

# Повреждённость ДНК в клетках миокарда крыс с экспериментальной алкогольной кардиомиопатией: модифицирующие эффекты фабомотизола и триметазида

Жанатаев А.К., Мирошкина И.А., Цорин И.Б., Чайка З.В.,  
Крыжановский С.А., Дурнев А.Д.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

**Резюме.** *Актуальность.* Алкогольная кардиомиопатия (АКМП) – специфический вид дилатационной кардиомиопатии, возникающей при чрезмерном и длительном потреблении алкоголя. До настоящего времени не разработаны эффективные схемы её терапии, что связано, прежде всего, с отсутствием знаний о тонких механизмах её патогенеза. Индукция окислительного стресса, ведущего к повреждению ДНК и активации внутриклеточных сигнальных каскадов клеточной гибели, рассматривается как основной механизм этиопатогенеза алкогольной кардиомиопатии. *Цель* настоящего исследования – на разработанной ранее трансляционной модели АКМП у крыс оценить повреждённость ДНК и апоптоз клеток миокарда и влияние на эти показатели кардиопротективных средств. *Методы.* АКМП у крыс моделировали путём 24-недельной алкоголизации (10 % этанол как единственный источник воды; ежедневная доза этанола 5,0–6,5 г/кг). Триметазидин (20 или 30 мг/кг), фабомотизол (15 мг/кг) или их комбинацию (20 + 15 мг/кг) вводили внутривентрикулярно в течение последующих 4 недель абстиненции. Оценка повреждённости ДНК клеток миокарда проводили методом ДНК-комет в щелочной и нейтральной версиях. Уровень апоптоза на парафиновых срезах определяли методом TUNEL. *Результаты.* Установлено, что сформировавшаяся АКМП в период абстиненции не сопровождается увеличением уровня повреждений ДНК и апоптозом клеток миокарда. Выявлено снижение уровня кардиомиоцитов с высокой степенью фрагментации ДНК, детектируемых в виде атипичных ДНК-комет и являющихся, предположительно, клетками на стадии аутофагической фрагментации хроматина. Введение животным на фоне алкогольной абстиненции кардиопротекторов фабомотизола и триметазида или их комбинации приводит к восстановлению уровней клеток с фрагментированной ДНК до значений контроля. *Заключение.* Полученные данные позволяют рассматривать появление кардиомиоцитов с фрагментированной ДНК как важный механизм регуляции и поддержания гомеостаза миокарда при АКМП.

**Ключевые слова:** алкогольная кардиомиопатия; ДНК-кометы; апоптоз; фабомотизол; триметазидин

## Для цитирования:

Жанатаев А.К., Мирошкина И.А., Цорин И.Б., Чайка З.В., Крыжановский С.А., Дурнев А.Д. Повреждённость ДНК в клетках миокарда крыс с экспериментальной алкогольной кардиомиопатией: модифицирующие эффекты фабомотизола и триметазида // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – №2. – С.28–34. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10012.

## DNA damage in myocardial cells of rats with experimental alcoholic cardiomyopathy: modifying effects of fabomotizole and trimetazidine

Zhanataev A.K., Miroshkina I.A., Tsorin I.B., Chayka Z.V., Kryzhanovskii S.A., Durnev A.D.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

**Resume.** *Relevance.* Alcoholic cardiomyopathy (ACM) is a specific heart muscle disease found in individuals with a history of long-term heavy alcohol consumption. Their underlying mechanisms are poorly known, leading to a lack of effective therapy. Related with oxidative stress DNA damage and cell death play an essential role in the development of alcoholic cardiomyopathy. *The aim* of present study - using previously developed translation model to evaluate the levels of DNA damage and apoptosis in the myocardium of rats with ACM and modulating effect of cardioprotective drugs. *Methods.* ACM was established by forced alcoholization of rats (10 % ethanol solution as the only source of drinking water for 24 weeks; mean daily ethanol consumption was 5.0–6.5 g/kg). Trimetazidine (20 or 30 mg/kg), fabomotizole (15 mg/kg) or their combination (20 + 15 mg/kg) were injected ip, daily during following 4 weeks of abstinence. DNA damage was evaluated using alkaline and neutral comet assay. Apoptosis was assessed by TUNEL assay in paraffin-embedded sections. *Results.* No DNA damage or apoptosis of the myocardial cells was observed in rats with alcoholic cardiomyopathy at the abstinence period. A decrease in the level of cardiomyocytes with a high degree of DNA fragmentation, referred to as “hedgehog” DNA comets and that are presumably cells at the stage of autophagic fragmentation of chromatin, was revealed. Treatment of rats at the abstinence period with cardioprotective drugs trimetazidine and fabomotizole or their combination raised “hedgehog” DNA comets level up to control value. *Conclusion.* Our findings allows considering the appearance of cardiomyocytes with highly fragmented DNA as an important mechanism for regulating and maintaining myocardial homeostasis in ACM.

