тромбоцитов с индуктором АДФ в день заготовки компонента (нулевой день) значение максимальной амплитуды агрегации (МА) было одинаковым

для клеток, хранящихся в двух растворах, и составило $16,4 \pm 5,0$ % для ДРФ, $16,4 \pm 1,9$ % для SSP+. На 9 день хранения значение МА тромбоцитов, хранившихся в ДРФ, составило $3,6 \pm 1,5$ %, в SSP+ $0,4 \pm 0,4$ %. Динамика снижения агрегационной активности показана на рисунке 4.

При исследовании агрегации с ристоцетином в нулевой день значение МА тромбоцитов, хранившихся в растворе SSP+, было равно $67,0 \pm 1,9$ %, в ДРФ это значение было несколько ниже — $62,0 \pm 4,2$ %. Однако на 9 день хранения значение МА

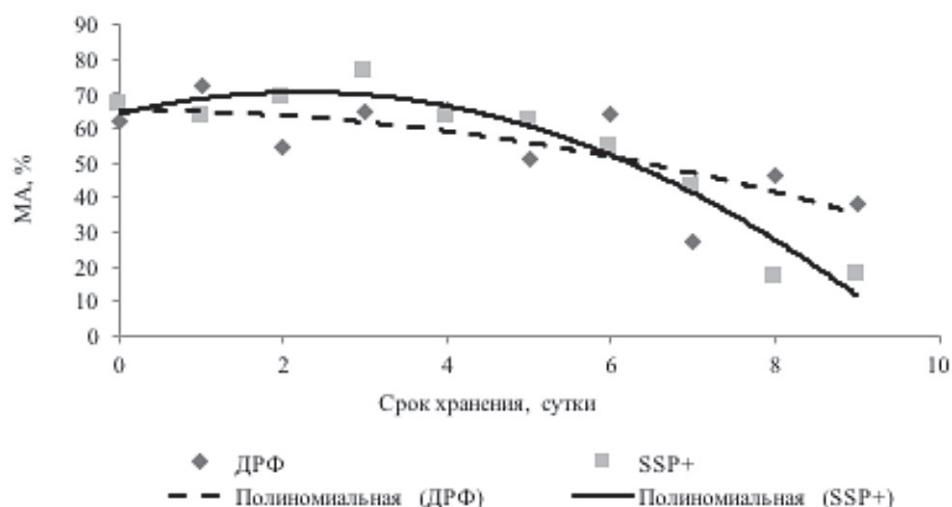


Рис. 5. Агрегация тромбоцитов, МА (%), в процессе хранения в добавочных растворах SSP+ и ДРФ. Индуктор агрегации — ристоцетин, 1,1 мг/мл

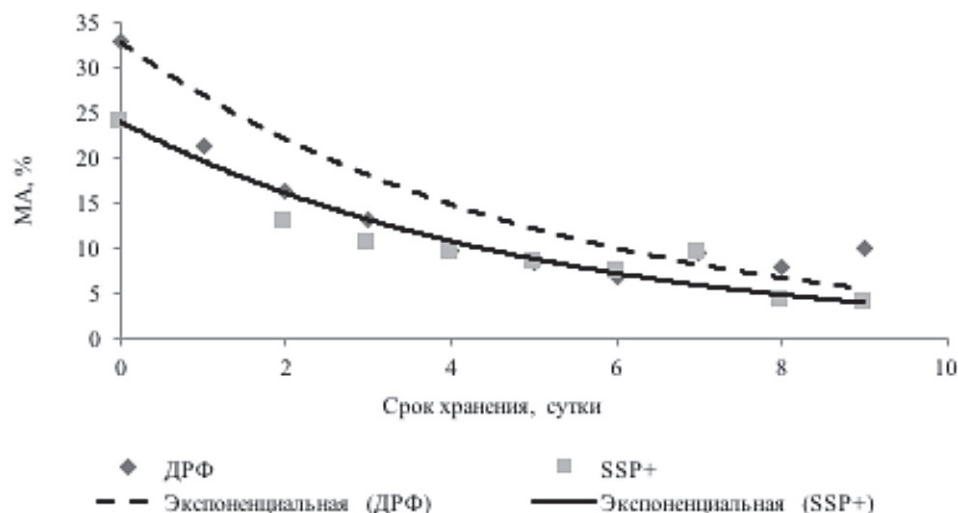


Рис. 6. Агрегация тромбоцитов, МА (%), в процессе хранения в добавочных растворах SSP+ и ДРФ. Индуктор агрегации — коллаген, 200 мкг/мл

клеток, хранившихся в ДРФ, было более чем в два раза выше, чем в SSP+ ($38,4 \pm 6,8$ % против $17,4 \pm 6,0$ %). Полиномиальная кривая изменения агрегационной активности в процессе хранения (рис. 5) показывает повышение агрегации в первые три дня хранения, несколько более выраженное у кровяных пластинок, хранящихся в SSP+. Так, МА на 3 день хранения в растворе SSP+ составило $76,3 \pm 5,1$ %. При использовании ДРФ средние значения МА не превышали $64,9 \pm 2,9$ %.

Агрегационная активность тромбоцитов, индуцированная коллагеном, в день заготовки оказалась несколько выше в растворе ДРФ (значение МА было равно $32,7 \pm 6,2$ %). В растворе SSP+ среднее значение этого показателя не превышало $23,95 \pm 5,5$ %. На 9 день хранения эта тенденция сохранилась, значение МА клеток, хранившихся в ДРФ, было также выше, чем в SSP+ ($9,9 \pm 1,0$ % против $3,8 \pm 0,2$ %). Динамика снижения агрегационной активности клеток (рис. 6) в процессе хранения их в двух растворах была практически одинаковой.

Обсуждение

Сравнение свойств тромбоцитов, заготовленных в растворах разного состава, выявило различия как в содержании метаболитов в среде хранения КТ, так и в сохранности кровяных пластинок к концу срока наблюдения.

Исследования показали, что в концентратах тромбоцитов, хранившихся в растворе SSP+, глюкоза значимо определялась в течение 3–4 суток. Между тем в ДРФ глюкоза присутствовала спустя 8 суток хранения (рис. 2). Важно отметить, что при практически одинаковых исходных количествах глюкозы в сравниваемых растворах более экономичное ее потребление обеспечивал раствор ДРФ.

В SSP+ уже с первых дней хранения КТ регистрировалось более высокое содержание лактата по сравнению с ДРФ. Быстрое образование лактата в сочетании с более активным потреблением глюкозы позволяет судить о преобладании процессов анаэробного окисления в тромбоцитах, заготовленных в растворе SSP+. Так, к 6 дню наблюдения содержание лактата в SSP+ увеличивалось на $6,58$ ммоль/л, а в ДРФ уровень лактата возрос только на $3,64$ ммоль/л. К 9 дню наблюдения разница в содержании лактата немного уменьшалась ($6,29$ ммоль/л против $5,66$ ммоль/л). Однако конечная концентрация лактата в ДРФ продолжала оставаться более низкой. Очевидно, присутствие фумарата натрия в добавочном растворе сдерживало процесс накопления лактата путем включения механизмов аэробного гликолиза в тромбоцитах, тем самым предотвращая реакции образования лактата из

пирувата [7]. При этом раствор ДРФ обеспечивал протекание этих реакций при более экономичном потреблении глюкозы. Полученные данные косвенно подтверждают способность фумарата натрия оптимизировать метаболизм клеток в условиях недостатка кислорода, отмеченную и другими авторами [7–9]. Некоторое выравнивание показателей содержания лактата к 9 дню хранения, по-видимому, было связано с истощением фонда фумарата натрия в среде хранения и, в связи с этим, ослаблением процессов митохондриального окисления в тромбоцитах.

Изменения показателей pH при хранении КТ в сравниваемых растворах оказались разнонаправленными. В ДРФ к 9 дню наблюдения значение pH снижалось с $7,17 \pm 0,04$ до $7,09 \pm 0,06$. В SSP+ отмечено небольшое возрастание pH с $7,07 \pm 0,04$ до $7,13 \pm 0,01$. Аналогичный результат для раствора SSP+ отмечался и другими авторами [10]. Не анализируя механизмы работы буферных систем раствора SSP+, важно отметить, что, хотя абсолютные значения pH в сравниваемых ДР достоверно различались, в процессе хранения они изменялись незначительно. Это свидетельствовало о достаточной компенсационной возможности буферных систем обоих растворов.

Данные литературы свидетельствуют о том, что с увеличением срока хранения КТ в добавочных растворах увеличивается объем тромбоцитов, что рассматривается авторами как один из признаков старения тромбоцитов [2, 3, 11, 12]. В наших исследованиях также была выявлена тенденция к повышению этого показателя. Обнаруженные изменения размеров клеток в двух растворах укладывались в границы физиологической нормы. Вместе с тем абсолютные значения MPV клеток в любые сроки хранения в растворе ДРФ оказались достоверно меньшими, чем у КТ, заготовленных в растворе SSP+. Эти данные позволяют предположить замедление процессов старения клеток в присутствии фумарата натрия.

Одним из важных показателей КТ является количество клеток в компоненте крови. Проведенные исследования выявили достоверные различия в сохранности тромбоцитов в процессе их хранения в растворах ДРФ и SSP+. К 9 дню наблюдения число клеток в ДРФ составляло $94,1 \pm 1,8$ % от исходного, в то время как в SSP+ сохранялось $86,7 \pm 2,6$ % ($p < 0,05$). Раствор ДРФ создавал лучшие условия жизнеобеспечения тромбоцитов, что достигалось, вероятно, оптимизирующим влиянием фумарата натрия на метаболизм тромбоцитов.

Наряду с морфологической сохранностью тромбоцитов их функциональные свойства яв-

ляются важным критерием качества КТ. Изучение агрегации кровяных пластинок использовалось как интегральный показатель их активности и сохранности. Результаты агрегации тромбоцитов, индуцированной ристоцетином, показали, что оба добавочных раствора одинаково хорошо сохраняют клетки вплоть до шестого дня хранения. В дальнейшем тромбоциты, хранящиеся в SSP+, теряют свою активность почти в 2 раза быстрее, чем в растворе ДРФ. Агрегация тромбоцитов с помощью АДФ, связывающимся со специфическими рецепторами P2Y₁/P2Y₁₂, характеризует сохранность механизма передачи сигнала активации тромбоцитов «изнутри–наружу». Этот механизм делает доступными рецепторные места связи в комплексе GPIIb-IIIa (интегрине $\alpha_{IIb}\beta_3$), обеспечивая возможности их связи с фибриногеном [13]. Результаты сравнения агрегационных свойств тромбоцитов с индуктором АДФ в растворах разного состава показывают их лучшую сохранность при использовании ДРФ. Агрегация, индуцированная коллагеном, характеризует сохранность механизма адгезии тромбоцитов на коллагеновые волокна при помощи специфических рецепторов GPIa/IIa/GPVI. После адгезии из тромбоцитарных гранул хранения высвобождается АДФ и другие эндогенные индукторы, секретируемые тромбоцитами после их адгезии к волокнам коллагена, что, в свою очередь, вызывает агрегацию тромбоцитов. Агрегационная активность клеток, индуцированных коллагеном, при использовании раствора ДРФ в начальный и конечный срок наблюдения была выше, чем в SSP+, однако различие было недостоверным. Проведенные исследования позволяют заключить, что в целом по своей агрегационной активности тромбоциты, заготовленные в ДРФ, не уступали КТ, хранившихся в SSP+. Вместе с тем по длительности сохранения агрегационных свойств ДРФ позволял получить определенные преимущества.

Таким образом, включение фумарата натрия в состав добавочного раствора обеспечивало лучшую сохранность морфофункциональных свойств тромбоцитов в процессе их хранения в течение 9 суток.

Заключение

Результаты проведенных исследований позволяют заключить, что использование фумарата натрия в составе добавочного раствора способствует более экономичному потреблению глюкозы и сдерживает образование лактата в среде хранения концентрата тромбоцитов по сравнению с действием раствора SSP+. Добавочный раствор такого состава

обеспечивает лучшую сохранность числа тромбоцитов в процессе хранения КТ. Включенный метаболический компонент позволяет более длительно поддерживать агрегационные свойства тромбоцитов по сравнению с раствором SSP+. С помощью фумарата натрия удастся увеличить срок хранения тромбоцитного концентрата до 9 дней, что позволит более эффективно использовать этот компонент крови в целях коррекции тромбоцитопении различной этиологии.

По итогам проведенных исследований разработан состав добавочного раствора, содержащего фумарат натрия. Получено положительное решение на заявку на патент РФ № 2019130545 от 25.09.2019 г. «Раствор для ресуспендирования и хранения тромбоцитов».

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Kiseleva E.A., Chechetkin A.V., Danilchenko V.V. et al. The efficacy and safety of combined donation of platelets and plasma. Transfusion=Transfuziologiya. 2018;19(2): 4–12. In Russian [Киселева Е.А., Четчин А.В., Данильченко В.В. и др. Эффективность и безопасность сочетанного донорства тромбоцитов и плазмы. Трансфузиология. 2018;19(2):4–12].
2. Leitner GC, List J, Horvath M, et al. Additive solutions differentially affect metabolic and functional parameters of platelet concentrates. Vox Sang. 2016;110(1):20–26.
3. Yang J, Yin W, Zhang Y, et al. Evaluation of the advantages of platelet concentrates stored at 4°C versus 22°C. Transfusion. 2018;58(3):736–747.
4. Gulliksson H. Platelet storage media. Vox Sang. 2014;107(2):205–212.
5. Nogawa M, Naito Y, Chatani M, et al. Parallel comparison of apheresis-collected platelet concentrates stored in four different additive solutions. Vox Sang. 2013;105(4):305–312.
6. Gyongyossy-Issa MI. Glucose in platelet additive solutions: to add or not to add? Transfus Apher Sci. 2011;44(3):283–295.
7. Slepneva LV, Khmylova GA. Failure mechanism of energy metabolism during hypoxia and possible ways to correction of fumarate-containing solutions. Transfusion=Transfuziologiya. 2013;14(2):49–65. In Russian [Слепнева Л.В., Хмылова Г.А. Механизм повреждения энергетического обмена и возможные пути его коррекции фумаратсодержащими растворами. Трансфузиология. 2013;14(2):49–65].
8. Gorbacheva IA, Sycheva YA, Slepneva LV, et al. Antihypoxic therapy resources in ischemic heart treatment. Preventive and clinical medicine=Profilakticheskaja i klinicheskaja medicina. 2010;2(35):76–80. In Russian [Горбачева И.А., Сычева Ю.А., Слепнева Л.В. и др. Возможности антигипоксантами терапии в лечении больных

ишемической болезнью сердца. Профилактическая и клиническая медицина. 2010;2(35):76–80].

9. Selivanov EA, Slepneva LV, Alekseeva NN, et al. Use of the preparation “Konfumin” intended for treatment of ischemic myocardium in experiment. Medical Academic Journal= Medicinskij akademicheskij zhurnal. 2008;8(2):62–68. In Russian [Селиванов Е.А., Слепнева Л.В., Алексеева Н.Н. и др. Использование препарата «Конфумин» для лечения ишемии миокарда в эксперименте. Медицинский академический журнал. 2008;8(2):62–68].

10. Karpova OV, Rojzman EV, Kolesnikova IM, et al. Metabolic changes in various prepared platelet concentrates during storage. Transfusion=Transfuziologiya. 2014;15(3):22–30. In Russian [Карпова О.В., Ройтман Е.В., Колесникова И.М. и др. Метаболические изменения при хранении тромбоцитных концентратов, приготовленных разными методами. Трансфузиология. 2014;15(3):22–30].

11. Malysh PN, Kondrashov SA, Gusakova VJa, et al. Human platelets: an estimation of alternative suspension environments for their storage. Ukrainian Journ. emergency medicine named G.O. Mozhaev=Ukrainskij zhurnal jekstremal'noj medicyny im. G.O. Mozhaeva. 2010;11(3):67–71. In Russian [Малыш П.Н., Кондрашов С.А., Гусакова В.Я. и др. Тромбоциты человека: оценка альтернативных взвешивающих сред для их хранения. Украинский журнал экстремальной медицины им. Г.О. Можаяева. 2010;11(3):67–71].

12. Gulliksson H. Defining of optimal storage conditions for the long-term storage of platelets. Transfus Med Rev. 2003;17(3):209–215.

13. Shitikova AS. Platelet's hemostasis. SPb.: Izdatelstvo SPbGMU, 2000. p. 227. In Russian [Шитикова А.С. Тромбоцитарный гемостаз. СПб.:Изд-во СПбГМУ, 2000. с. 227].

Информация об авторах:

Чечеткин Александр Викторович, д.м.н., профессор, директор ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России;

Алексеева Наталья Николаевна, к.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России;

Старицына Наталья Николаевна, к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России;

Киселева Елена Анатольевна, заведующий Республиканским центром гравитационной хирургии крови (РЦГХК), ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России;

Гришина Галина Викторовна, к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России;

Тарковская Лана Ростиславовна, к.б.н., старший научный сотрудник ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России.

Author information:

Chechetkin Alexander V., Dr. Sci., Prof., Director of the Russian Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of Federal Medical-Biological Agency;

Alekseeva Nataliya N., PhD, Leading Researcher, Russian Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of Federal Medical-Biological Agency;

Staritsyna Natalya N., PhD, Senior Researcher, Russian Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of Federal Medical-Biological Agency;

Kiseleva Elena A., head of the Republican Center for Gravity Blood Surgery;

Grishina Galina V., PhD, Senior Researcher, Russian Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of Federal Medical-Biological Agency;

Tarkovskaya Lana R., PhD, Senior Researcher, Russian Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of Federal Medical-Biological Agency.

СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ КОЛЛОИДНОГО СЕРЕБРА И СТАБИЛИЗАЦИЯ ИХ НЕСКОЛЬКИМИ СПОСОБАМИ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Королев Д. В.^{1,2}, Шумило М. В.³, Истомина М. С.^{1,3},
Шульмейстер Г. А.¹, Горшков А. Н.⁴, Крутиков А. Н.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени академика
И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

³Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им.
В. И. Ульянова (Ленина)», Санкт-Петербург, Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-
исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Истомина Мария Сергеевна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Пархоменко, д. 15, лит. Б,
Санкт-Петербург, Россия, 194156.
E-mail: istomina_ms@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию 14.01.2020
и принята к печати 25.03.2020.

Резюме

Актуальность. Повышение антибактериального эффекта лекарственных препаратов за счет применения коллоидного раствора наночастиц серебра отражается во многих исследованиях. Создание различных форм препаратов для наружного применения с медленным высвобождением действующего вещества и антибактериальной активностью является актуальным и перспективным средством для применения в лечении поверхностных ран и повреждений. **Цель.** Синтез и стабилизация квазисферических наночастиц серебра для применения в лекарственных формах наружного применения. **Материалы и методы.** Для синтеза коллоидного серебра использовался цитратный метод. Лекарственные формы наружного применения готовились несколькими методами: реакция с альбумином, липосомальная форма, загущение аэросилом и инкорпорирование в микросферы. **Результаты.** Продемонстрировано несколько способов возможного приготовления готовых лекарственных форм на основе наночастиц коллоидного серебра: реакция с альбумином, липосомальная форма, загущение аэросилом и инкорпорирование в микросферы. **Заключение.** Дальнейшее исследование как антимикробной активности, так и цитотоксичности позволит выявить лекарственные формы с оптимальным соотношением эффективность/безопасность.

Ключевые слова: лекарственные формы наружного применения, наночастицы серебра.

Для цитирования: Королев Д.В., Шумило М.В., Истомина М.С. и др. Синтез наночастиц коллоидного серебра и стабилизация их несколькими способами для использования в лекарственных формах наружного применения. Трансляционная медицина. 2020;7(2): 42–51. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-2-42-51.

SYNTHESIS OF COLLOIDAL SILVER NANOPARTICLES AND THEIR STABILIZATION IN SEVERAL WAYS FOR EXTERNAL APPLICATIONS

Korolev D. V.^{1,2}, Shumilo M. V.³, Istomina M. S.^{1,3}, Shulmeister G. A.³, Gorshkov A. N.⁴, Krutikov A. N.^{1,2}

Corresponding author:

Istomina Maria S.,
Almazov National Medical Research Centre,
Parkhomenko str. 15-B, Saint Petersburg,
Russia, 194156.
E-mail: istomina_ms@almazovcentre.ru

¹Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

²Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

³Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", Saint Petersburg, Russia

⁴Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia

Received 14 January 2020; accepted
25 March 2020.

Abstract

Background. Today, many studies reflect an increase in the antibacterial effect of drugs through the use of a colloidal solution of silver nanoparticles. Creation of the various forms of drugs for an external use with a slow-release active component and antibacterial activity is relevant and promising for use in the treatment of superficial wounds and injuries. **Objective.** Synthesis and stabilization of quasispherical silver nanoparticles for external applications. **Design and methods.** The citrate method was used for the synthesis of colloidal silver. Dosage forms of external use were prepared by several methods: reaction with albumin, liposomal form, thickening with Aerosil and incorporation into microspheres. **Results.** Several methods of possible preparation of finished dosage forms based on colloidal silver nanoparticles have been demonstrated: reaction with albumin, liposomal form, thickening with Aerosil and incorporation into microspheres. **Conclusion.** Further investigation of both antimicrobial activity and cytotoxicity will reveal dosage forms with optimal efficiency/safety ratio.

Key words: drug for external application, silver nanoparticles.

For citation: Korolev DV, Shumilo MV, Istomina MS et al., Synthesis of colloidal silver nanoparticles and their stabilization in several ways for external applications. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020;7(2): 42–51. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-2-42-51.

Введение

Быстрое развитие у микроорганизмов резистентности к антибиотикам диктует необходимость разработки новых антибактериальных/антисептических лекарственных препаратов. Одним из направлений является использование препаратов серебра, прежде всего в форме коллоидного раствора наночастиц.

В настоящее время препараты на основе AgNP (наночастиц серебра) переживают второе рождение. В связи с этим появилось множество исследований, связанных с антибактериальной активностью коллоидного серебра и сравнением с антисептиками и антибиотиками, а также попытками повысить антибактериальную активность путем комбинации антисептика/антибиотика с препаратом серебра [1, 2].

Исследование было проведено для изучения антибактериальных свойств наночастиц коллоидного серебра и эвгенола, отдельно и в комбинации, на *Staphylococcus aureus* и *Salmonella Typhimurium* и их взаимодействиях с пищевыми компонентами (жир, белок и углеводы) [1]. Антимикробная активность как эвгенола, так и AgNP зависела от среды, в которой проводился эксперимент, и комбинация обоих антимикробных агентов усиливала антимикробный эффект.

В другом исследовании с целью изучения комбинаторных вариантов, которые могли бы повысить бактерицидную эффективность линезолида против грамотрицательных бактерий, оценивали степень комбинации наносеребра и линезолида [2]. Результаты показали, что наносеребро может не только препятствовать работе эффлюксных на-

сосов, удаляющих антибиотик из бактериальной клетки, но и одновременно изменять целостность мембраны и, таким образом, увеличивать цитоплазматическую концентрацию линезолида до эффективного уровня.

Все большее применение находят наночастицы серебра в качестве противомикробных препаратов в лечении ран и язв — выпускаются мази и кремы («Аргосульфан», «Дермазин»), нанесения на перевязочный материал («Atrauman Ag», «Aquascel Ag+Extra») [3], серебро активно используется в стоматологии [4], инженерии костной ткани [5], в составе химических агентов для очистки сточных вод [6], консервантов для косметики [7], препаратов против микробов, связанных с пищевыми и сельскохозяйственными патогенами [8, 9], в пищевых упаковках [10], нанокатализаторах [11] и даже как консерванты для белых вин [12].

Так, были исследованы свойства разработанного перевязочного материала с хорошей биосовместимостью, пористой структурой и антибактериальной активностью в отношении устойчивых к лекарствам бактерий [3]. Получены изделия на основе мембраны, модифицированной биомиметическим полидопаминовым покрытием с AgNP. Анализ противобактериальной активности показал хорошую активность в отношении бактерий *P. aeruginosa*, *E.coli*, *S. aureus* и MRSA, в то время как тестирование ССК8, SEM-наблюдения и оценка апоптоза показали, что они не обладали измеримой цитотоксичностью по отношению к клеткам млекопитающих. С помощью модели мышинной раны, инфицированной бактериями (MRSA или *P. aeruginosa*), было обнаружено, что мембраны TPU/AgNP могут предотвращать бактериальные инфекции *in vivo* и способствовать заживлению ран через ускорение процесса эпителизации.

В исследовании, где оценивались антибактериальные свойства и высвобождение ионов в ортодонтических скобках, покрытых наносеребром, по сравнению с обычными скобками, покрытая наносеребром ортодонтическая скобка способствовала ингибированию *S.mutans* на 30-й день и уменьшению кариеса на гладких поверхностях [4]. Количество наносеребра в образцах слюны и сыворотки было значительно выше в основной группе на 7-й день.

В другой работе была предпринята попытка выявить присутствие серебра в мышцах и органах цыплят-бройлеров, которым было дано коллоидное серебро [9]. Результаты показывают, что мясо цыплят-бройлеров содержит серебро в количествах, безопасных для человека.

В еще одной работе водные экстракты, полученные из побочных продуктов виноделия (виноградных косточек и стеблей), отдельно или в сочетании с AgNP, использовались для белой винификации [12]. Антимикробный эффект экстрактов был аналогичен эффекту диоксида серы и более эффективен в отношении молочнокислых и уксусных бактерий в тех винах, к которым добавлялось коллоидное серебро.

Большое место среди современных публикаций занимает синтез коллоидного серебра методами так называемой «зеленой» химии [6, 8, 10, 11, 13, 14]. Это связано с тем, что сам по себе синтез коллоидного серебра весьма непривлекателен к условиям и реагентам.

Был разработан биологический метод синтеза AgNP с использованием экстракта листьев *Bryophyllum pinnatum* [8]. Полученные AgNP оказались эффективными против пищевых (*Escherichia coli*-MTCC-443) и сельскохозяйственных (*Bacillus megaterium*-MTCC-2412) патогенов. Для разработки новых наноморфированных инсектицидов и противомикробных препаратов были синтезированы AgNP с использованием экстракта листьев *Bauhinia acuminata* [10]. Полученные AgNP проявили противомикробную и инсектицидную активность, что может быть использовано в пищевых упаковках.

AgNP были синтезированы фотохимическим синтезом с использованием прямого солнечного света и экстракта вешенки (*Pleurotus citrinopileatus*) [13]. Бактерицидный эффект синтезированных AgNP был изучен в отношении патогенных бактерий *Escherichia coli*. Минимальная ингибирующая концентрация составила 25 ppm. AgNP были также синтезированы с использованием зеленого подхода с применением водно-спиртовых экстрактов *Malva sylvestris* из нитрата серебра [14]. Антибактериальную активность синтезированных наночастиц изучали на *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pyogenes* с использованием анализа диффузии диска, минимальных ингибирующих концентраций и минимальных бактерицидных концентраций. Наилучшая антибактериальная активность была зарегистрирована для AgNP, полученных при использовании 96 %-го этанольного экстракта.

Стабильные коллоидные наночастицы серебра были синтезированы с использованием водного экстракта *Caulerpa serrulata* (зеленые морские водоросли) в качестве эффективного восстанавливающего и стабилизирующего агента [6]. Синтезированные AgNP показали высокую каталитическую восстановительную активность красителя конго красного (CR) из водных растворов. Также

AgNP проявляли антибактериальную активность при более низких концентрациях в отношении *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sp.*, *Salmonella typhi* и *Escherichia coli* и могут быть хорошим альтернативным терапевтическим средством.

AgNP могут быть синтезированы с использованием экстракта плодов *Terminalia bellirica* и микроволнового излучения [11]. Эти AgNP показали заметную каталитическую активность в восстановлении 4-нитрофенола до 4-аминофенола в присутствии NaBH_4 . Синтезированные AgNP показали потенциальную антибактериальную и антибиопленочную активность против бактериальных патогенов, таких как *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.

В последние годы были опубликованы работы, посвященные получению готовых лекарственных форм различными методами, при которых наночастицы серебра встраивались в глобулы, сферы или мембраны [5, 15, 16]. Это обусловлено стремлением снизить возможные цитотоксические эффекты AgNP на кератиноциты и фибробласты [17].

Коллоидные растворы наночастиц серебра были стабилизированы лецитином, и влияние концентраций лецитина на стабильность синтезированных наночастиц серебра оценивали при температуре от 25 до 80 °C [15]. Результаты показали, что повышение температуры вызывает различные изменения размера стабилизированных и нестабилизированных наночастиц серебра. Размер стабилизированных наночастиц серебра уменьшился с 38 до 36 нм при повышении температуры, что подтвердило их хорошую стабильность.

В другой работе AgNP были встроены в чувствительный к температуре и pH микрогель на основе поли-(N-изопропилакриламида) и хитозана (PNCS) [16]. В результате чего была получена «умная» текстильная ткань с возможностью контроля за влажностью и антимикробным действием. Была оценена антимикробная активность в отношении бактерий *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Независимо от способа встраивания, присутствие наночастиц серебра приводило к ухудшению активности влаги в исследуемом микрогеле. Микрогель PNCS оказался подходящим носителем антимикробных агентов, обеспечивая эффективное контролируемое высвобождение серебра, вызванное изменениями температуры и pH среды.

Биосорбируемые пористые структурированные микросферы изготавливали из амфифильного блок-сополимера, состоящего из блоков поли(1-лактида) и поли(этилгликоля) [5]. После покрытия поверхности полидопамином, микрос-

феры загружали наносеребром методом восстановления нитрата серебра. Оценка препарата *in vivo* проводилась путем погружения микросфер в инфицированные дефекты черепа крысы. Первичные результаты показали, что микросферы угнетали инфекцию, способствуя регенерации кости.

В настоящей работе была предпринята попытка синтеза квазисферических AgNP и стабилизации их несколькими способами для применения в лекарственных формах наружного применения.

Материалы и методы

Синтез коллоидного серебра

Смесь 6,25 мл воды, 1,25 мл цитрата натрия (1 % масс.), 1,25 мл нитрата серебра (1 % масс.) и 50 мкл йодида калия (300 мкМ) готовили при перемешивании и комнатной температуре и выдерживали в течение 5 минут. Эту смесь заливали 237,5 мл кипящей воды, которая включала 250 мкл аскорбиновой кислоты (0,1 М) при перемешивании. Цвет раствора менялся на желтый, затем на слегка оранжевый, что указывало на образование наночастиц. Затем коллоидный раствор кипятили в течение 15 минут. После охлаждения наночастицы серебра хранили в емкости из темного стекла в темном месте при температуре 4 °C.

Изучение физико-химических свойств AgNP

Снимки просвечивающей электронной микроскопии (TEM) получали на приборе JEM-2010 (JEOL, Tokyo, Japan).

Спектры поглощения коллоидных растворов получали при помощи спектрофотометра Unico 2802s (Usino Sys, США).

Исследование распределения липосом по размерам проводили на лазерном дифракционном анализаторе размера частиц Mastersizer 3000 (лазерный гранулометр).

Приготовление лекарственных форм

Смесь с альбумином

Для применения в медицинских целях используют изотонические растворы препаратов, в частности физиологический раствор (0,5 % NaCl). Коллоидный раствор наночастиц серебра в физиологическом растворе (ФР) не обладает седиментационной и химической стойкостью, поэтому наночастицы модифицировали альбумином человеческого (Baxter AG).

Коллоидный раствор AgNP объемом 5 мл смешивали с 1 мл 20 % водного раствора альбумина и перемешивали в течение 2 часов при скорости 300 мин⁻¹ на орбитальном шейкере LS-220 (LOIP, Россия).

Синтез липосомальной формы

Еще одним способом защиты наночастиц серебра от нежелательных воздействий является инкапсуляция их в липосомы. Также это способствует эффекту пролонгации.

Существуют различные методики получения липосом и их модифицирования с целью получения уникальных характеристик.

Наиболее известные из методик, применяемых для получения липосом, используемых в качестве носителей лекарственных средств: метод высокого давления, звуковой, конвекционный методы, метод растворения и удаления детергента, метод испарения с обращением фаз и другие [18].

Классическим и часто применяемым методом синтеза липосом является метод гидратации тонкой пленки, который состоит из включения антиоксиданта в липосомальную оболочку, в результате чего образуются многослойные везикулы. Получение однослойных липосом происходит путем обработки ультразвуком (звуковой метод) или пропусканием через фильтр экструдера (метод высокого давления). Этим методом получают так называемые «большие» липосомы.

Для синтеза липосом навеску соевого лецитина 75 мг растворяли в 15 мл хлороформа, добавляли 10 мкл α -токоферола ацетат и перемещали в круглодонную колбу на 1000 мл. Растворитель упаривали на ротационном испарителе RE-5000 (Rotary Evaporator, Китай) при откачке вакуумным насосом N810 (LABOPORT, Китай) без нагревания до образования тонкой пленки. Тонкую липидную пленку досушивали при температуре водяной бани

35 ± 5 °C до состояния прозрачности.

Далее гидратировали высушенную пленку раствором коллоидного серебра. Процесс гидратации продолжали до полного смывания липидной пленки со стенок колбы.

После гидратации липосомальную форму переносили в полипропиленовую пробирку и обрабатывали ультразвуком на диспергаторе УЗГ13-0,1/22 (НИИ ТВЧ, Россия) с частотой 20 кГц в течение 25–30 минут для получения однослойных липосом.

Загущение аэросилом

Часто в производстве мазей и гелей в качестве загустителя используют аэросил [19].

Для получения мази в коллоидный раствор AgNP добавлялся аэросил А-200 (Degussa AG), и каждый раз контролировался краевой угол смачивания капли полученной мази. При достижении краевого угла смачивания равного 90° мазь считалась готовой. Краевой угол смачивания контролировался при помощи установки, показанной на рисунке 1.

Инкорпорирование в микросферы

«Сфера-спектр»

Еще одним методом получения лекарственной формы может служить упаковка в микросферы. В работе использовались микросферы, насыщаемые полимерные, широкого спектра применения, для внутрисосудистых вмешательств в рентгенохирургии «Сфера-Спектр» ТУ 9398-001-44359038-2016. Микросферы набухают в растворах с увеличением размера и постоянно контактируют с внутренней средой организма.

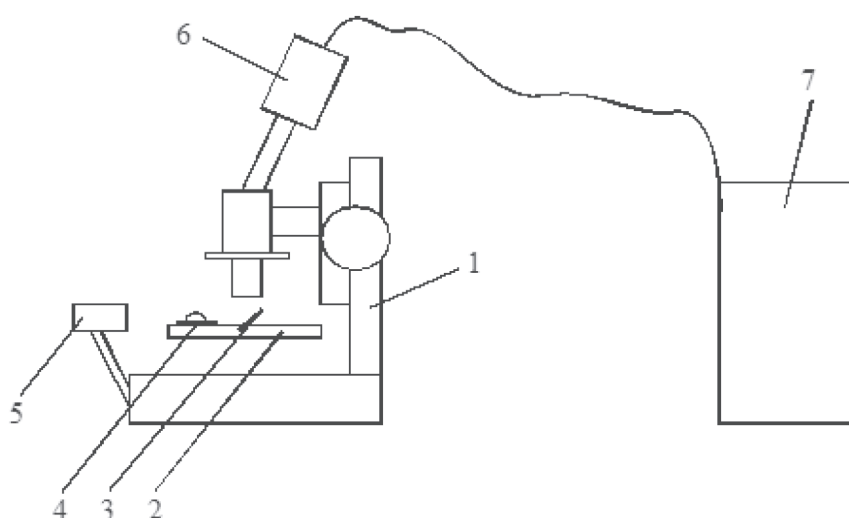


Рис. 1. Установка для получения проекции капли:

1 — микроскоп МБС-1 (ЛОМО, Россия); 2 — предметный столик микроскопа; 3 — металлическое зеркало, расположенное под углом 45° к столику; 4 — предметное стекло с каплей; 5 — осевой осветитель; 6 — видеокамера; 7 — персональный компьютер

Результаты и их обсуждение

Физико-химические характеристики наночастиц и коллоидного раствора

Полученный концентрат раствора наночастиц пропускали через центрифужные фильтры Vivaspin 6 с размером пор 1000000 кДа и 0,2 мкм (Sartorius, Germany) с материалом мембраны ПЭС.

Через мембранные фильтры 1000000 кДа и 0,2 мкм проходит 100 % наночастиц. При этом кол-

лоидный раствор абсолютно устойчив во времени и не меняет своих свойств.

Как видно на рисунке 2, коллоидный раствор содержит сферические частицы серебра размером около 40 нанометров. Частицы абсолютно электроноплотные, поэтому их структуру выявить не представляется возможным.

На рисунке 3 видно, что полосы поглощения, соответствующие плазмонному эффекту (макси-

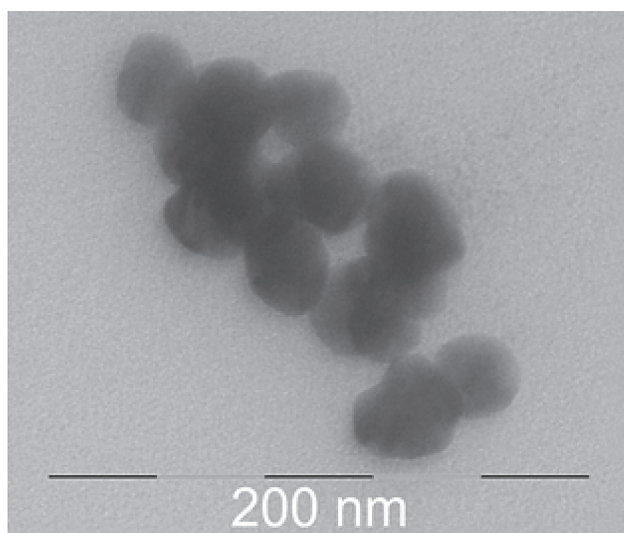


Рис. 2. Микрофотография наночастиц серебра

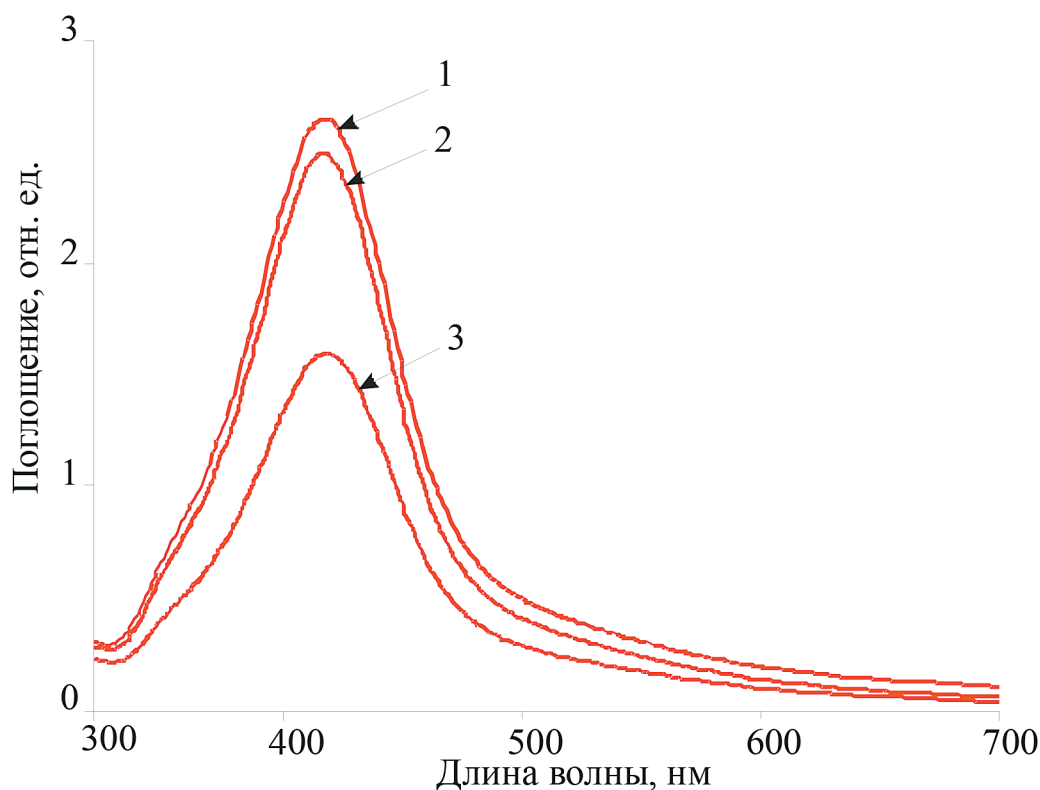


Рис. 3. Спектры поглощения суспензии наночастиц серебра:

1 — исходная суспензия; 2 — суспензия, пропущенная через фильтр 200 нм; 3 — суспензия, пропущенная через фильтр 1000000 кДа

мум 434 нм), коррелируют с приведенным в литературе [20].

Приготовление формы с альбумином предполагало, что проходило химическое связывание альбумина с поверхностью наночастиц, что в дальнейшем способствовало химической и физической устойчивости коллоидного раствора при добавлении 0,9 % NaCl. Такой раствор хранился не менее 6 месяцев в таре из темного стекла.

Липосомы, нагруженные AgNP, имели средний размер 1 мкм (рис. 4). Их сферическая структура и однослойность были подтверждены при помощи светового микроскопа (рис. 5). Такая форма имеет

срок хранения не менее 6 месяцев даже в прозрачной таре.

Рисунок 6 иллюстрирует динамику загущения коллоидного раствора наночастиц серебра аэросилом. На рисунке 6, а показана капля дистиллированной воды, а на рисунке 6, б — капля коллоидного раствора AgNP. Как видно, они имеют приблизительно одинаковый краевой угол смачивания, а значит практически одинаковую вязкость. При постепенном добавлении аэросила (рис. 6, в–з) краевой угол постепенно увеличивается и становится равным 90° при содержании аэросила в композиции равном 10 % масс.