**Keywords:** alcoholic cardiomyopathy; DNA damage; comet assay; apoptosis; fabomotizole; trimetazidine

## For citations:

Zhanataev AK, Miroshkina IA, Tsorin IB, Chayka ZV, Kryzhanovskii SA, Durnev AD. DNA damage in myocardial cells of rats with experimental alcoholic cardiomyopathy: modifying effects of fabomotizole and trimetazidine. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;2:28–34. (In Russ). DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10012.

## Введение

Алкогольная кардиомиопатия (АКМП) — специфический вид дилатационной кардиомиопатии, возникающей вследствие токсического поражения сердечной мышцы при чрезмерном и длительном потреблении алкоголя [1]. Несмотря на распространённость заболевания, до настоящего времени не разработаны эффективные схемы её терапии, что связано, прежде всего, с отсутствием соответствующих трансляционных моделей, позволяющих изучить тонкие механизмы патогенеза АКМП и разработать патогномоничные средства терапии [1, 2]. Новые возможности исследований появились с внедрением новой инновационной трансляционной экспериментальной модели, достаточно полно воспроизводящей клиническую картину АКМП [3].

Возможные механизмы кардиомиопатогенного действия включают действие этанола и его метаболита ацетальдегида на транспорт и связывание кальция, функцию митохондрий, метаболизм липидов, синтез белка кардиомиоцитами, активность миофибрилярной АТФ-азы и т. д. [2, 4]. Патофизиологическим следствием указанных процессов является индукция окислительного стресса и активация внутриклеточных сигнальных каскадов, вовлечённых в клеточную гибель, одним из звеньев которых и, соответственно, биомаркёром, может служить повреждённость ДНК [4, 5].

Ранее было показано, что агонист сигма-1 рецептора, анксиолитик, цитопротектор и антимуаген фабомотизол (афобазол) и р-Fox ингибитор, кардиопротектор триметазидин уменьшают ремоделирование правого и левого желудочков сердца и увеличивают его сократительную функцию в условиях сформировавшейся АКМП в трансляционной модели у крыс [6]. Целью настоящего исследования явилась изучение повреждённости ДНК в клетках миокарда крыс со сформировавшейся АКМП с оценкой влияния на регистрируемые показатели фабомотизола, триметазида и их комбинаций.

## Материалы и методы

Опыты проводили на беспородных белых крысах-самцах начальной массой 180–200 г, которые содержались в виварии в соответствии с приказом МЗ РФ № 267 от 09.06.2003 г. «Об учреждении правил лабораторной практики» с представлением брикетированного корма *ad libitum* при регулируемом 12/12 световом режиме. На первом этапе животных рандомизировали на две группы: интактные крысы, получавшие обычный рацион питания и животные, которые в принудительном порядке подвергались алкоголизации с

использованием в качестве единственного источника жидкости 10 % водного раствора этанола в течение 24 недель — периода, необходимого для формирования у них дилатационной алкогольной кардиомиопатии. На протяжении всего исследования еженедельно регистрировали количество потребляемого этанола (г/кг). Для дальнейших экспериментов были отобраны крысы, активно потребляющие физиологически значимое количество 10 % раствора этанола, составляющего в пересчёте на чистый 5,0–6,5 г/кг в сутки. Через 24 нед. животным прекращали доступ к алкоголю, переводили на обычный рацион питания и рандомизировали их на 4 группы: алкоголизованный контроль; триметазидин (20 или 30 мг/кг/сут., в/б, 28 дней); фабомотизол (15 мг/кг/сут., в/б, 28 дней); триметазидин (20 мг/кг/сут., в/б, ежедневно на протяжении 28 дней) + фабомотизол (10 мг/кг/сут., в/б, 28 дней). Животные группы алкоголизованного контроля по аналогичной схеме получали инъекции 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида. Через сутки после последней инъекции исследуемых препаратов и эхокардиографической верификации кардиомиопатии животных умерщвляли и выделяли сердца.