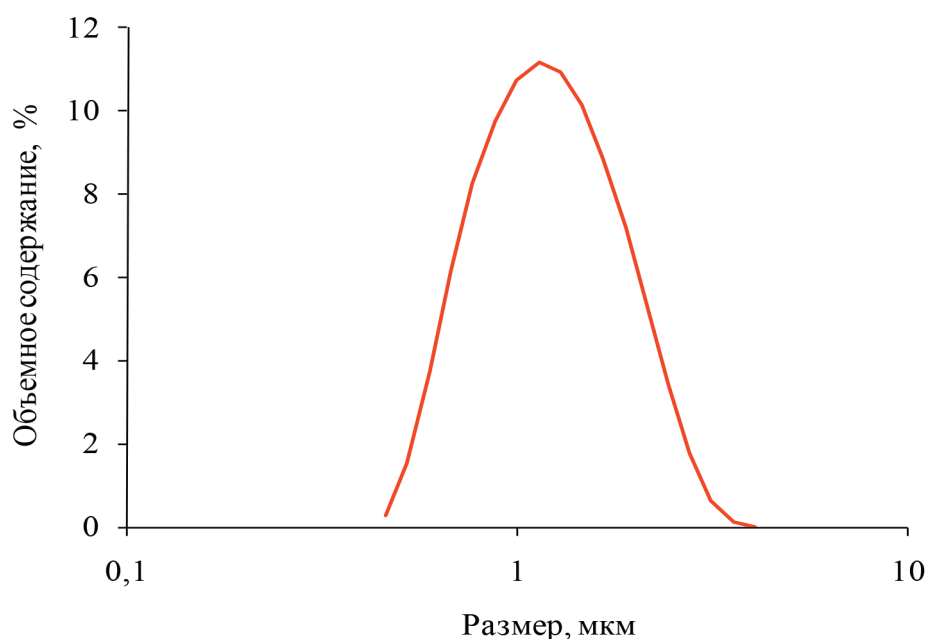


Рис. 4. Распределение липосом по размерам

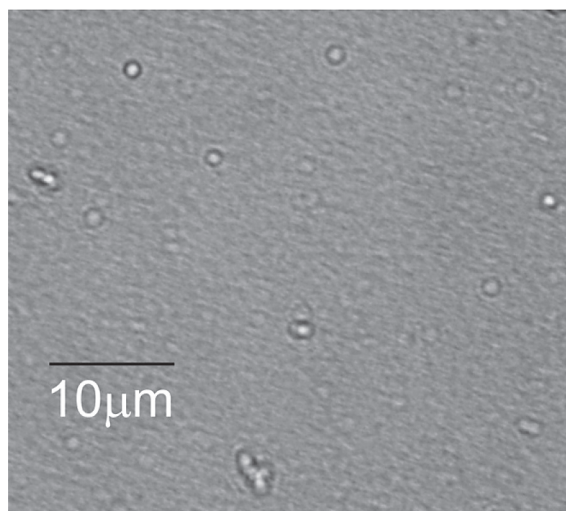


Рис. 5. Микрофотография липосом

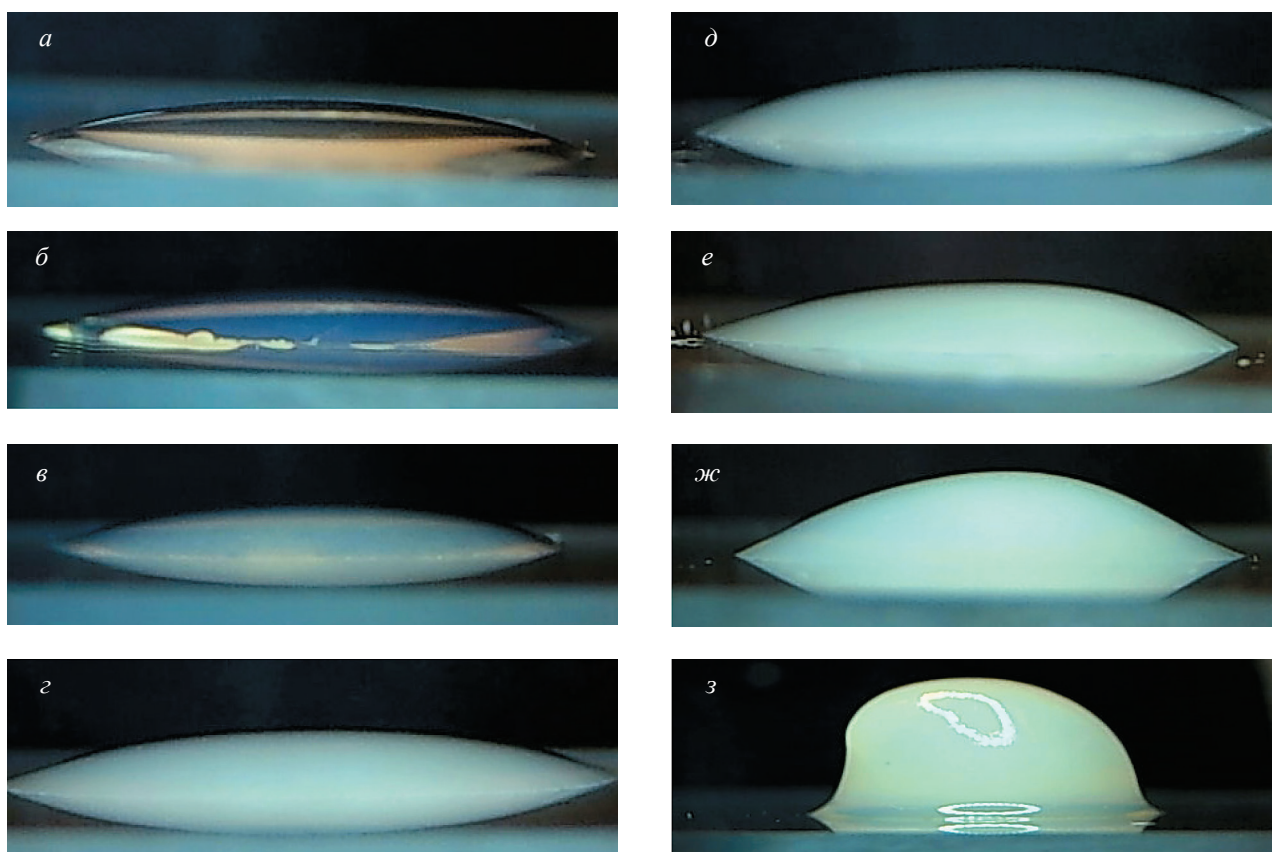


Рис. 6. Загущение коллоидного серебра аэросилом

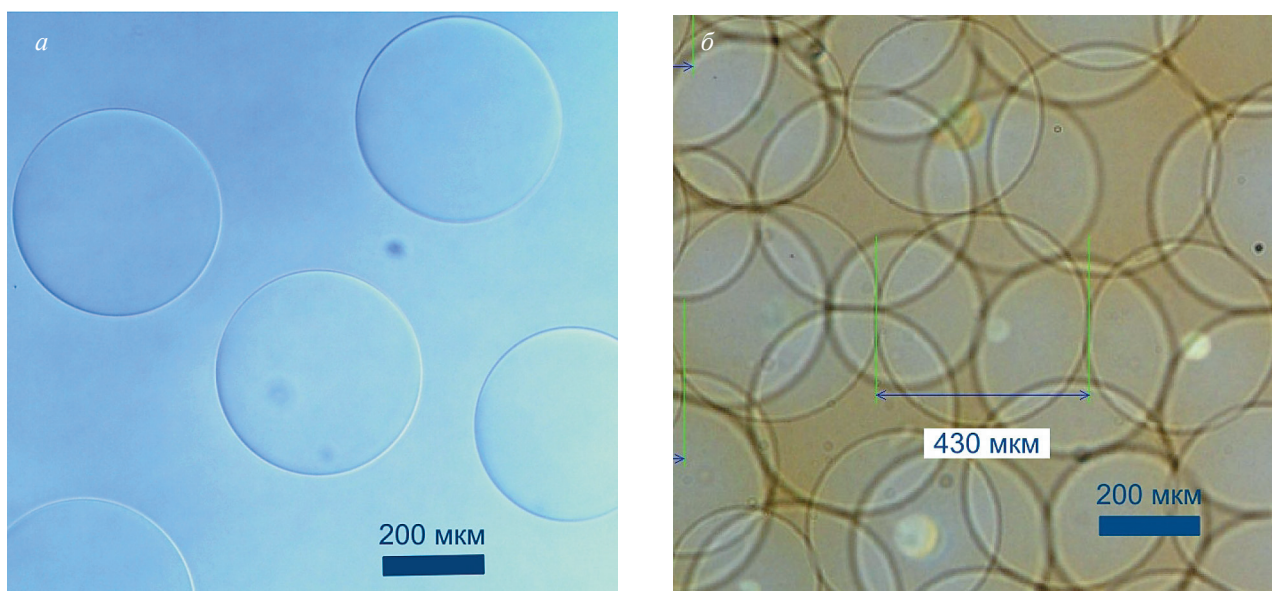


Рис. 7. Микросферы «Сфера-спектр»:

а — наполненные физиологическим раствором; б — наполненные суспензией коллоидного серебра

Для инкорпорирования коллоидного раствора в микросферы «Сфера-Спектр» во флакон, содержащий 25 мг микросфер размером 35–40 нм, добавляли 10 мл коллоидного раствора AgNP. При этом микросферы набухали, инкорпорировав наночастицы, и получался вязкий гель.

На рисунке 7 показаны микросферы, набухшие в физиологическом растворе (а) и в коллоидном растворе наночастиц серебра (б). По цвету сфер видно, что AgNP действительно инкорпорировались в микросферы, что позволило приготовить вязкую лекарственную форму, устойчивую во времени.

Заключение

В статье продемонстрировано несколько способов возможного приготовления готовых лекарственных форм на основе наночастиц коллоидного серебра: реакция с альбумином, липосомальная форма, загущение аэросилом и инкорпорирование в микросферы. Дальнейшее исследование как антимикробной активности, так и цитотоксичности позволит выявить лекарственные формы с оптимальным соотношением эффективность/безопасность.

Работа выполнена с применением оборудования ресурсного центра «Инновационные технологии композитных наноматериалов» Санкт-Петербургского государственного университета.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Dehkordi NH, Tajik H, Moradi M, et al. Antibacterial interactions of colloid nanosilver with eugenol and food ingredients. *J Food Prot.* 2019; 82(10):1783–1792.
2. Anuj SA, Gajera HP, Hirpara DG, Golakiya BA. Bacterial membrane destabilization with cationic particles of nano-silver to combat efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Life Sci.* 2019; 230:178–187.
3. Liu M, Liu T, Chen X, et al. Nano-silver-incorporated biomimetic polydopamine coating on a thermoplastic polyurethane porous nanocomposite as an efficient antibacterial wound dressing. *J Nanobiotechnology.* 2018; 16(1):89.
4. Metin-Gürsoy G, Taner L, Akca G. Nanosilver coated orthodontic brackets: in vivo antibacterial properties and ion release. *Eur J Orthod.* 2017; 39(1):9–16.
5. Wei P, Yuan Z, Cai Q, et al. Bioresorbable microspheres with surface-loaded nanosilver and apatite as dual-functional injectable cell carriers for bone regeneration. *Macromol Rapid Commun.* 2018; 39(20): e1800062.
6. Aboelfetoh EF, El-Shenody RA, Ghobara MM. Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using green algae (*Caulerpa serrulata*): reaction optimization, catalytic and antibacterial activities. *Environ Monit Assess.* 2017; 189(7):349.
7. Salvioni L, Galbiati E, Collico V, et al. Negatively charged silver nanoparticles with potent antibacterial activity and reduced toxicity for pharmaceutical preparations. *Int J Nanomedicine.* 2017; 12:2517–2530.
8. Tareq FK, Fayzunnisa M, Kabir MS. Antimicrobial activity of plant-median synthesized silver nanoparticles against food and agricultural pathogens. *Microb Pathog.* 2017; 109:228–232.
9. Sergeevna AS, Anatolevich SO, Nurchallaeva SG, et al. Silver in the meat and organs of broiler chickens in case of using colloidal silver as an alternative to antibiotics. *Biometals.* 2018; 31(6):975–980.
10. Alharbi NS, Govindarajan M, Kadaikunnan S, et al. Nanosilver crystals capped with *Bauhinia acuminata*

phytochemicals as new antimicrobials and mosquito larvicides. *J Trace Elem Med Biol.* 2018; 50:146–153.

11. Patil S, Chaudhari G, Paradeshi J, et al. Instant green synthesis of silver-based herbo-metallic colloidal nanosuspension in *Terminalia bellirica* fruit aqueous extract for catalytic and antibacterial applications. *3 Biotech.* 2017; 7(1):36.

12. Marchante L, Loarce L, Izquierdo-Cañas PM, et al. Natural extracts from grape seed and stem by-products in combination with colloidal silver as alternative preservatives to SO₂ for white wines: Effects on chemical composition and sensorial properties. *Food Res Int.* 2019; 125:108594.

13. Bhardwaj AK, Shukla A, Maurya S, et al. Direct sunlight enabled photo-biochemical synthesis of silver nanoparticles and their Bactericidal Efficacy: Photon energy as key for size and distribution control. *J Photochem Photobiol B.* 2018; 188:42–49.

14. Esfanddarani HM, Kajani AA, Bordbar AK. Green synthesis of silver nanoparticles using flower extract of *Malva sylvestris* and investigation of their antibacterial activity. *IET Nanobiotechnology.* 2017; 12(4):412–416.

15. Barani H, Montazer M, Braun HG, Dutschk V. Stability of colloidal silver nanoparticles trapped in lipid bilayer: effect of lecithin concentration and applied temperature. *IET Nanobiotechnol.* 2014; 8(4):282–289.

16. Štular D, Jerman I, Naglič I, et al. Embedment of silver into temperature- and pH-responsive microgel for the development of smart textiles with simultaneous moisture management and controlled antimicrobial activities. *Carbohydr Polym.* 2017; 159:161–170.

17. Poon VK, Burd A. In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns*, 2004, 30(2): 140–147.

18. Novikova AA, Kezimana P, Stanishevskij YM. Methods of obtaining liposomes, used as drug delivery system (review). Drug development and registration=Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv. 2017; 2(19):134–138. In Russian. [Новикова А.А., Кезимана П., Станишевский Я.М. Методы получения липосом, используемых в качестве носителей лекарственных средств (Обзор). Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017; 2(19):134–138.]

19. Semkina OA, Dzhavahyan MA, Levchuk TA, et al. Auxiliary substances used in technology of soft medicinal forms: ointments, gels, liniments, and creams). Chemical-Pharmaceutical journal=Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 2005; 39(9):45–48. In Russian. [Семкина О.А., Джавахян М.А., Левчук Т.А., и соавт. Вспомогательные вещества, используемые в технологии мягких лекарственных форм (мазей, гелей, линиментов, кремов). Химико-фармацевтический журнал. 2005; 39(9):45–48].

20. Khatami M, Noor FG, Ahmadi S, Aflatoonian M. Biosynthesis of Ag nanoparticles using *Salicornia bigelovii* and its antibacterial activity. *Electronic physician.* 2018; 10(4):6733–6740.

Информация об авторах:

Королев Дмитрий Владимирович, к.т.н., ведущий научный сотрудник НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; младший научный сотрудник ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России;

Шумило Михаил Викторович, студент СПбГЭТУ «ЛЭТИ»;

Истомина Мария Сергеевна, аспирант СПбГЭТУ «ЛЭТИ»; младший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Шульмейстер Галина Анатольевна, младший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Горшков Андрей Николаевич, к.б.н., заведующий лабораторией внутриклеточного сигналинга и транспорта ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России;

Крутиков Александр Николаевич, к.м.н., ведущий научный сотрудник НИО инфильтративных заболеваний сердца ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России.

Author information:

Korolev Dmitry V., PhD, Head of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre; Junior Researcher of the Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Shumilo Mikhail V., Student of Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI";

Istomina Maria S., PhD Student of Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI"; Junior Research Assistant of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre;

Shulmeijster Galina A., Junior Research Assistant of the Research Laboratory of Nanotechnologies, Almazov National Medical Research Centre;

Gorshkov Andrey N., PhD, Head of the Laboratory of Intracellular Signaling and Transport, Smorodintsev Research Institute of Influenza;

Krutikov Aleksandr N., PhD, Leading Researcher of the Research Department of Infiltrative Heart Diseases of Almazov National Medical Research Centre, the Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ КРЫСАМ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА С РАЗЛИЧНЫМИ ОБОЛОЧКАМИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ И МОРФОЛОГИЮ ЭНДОТЕЛИЯ И НА АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС

Торопова Я. Г.¹, Моторина Д. С.², Горшкова М. Н.², Гареев К. Г.³,
Королев Д. В.¹, Мужикян А. А.¹

Контактная информация:

Торопова Яна Геннадьевна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
пр. Пархоменко, д. 15, Санкт-Петербург,
Россия, 194156.
Email: toropova_yag@almazovcentre.ru

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург,
Россия

³Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им.
В. И. Ульянова (Ленина)», Санкт-Петербург, Россия

Статья поступила в редакцию 30.01.2020
и принята к печати 06.04.2020.

Резюме

Актуальность. На сегодняшний день активно ведутся разработки наночастиц для таргетной доставки лекарственных препаратов. Отдельное место занимают магнитные наночастицы (МНЧ) на основе оксидов железа ввиду их химической стабильности, относительно высокой биосовместимости и сравнительной легкости получения. Немодифицированные МНЧ могут легко окисляться, что, вероятно, приведет к токсическим эффектам и потере магнитной и коллоидной устойчивости, во избежание данных эффектов необходимо нанесение покрытия на их поверхность с последующим исследованием их влияния на эндотелий сосудов и антиоксидантный статус. **Цель работы.** Изучение влияния внутривенного введения крысам МНЧ на основе оксида железа с различными оболочками на функциональное состояние и морфологию эндотелия и на антиоксидантный статус. **Материалы и методы.** В данной работе использованы коллоидные растворы наночастиц магнетита, покрытые оболочками из альбумина (МНЧ + альбумин), полилактида (МНЧ + полилактид) и полисахарида (МНЧ + полисахарид), в 0,9 %-ом растворе NaCl. Исследование проводили на крысах-самцах стока Wistar SPF-категории. МНЧ вводились однократно в латеральную хвостовую вену крыс. Гистологическими методами была изучена морфология сосудов. Для исследования функциональной активности эндотелия использовали метод проволоочной миографии. Оценивались концентрации оксида азота и продуктов перекисного окисления липидов. Методом люминол-активированной хемилюминисценции оценены общая антиоксидантная активность и общая антиоксидантная емкость плазмы крови, полученной после введения МНЧ. **Результаты.** Однократное внутривенное введение крысам МНЧ + альбумин и МНЧ + полилактид не обеспечивает изменений реактивности сосудов, тогда как введение МНЧ + полисахарид обуславливает снижение эндотелий-зависимого расслабления с сохранением при этом способности к сокращению. Исследуемые виды магнитных наночастиц не влияют на метаболическую активность эндотелия и морфологию сосудов. Установлено,

что введение исследуемых агентов обуславливает снижение уровня перекисного окисления липидов. МНЧ + альбумин, МНЧ + полилактид и МНЧ + полисахарид при их однократном внутривенном введении обеспечивают схожий по выраженности, но разный по механизмам реализации эффект на антиоксидантный статус. **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые виды МНЧ обладают равнозначной биосовместимостью при их однократном внутривенном введении крысам.

Ключевые слова: антиоксидантный статус, биосовместимость, магнитные наночастицы, проволоочная миография, хемилюминесценция, эндотелий.

Для цитирования: Торопова Я.Г., Моторина Д.С., Горшкова М.Н. и др. Влияние внутривенного введения крысам наночастиц магнетита с различными оболочками на функциональное состояние и морфологию эндотелия и на антиоксидантный статус. *Трансляционная медицина*. 2020;7(2): 52–64. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-2-52-64.

THE EFFECT OF INTRAVENOUS ADMINISTRATION TO RATS OF MAGNETITE NANOPARTICLES WITH VARIOUS SHELLS ON THE FUNCTIONAL STATE AND MORPHOLOGY OF THE ENDOTHELIUM AND ON ANTIOXIDANT STATUS

Toropova Y. G.¹, Motorina D. S.², Gorshkova M. N.², Gareev K. G.³, Korolev D. V.¹, Muzhikyan A. A.¹

Corresponding author:

Toropova Yana G.
Almazov National Medical Research Centre
Parkhomenko str. 15-B,
Saint Petersburg, Russia, 194156
Email: toropova_yag@almazovcentre.ru

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University,
Saint Petersburg, Russia

³ Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", Saint Petersburg,
Russia

Received 30 January 2020; accepted 06 April 2020.

Abstract

Background. Today, the development of nanoparticles for targeted drug delivery is underway. A separate place is occupied by magnetic nanoparticles based on iron oxides (MNPs) due to their chemical stability, relatively high biocompatibility, and comparative ease of preparation. Unmodified MNPs can easily be oxidized, that can lead to toxic effects and a loss of magnetic and colloidal stability, in order to avoid these effects, it is necessary to coat their surface, then to study of their effect on vascular endothelium and antioxidant status. **Objective.** The aim of the work was to study the effect of intravenous injection to rats of magnetic nanoparticles of iron oxide with various shells on the functional condition and morphology of the endothelium and on antioxidant status. **Design and methods.** In this work, we used colloidal solutions of magnetite nanoparticles (MNP) in a 0.9 % NaCl solution. MNPs were coated with albumin (MNP + albumin), polylactide (MNP + polylactide) and polysaccharide (MNP + polysaccharide). The study was performed on male rats of the Wistar SPF-category. MNP were injected once into the lateral tail vein of rats. Vascular morphology was studied by histological methods. The functional activity of the endothelium was studied by wire myography method. The concentration of nitric oxide and the concentration of lipid peroxidation products were evaluated by enzyme immunoassay. Total antioxidant activity and total antioxidant capacity of plasma were evaluated by using the method of luminol-activated chemiluminescence. **Results.** A single intravenous injection to rats of MNP + albumin and MNP + polylactide does not provide changes in vascular reactivity, however, the introduction of MNP + polysaccharide

causes a decrease in endothelium-dependent relaxation while maintaining the ability to reduce. The studied types of magnetic nanoparticles do not affect the metabolic activity of the endothelium and vascular morphology. It was found that the introduction of the studied agents causes a decrease in the level of lipid peroxidation. MNP + albumin, MNP + polylactide, and MNP + polysaccharide, when it injected once intravenously, provide a similar effect, but different mechanisms of realization on the antioxidant status. **Conclusion.** The obtained data indicate that the studied species of MNPs have equal biocompatibility when they are once administered intravenously to rats.

Key words: antioxidant status, biocompatibility, chemiluminescence, endothelium, magnetic nanoparticles, wire myography.

For citation: Toropova Y.G., Motorina D.S., Gorshkova M.N. et al. The effect of intravenous administration to rats of magnetite nanoparticles with various shells on the functional state and morphology of the endothelium and on antioxidant status. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020;7(2): 52–64. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-2-52-64.

Список сокращений:

АБАП — 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан)дигидрохлорид, АО — антиоксидант, АОА — антиоксидантная активность, АОЕ — антиоксидантная емкость, АХ — ацетилхолин, ИФА — иммуноферментный анализ, МНЧ — магнитные наночастицы, МНЧ + альбумин — магнитные наночастицы, покрытые оболочкой из альбумина, МНЧ + полилактид — магнитные наночастицы, покрытые оболочкой из полилактида, МНЧ + полисахарид — магнитные наночастицы, покрытые оболочкой из полисахарида, ФЭ — фенилэфрин, ХЛ — люминол-активированная хемилюминесценция, $E_{\max}$ — значение максимальной величины ответа сосудов, ΔI — прирост интенсивности хемилюминесценции после выхода сигнала на плато, $\log EC_{50}$ — логарифм концентрации агониста, обеспечивающей половину величины максимального ответа, S — площадь «провала», или область подавления свечения после внесения плазмы в кювету, $\tan \alpha$ — тангенс угла наклона кривой во время нарастания интенсивности хемилюминесценции после ингибирования свечения.

Введение

На сегодняшний день активно ведутся разработки наночастиц для биомедицинских применений. Отдельное место в широком спектре наночастиц (липосомы, неорганические и полимерные наночастицы, наностержни и т. д.) занимают магнитные наночастицы (МНЧ) на основе оксидов железа ввиду их химической стабильности, относительно высокой биосовместимости и сравнительной легкости получения наночастиц магнетита и маггемита ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), а также возможности придания различных свойств посредством поверхностной модификации. МНЧ могут использоваться для адресной доставки лекарственных препаратов [1–3] в качестве

теплогенерирующих систем для гипертермического воздействия [4], в качестве контрастных агентов для магнитной резонансной томографии (МРТ) [3]. Перспективной областью применения МНЧ является создание чувствительных биосенсоров [5]. К недостаткам немодифицированных наночастиц можно отнести их способность легко окисляться в условиях окружающей среды (что, в свою очередь, может обуславливать токсические эффекты), а также потерю магнитной и коллоидной устойчивости [6]. Кроме того, агрегация наночастиц приводит к их быстрому обнаружению иммунной системой и, как следствие, уменьшению времени нахождения в кровотоке. Для обеспечения высокой коллоидной стабильности и преодоления тенденции к агрегации, повышения биосовместимости, а также для увеличения времени циркуляции наночастиц в кровотоке необходимо нанесение покрытия на их поверхность [7–8]. В качестве оболочек для МНЧ могут использоваться биосовместимые полимеры, такие как полиэтиленгликоль, полисахариды (декстран, крахмал и хитозан), полилактид [9] и др. Также естественным веществом для формирования биodeградируемой оболочки является альбумин — белок, содержащийся в плазме крови и формирующий «белковую корону» на поверхности необработанных наночастиц при введении в кровоток [10]. Известно, что наличие оболочки и ее качественный состав в значительной степени определяют механизм биологического действия и оказываемые эффекты [11]. Ранее авторами было подтверждено активное взаимодействие непокрытых наночастиц с эндотелием при их внутривенном введении [10, 12]. Данный факт обуславливает необходимость при модификации поверхности МНЧ проведения исследований, направленных на изучение эффектов взаимодействия МНЧ (при их внутривенном введении) с эндотелием сосудов.

Кроме того, необходимо учитывать при этом реализацию основного классического механизма, лежащего в основе токсического эффекта МНЧ — окислительного стресса.

Таким образом, целью исследования явилось сравнительное изучение влияния внутривенного введения крысам МНЧ на основе оксида железа с различными оболочками на функциональное состояние и морфологию эндотелия и на антиоксидантный статус.

Материалы и методы

Исследование выполнено на крысах-самцах стока Wistar SPF-категории массой $250 \text{ г} \pm 10 \%$, содержащихся на полном пищевом рационе соответственно суточным нормативам питания для данного вида животных, при стандартном суточном свето-темновом режиме. Эксперимент проводили, соблюдая принципы гуманного обращения с животными, регламентированные требованиями Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. В постановке опытов руководствовались требованиями Всемирного общества защиты животных (WSPA) и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

Синтез исследуемых агентов

В данной работе использованы МНЧ на основе магнетита с различными оболочками: МНЧ + альбумин, МНЧ + полилактид и МНЧ + полисахарид.

Синтез наночастиц магнетита. Раствор, объемом 1000 мл, содержащий смесь сульфатов железа (II), железа (III) и оксалата аммония в мольном соотношении 2:1:0.1, постоянно перемешивали со скоростью 4 мл/мин при добавлении 50 %-го раствора гидроксида аммония. МНЧ синтезировали до фиксации насыщенно черной окраски и установления значения pH 8–9. При помощи дискового неодимового магнита полученную суспензию подвергали осаждению, а затем промывали 4 раза дистиллированной водой. Для подготовки сухой пробы полученные МНЧ подвергались лиофильной сушке при температуре -50°C и давлении 3 Па в течение 7 суток.

Для синтеза был использован модифицированный реактор идеального смешения периодического действия емкостью резервуара 2000 мл (YINCHEN, Китай).

Получение опытных образцов МНЧ с различными оболочками:

Оболочка на основе полилактида. К 200 мг МНЧ добавляли 2 мл раствора PLA-D,L в хло-

роформе концентрацией 0,1 г/мл и 2 мл раствора карбоплатина в диметилсульфоксиде. Затем полученную суспензию с использованием шейкера LS-220 (LOIP, Россия) перемешивали 30 минут с частотой 300 мин^{-1} . После чего три раза промывали с магнитной сепарацией. В качестве растворителя на первой и второй промывке использовали хлороформ или изопропиловый спирт. В случае использования изопропилового спирта добавление его в суспензию производили при постоянном ультразвуковом воздействии длительностью 5–10 минут с использованием ультразвукового диспергатора УЗД-2 (ФГУП НИИ ТВЧ, Россия). После третьей промывки изопропиловым спиртом полученный осадок редиспергировали в дистиллированной воде, замораживали и лиофилизировали при температуре -50°C и давлении 30 Па в течение 48 часов на лиофильной сушилке Vaco II (ZirBus, США).

Оболочка из полисахаридов. Оболочку из полисахаридов наносили гидротермальным методом. Суспензию МНЧ обрабатывали насыщенным водным раствором глюкозы с добавлением карбоплатина при повышенном давлении до 50 МПа в течение 24 часов. К 50 мг МНЧ добавляли 1 мл водного раствора карбоплатина концентрацией 5 мг/мл и 200 мг глюкозы. После этого производили перемешивание суспензии с использованием шейкера LS-220 (LOIP, Россия) в течение 30 минут с частотой 300 мин^{-1} . Затем доводили объем образца до 15 мл добавлением дистиллированной воды и загружали в стальной мини-автоклав с вкладышем из политетрафторэтилена КН-25 (КНР). После остывания реактора естественным образом до комнатной температуры полученные МНЧ, промывали водой трехкратно с магнитной сепарацией. Затем осадок замораживали и лиофилизировали при температуре -50°C и давлении 30 Па в течение 48 часов на лиофильной сушилке Vaco II (ZirBus, США).

Оболочка из альбумина. К 50 мг МНЧ добавляли 1 мл раствора альбумина человека в воде концентрацией 0,2 г/мл и 1 мл раствора карбоплатина в воде концентрацией 5 мг/мл. Полученную суспензию перемешивали с использованием шейкера LS-220 (LOIP, Россия) в течение 30 минут с частотой 300 мин^{-1} . Затем осадок промывали водой трехкратно с магнитной сепарацией, замораживали и лиофилизировали при температуре -50°C и давлении 30 Па в течение 48 часов на лиофильной сушилке Vaco II (ZirBus, США).

Протокол исследования

Осуществляли однократное введение исследуемых агентов в латеральную хвостовую вену крыс в объеме, не превышающем максимально допустимые значения для лабораторных животных (2 мл).

Доза введенных наночастиц составляла 1,4 мг, что не превышает максимальных переносимых доз для данного металла [13]. Группы формировались в соответствии с введенными агентами (МНЧ + альбумин, МНЧ + полилактид и МНЧ + полисахарид). Животные контрольной группы получали инъекцию 0,9 % NaCl в эквивалентном объеме.

Через 1 час после введения [10, 14] исследуемых агентов животных наркотизировали (изофлюран), после чего производили взятие крови методом прокола задней полый вены для дальнейшего хемилюминесцентного и иммуноферментного анализа, а также выделение брыжейки тонкого кишечника для проведения миографии ($n = 9$ в каждой группе) и образцов сосудов брыжейки, срезов кишки и сальника для гистологических исследований.

Образцы крови, полученной от животных всех исследуемых групп, центрифугировали, полученную плазму алиquotировали и хранили при -80°C до момента проведения иммуноферментного анализа (ИФА) и хемилюминесцентного анализа. ИФА анализ (уровень NO, содержание перекисей) проводили на автоматическом биохимическом и ИФА-анализаторе ChemWell 2910 (Combi) (AwarenessTechnology, США) с помощью коммерческих наборов.

Оценка функциональной активности эндотелия

Функциональную активность эндотелия оценивали с помощью проведения проволоочной миографии изолированных сосудов брыжейки (*ex vivo*), а также на основании определения уровня оксида азота (NO), как основного маркера сохранности эндотелия. Выделенную брыжейку помещали в охлажденный раствор Кребса–Хензеляйта следующего состава (мМ): NaCl 119; KCl 4,7; $1,17$; $1,6$; $1,2$; 25 ; глюкоза 5,5; ЭДТА 0,03. Для исследования функциональной активности использовали артериолы брыжейки 3-го порядка длиной 3 мм. Эксперимент проводили в многокамерном миографе DMT620M (Дания) согласно описанной методике [15]. Сосуды монтировали в камере миографа при помощи стальных проволок (40 мкм). В течение всего эксперимента производили подогрев до 37°C и аэрацию карбогеном рабочего раствора. Для исследования функциональной активности использовали кумулятивные кривые «концентрация–ответ» для фенилэфрина (ФЭ) и ацетилхолина (АХ). Для исследования сократительной функции сосудов инкубировали в растворах с концентрацией ФЭ от 0,1 до 10 мкМ (10^{-7} – 10^{-5} М). Для исследования расслабления сосудов предварительно сокращали фенилэфрином на 60% от максимального сокраще-

ния, а затем производили инкубацию в растворах с концентрацией АХ от 0,1 до 10 мкМ. Регистрацию данных производили с помощью программы LabChart 8.

Оценка антиоксидантного статуса

Антиоксидантный статус оценивали с помощью люминол-активированной хемилюминисценции [с определением общей антиоксидантной активности (АОА) и антиоксидантной емкости (АОЕ) плазмы]. Также определяли уровни перекисного окисления липидов (по содержанию перекисей, образующихся при свободнорадикальном окислении липидов клеточной мембраны).

Оценку антиоксидантной активности и антиоксидантной емкости производили с помощью методики люминол-активированной хемилюминисценции (ХЛ) [16] на 12-кюветном хемилюминометре «Lum-1200» (ДИСофт, Россия) в термостатированных условиях при 37°C . В качестве реагентов использовали: генератор свободных радикалов 50 мМ раствор АБАП (2,2'-азо-бис(2-амидинопропан)дигидрохлорид) (Fluka, Германия) [17]; 1 мМ раствор люминола (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион), (Fluka, Германия); калий-фосфатный буфер pH 7.4. Для записи и визуализации сигнала использовали программное обеспечение PowerGraph 3.3. Оценивали изменение интенсивности свечения после добавления антиоксиданта (АО) в систему АБАП + люминол. Для проведения исследования в кювету вносили 920 мкл буфера, 20 мкл раствора люминола и 50 мкл раствора АБАП, инкубировали в течение 5 минут до стабилизации сигнала, затем добавляли 10 мкл плазмы, предварительно разбавленной в 10 раз, после чего ждали выхода сигнала на плато. Общий объем пробы в кювете составлял 1 мл. Интенсивность ХЛ регистрировали в вольтах. В контрольные кюветы вместо плазмы вносили эквивалентный объем буфера.

Общий антиоксидантный статус образца оценивали на основе следующих показателей (рис. 1): S — площадь «провала», или область подавления свечения; ΔI — прирост интенсивности ХЛ после выхода сигнала на плато; $\text{tg} \alpha$ — тангенс угла наклона кривой во время нарастания интенсивности ХЛ после ингибирования свечения. На хемилюминесцентной кривой после добавления плазмы выделяли следующие фазы: фаза 1 — подавление хемилюминесценции, фаза 2 — нарастание после ингибирования свечения, фаза 3 — область стационарного свечения. Рассчитывали площади фазы 1, являющейся мерой АОЕ плазмы, фазы 2, отображающей АОА белков плазмы, а также фазы 3, связанной с количеством альбумина (как важнейшего

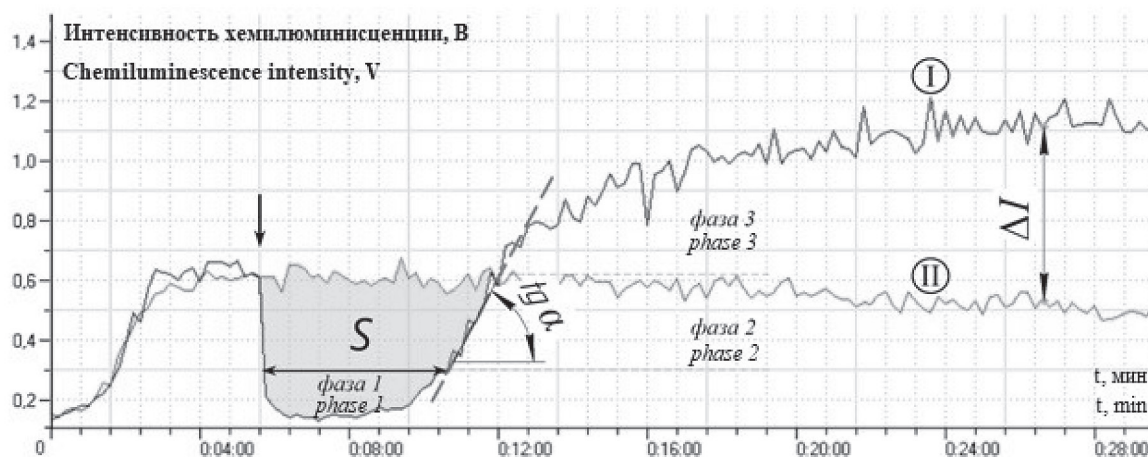


Рис. 1. Кривая развития ХЛ в системе АБАП + люминол + плазма: I — ХЛ в кювете с образцом плазмы; II — ХЛ в контрольной кювете

компонента антиоксидантной системы организма) и степенью его окисленности.

Оценка морфологических изменений сосудов

Производили оценку морфологических изменений фрагментов тонкой кишки, сальника и сосудов животных, как наиболее распространенных и хорошо изученных объектов исследований в аспекте физиологических изменений и нарушений состояния микроциркуляторного русла [18–19]. Материал для гистологического исследования фиксировали в 10 %-ом растворе нейтрального формалина в течение 24 часов, после чего по общепринятой методике заливали в парафин [20]. Затем изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Также образцы окрашивали по Перлсу с целью выявления трехвалентного железа [21]. Морфологическое исследование гистологических препаратов проводилось при помощи светоптического микроскопа CarlZeissPrimoStar при увеличении 10 и 40. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры TourCam и программного обеспечения TourView.

Статистическая обработка данных

Для обработки результатов проводочной мюграфии использовали программы MicrosoftExcel и GraphPadPrism 6. Данные подвергали нормализации, а затем применяли методы нелинейного регрессионного анализа. За критический уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$. Вычисляли значение логарифма концентрации агониста, обеспечивающей половину величины максимального ответа ($\log EC_{50}$), характеризующее

чувствительность сосудов, и значение максимальной величины ответа ($E_{\max}$), характеризующее интенсивность реакции сосудов.

Полученные результаты ХЛ и ИФА обрабатывались с помощью программы GraphPadPrism 6. Для оценки достоверности различий между несопряженными совокупностями применялся U-критерий (Манна–Уитни). Достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Результаты

Исследование функциональной активности эндотелия

Исследование активности эндотелия в условиях *ex vivo*

Значения $\log EC_{50}$ и $E_{\max}$ для АХ и ФЭ в исследуемых группах представлены в таблице 1. Кривые зависимостей «концентрация–ответ» при воздействии фенилэфрина представлены на рисунке 2А. В условиях введения всех видов наночастиц сократительная активность изолированных сосудов не отличалась от таковой в группе контроля ($p > 0,05$). Значения $\log EC_{50}$ для ФЭ во всех исследуемых группах статистически не различались ($p > 0,05$), что являлось свидетельством сохранности чувствительности сосудов к агонисту в условиях воздействия всех видов МНЧ.

В условиях введения МНЧ + альбумин и МНЧ + полилактид характер расслабления сосудов не отличался от такового в группе контроля. В то же время на фоне введения МНЧ + полисахарид отмечалось достоверное снижение ответа на АХ в диапазоне концентраций 1,3; 1,5; 3 (мкМ) (в логарифмическом масштабе соответственно: $-5,9$; $-5,8$; $-5,5$ (М), $p < 0,05$

по сравнению с контролем), с приближением релаксации к контрольному уровню, с увеличением концентрации агониста от 3 до 10 мкМ (табл. 1, рис. 2Б).

Таким образом, однократное внутривенное введение крысам МНЧ + альбумин и МНЧ + полилактид не обеспечивает изменений реактивности сосудов, тогда как введение МНЧ + полисахарид обуславливает снижение эндотелий-зависимого расслабления с сохранением при этом способности к сокращению.

Исследование содержания оксида азота

Концентрация оксида азота в образцах плазмы крови животных всех исследуемых групп статистически не различалась ($p > 0,05$). Значения концентраций NO в исследуемых группах представлены на рисунке 3.

В условиях однократного внутривенного введения крысам всех видов наночастиц уровень оксида азота соответствовал таковому в группе контроля.

Таким образом, однократное внутривенное введение всех исследуемых видов МНЧ не обеспечивает изменения уровня оксида азота.

Исследование антиоксидантного статуса плазмы крови

Исследование антиоксидантной активности и антиоксидантной емкости

Наибольшая площадь ингибирования свечения наблюдалась у образцов плазмы, полученной от крыс после введения МНЧ + полилактид ($p < 0,05$ по сравнению с МНЧ + полисахарид и МНЧ + альбумин, контроль), тогда как наимень-

Таблица 1. Значения $\log EC_{50}$ в молях ($M \pm SEM$) и E_{max} в процентах ($M \pm SEM$) для фенилэфрина (ФЭ) и ацетилхолина (АХ) в экспериментальных группах с введением МНЧ с различными оболочками

Агонист	Показатель	Контрольная группа	МНЧ + альбумин	МНЧ + полисахарид	МНЧ + полилактид
ФЭ	$\log EC_{50}$, М	$-5,88 \pm 0,07$	$-5,87 \pm 0,056$	$-5,96 \pm 0,06$	$-5,76 \pm 0,28$
	E_{max} , %	$124,02 \pm 11,21$	$130,39 \pm 7,13$	$121,17 \pm 7,37$	$124,41 \pm 7,58$
АХ	$\log EC_{50}$, М	$-6,69 \pm 0,05$	$-6,94 \pm 0,15$	$-6,72 \pm 0,14$	$-6,82 \pm 0,08$
	E_{max} , %	$93,19 \pm 2,66$	$82,45 \pm 6,76$	$80,26 \pm 7,93^*$	$94,67 \pm 1,92$

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

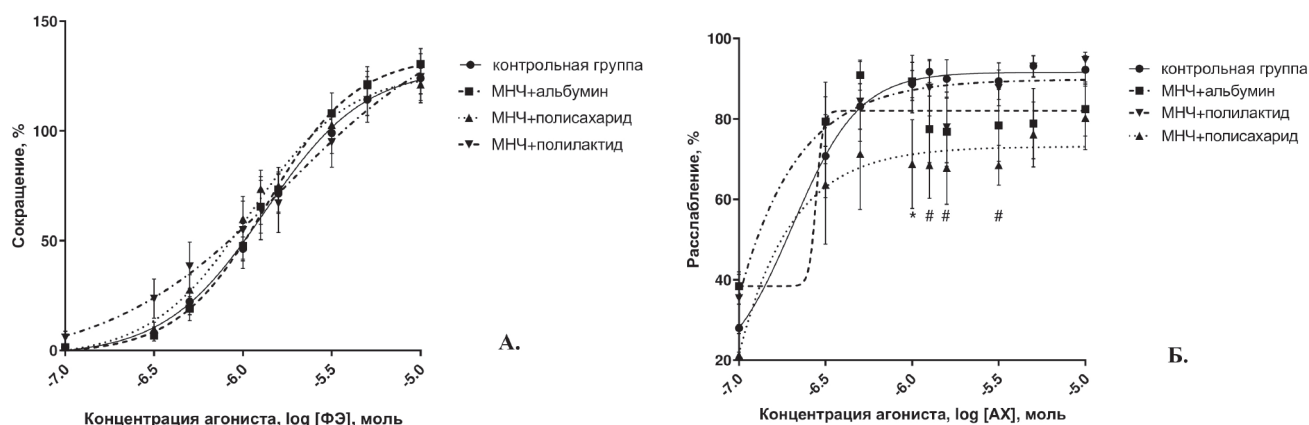


Рис. 2. Дозозависимое сокращение (А) и расслабление (Б) сосудов брыжейки крыс при внутривенном однократном введении МНЧ с различными оболочками.