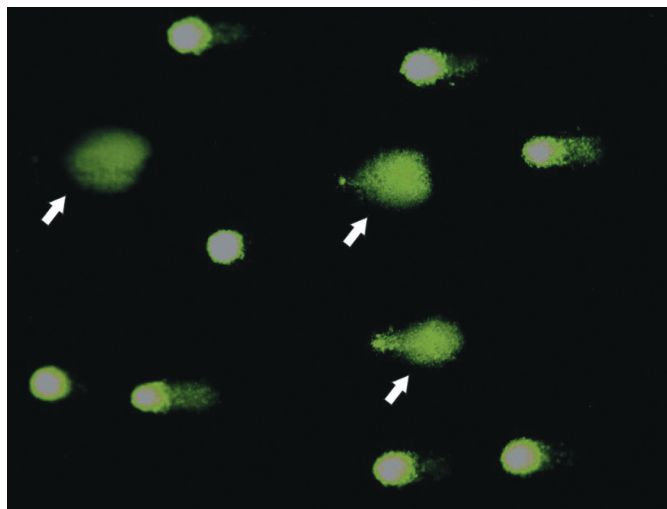
Метод ДНК-комет проводили в щелочной и нейтральной версиях в соответствии с рекомендациями [7, 8]. Сердечную мышцу измельчали препаративными ножницами, дважды отмывали в 3 мл охлаждённого до 4 °С фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего 20 мМ EDTA-Na<sub>2</sub> и 10 % ДМСО (рН 7,5), переносили в стеклянные пробирки с 3 мл того же буфера и раздавливали стеклянной палочкой. Пробирки выдерживали 5 мин для осаждения крупных фрагментов, после чего 1,5 мл верхнего слоя переносили в новую пробирку. Суспензии клеток в объёме 60 мкл вносили в пробирку с 240 мкл 0,9 % раствора легкоплавкой агарозы (температура плавления < 420 °С) в ФСБ, подогретым до 410 °С (микротермостат «Термит», Россия) и ресуспендировали. Затем 60 мкл раствора агарозы с клетками наносили на предварительно покрытые 1 % универсальной агарозой предметные стекла, покрывали покровным стеклом и помещали на лёд. Покровные стекла осторожно удаляли, микропрепараты помещали в стеклянную кювету (тип Шиффендекер), заливали предварительно охлаждённым до 4 °С лизирующим буфером (10 мМ Tris-HCl [рН 10], 2,5 М NaCl, 100 мМ EDTA-Na<sub>2</sub>, 1 % Triton X-100, 10 % ДМСО) и инкубировали не менее 1 ч.

В щелочной версии метода после окончания лизиса микропрепараты переносили в камеру для электрофореза (SubCell GT, “Bio-Rad”) с раствором 300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA-Na<sub>2</sub>, рН > 13) и инкубировали в течение 20 мин для реализации щелочно-лабильных сайтов и щелочной денатурации ДНК. Далее проводили электрофорез в течение 20 мин при напряжённо-

сти поля 1V/cm и силе тока ~ 300 mA. В нейтральной версии метода микропрепараты переносили в камеру для электрофореза с буфером 90 mM Tris-borate, 2 mM EDTA-Na<sub>2</sub> (pH 7,5) и проводили электрофорез в течение 10 мин при напряжённости поля 1 V/cm. В обоих случаях по окончании электрофореза микропрепараты переносили в стеклянную кювету и фиксировали в 70 % растворе этилового спирта в течение 15 мин. После фиксации микропрепараты высушивали и хранили до анализа при комнатной температуре.

Микропрепараты окрашивали флуоресцирующим красителем SYBR Green I (1:10000 в TE-буфере с 50 % глицерином, pH 8,5) в течение 20 мин. Анализ проводили на эпифлуоресцентном микроскопе Микмед-2 12Т («Ломо», Россия), совмещённом с цифровой камерой высокого разрешения (VEC-335, «ЭВС», Россия), при увеличении ×200. Изображения ДНК-комет анализировали с использованием программного обеспечения CASP 1.2.2. В качестве показателя повреждённости ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте ДНК-комет (% ДНК в хвосте). В отдельную категорию выделяли клетки с показателем % ДНК в хвосте > 75 %, т. н. атипичные ДНК-кометы (*ghost cells*) – клетки с высокой степенью фрагментации ДНК (рис. 1). Подсчитывали их процентное содержание к общему числу проанализированных клеток. Статистическую обработку проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений с использованием критерия Даннета (% ДНК в хвосте) и критерия  $\chi^2$  (% атипичных ДНК-комет).