По оси х: концентрация агониста в логарифмическом масштабе в молях. По оси у: интенсивность ответа в процентах ($M \pm SEM$). # — $p < 0,05$, контроль по сравнению с МНЧ + полисахарид; * — $p < 0,05$, МНЧ + альбумин по сравнению с МНЧ + полисахарид

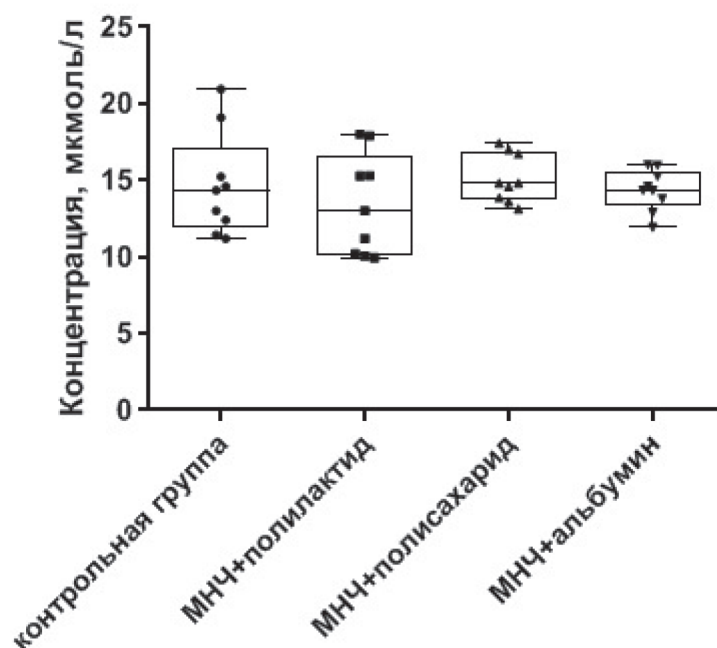


Рис. 3. Уровни NO (ммоль/л) в плазме крови крыс на фоне внутривенного введения магнитных наночастиц с различными оболочками

шая площадь ингибирования свечения оказалась у группы животных после введения МНЧ + альбумин ($p < 0,05$ по сравнению с контролем и группой МНЧ + полилактид) (рис. 4).

Значение тангенса угла наклона кривой во время нарастания интенсивности ХЛ после ингибирования свечения оказалось максимальным в образцах плазмы, полученной от животных с введением МНЧ + альбумин ($p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, МНЧ + полисахарид и МНЧ + полилактид) (рис. 5).

Минимальный прирост уровня стационарного свечения наблюдался в образцах плазмы крови, полученной от крыс с введением МНЧ + альбумин ($p < 0,05$ по сравнению с контролем) (рис. 6).

Таким образом, образцы из группы МНЧ + полилактид обладали наибольшей площадью ингибирования свечения и соответственно наибольшей АОЕ. Показатели тангенса угла наклона касательной к кривой возрастания интенсивности и прироста уровня стационарного свечения для данной группы не отличались от контроля. Образцы из группы МНЧ + полисахарид отличались наименьшим tga , причем данный показатель статистически значимо не отличался от контроля, только от группы МНЧ + полилактид. Таким образом, скорость взаимодействия (АОА) белков плазмы из группы МНЧ + полисахарид со свободными радикалами была наименьшей, но значимо не отличалась от контроля. Показатели S и ΔI для плазмы, полученной после введения магнитных наночастиц

с оболочкой из полисахарида, не отличались от показателей контрольной группы.

По всем тем показателям от контрольной группы отличались образцы из группы МНЧ + альбумин. Количество антиоксидантов (АОЕ) в данной системе оказалось наименьшим, а tga (скорость взаимодействия АО со свободными радикалами) — наибольшим по сравнению со всеми исследуемыми группами. Изменение интенсивности свечения ΔI также оказалось наименьшим.

Таким образом, МНЧ + альбумин, МНЧ + полилактид и МНЧ + полисахарид при их однократном внутривенном введении обеспечивают схожий по выраженности, но разный по механизмам реализации эффект на антиоксидантный статус.

Исследование концентрации перекисей

Концентрация продуктов перекисного окисления липидов в контрольных образцах была достоверно ($p < 0,05$) выше, чем в образцах плазмы крови крыс с введением МНЧ + полисахарид, МНЧ + полилактид и МНЧ + альбумин. Уровни концентраций перекисей для всех исследуемых групп представлены на рисунке 7.

Однократное внутривенное введение крысам МНЧ с оболочками из полилактида, альбумина и полисахарида обеспечивает равнозначное снижение уровня перекисей в плазме крови.

Результаты гистологического исследования

Кровеносные сосуды во всех исследованных образцах имели типичное гистологическое строение.

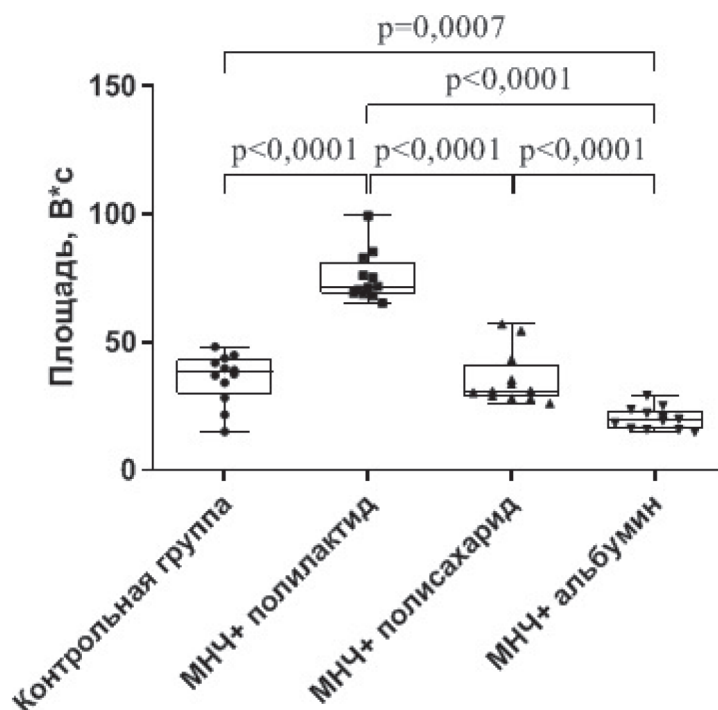


Рис. 4. Площадь ингибирования ХЛ после добавления плазмы в систему АБАП + люминол (В×с) наночастиц с различными оболочками

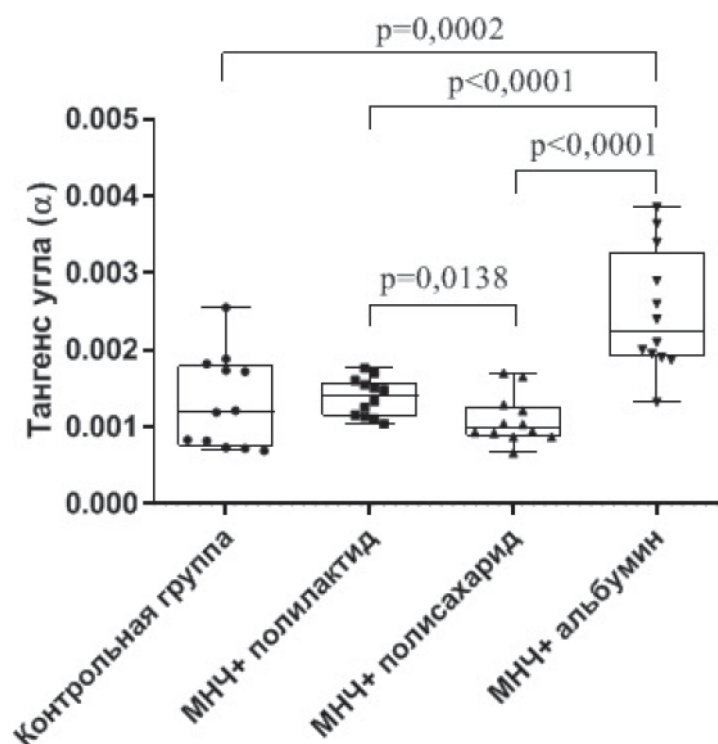


Рис. 5. Тангенс угла наклона касательной к кривой возрастания интенсивности ХЛ

Внутренняя оболочка была представлена эндотелиальным слоем, образованным уплощенными эндотелиоцитами вытянутой формы, и субэндотелиальным слоем из элементов рыхлой соединительной ткани. В интиме артерий определялась внутренняя

эластическая мембрана. Средняя оболочка была образована гладкими миоцитами, клетками фибробластического ряда и эластическими элементами (эластические волокна и мембраны в артериях). Адвентиция сосудов была образована рыхлой сое-

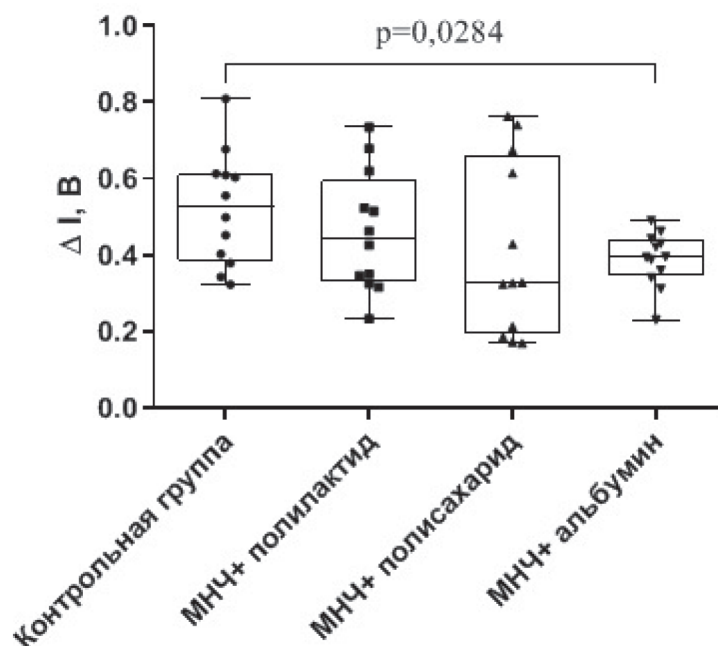


Рис. 6. Изменение интенсивности свечения (B) после окончания фазы ингибирования (прирост уровня стационарного свечения)

динительной тканью. Сосуды микроциркуляторного русла были представлены артериолами, прекапиллярами, капиллярами, посткапиллярами и венулами. Гистологическое строение сосудов микроциркуляторного русла в исследованных образцах также соответствовало норме. Эндотелиальные клетки были без выраженных повреждений, имели характерную полярность, сохраняли межклеточную связь, обеспечивая непрерывность эндотелия во всех исследованных сосудах. Гистохимическая окраска по Перлсу показала отсутствие в исследованных образцах соединений трехвалентного железа.

Обсуждение

В настоящем исследовании проводилось изучение влияния однократного внутривенного введения крысам МНЧ, различающихся качественным составом оболочки (из альбумина, полисахарида, полилактида), на функциональное состояние и морфологию эндотелия и на антиоксидантный статус.

На основании результатов, полученных в ходе изучения функциональной активности эндотелия, установлено, что однократное внутривенное введение крысам МНЧ + альбумин и МНЧ + полилактид не обеспечивает изменений реактивности сосудов, тогда как введение МНЧ + полисахарид обуславливает снижение эндотелий-зависимого расслабления с сохранением при этом способности к сокращению. Следует отметить при этом сохранность метаболической активности и морфологического строения эндотелия в условиях

воздействия всех используемых видов наночастиц. Ранее авторами было показано активное взаимодействие непокрытых наночастиц магнетита с клетками эндотелия в условиях *in vitro*, проявляющееся в виде снижения пролиферативной активности и жизнеспособности эндотелиоцитов, интернализации наночастиц в эндотелиальные клетки и, как следствие, изменении их морфологии [12]. Также в экспериментах *in vivo* с однократным внутривенным введением крысам наночастиц магнетита при отсутствии оболочки было продемонстрировано изменение в условиях их воздействия сократительной активности сосудов с сохранением эндотелий-зависимого расслабления [10]. Предположительно, наличие оболочки на поверхности наночастиц магнетита обуславливает изменение механизма взаимодействия наночастиц с эндотелием. Вероятно, наличие оболочки вне зависимости от ее качественного состава замедляет или нивелирует возможность поглощения наночастиц эндотелиальными клетками, о чем косвенно свидетельствует гистохимический и гистологический анализ. Не исключено, что данный факт находит свое отражение в виде отсутствия влияния внутривенного введения МНЧ + альбумин и МНЧ + полилактид на функциональную активность сосудов. При этом снижение релаксации сосудов в условиях воздействия МНЧ + полисахарид может быть обусловлено повреждающим действием свободных радикалов в условиях наименьшего (по сравнению с МНЧ + альбумин и МНЧ

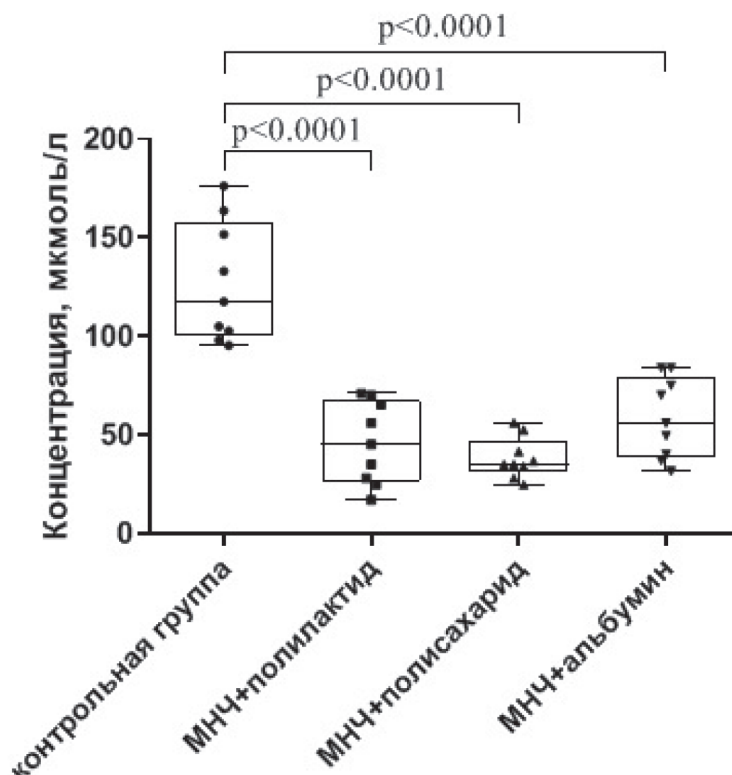


Рис. 7. Уровни оксистата (мкмоль/л) в плазме крови крыс на фоне внутривенного однократного введения магнитных наночастиц с различными оболочками

+ полилактид) воздействия на антиоксидантный статус.

Тенденция к снижению концентрации альбумина прослеживалась для всех исследуемых групп, что может быть связано с формированием «белковой короны» из альбумина на поверхности магнитных наночастиц при введении их в кровоток [10]. Значение концентрации продуктов перекисного окисления липидов для всех групп оказалось значимо меньше значения оксистата в контрольной группе. Это может быть обусловлено снижением генерации активных форм кислорода после введения исследуемых агентов. Также нельзя исключить и вероятность связывания наночастицами свободных радикалов [14].

Заключение

1. Однократное внутривенное введение крысам МНЧ + альбумин и МНЧ + полилактид не обеспечивает изменений реактивности сосудов, тогда как введение МНЧ + полисахарид обуславливает снижение эндотелий-зависимого расслабления с сохранением при этом способности к сокращению.

2. Однократное внутривенное введение всех исследуемых видов магнитных наночастиц не влияет на метаболическую активность эндотелия,

а также не обуславливает морфологических изменений сосудов.

3. Однократное внутривенное введение крысам магнитных наночастиц с оболочками из полилактида, полисахарида, альбумина обуславливает снижение уровня перекисного окисления липидов. По выраженности данного эффекта исследуемые виды наночастиц можно расположить в ряду (в порядке убывания эффекта): МНЧ + полилактид, МНЧ + полисахарид, МНЧ + альбумин.

4. Таким образом, МНЧ + альбумин, МНЧ + полилактид и МНЧ + полисахарид при их однократном внутривенном введении обеспечивают схожий по выраженности, но разный по механизмам реализации эффект на антиоксидантный статус.

5. МНЧ + альбумин, МНЧ + полилактид и МНЧ + полисахарид обладают равнозначной биосовместимостью при их однократном внутривенном введении крысам.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Reddy L, Arias J, Nicolas J, et al. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chemical Reviews*. 2012; 112(11):5818–5878.
2. Dobson J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Drug Development Research*. 2006; 67:55–60.
3. Sun C, Lee J, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2008; 60(11):1252–1265.
4. Liu X, Choo E, Ahmed A, et al. Magnetic nanoparticle-loaded polymer nanospheres as magnetic hyperthermia agents. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014; 2(1):120–128.
5. Haun JB, Yoon T-J, Lee H, Weissleder R. Magnetic nanoparticle biosensors. *WIREs: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2010; 2(3):291–304.
6. Gupta AK, Curtis AS. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. *Biomaterials*. 2004; 25(15): 3029–3040.
7. Sun S, Zeng H, Robinson DB, et al. Monodisperse MFe_2O_4 ($M=Fe, Co, Mn$) nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*. 2004; 126(1):273–279.
8. Mandal S, Chaudhuri K. A simple method for the synthesis of ultrafine carbon nanoparticles and its interaction with bovine serum albumin. *Advanced Science Letters*. 2012; 5(1):139–143.
9. Van Sliedregt A, Radder AM, de Groot K, van Blitterswijk CA. In vitro biocompatibility testing of polylactides Part I Proliferation of different cell types. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1992;3:365–370.
10. Toropova YaG, Zelinskaya IA, Markitanova AC, et al. The influence of magnetite nanoparticles and FemOn- SiO_2 colloidal particles on endothelium functional statement after intravenous injection in rats. *Russian Journal of physiology = Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2017; 103 (12):1416–1424. In Russian [Торопова Я.Г., Зелинская И.А., Маркитанова А.С. и соавт. Влияние наночастиц магнетита и коллоидных частиц FemO- SiO_2 на функциональное состояние эндотелия при внутривенном введении крысам. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2017; 103 (12):1416–1424].
11. Mandal S, Chaudhuri K. Magnetic core-shell nanoparticles for biomedical applications. In: Sharma S, (eds) *Complex Magnetic Nanostructures*. Cham: Springer International Publishing AG, 2017:425–453.
12. Toropova YaG, Golovkin AS, Malashicheva AB, et al. In vitro toxicity of FemOn, FemOn- SiO_2 composite, and SiO_2 -FemOn core-shell magnetic nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2017; 12: 593–603.
13. Waynforth HB, Flecknell PA. *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. 2nd ed. London: Academic Press, 1992: p. 382.
14. Toropova YaG, Pechnikova NA, Zelinskaya IA, et al. Hemocompatibility of magnetic magnetite nanoparticles and magnetite-silica composites in vitro. *Bulletin of Siberian Medicine = Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2018; 17(3):157–167. In Russian [Торопова Я.Г., Печникова Н.А., Зелинская И. А. и соавт. Изучение гемосовместимости магнитных наночастиц магнетита и композитных частиц магнетита-кремнезема in vitro. Бюллетень сибирской медицины. 2018; 17 (3):157–167].
15. Zelinskaya IA, Toropova YaG. Wire myography in modern scientific researches: methodical aspects. *Regional blood circulation and microcirculation = Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya*. 2018;17(1):83–89. In Russian [Зелинская И.А., Торопова Я.Г. Проволочная миография в современных научных исследованиях: методические аспекты. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2018; 17(1): 83–89].
16. Vladimirov YuA, Proskurnina EV. Free radicals and cell chemiluminescence. *Advances in biological chemistry = Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2009; 49: 341–388. In Russian [Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция. Успехи биологической химии. 2009; 49: 341–388].
17. Uotila J, Kirkkola AL, Rorarius M, et al. The total peroxy radical-trapping ability of plasma and cerebrospinal fluid in normal and preeclamptic parturients. *Free Radical Biology and Medicine*. 1994;16(5):581–590.
18. Petrenko VM. The reticular structure of the microcirculatory. *University proceedings. Volga region. Medical sciences = Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Meditsinskie nauki*. 2010; 13(1): 37–46. In Russian [Петренко В.М. Сетевидная конструкция микроциркуляторного русла. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2010; 13(1): 37–46].
19. Tybinka AM, Paladiychuk ER. Characteristic of the blood vessels of the intestine and its mesentery. *Scientific messenger of LNU of veterinary medicine and biotechnologies = Naukovyj visnyk LNUVMBT imeni S.Z. G'zhyckogo*. 2015; 17 (2): 232–240. In Russian [Тыбинка А.М., Паладийчук Е.Р. Характеристика кровеносных сосудов кишечника и его брыжейки. Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. 2015; 17 (2): 232–240].
20. Junqueira L, Carneiro J. *Junqueira's basic histology. Text and atlas*. 11th ed. New York: McGraw-Hill, 2005. p. 544.
21. Korzhevskiy DE, Kolos EA, Karpenko MN, et al. *Histochemical determination of metals*. SPb: SpetsLit, 2016. p. 63. In Russian [Коржевский Д.Э., Колос Е.А., Карпенко М.Н. и др. Гистохимическое определение металлов. СПб: СпецЛит, 2016. с 63].

Информация об авторах:

Торопова Яна Геннадьевна, к.б.н., заведующий НИЛ биопротезирования и кардиопротекции Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Моторина Дарья Сергеевна, лаборант-исследователь НИЛ биопротезирования и кардиопротекции Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Горшкова Мария Николаевна, лаборант-исследователь НИЛ биопротезирования и кардиопротекции Центра экспериментального биомоделирования Института

та экспериментальной медицины, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Гареев Камилъ Газинурович, к.т.н., ассистент СПб-ГЭТУ «ЛЭТИ»;

Королев Дмитрий Владимирович, к.т.н., доцент, заведующий НИЛ нанотехнологий, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Мужикян Арман Артушович, к.ветеринар.н., лаборант-исследователь вивария № 1 питомника лабораторных животных с вивариями Центра доклинических и трансляционных исследований Института экспериментальной медицины, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Toropova Yana G., PhD, Associate Professor, Head of Bioprosthesis and Cardioprotection Research Lab, Almazov National Medical Research Centre;

Motorina Darya S., Research Assistant, Almazov National Medical Research Centre;

Gorshkova Mariya N., Research Assistant, Bioprosthesis and Cardioprotection Research Lab, Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg;

Gareev Kamil G., PhD, Assistant Professor, Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI";

Korolev Dmitriy V., PhD, Associate Professor, Head of Nanotechnology Research Lab, Almazov National Medical Research Centre;

Muzhikyan Arman A., PhD, Research Assistant, Vivarium, Centre of Doclinical Studies, Almazov National Medical Research Centre.

ВЕГЕТОТРОПНЫЙ И ЭМОЦИОНАЛЬНО-ПОВЕДЕНЧЕСКИЙ ЭФФЕКТЫ МОКСОНИДИНА У НОРМОТЕНЗИВНЫХ КРЫС

Цырлин В. А.¹, Плисс М. Г.^{1,2}, Кузьменко Н. В.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени академика
И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Кузьменко Наталья Владимировна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Пархоменко, д. 15, лит. Б, Санкт-
Петербург, Россия, 194156.
E-mail: kuzmenko@niiekf.ru

Статья поступила в редакцию 24.01.2020
и принята к печати 09.03.2020

Резюме

Цель настоящей работы заключалась в изучении вегетотропного и эмоционально-поведенческого эффектов агониста имидазолиновых рецепторов моксонидина. **Материалы и методы.** На бодрствующих самцах линии Wistar исследовалось действие моксонидина в различных дозах (без и с предварительным введением преимущественного блокатора имидазолиновых рецепторов эфароксана) на параметры гемодинамики, показатели вариабельности сердечного ритма (ВСР), сердечно-сосудистый ответ на стресс и на поведение в тесте «открытое поле». **Результаты.** Показано, что моксонидин в исследуемых дозах не оказывает существенного влияния на параметры гемодинамики, компоненты спектра ВСР и локомоторную активность животных, однако уменьшает тахикардическую реакцию на звонок. Последний эффект моксонидина снимается предварительным введением эфароксана. **Заключение.** Основываясь на результатах проведенного исследования и литературных данных, можно предположить, что в уменьшение сердечно-сосудистого ответа на стресс и в седативное действие препаратов группы «имидазолины» вовлечены разные типы рецепторов. В первом случае эффект обусловлен активацией I₁-рецепторов, во втором — α_2 -адренергических рецепторов. Также результаты проведенных экспериментов позволяют сделать заключение, что у нормотензивных крыс функциональная активность имидазолиновых рецепторов снижена по сравнению с гипертензивными крысами. Возможно, этим обстоятельством и объясняется низкая эффективность моксонидина у крыс линии Wistar.

Ключевые слова: вариабельность сердечного ритма, имидазолиновые рецепторы, моксонидин, тест «открытое поле», эмоциональный стресс.

Для цитирования: Цырлин В.А., Плисс М.Г., Кузьменко Н.В. Вегетотропный и эмоционально-поведенческий эффекты моксонидина у нормотензивных крыс. Трансляционная медицина. 2020;7(2): 65–72. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-2-65-72.

VEGETOTROPIC AND EMOTIONAL-BEHAVIORAL EFFECTS OF MOXONIDINE IN NORMOTENSIVE RATS

Tsyrlin V. A.¹, Pliss M. G.^{1,2}, Kuzmenko N. V.^{1,2}

¹Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

²Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Kuzmenko Natalia V.,
Almazov National Medical Research Centre,
Parkhomenko str. 15-B, Saint Petersburg,
Russia, 194156.
E-mail: kuzmenko@niiekf.ru

Received 24 January 2020, Accepted
09 March 2020.

Abstract

The purpose of this work was to study the vegetotropic and emotional-behavioral effects of the imidazoline receptor agonist moxonidine. **Materials and methods.** In awake males of the Wistar line, the effect of moxonidine in various doses (without and with the preliminary introduction of the predominant blocker of the imidazoline receptors of efaroxan) on hemodynamic parameters, heart rate variability (HRV), cardiovascular response to stress and on the behavior in the “open field” test was studied. **Results.** It was shown that moxonidine in the studied doses does not significantly affect the hemodynamic parameters, the components of the HRV spectrum and the locomotor activity of animals, however, it reduces the tachycardic response to the call. The last effect of moxonidine is removed by the preliminary administration of efaroxane. **Conclusion.** Based on the results of the study and literature data, it can be assumed that different types of receptors are involved in reducing the cardiovascular response to stress and in the sedative effect of drugs of the imidazoline group. In the first case, the effect is due to the activation of I1 receptors, in the second — $\alpha 2$ -adrenergic receptors. Also, the results of the experiments allow us to conclude that in normotensive rats, the functional activity of imidazoline receptors is reduced in comparison with hypertensive rats. Perhaps this circumstance explains the low efficacy of moxonidine in Wistar rats.

Key words: emotional stress, heart rate variability, imidazoline receptors, moxonidine, open field test.

For citation: Tsyrlin V.A., Pliss M.G., Kuzmenko N. V. Vegetotropic and emotional-behavioral effects of moxonidine in normotensive rats. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020;7(2): 65–72. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-2-65-72.

Список сокращений: АД — артериальное давление, БР — барорецепторный рефлекс, ВСР — вариабельность сердечного ритма, ВЧ — высокие частоты, МСИ — межсистолический интервал, НЧ — низкие частоты, САД — систолическое артериальное давление, ЧСС — частота сердечных сокращений.

Введение

Ранее было установлено, что моксонидин снижает повышение артериального давления (АД) в условиях эмоционального стресса и восстанавливает барорецепторный рефлекс (БР) у крыс линий WKY и SHR [1]. Этот эффект препарата обусловлен активацией имидазолиновых рецепторов мозга, по морфологическим и функциональным характеристикам

отличных от $\alpha 2$ -адренорецепторов [2–5]. Показано, что аффинность моксонидина к I1-рецепторам примерно в 40 раз выше, чем к $\alpha 2$ -адренорецепторам [6], а гипотензивное действие моксонидина в 7–8 раз меньше, чем клонидина [7]. При этом моксонидин, усиливая БР, способен вызывать брадикардию и снижать активность симпатической нервной системы [1, 7–9]. Некоторые исследователи также отмечают седативный эффект моксонидина [10], который связывают с его родством к $\alpha 2$ -адренорецепторам, локализованным в locus coeruleus [11, 12].

В экспериментальных исследованиях симпатингибирующий эффект активации имидазолиновых рецепторов изучается в основном в условиях общей анестезии животных. Наблюдения, где этот

анализ осуществлялся бы на бодрствующих животных, единичны. Одним из способов оценки симпатингибирующего эффекта вегетотропных препаратов является анализ их влияния на компоненты спектра вариабельности сердечного ритма (ВСР) с применением математического метода обработки (преобразование Фурье) записей пульсаций, предложенного в 1996 году Европейским обществом кардиологии и Североамериканским обществом электростимуляции и электрофизиологии [13]. При данном методе анализа низкие частоты спектра (НЧ) связывают с симпатическими влияниями на работу сердца, а высокие частоты (ВЧ) — с парасимпатическими; по соотношению НЧ/ВЧ делают вывод о симпато-вагусном балансе.

К настоящему времени недостаточно работ, исследовавших действие моксонидина на активность вегетативной нервной системы и эмоциональное состояние бодрствующих животных. Цель данной работы — исследовать у бодрствующих нормотензивных крыс влияние моксонидина на изменение параметров гемодинамики (в покое и при эмоциональном стрессе), компонентов спектра ВСР и на поведение в тесте «открытое поле».

Материалы и методы

Общие положения и протокол экспериментов

Эксперименты были поставлены на 21 лабораторной крысе-самце линии Wistar трехмесячного возраста, массой 250–300 г, разведение — питомник «Рапполово». Условия проведения исследований были согласованы с Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, и было получено разрешение на их проведение (№ 77 от 21.06.2010). Крысы содержались в условиях свободного доступа к пище и воде при естественном освещении.

Были выделены три экспериментальные группы: контрольная (7 крыс) — введение физиологического раствора; 1-я опытная группа (7 крыс) — введение раствора моксонидина 100 мкг/кг; 2-я опытная группа (7 крыс) — введение раствора моксонидина 1000 мкг/кг. Все растворы вводились внутривенно в объеме 2 мл [14, 15]. Через 1 час [15] после введения растворов моксонидина проводились поведенческие тесты и регистрация параметров гемодинамики с анализом спектра ВСР.

В отдельной серии опытов было изучено влияние моксонидина [без (11 крыс) и с предварительной блокадой (8 крыс) имидазолиновых рецепторов эфароксаном] на изменения гемодинамики при эмоциональном напряжении, обусловленном условным раздражителем (звонок). Исследовалась амплитуда изменения на звонок АД, частоты

сердечных сокращений (ЧСС) и время развития реакции параметров.

Получение растворов

Получение раствора моксонидина было связано с восстановлением его в водорастворимую форму солянокислой соли из основания с последующим замещением сильной щелочью и получением в растворе основной формы в смеси с вытеснившим его хлоридом натрия. Рабочий раствор моксонидина получали путем растворения сухого вещества таблетки Cynt 0.4 (Solvay-Pharma) в смеси равных объемов (по 5 мл) 1N HCl и буфера с последующим титрованием 6 % NaOH до pH 7.0 [16]. Раствор необходимого объема и концентрации был получен путем добавления дистиллированной воды.

Порошок эфароксана разводился в физиологическом растворе до получения 0,2 % раствора, который вводился внутривенно в дозе 2 мг/кг.

Тест «открытое поле»

Локомоторная активность крыс была исследована с помощью теста «открытое поле». Для проведения теста использовался квадратный открытый манеж из белого пластика с размером стороны 76 см и с высотой бортов 27 см, поделенный на квадраты со стороной 19 см, с круглыми отверстиями диаметром 2 см в вершинах квадратов. Наблюдения за поведением крысы в «открытом поле» осуществлялись при помощи видеокамеры (автомобильного регистратора), размещенной таким образом, чтобы полностью обозревать манеж.

Манеж располагался на полу вивария. Освещенность в манипуляционной зоне была 487 люкс. Тест проводился с 10:00 до 16:00 часов.

При проведении теста крыса помещалась в центр манежа, и затем в течение 5 минут велось наблюдение за ее поведением. Оценивались следующие показатели: латентный период в секундах (от помещения животного в манеж до начала двигательной активности), горизонтальная активность (число пересеченных секторов-квадратов), вертикальная активность (количество вертикальных стоек с отрывом передних лап от пола), количество проходов через центр «открытого поля», количество обследованных отверстий, груминг. После тестирования каждого животного манеж протирался слабым раствором перекиси водорода для ликвидации органических меток.

Регистрация параметров гемодинамики

Измерение параметров гемодинамики осуществлялось у бодрствующих животных, зафиксированных в рестрейнере, с использованием компью-

терной программы Chart на системе неинвазивного измерения кровяного давления (ADInstruments, Австралия), включающей ML125 NIBP-контроллер, MLT125R-датчик пульса и хвостовую манжетку для крыс. Частота опроса — 100 Гц, FFT — 1024. Данная система позволяет регистрировать систолическое артериальное давление (САД) и межсистольный интервал (МСИ) на хвосте крысы. При измерении параметров производилось 5–6 тестирований, затем вычислялось среднее арифметическое значение.

Одновременно с регистрацией параметров гемодинамики с помощью программы Chart (ADInstruments) проводился спектральный анализ вариабельности сердечного ритма. Для анализа брались короткие участки записи пульсаций продолжительностью 40 секунд. С помощью математических методов, принятых Североамериканским обществом электростимуляции и электрофизиологии, проводился расчет в $\text{мс}^2/\text{Гц}$ низкочастотного компонента спектра (НЧ: 0,15–0,8 Гц), используемого как маркер активности симпатической нервной системы, и высокочастотного компонента спектра (ВЧ: 0,8–2,5 Гц), характеризующего парасимпатическую активность [13]. По соотношению НЧ/ВЧ делался вывод о симпато-вагусном балансе в регуляции работы сердца, сумма НЧ + ВЧ отражала общую мощность ВСР.

Исследование сердечно-сосудистого ответа на звонок

В отдельной серии наблюдений для регистрации АД и введения препаратов крысам в условиях наркоза за 2–3 дня до эксперимента в аорту (через бедренную артерию) и бедренную вену вживляли катетеры из полиэтилена высокого давления диаметром 0,5–0,6 мм (Курганский комбинат медполимеров «Синтез»), заполненные раствором гепарина (Гедеон Рихтер) в концентрации 500 ме/мл. Опыты проводились через 2–3 дня после оперативного вмешательства. В процессе наблюдений в покое и при эмоциональном стрессе, вызванном звонком, у животных регистрировались среднее АД и МСИ с помощью автоматической установки [1].

Отрицательное эмоциональное состояние у крыс вызывалось резким звуковым сигналом (звонок) в течение 15–30 секунд, который в период обучения животных сочетался с болевым раздражением корня хвоста (электрическая стимуляция параметрами: 30 стим/с, 1 мс, 2–3,5 мА, 10 с). В процессе эксперимента регистрировались гемодинамические реакции и время их развития только на условный раздражитель. Исследовалась реакция сердечно-сосудистой системы на звонок: в первой серии опытов (11 крыс) — исходная реакция и после внутривенного введения моксонидина в дозах 10 и 100 мкг/кг;

Таблица 1. Влияние моксонидина на параметры гемодинамики и компоненты вариабельности сердечного ритма крыс линии Wistar

Показатель	Контроль (n = 7)	Моксонидин 100 мкг/кг (n = 7)	Моксонидин 1000 мкг/кг (n = 7)
САД, мм рт. ст.	106 (100,5; 108,3)	110,2 (103,2; 115,4)	89,8* (88,4; 101,4)
МСИ, мс	179,6 (169,7; 184,9)	169,8 (154,9; 182,3)	180,1 (176,7; 189,3)
НЧ, $\text{мс}^2/\text{Гц}$	50,5 (27,2; 108,3)	27,4 (18,9; 61,3)	23,6 (22,4; 35,1)
ВЧ, $\text{мс}^2/\text{Гц}$	152,1 (129,0; 162,1)	93,9 (85,3; 118,8)	138,1 (114,9; 198,6)
НЧ + ВЧ, $\text{мс}^2/\text{Гц}$	188,2 (170,7; 278,4)	117,6 (104,1; 178,8)	161,7 (142,4; 247,6)
НЧ/ВЧ	0,43 (0,22; 0,57)	0,35 (0,24; 0,51)	0,24 (0,18; 0,26)

Примечания: * $p < 0,05$ — значимость различий относительно группы крыс, которым вводился моксонидин в дозе 0,01 мг/кг; САД — систолическое артериальное давление; МСИ — межсистольный интервал; НЧ — низкочастотный компонент вариабельности сердечного ритма; ВЧ — высокочастотный компонент вариабельности сердечного ритма; n — количество животных в группе.

Таблица 2. Влияние моксонидина на поведение крыс линии Wistar в тесте «открытое поле»

Показатель	Контроль (n = 7)	Моксонидин 100 мкг/кг (n = 7)	Моксонидин 1000 мкг/кг (n = 7)
Латентный период, с	1 (0; 1)	1 (0; 1)	2 (1; 3,5)
Горизонтальная активность, квадраты	41 (32; 62)	46 (34; 60)	36 (33; 49)
Вертикальная активность, стойки	14 (13; 36)	26 (13; 30)	18 (16; 20)
Обследование отверстий, штуки	1 (0; 5)	4 (3; 5)	4 (1; 4)
Прохождение через центр, раз	3 (1; 3)	4 (2; 4)	1 (1; 2)
Груминг, раз	3 (2; 6,5)	5 (3; 6)	2 (1; 4)

Примечание: n — количество животных в группе.

во второй серии опытов (8 крыс) — исходная реакция и после внутривенного введения моксонидина в дозах 10 и 100 мкг/кг с предварительным внутривенным введением преимущественного блокатора имидазолиновых рецепторов эфароксана (2 мг/кг).

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных проводилась при помощи программы Statistica 6.0. Поскольку исследуемые группы включали небольшое количество животных, использовались методы непараметрической статистики. Две независимые группы сравнивались с помощью U-критерия Манна–Уитни, две зависимые — с помощью критерия Вилкоксона. Статистически значимыми считались различия данных при $p < 0,05$. Результаты измерений представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (25 и 75-й перцентили).

Результаты

У бодрствующих крыс уровень САД был в среднем 106 мм рт. ст., МСИ — 179,6 мс. Внутривенное введение моксонидина в дозе 100 мкг/кг не влияло на параметры гемодинамики, при этом наблюдалась тенденция к уменьшению общей мощности спектра ВСР (табл. 1). Моксонидин в дозе 1000 мкг/кг проявлял незначительный гипотензивный и симпатотонизирующий эффекты (табл. 1).

По результатам теста «открытое поле» однократное внутривенное введение моксонидина в дозах 100 мкг/кг и 1000 мкг/кг не оказывало влияния

на локомоторную активность и тревожность крыс (табл. 2).

Как видно из таблицы 3 в ответ на условный раздражитель (звонок) сначала возникала тахикардия, затем повышалось АД. Внутривенное введение моксонидина в дозах 10 и 100 мкг/кг не влияло на изменения АД, обусловленные звонком, но уменьшало тахикардию, связанную с эмоциональным напряжением. Эффект моксонидина снимался предварительным введением эфароксана. Внутривенное введение моксонидина в дозах 10 и 100 мкг/кг не оказывало влияния на фоновые значения параметров гемодинамики.

Обсуждение

В экспериментах на наркотизированных крысах наблюдались дозозависимые эффекты моксонидина, которые проявлялись снижением АД, развитием брадикардии, снижением концентрации норадреналина в плазме крови и в головном мозге [17]. Антигипертензивное действие моксонидина наблюдалось и при введении препарата бодрствующим животным с повышенным уровнем АД [1].

Как показали проведенные нами эксперименты на ненаркотизированных нормотензивных животных, моксонидин не оказывал существенного влияния на параметры гемодинамики и компоненты спектра ВСР, отмечалась лишь тенденция к снижению АД и уменьшению симпатических влияний на работу сердца (что проявлялось незначительным снижением НЧ-компонента спектра ВСР).

Таблица 3. Амплитуда изменения параметров гемодинамики и время развития реакции на звонок до и после введения моксонидина

Экспериментальная группа	ДАД, мм рт. ст.	ДСИ, мс	t_1 , с	t_2 , с
Исходная (n = 11)	10,8 (7,9; 13,7)	-31,1 (-35,4; -26,8)	0,26 (0,01; 0,51)	2,7 (2,2; 3,2)
Моксонидин 10 мкг/кг	8,3 (7,4; 9,2)	-19,4* (-23,1; -15,7)	0,26 (0,05; 0,48)	2,3 (1,8; 2,8)
Моксонидин 100 мкг/кг	9,0 (6,4; 11,6)	-15,0** (-17,4; -12,6)	0,5 (0,2; 0,8)	2,9 (2,4; 3,4)
Исходная (n = 8)	10,6 (7,0; 14,2)	-19,8 (-28,6; -11,0)	0,04 (0; 0,08)	1,8 (1,4; 2,2)
Эфароксан 2 мг/кг + Моксонидин 10 мкг/кг	10,0 (7,7; 12,3)	-14,5 (-20,3; -8,7)	0,32 (0; 0,65)	2,2 (1,6; 2,8)
Эфароксан 2 мг/кг + Моксонидин 100 мкг/кг	8,6 (5,3; 11,9)	-17,8 (-22,5; -13,1)	0,1 (0; 0,22)	1,5 (1,2; 1,8)

Примечания: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ — значимость различий относительно исходных параметров; АД — среднее артериальное давление; МСИ — межсистолический интервал; t_1 — латентный период изменений МСИ; t_2 — латентный период изменений АД на звонок; n — количество животных в группе.

Turcani M. (2008) в опытах на крысах линии Wistar при использовании телеметрической регистрации параметров наблюдал существенное уменьшение АД и ЧСС после подкожного введения моксонидина в дозе 3240 мкг/кг, в меньших дозах моксонидин не изменял параметров гемодинамики [18]. Также Turcani M. зарегистрировал уменьшение НЧ-компонента спектра ВСР после введения моксонидина в низких дозах и увеличение ВЧ-компонента после введения моксонидина в высоких дозах [18]. В исследованиях на здоровых добровольцах после введения моксонидина также отмечалось уменьшение НЧ/ВЧ вследствие увеличения ВЧ-компонента спектра ВСР [19], хотя в других работах [20] этот эффект не наблюдался. Не было зафиксировано изменение компонентов спектра ВСР и при однократном приеме другого агониста имидазолиновых рецепторов — рилменидина [21, 22]. Однако есть сообщения об уменьшении НЧ-компонента и увеличении ВЧ-компонента при длительной терапии рилменидином [23].

Известно, что клонидин, активатор имидазолиновых и α_2 -адренергических рецепторов, оказывает выраженное влияние на ВСР даже при однократном введении. После приема клонидина у здоровых добровольцев наблюдалось уменьшение НЧ/ВЧ за счет значительного увеличения ВЧ-компонента спектра ВСР [24, 25]. В экспериментах на мышях клонидин вызывал увеличение всех компонентов спектра ВСР

(НЧ, ВЧ и НЧ/ВЧ), однако при повышении дозы препарата увеличивался прирост, главным образом, ВЧ-компонента [26]. Данные эффекты клонидина были обусловлены усилением тонуса блуждающего нерва, поскольку снимались предварительной блокадой холинергических рецепторов [26].