Оценку апоптоза на парафиновых срезах миокарда проводили методом мечения терминальной трансферазой (TUNEL). Выделенные из грудных клеток сердца



**Рис. 1.** Цифровое изображение с препарата ДНК-комет миокарда крысы (ув. ×200; окраска SYBR Green I). Стрелками указаны атипичные ДНК-кометы

крыс фиксировали в 10 % забуференном растворе формалина. После окончания фиксации и стандартной проводки препараты сердец заливали в парафиновые блоки. Готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм, которые помещали на стекла с полилизинным покрытием и проводили стандартную процедуру депарафинирования [9]. Демаскирование проводили нагреванием срезов в 200 мл 0,01 M цитратного буфера (pH 6), содержащего 0,1 % Triton X-100, в микроволновой печи в течение 45 с при мощности излучения 1000 ватт. По окончании препараты охлаждались добавлением 80 мл дистиллированной воды и дважды отмывались в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) и однократно дистиллированной водой. На каждый препарат наносили 50 мкл реакционной смеси, включающей 1,5 ед. терминальной трансферазы TdT (NEB), 0,25 mM хлорида кобальта и 10 мкмоль TAMRA-dUTP (ДНК-синтез) в 1X реакционном буфере для TdT. Препараты накрывали покровным стеклом и помещали во влажную камеру и инкубировали 1 ч при 37 °C. Далее препараты дважды отмывались дистиллированной водой. Ядра кардиомиоцитов контрастировали красителем SYBR Green I. Микроскопирование проводили на микроскопе AxioImager M2 (Carl Zeiss) с фильтрами для FITC (SYBR Green I) и родамина (TAMRA). Совмещённые по обоим каналам цифровые изображения (merge) получали с помощью камеры AxioCam Mrtm в программной среде AxioVision (рис. 2). Анализировали 10 полей зрения на каждом препарате при увеличении ×1000. Количественный анализ интенсивности апоптоза проводили методом расчёта индекса апоптоза, представляющего собой отношение числа TUNEL-позитивных ядер к общему числу кардиомиоцитов. Статистическую обработку проводили с помощью критерия  $\chi^2$ .

## Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты оценки в щелочной версии метода ДНК-комет повреждённости ДНК клеток миокарда крыс со сформировавшейся АКМП на фоне 28-дневной абстиненции и влияние на наблюдаемые эффекты афобазола и триметазида.

Уровень повреждений ДНК у крыс с АКМП не отличался статистически значимо от показателя для интактных животных. Не выявлено также значимых отличий в оцениваемом показателе для животных, получавших на фоне абстиненции фабомотизол в дозе 15 мг/кг или триметазидин в дозе 20 мг/кг.

Выявлено статистически значимое снижение уровня атипичных ДНК-комет в группе алкоголизованных крыс по сравнению с животными интактного контроля (2,7 против 7,6 %). У животных, получавших фабомотизол, данный показатель оказался статистически значимо выше по сравнению с группой алкоголизованных крыс и не отличался от значения для интактного кон-



Таблица 1

**Поврежденность ДНК клеток миокарда крыс с АКМП и влияние на наблюдаемые эффекты триметазида и фабомотизола. Щелочная версия метода ДНК-комет**

Экспериментальная группа	Доза препарата (мг/кг/сут.)	n*	% ДНК в хвосте (M ± m)	Атипичных ДНК-комет (%)
Интakтный контроль	-	6	36,9 ± 5,3	7,6
Алкоголизация	-	6	29,3 ± 4,9 ( $p_k = 0,595$ )	2,7 ( $p_k < 0,001$ )
Алкоголизация + триметазидин	20	6	35,7 ± 4,4 ( $p_a = 0,703$ )	3,8 ( $p_a = 0,340$ )
Алкоголизация + фабомотизол	15	6	32,5 ± 5,7 ( $p_a = 0,945$ )	8,4 ( $p_k > 0,05$ ); ( $p_a < 0,001$ )

Примечания: \* – количество животных в группе;  $p_k$  – по отношению к интактному контролю;  $p_a$  – по отношению группе алкоголизации.