В экспериментах показано, что введение клонидина изменяет поведение животных в тесте «открытое поле». Было установлено, что клонидин обладает анксиолитическим действием, а также снижает двигательную активность [27–30]. Эти эффекты препарата связывают с активацией центральных α_2 -адренергических рецепторов в locus coeruleus, поскольку их фармакологическая блокада существенно уменьшала вызванные клонидином изменения в поведении [27, 30]. Однако, как показали ранее проведенные нами эксперименты [1] и настоящее исследование, именно моксонидин, но не клонидин, уменьшал сердечно-сосудистый ответ на стресс, вызванный звонком. Этот эффект моксонидина был выражен уже после его внутривенного введения в дозе 10 мкг/кг [1], которая, по наблюдениям Szabo B. и соавторов (2001), недостаточна для изменения уровня норадреналина в плазме и в медиальной префронтальной коре [17]. Кроме того, данный эффект моксонидина отсутствовал после предварительного введения эфароксана (преимущественного блокатора имидазолиновых рецепторов). При этом, как показано

в настоящем исследовании, моксонидин в исследуемых дозах не влиял на локомоторную активность и тревожность крыс в тесте «открытое поле». Другие авторы наблюдали существенное снижение подвижности крыс только после введения моксонидина в больших дозах [10, 18]. В итоге можно предположить, что в уменьшение сердечно-сосудистого ответа на стресс и в седативное действие препаратов группы «имидазолины» вовлечены разные типы рецепторов. В первом случае эффект обусловлен активацией I1-рецепторов, во втором — $\alpha 2$ -адренергических рецепторов. Также результаты проведенных экспериментов позволяют сделать заключение, что у нормотензивных крыс функциональная активность имидазолиновых рецепторов снижена по сравнению с гипертензивными крысами. Возможно, этим обстоятельством и объясняется низкая эффективность моксонидина у крыс линии Wistar.

Заключение

1. Моксонидин в дозе 100 мкг/кг, введенный внутривенно крысам линии Wistar, не влияет на параметры гемодинамики, компоненты спектра ВСР и локомоторную активность животных.

2. Моксонидин в дозе 1000 мкг/кг, введенный внутривенно крысам линии Wistar, оказывает слабо выраженное гипотензивное и симпатотонизирующее действие и не влияет на локомоторную активность животных.

3. При внутривенном введении моксонидин в дозах 10 и 100 мкг/кг уменьшает тахикардическую реакцию на звонок; данный эффект снимается предварительным введением эфороксана.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Tsyrlin VA, Kuzmenko NV, Pliss MG. Adrenergic and imidazoline mechanisms of circulation central regulation in rats of different lines. Russian journal of physiology. 2016; 102(4): 442–453. In Russian. [Цырлин В.А., Кузьменко Н.В., Плисс М.Г. Адренергические и имидазолиновые механизмы центральной регуляции кровообращения у крыс разных линий. Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2016; 102(4): 442–453].
2. Bousquet P, Feldman J, Bloch R, et al. The nucleus reticularis lateralis: a region highly sensitive to clonidine. Eur J Pharmacol. 1981; 69(3): 389–392.
3. Bousquet P, Feldman J, Schwartz J. Central cardiovascular effects of alfa adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. J Pharmacol Exp Ther. 1984; 230(1): 232–236.

4. Bousquet P, Feldman J, Tibirica E, et al. From alpha 2-adrenergic to endazoline receptors. Arch Mal Coeur Vaiss. 1989; 82(5): 11–14.
5. Bousquet P, Feldman J, Tibirica E, et al. New concepts on the central regulation of blood pressure. Alpha 2-adrenoceptors and «imidazoline receptors». Am J Med. 1989; 87(3C): 10S–13S.
6. Ernsberger P, Damon TH, Graff LM, et al. Moxonidine, a centrally acting antihypertensive agent, is a selective ligand for I1-imidazoline sites. J Pharmacol Exp Ther. 1993; 264(1): 172–182.
7. Chan CK, Head GA. Relative importance of central imidazoline receptors for the antihypertensive effects of moxonidine and rilmenidine. J. Hypertens. 1996; 14(7): 855–864.
8. Godwin SJ, Tortelli CF, Parkin ML, et al. Comparison of the baroreceptor-heart rate reflex effects of moxonidine, rilmenidine and clonidine in conscious rabbits. J Auton Nerv Syst. 1998; 72 (2–3): 195–204.
9. Khokhlova ON, Murashev AN, Medvedev OS. Role of the rostroventrolateral medulla in moxonidine-induced changes in cardiochronotropic regulation. Bull Exp Biol Med. 2001; 132(5): 1073–1075.
10. Khokhlova ON, Murashev AN, Lavrova LN, et al. Effects of chronic administration of moxonidine in hypertensive rats SHR-SP. Eksp Klin Farmakol. 2000; 63(5): 21–23.
11. Feldman J, Grenay H, Monassier L, et al. Does a second generation of centrally acting antihypertensive drugs really exist? J Auton Nerv Syst. 1998; 72(2–3): 94–97.
12. Cervo L, Samanin R. Clonidine causes antidepressant-like effects in rats by activating alpha 2-adrenoceptors outside the locus coeruleus. Eur J Pharmacol. 1991; 193(3): 309–313.
13. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Circulation. 1996; 93(5): 1043–1065.
14. Ilik MK, Kocaogullar Y, Koc O, et al. Beneficial effects of moxonidine on cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. Turk Neurosurg. 2014; 24(6): 873–879.
15. Ma X-J, Shen F-M, Liu A-J et al. Clonidine, moxonidine, folic acid, and mecobalamin improve baroreflex function in stroke-prone, spontaneously hypertensive rats. Acta Pharmacol Sin. 2007; 28(10): 1550–1558.
16. Menaouar A, El-Ayoubi R, Jankowski M, et al. Chronic imidazoline receptor activation in spontaneously hypertensive rats. Am J Hypertens. 2002; 15(9): 803–808.
17. Szabo B, Fritz T, Wedzony K. Effects of imidazoline antihypertensive drugs on sympathetic tone and noradrenaline release in the prefrontal cortex. Br J Pharmacol. 2001; 134(2): 295–304.
18. Turcani M. Biphasic dose-dependent modulation of cardiac parasympathetic activity by moxonidine, an imidazoline I1-receptor agonist. J Cardiovasc Pharmacol. 2008; 52(6): 524–535.
19. Kaya D, Barutcu I, Esen AM, et al. Acute effects of moxonidine on cardiac autonomic modulation. Pacing Clin Electrophysiol. 2010; 33(8): 929–933.
20. De Vito G, Galloway SDR, Nimmo MA, et al. Effects of central sympathetic inhibition on heart rate variability during steady-state exercise in healthy humans.

Clin Physiol Funct Imaging. 2002; 22(1):32–38.

21. Onrat E, Kaya D, Kerpeten K, et al. The effects of rilmenidine on cardiac autonomic function in healthy volunteers. *Rev Esp Cardiol*. 2004; 57(8):745–750.

22. Shavarov A.A., Kasherininov Yu.R., Mamontov O.V., et al. Dynamics of sensitivity of cardiopulmonary baroreflex and heart rate variability in individuals with hypertension during acute drug tests: a comparison of rilmenidine and atenolol. *Arterial'naya Gipertenziya=Arterial Hypertension*. 2002; 8(4): 136–140. In Russian. [Шаваров А.А., Кашерининов Ю.Р., Мамонтов О.В., и др. Динамика чувствительности кардиопульмонального барорефлекса и вариабельности сердечного ритма у лиц с гипертонической болезнью в ходе острых лекарственных тестов: сравнение рилменидина и атенолола. *Артериальная гипертензия*. 2002; 8(4): 136–140].

23. Nikitina N.N., Avtandilov A.G., Petrosyan K.R., et al. Arterial hypertension in young people: efficacy of sympatholytic therapy. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2007; 3 (2): 43–47. In Russian. [Никитина Н. Н., Автандилов А. Г., Петросян К. Р., и др. Артериальная гипертензия у молодых: эффективность симпатолитической терапии. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2007; 3 (2): 43–47].

24. Tank J, Diedrich A, Szczech E, et al. Alpha-2 adrenergic transmission and human baroreflex regulation. *Hypertension*. 2004; 43(5):1035–1041.

25. Furlan R, Ardizzone S, Palazzolo L, et al. Sympathetic overactivity in active ulcerative colitis: effects of clonidine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 290(1):R224–232.

26. Tank J, Jordan J, Diedrich A, et al. Clonidine improves spontaneous baroreflex sensitivity in conscious mice through parasympathetic activation. *Hypertension*. 2004; 43(5):1042–1047.

27. Wu Z, Wang T, Li L, et al. Activation and blockade of α_2 -adrenoceptors in the prelimbic cortex regulate anxiety-like behaviors in hemiparkinsonian rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019; 519(4):697–704.

28. Wrenn CC, Heitzer AM, Roth AK, et al. Effects of clonidine and methylphenidate on motor activity in Fmr1 knockout mice. *Neurosci Lett*. 2015; 585:109–113.

29. De Angelis L. Multiple administration of carbamazepine, typical and atypical antidepressant drugs on clonidine-induced hypoactivity in mice. *In Vivo*. 1991; 5(4):393–396.

30. Mogilnicka E. Are beta- and alpha 2-adrenoceptors co-regulated during their stimulation? *Behavioral studies*. *Pol J Pharmacol Pharm*. 1986; 38(5–6):521–528.

Информация об авторах:

Цырлин Виталий Александрович, д.м.н., главный научный сотрудник отдела экспериментальной физиологии и фармакологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Плисс Михаил Гениевич, к.м.н., заведующий отделом экспериментальной физиологии и фармакологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; заведующий лабораторией биофизики кровообращения ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России;

Кузьменко Наталия Владимировна, к.б.н., старший научный сотрудник отдела экспериментальной физиологии и фармакологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алма-

зова» Минздрава России; старший научный сотрудник лаборатории биофизики кровообращения ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России.

Author information:

Tsyrlin Vitaliy A., MD, Senior Researcher, Laboratory of Experimental Physiology and Pharmacology, Almazov National Medical Research Centre;

Pliss Mikhail G., PhD, Head of the Laboratory of Experimental Physiology and Pharmacology, Almazov National Medical Research Centre; Head of the Laboratory of Biophysics of Blood Circulation, Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Kuzmenko Natalia V., PhD, Senior Researcher, Laboratory of Experimental Physiology, Almazov National Medical Research Centre; Laboratory of Biophysics of Blood Circulation, Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ: РОБОТ-АССИСТИРОВАННАЯ РЕЗЕКЦИЯ ПОЧКИ ПО ПОВОДУ КРУПНОЙ ОПУХОЛИ (T2)

Мосоян М. С.^{1,2}, Федоров Д. А.¹, Айсина Н. А.¹, Гилев Е. С.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Федоров Дмитрий Александрович,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: tvoiuurolog@gmail.com

Статья поступила в редакцию 06.09.2019
и принята к печати 17.12.2019.

Резюме

В статье представлен клинический случай робот-ассистированной операции, выполненной по поводу опухоли больших размеров правой почки, изложена техника операции, приведены основные периоперационные показатели. **Материалы и методы.** У мужчины 39 лет по данным УЗИ и МРТ выявлено образование правой почки, в верхней трети киста размерами 105 × 85 × 79 мм с четкими ровными контурами, с плотностью содержимого от 13 до 22 НУ, с васкуляризованными вегетациями вдоль капсулы и умеренным накоплением контраста в тонких перегородках (Bosniak IV), киста деформирует синус почки в верхнем отделе, паранефральная клетчатка не инфильтрирована. **Результаты.** Опухоль почки удалена в пределах здоровой ткани. Продолжительность операции 290 минут. Консольное время составило 255 минут. Объем кровопотери не превышал 150,0 мл. Время тепловой ишемии почки — 33 минуты. Уровень гемоглобина снизился на 10 %, количество эритроцитов снизилось на 14 %. Увеличения уровня креатинина и мочевины сыворотки крови не отмечалось. Нахождение в отделении реанимации и интенсивной терапии — 1 сутки. После операции пациенту установлено 2 дренажа к зоне резекции, которые удалены на 4 и 5-е сутки. Больной был выписан из стационара на 10-е сутки после операции. **Выводы.** Мы представляем клинический случай выполнения робот-ассистированной резекции крупной опухоли почки у пациента молодого возраста. Преимущества робот-ассистированной хирургии, заключающиеся в отличной визуализации, а также прецизионности и точности движений, в совокупности с высоким уровнем хирургического опыта, снижают риск интра- и послеоперационных осложнений и вероятность нефрэктомии, связанной с ними. Молодой возраст пациента и высокий риск возможной нефрэктомии, по нашему мнению, являются показаниями к выполнению робот-ассистированных вмешательств, что позволяет снизить риск неоправданных нефрэктомий.

Ключевые слова: опухоли почки большого размера, почечно-клеточный рак, рак почки, робот-ассистированная резекция почки.

Для цитирования: Мосоян М.С., Федоров Д.А., Айсина Н.А., Гилев Е.С. Клинический случай: робот-ассистированная резекция почки по поводу крупной опухоли (T2). Трансляционная медицина. 2020;7(2): 73–81. DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-2-73-81.

CASE REPORT: ROBOT-ASSISTED PARTIAL NEPHRECTOMY IN PATIENT WITH LARGE TUMOR (T2)

Mosoyan M. S.^{1,2}, Fedorov D. S.¹, Aysina N. A.¹, Gilev E. S.¹

¹Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

²Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Fedorov Dmitry A.,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str. 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.

E-mail: tvoiurolog@gmail.com

Received 06 September 2019; accepted 17 December 2019.

Abstract

The present article describes a clinical case of a robot-assisted surgery performed for a large tumor of the right kidney. Here, the surgery technique is described, and the main perioperative indicators are listed. **Materials and Methods.** A 39 year old man, according to ultrasound and MRI, revealed the growth of a right kidney in the upper third of the cyst measuring 105 × 85 × 79 mm with clear even borders, and a density of content from 13 to 22 HU, with vascularized vegetations along the capsule, and moderate contrast accumulation in thin partitions (Bosniak IV), the cyst deforms the sinus of the kidney in the upper section, the perinephral tissue was not infiltrated. **Results.** Kidney tumor was removed within healthy tissue. The total operating time was 290 minutes, while the surgical console time was 255 minutes. The volume of blood loss did not exceed 150 ml. The thermal kidney ischemia lasted for 33 minutes. The hemoglobin level was decreased by 10%, and the number of red blood cells — by 14 %. An increase in serum creatinine and urea levels was not observed. Patient spent one day in intensive care unit. After the surgery, two drains were placed to the resection area and were removed after the 4 and 5 days. The patient was discharged from the hospital on the 10th day after the operation. **Conclusions.** Here, we reported a clinical case of robot-assisted resection of a large kidney tumor in a young patient. The advantages of robot-assisted surgery are associated with excellent visualization, as well as precision and accuracy of movements, together with a high level of surgical experience, it reduces the risk of intra- and post-operative complications and the nephrectomy associated with them. The young age of the patient and the high risk of possible nephrectomy, in our opinion, could be the justification for performing robot-assisted interventions, reducing the risk of nephrectomy development.

Key words: large kidney tumors, malignant renal tumors, renal cell carcinoma, robot-assisted partial nephrectomy.

For citation: Mosoyan M.S., Fedorov D.S., Aysina N.A., Gilev E.S. Case report: robot-assisted partial nephrectomy in patient with large tumor (T2). Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2020;7(2): 73–81. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2020-7-2-73-81.

Введение

Во всем мире почечно-клеточный рак (ПКР) занимает шестое место среди диагностируемых опухолевых заболеваний у мужчин и десятое — у женщин, составляя 5 и 3 % всех онкологических диагнозов соответственно [1–2]. В Европе и Северной Америке ежегодный прирост диагностируемых ПКР колеблется от 1,3 до 1,8 %. Согласно последним данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно происходит более 140 000 смер-

тей, связанных с ПКР, который занимает 13-е место по распространенности среди причин смерти от рака во всем мире [3]. В России прирост составляет 3,9 % на 100 000 человек [4–9]. На сегодняшний день общепризнанным стандартом лечения почечно-клеточного рака стадии T1 является резекция почки [10]. Существуют три основных способа выполнения данного вмешательства: открытый, лапароскопический и робот-ассистированный [11]. Первая робот-ассистированная резекция почки

была описана Gettman и соавт. в 2004 году [12]. Затем было доказано, что при опухолях почки T1b–T2b резекция не уступает радикальной нефрэктомии с точки зрения онкологической выживаемости [13–15]. В пользу робот-ассистированной резекции почки приводятся такие аргументы, как меньший период госпитализации; более низкий уровень послеоперационных осложнений; меньший процент положительного хирургического края; низкий объем интраоперационной кровопотери; обеспечение хорошего онкологического и функционального результата [16–19]. Тем не менее робот-ассистированная резекция почки для cT2-опухолей представляет собой сложное вмешательство, и на сегодняшний день сообщается об очень небольшом числе оперативных случаев, в связи с чем показания к данному методу лечения остаются индивидуальными и зависят от оперирующего хирурга [20].

Описание пациента

Пациент Г., 39 лет, поступил в урологическое отделение ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России 12.03.2018. Отмечал жалобы на умеренные тянущие боли в правой поясничной области. Считает себя больным с января 2018 года, когда с подозрением на субкапсулярную гематому правой почки был госпитализирован в урологическое отделение СПб ГБУЗ Клинической больницы Святителя Луки. При обследовании, по данным мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ), была обнаружена крупная киста правой почки (Bosniak IV). Объективно: почки не пальпируются. Поколачивание по поясничной области безболезненно с обеих сторон. Мочеиспускание самостоятельное, свободное, безболезненное. Макрогематурии не отмечал. Операции в анамнезе: 1988 год — аппендэктомия. Вес пациента — 97 кг, рост — 197 см; индекс массы тела — 25,0. Серьез-

ными сопутствующими заболеваниями не страдал. По данным лабораторных исследований, при поступлении в биохимическом анализе крови: мочевины — 5,4 ммоль/л, креатинин — 75 мкмоль/л; в клиническом анализе крови при поступлении: уровень гемоглобина — 149 г/л, лейкоцитоза и нейтрофильного сдвига нет. В общем анализе мочи: без патологических изменений. По данным МСКТ брюшной полости и мочевыводящих путей 25.01.2018, правая почка размерами 167 × 74 × 73 мм, паренхима выражена достаточно, в верхней трети почки киста размерами 105 × 85 × 79 мм с четкими ровными контурами, с плотностью содержимого от 13 до 22 НУ, с васкуляризированными вегетациями вдоль капсулы, умеренно накапливает контраст в тонких перегородках (Bosniak IV), киста деформирует синус почки в верхнем отделе, паранефральная клетчатка не инфильтрирована, к кисте подходит ветвь почечной артерии диаметром 3 мм, отходящая от ее верхней стенки на 25 мм дистальнее устья. По данным нефрометрической шкалы R.E.N.A.L., опухоль правой почки имела оценку 10Р. При комплексном обследовании, проведенном в ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, признаков другой очаговой патологии и генерализации процесса у больного не выявлено.

Проведенные оперативные вмешательства

14.03.2018 больному было выполнено оперативное вмешательство в объеме робот-ассистированной резекции правой почки.