троля. Для животных, получавших триметазидин, также выявлено снижение содержания атипичных ДНК-комет по сравнению с интактным контролем, однако различия оказались статистически незначимы.

Таким образом, установлено, что у крыс сформировавшаяся АКМП не сопровождается увеличением уровня повреждений ДНК клеток миокарда. Вместе с тем, в результате исследований выявлен феномен, заключающийся в снижении у алкоголизованных крыс уровня клеток с высокой степенью фрагментации ДНК по сравнению с интактными животными. При этом у животных, получавших на фоне абстиненции фабомотизол, данный показатель оказался на уровне значения интактного контроля.

На сегодняшний день не существует единого мнения о происхождении атипичных ДНК-комет [10]. Считается, что ДНК-кометы с высокой степенью фрагментации ДНК, т. н. «ghost cells» или «hedgehogs» формируют клетки, находящиеся на стадии апоптоза или пред-апоптотической гибели, что подтверждалось данными о корреляционной зависимости уровней таких клеток с показателем апоптоза, оцениваемого классическими методами (TUNEL, FACS) [11]. В то же время такие ДНК-кометы выявляются и для клеток, гибнущих вследствие цитотоксического воздействия [10, 12].

Предполагая возможный вклад процессов клеточной гибели в наблюдаемые эффекты были повторены эксперименты с оценкой повреждений ДНК в нейтральной версии метода ДНК-комет с параллельной оценкой уровней апоптоза. Нейтральная версия метода позволяет оценить исключительно двунитевые разрывы в ДНК, характерные при фрагментации хро-

матина в ходе реализации программы апоптоза. Полученные данные представлены в табл. 2.

Как и в экспериментах с щелочной версией метода уровень поврежденности ДНК в миокарде крыс с АКМП статистически значимо не отличался от показателя для интактного контроля. При этом у интактных крыс значение поврежденности ДНК, оцениваемое по показателю % ДНК в хвосте, оказалось значимо ниже, по сравнению с аналогичным показателем, получаемым при щелочной версии метода –  $12,0 \pm 3,9$  против  $36,9 \pm 5,3$  %. Полученные данные свидетельствует о том, что повреждения ДНК в миокарде крыс в условиях физиологической нормы представлены в большей степени одностранными разрывами и/или щелочно-лабильными сайтами. Не выявлено отличий в оцениваемом показателе для животных, получавших триметазидин (30 мг/кг) и комбинацию фабомотизол (10 мг/кг) + триметазидин (20 мг/кг) на фоне абстиненции.

Таблица 2

**Поврежденность ДНК клеток миокарда крыс с АКМП и влияние на наблюдаемые эффекты триметазида *per se* или в комбинации с фабомотизолом.**

Нейтральная версия метода ДНК-комет

Экспериментальная группа	Доза препарата (мг/кг/сут.)	n*	% ДНК в хвосте (M ± m)	Атипичных ДНК-комет (%)
Интakтный контроль	-	5	12,0 ± 3,9	8,0
Алкоголизация	-	5	9,7 ± 2,0 ( $p_k = 0,570$ )	2,0 ( $p_k < 0,05$ )
Алкоголизация + триметазидин	30	6	18,2 ± 1,9 ( $p_a = 0,170$ )	7,3 ( $p_k > 0,05$ ); ( $p_a < 0,05$ )
Алкоголизация + триметазидин + фабомотизол	20 + 10	5	8,7 ± 2,1 ( $p_a = 0,180$ )	5,1 ( $p_k > 0,05$ ); ( $p_a < 0,05$ )

Примечания: \* – число животных в группе;  $p_k$  – по отношению к интактному контролю;  $p_a$  – по отношению группе алкоголизации.

Выявлено статистически значимое снижение уровня атипичных ДНК-комет в группе крыс с АКМП по сравнению с животными интактного контроля (1,9 против 7,1 %). В группе животных, получавших триметазидин, данный показатель оказался статистически значимо выше по сравнению с группой без введения препарата и не отличался от значения для интактного контроля. Для животных, получавших комбинацию триметазидин + фабомотизол, также наблюдалось повышение процентного содержания атипичных



Рис. 2. TUNEL-анализ миокарда крысы (ув.  $\times 1000$ ). Стрелкой указан апоптотический кардиомиоцит

ДНК-комет по сравнению с алкоголизированными животными.

Анализ данных TUNEL показал, что у контрольных животных наблюдается незначительный уровень кардиомиоцитов, находящихся на стадии апоптоза (рис. 2). Индекс апоптоза составил в среднем 0,014, что согласуется с данными литературы [13]. Ни в одной из экспериментальных групп не выявлено значимых отличий по сравнению с контрольной — индекс апоптоза для группы животных с АКМП и животных, получавших фабомотизол составил 0,02 и 0,015, соответственно.

Таким образом, в ходе исследований установлено, что сформировавшаяся АКМП у крыс не сопровождается увеличением уровня повреждений ДНК и апоптотической гибелью кардиомиоцитов. У контрольных животных индекс апоптоза составил 0,014 (1,4 % апоптотических клеток), тогда как в ~8 % кардиомиоцитов наблюдали высокую степень фрагментации ДНК. Настоящие данные позволяют заключить, что выявляемые атипичные ДНК-кометы не могут рассматриваться как апоптотические, и клеточная гибель кардиомиоцитов реализуется отличным от апоптоза путём.

Согласно современным представлениям, ведущую роль в поддержании тканевого гомеостаза в сердечной мышце играет процесс аутофагии [14]. Нарушение аутофагии установлено при гипертензии, ишемии-реперфузии, инфаркте миокарда, а также при АКМП [14, 15]. Высокая активность аутофагии в сердечной мышце у пациентов с дилатированной кардиомиопатией ассоциировалась с лучшим прогнозом [16]. Индуктор аутофагии рапамицин снижал выраженность экспериментальной АКМП у крыс [17].

Деградация ДНК клеток в процессе аутофагии происходит предположительно при участии фермента ДНКазы II, которая вносит разрывы в ДНК, не детектируемые методом TUNEL [18]. В настоящем исследовании выявлен низкий уровень TUNEL-позитивных кардиомиоцитов, тогда как около 8 % имели фрагментированную ДНК. Вышеописанное позволяет предполагать, что атипичные ДНК-кометы на препаратах

миокарда крыс могут формировать клетки, находящиеся на стадии аутофагической деградации хроматина. В пользу этого предположения косвенно свидетельствуют полученные данные о значительном снижении таких ДНК-комет у крыс с АКМП, при которой наблюдается ингибирование аутофагии в ткани миокарда [15]. Ранее было показано, что фабомотизол и триметазидин проявляют кардиопротективное действие, статистически значимо снижая интенсивность дилатационной алкогольной кардиомиопатии [6]. В настоящем исследовании введение на фоне абстиненции фабомотизола и триметазида *per se* или в комбинации приводило к увеличению содержания атипичных ДНК-комет в миокарде крыс с АКМП до значений интактного контроля. Это позволяет рассматривать появление кардиомиоцитов с фрагментированной ДНК как важный механизм регуляции и поддержания гомеостаза миокарда. Полученные данные определяют перспективность исследований, направленных на изучение роли и механизмов аутофагии в функционировании миокарда с целью разработки фармакологических мишеней для терапии АКМП и других сердечно-сосудистых патологий.

### Заключение

Сформировавшаяся АКМП у крыс не сопровождается увеличением уровня повреждений ДНК и апоптотической гибелью клеток миокарда. У крыс с АКМП выявлено снижение уровня кардиомиоцитов с высокой степенью фрагментации ДНК, детектируемых на препаратах в виде атипичных ДНК-комет и являющихся, предположительно, клетками на стадии аутофагической фрагментации хроматина. Фабомотизол и триметазидин или их комбинации, вводимые животным с АКМП на фоне абстиненции, приводят к восстановлению уровней клеток с фрагментированной ДНК до значений физиологической нормы, что свидетельствует о значимой роли их возникновения в поддержании тканевого гомеостаза миокарда.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Жанатаев Алий Курманович***Автор, ответственный за переписку*

e-mail: zhanataev@academpharm.ru

SPIN-код: 7070-0510

к. б. н., зав. лабораторией фармакологии мутагенеза  
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»,  
Москва**Zhanataev Alii***Corresponding author*

e-mail: zhanataev@academpharm.ru

SPIN code: 7070-0510

Candidate of Biological Sciences, head of laboratory  
of pharmacology of mutagenesis FSBI «Zakusov  
institute of Pharmacology», Moscow**Мирошкина Ирина Александровна**