Трансперитонеальный доступ был осуществлен из 5 эндопортов. Доступ в брюшную полость был осуществлен через переднюю стенку живота. Укладка пациента, расстановка эндоскопических портов и расположение операционной бригады и тележки пациента представлены на рисунках 1–3. По нашему мнению, важным этапом операции

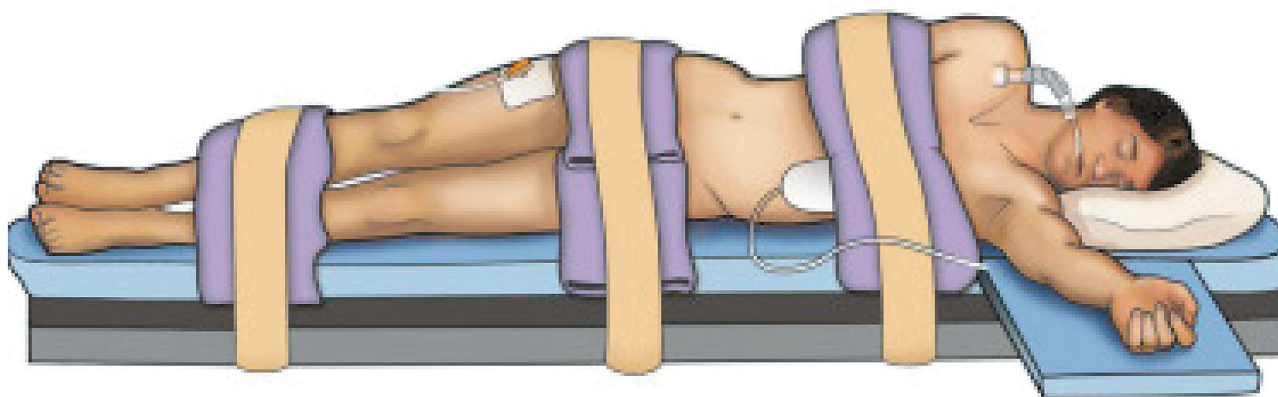


Рис. 1. Укладка пациента

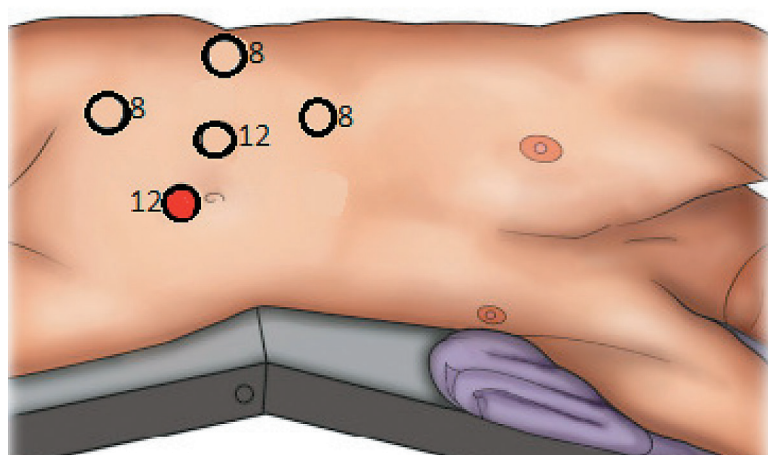


Рис. 2. Расстановка эндоскопических портов, красным цветом обозначен ассистентский порт

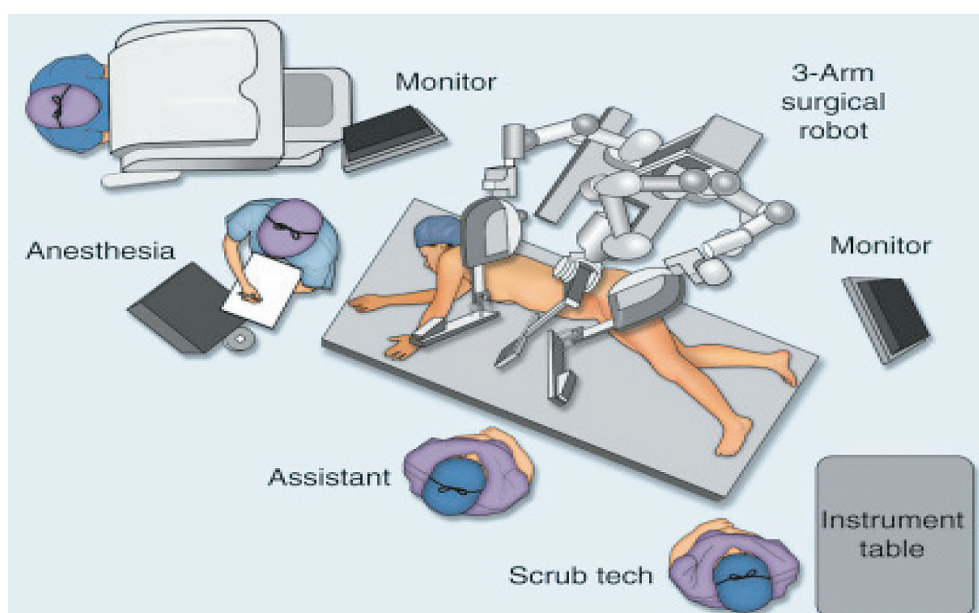


Рис. 3. Схема расположения операционной бригады и тележки пациента

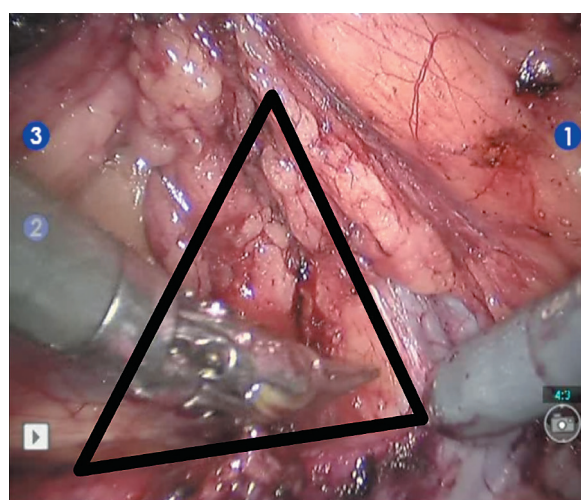


Рис. 4. Роботическим манипулятором № 3 происходит тракция почки к париетальной брюшине боковой стенки живота и выделяется анатомическая структура «венозно-почечный» треугольник

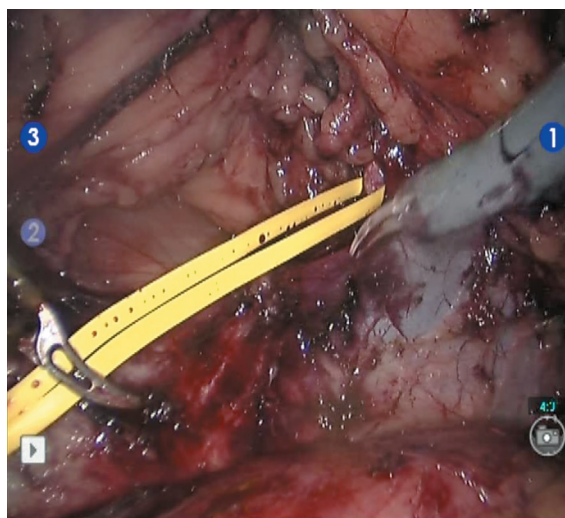


Рис. 5. Выделен почечно-венозный треугольник

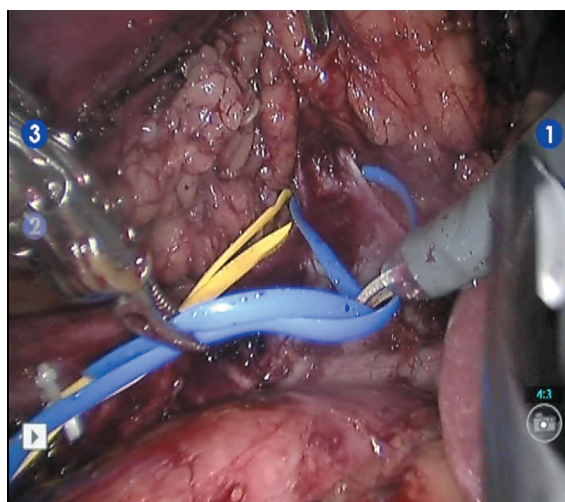


Рис. 6. Выделена и взята на турникет правая почечная вена

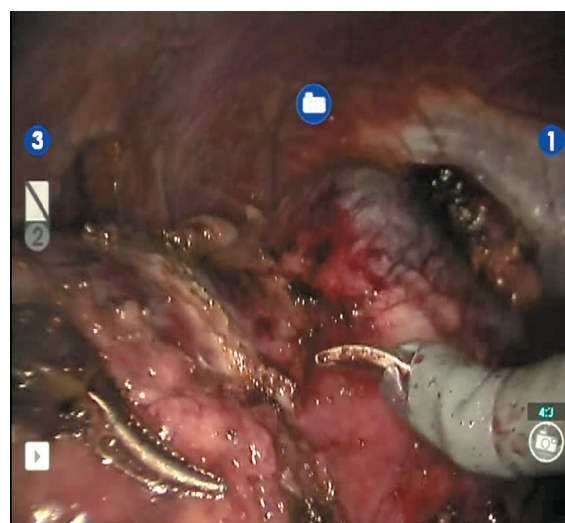


Рис. 7. Выделен верхний полюс правой почки, подготавливается площадка для резекции новообразования

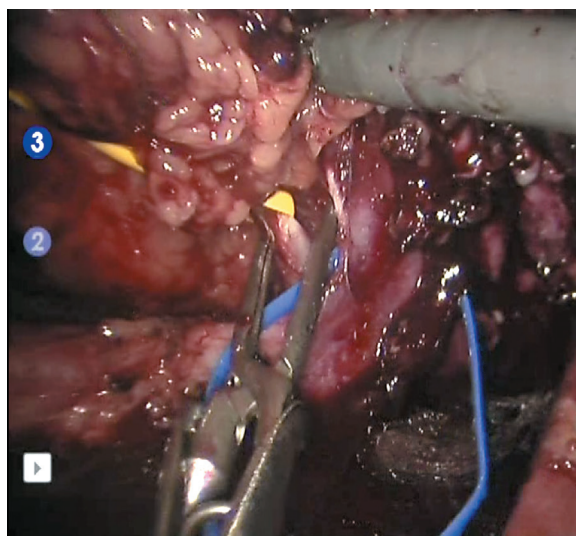


Рис. 8. Наложен сосудистый зажим по типу «бульдог» на правую почечную артерию

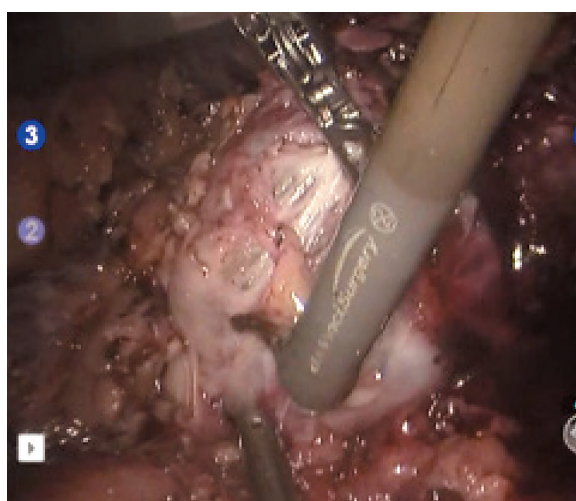


Рис. 9. Диссекция опухоли на тепловой ишемии

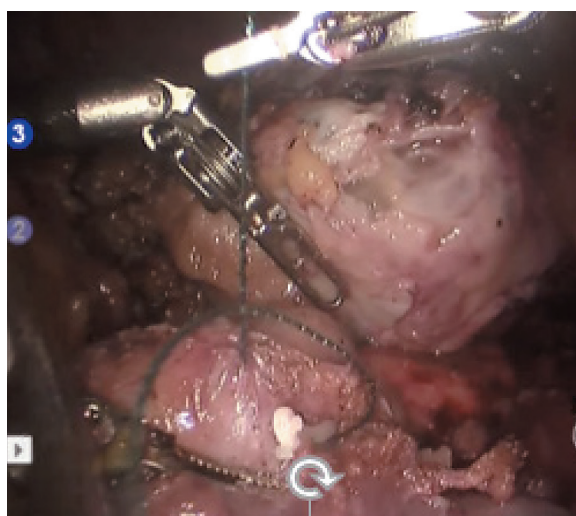


Рис. 10. Ушивание паренхимы зоны резекции методом «скользящей клипсы»

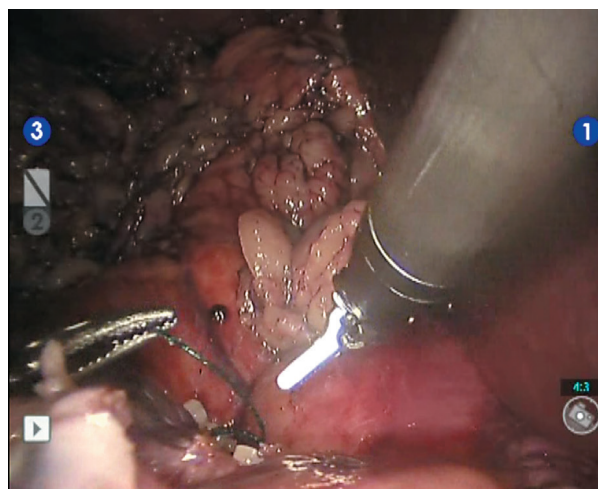


Рис. 11. Снятие зажима с почечной артерии и оценка гемостаза ушитого ложа опухоли

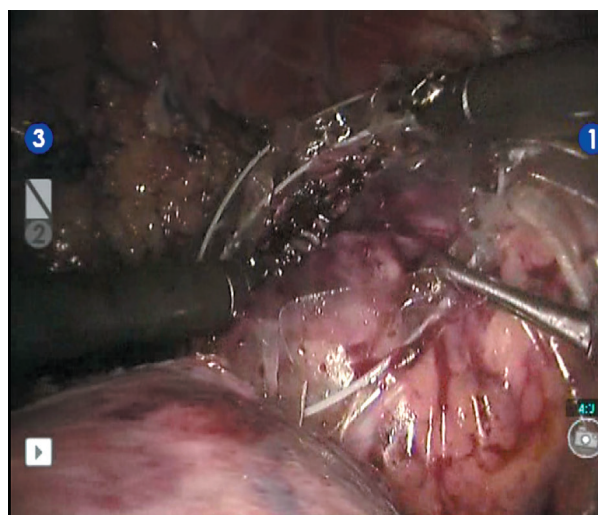


Рис. 12. Помещение удаленного препарата в эндоскопический эвакуатор

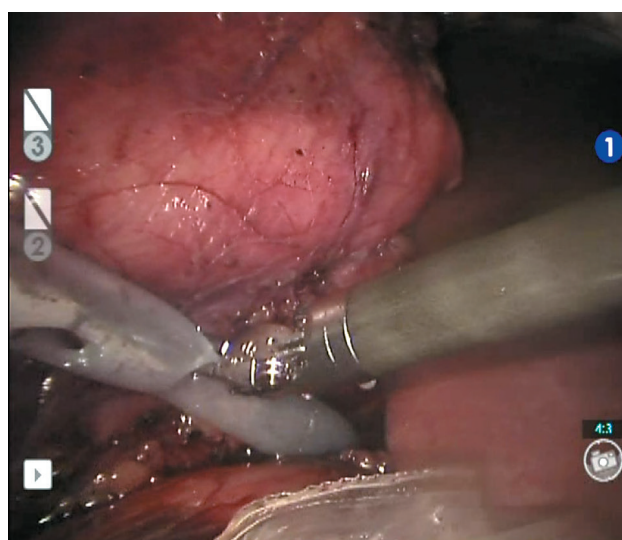


Рис. 13. Подведение силиконового дренажа к ложу резекции

является выделение сосудистой ножки почки, в связи с чем, с целью минимизации риска возникновения кровотечения при диссекции почечных сосудов, роботическим манипулятором № 3 происходит тракция почки к париетальной брюшине боковой стенки живота и выделяется анатомическая структура «венозно-почечный» треугольник (рис. 4), который служит анатомическим ориентиром для обнаружения почечных сосудов; полость треугольника является безопасной бессосудистой зоной; при возникновении экстренных ситуаций без труда можно наложить зажим Сатинского на всю почечную ножку. Выделена и взята на турникет правая почечная артерия (рис. 5). Выделена и взята на турникет правая почечная вена (рис. 6). Выделен верхний полюс правой почки, подготавливается площадка для резекции новообразования (рис. 7). Наложен сосудистый зажим по типу «бульдог» на правую почечную артерию (рис. 8). Производится диссекция опухоли на тепловой ишемии (рис. 9). Ушивание паренхимы зоны резекции методом «скользящей клипсы» (рис. 10). Снят зажим с почечной артерии и оценивается гемостаз ушитого ложа опухоли (рис. 11). Удаленный препарат помещен в эндоскопический эвакуатор (рис. 12). К ложу резекции подведен силиконовый дренаж (рис. 13). Продолжительность операции составила 290 минут, при этом консольное время составило 255 минут. Объем кровопотери не превышал 150 мл. Время тепловой ишемии почки составило 33 минуты. Гистологическое исследование операционного материала выявило светлоклеточную почечно-клеточную карциному (grade I (Fuhrman)). Таким образом, у больного был сформулирован заключительный диагноз: рак правой почки pT2bNoMo. В послеоперационном периоде у больного отмечалось незначительное снижение уровня гемоглобина (10 % от исходного), а также количества эритроцитов (на 14 % от исходного). Уровни креатинина и мочевины сыворотки крови не были увеличены. Пациент находился в отделении реанимации и интенсивной терапии в течение суток. На 4 и 5-е сутки произведено удаление дренажей из зоны резекции почки, уретральный катетер удален на 2-е сутки после операции. Больной был выписан из стационара на 10-е сутки после операции в удовлетворительном состоянии. Послеоперационный период был осложнен двусторонней полисегментарной пневмонией (по шкале Clavien-Dindo 1), без клинических проявлений (выявлена на основании лабораторных и инструментальных исследований), вероятно вследствие гиподинамии в течение раннего послеоперационного периода, по поводу чего проводилась антибактериальная, симптоматическая терапия.

В ходе периода наблюдения пациент проходил плановое обследование через 1, 6 и 12 месяцев после выписки. Выполнены контрольные исследования, МКСТ почек, по результатам которых данных о наличии местного рецидива, отдаленных метастазов не получено. В ходе контрольных лабораторных исследований в клиническом анализе крови и биохимическом анализе крови за весь период наблюдения признаков анемии и повышения уровня трансаминаз не обнаружили.

Выводы

Мы представляем клинический случай выполнения робот-ассистированной резекции крупной опухоли почки у пациента молодого возраста. Преимущества робот-ассистированной хирургии заключаются в отличной визуализации, а также прецизионности и точности движений и, в совокупности с высоким уровнем хирургического опыта, снижают риск интра- и послеоперационных осложнений и вероятность нефрэктомии, связанной с ними. Молодой возраст пациента и высокий риск возможной нефрэктомии, по нашему мнению, являются показаниями к выполнению робот-ассистированных вмешательств, что позволяет снизить риск неоправданных нефрэктомий.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2018; 68:284–296.
2. Capitanio U, Bensalah K, Bex A, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. Eur Urol. 2019;75(1):74–84.
3. Ferlay J, Autier P, Boniol M, et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. Ann Oncol. 2007;18(3):581–592.
4. Kaprin AD, Starinskiy VV, Petrova GV. Malignant tumors in Russia in 2017 (morbidity and mortality). Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena — filial FGBU “NMIRTS” Minzdrava Rossii, 2018. p. 250. In Russian [Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. с.250].
5. SEER Cancer Statistics Review 1975–2007. https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2007/results_merged/sect_23_prostate.pdf
6. Chow WH, Devesa SS, Warren JL, Fraumeni JF Jr. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. JAMA. 1999;281(17):1628–1631.
7. Davydov MI, Aksel EM. Statistics of malignant neoplasms in Russia and CIS in 2008. Journal of N.N.

Blokhin Russian Cancer Research Center RAMN = Vestnik RONC im. N.N. Blohina RAMN. 2011; 22(3 S1 (85): 54–92. In Russian [Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2008. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2011; 22(3 S1 (85): 54–92].

8. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014; 25 (Suppl 3): iii49–56.

9. Papworth DG, Lloyd RA. Cancer survival in the USA, 1973–1990: a statistical analysis. *Br J Cancer.* 1998;78(11):1514–1515.

10. Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *Eur Urol.* 2015;67(5):913–924.

11. Xia L, Wang X, Xu T, Guzzo TJ. Systematic Review and Meta-Analysis of Comparative Studies Reporting Perioperative Outcomes of Robot-Assisted Partial Nephrectomy Versus Open Partial Nephrectomy. *J Endourol.* 2017;31(9):893–909.

12. Gettman MT, Blute ML, Chow GK, et al. Robotic-assisted laparoscopic partial nephrectomy: technique and initial clinical experience with DaVinci robotic system. *Urology.* 2004;64(5):914–918.

13. Weight CJ, Miller DC, Campbell SC, et al. The management of a clinical T1b renal tumor in the presence of a normal contralateral kidney. *J Urol.* 2013;189(4):1198–1202.

14. Badalato GM, Kates M, Wisnivesky JP, et al. Survival after partial and radical nephrectomy for the treatment of stage T1bN0M0 renal cell carcinoma (RCC) in the USA: a propensity scoring approach. *BJU Int.* 2012;109(10):1457–1462.

15. Porpiglia F, Mari A, Bertolo R, et al. Comparative Study of Open, Laparoscopic and Robot-assisted Approach (the RECOReD Project). *Urology.* 2016;89:45–51.

16. Brandao LF, Zargar H, Autorino R, et al. Robot-assisted partial nephrectomy for ≥ 7 cm renal masses: a comparative outcome analysis. *Urology.* 2014;84(3):602–608.

17. Gupta GN, Boris R, Chung P, et al. Robot-assisted laparoscopic partial nephrectomy for tumors greater than 4 cm and high nephrometry score: feasibility, renal functional, and oncological outcomes with minimum 1 year follow-up. *Urol Oncol.* 2013 Jan;31(1):51–56.

18. Serni S, Vittori G, Frizzi J, et al. Simple enucleation for the treatment of highly complex renal tumors: Perioperative, functional and oncological results. *Eur J Surg Oncol.* 2015;41(7):934–940.

19. Malkoc E, Ramirez D, Kara O, et al. Robotic and open partial nephrectomy for localized renal tumors larger than 7 cm: a single-center experience. *World J Urol.* 2017 May;35(5):781–787.

20. Masson-Lecomte A, Yates DR, Bensalah K, et al. Robot-assisted laparoscopic nephron sparing surgery for tumors over 4 cm: operative results and preliminary oncologic outcomes from a multicentre French study. *Eur J Surg Oncol.* 2013;39(7):799–803.

Информация об авторах:

Мосоян Мкртич Семенович, д.м.н., заведующий кафедрой урологии с курсом роботической хирургии, руководитель Центра роботической хирургии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, про-

фессор кафедры урологии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Минздрава России;

Федоров Дмитрий Александрович, врач-уролог Центра роботической хирургии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Айсина Надежда Анатольевна, ассистент кафедры урологии с курсом роботической хирургии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Гилев Евгений Сергеевич, врач-уролог отделения урологии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Mosoyan Mkrtich S., MD, PhD, Dr. Sci., Professor, Head of Department of Urology and Robotic Surgery, Head of Centre for Robotic Surgery, Almazov National Medical Research Centre; Professor, Department of Urology Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University;

Fedorov Dmitriy A., MD, Urologist, Department of Urology and Robotic Surgery, Almazov National Medical Research Centre;

Aysina Nadezhda A., MD, Assistant of the Department of Urology and Robotic Surgery, Almazov National Medical Research Centre;

Gilev Evgeniy S., MD, Urologist, Department of Urology, Almazov National Medical Research Centre.