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN-код: 4697-7938

н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ  
«НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва**Miroshkina Irina**

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN code: 4697-7938

Research Officer at the laboratory of drug toxicology  
FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow**Цорин Иосиф Борисович**

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN-код: 4015-3025

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологического скри-  
нинга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Заку-  
сова», Москва**Tsorin Iosif**

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN code: 4015-3025

Doctor of Biological Sciences, leading researcher at  
the laboratory of pharmacological screening FSBI  
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow**Чайка Злата Владимировна**

SPIN-код: 1680-2370

н. с. лаборатории фармакологии мутагенеза ФГБ-  
НУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»,  
Москва**Chayka Zlata**

SPIN code: 1680-2370

Research Officer at the laboratory of pharmacology  
of mutagenesis FSBI «Zakusov institute of  
Pharmacology», Moscow**Крыжановский Сергей Александрович**

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN-код: 6596-4865

д. м. н., зав. лабораторией фармакологического скри-  
нинга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. За-  
кусова», Москва**Kryzhanovskii Sergei**

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN code: 6596-4865

Doctor of Medical Sciences, head of the laboratory of  
pharmacological screening FSBI «Zakusov institute  
of Pharmacology», Moscow**Дурнев Андрей Дмитриевич**

ORCID ID: 0000-0003-0218-8580

SPIN-код: 8426-0380

д. м. н., профессор, член-корр. РАН, зав. лаборато-  
рией лекарственной токсикологии, ФГБНУ «НИИ  
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва**Durnev Andrei**

ORCID ID: 0000-0003-0218-8580

SPIN code: 8426-0380

Grand PhD Medical Sciences, Professor,  
Corresponding Member, RAS, head of the laboratory  
of drug toxicology, FSBI «Zakusov institute of  
Pharmacology», Moscow

## Литература / References

1. Ивашкин В.Т., Драпкина О.М., Ашихмин Я.И. Алкоголь-  
ная кардиомиопатия // *Медицинская помощь: Научно-практиче-  
ский журнал*. – 2006. – №3. – С.11–15. [Ivashkin VT, Drapkina OM,  
Yashikhmin YI. Alcoholic cardio-myopathy. *Meditsinskaya pomoshch*:  
*Nauchno-prakticheskii zhurnal*. 2006;(3):11–15. (In Russ).]
2. Юсупова А.О. Алкогольная кардиомиопатия: основ-

ные аспекты эпидемиологии, патогенеза и лекарственной терапии  
// *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. – 2014. – Т.10.  
– №6. – С:651–658. [Yusupova AO. Alcoholic cardiomyopathy: basic  
aspects of epidemiology, pathogenesis and pharmacotherapy. *Rational  
Pharmacotherapy in Cardiology*. 2014;10(6):651–658. (In Russ).]

3. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Колик Л.Г., и др. Трансля-  
ционная модель алкогольной кардиомиопатии // *Молекулярная меди-  
цина*. – 2015. – №3. – С.40–47. [Kryzhanovskii SA, Tsorin IB, Kolik LG,

- et al. Translation model of alcoholic cardiomyopathy. *Molecular medicine*. 2015;(3):40–47. (In Russ.) DOI: 10.1007/s10517-017-3865-0
4. Piano MR, Phillips SA. Alcoholic cardiomyopathy: pathophysiologic insights. *Cardiovasc. Toxicol*. 2014;14(4):291–308. DOI: 10.1007/s12012-014-9252-4
5. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Шредер О.В., и др. Генотоксические поражения и болезни // *Молекулярная медицина*. – 2013. – №3. – С.3–19. [Durnev AD, Zhanataev AK, Shreder OV, et al. Genotoxic events and diseases. *Molecular medicine*. 2013;(3):3–19. (In Russ).]
6. Цорин И.Б., Мирошкина И.А., Ионова Е.О., и др. Сравнительное изучение кардиопротекторного действия триметазидина и фабомотизола гидрохлорида у крыс со сформировавшейся алкогольной кардиомиопатией в условиях продолжающегося потребления этанола // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2016. – №3. – С.38–41. [Tsorin IB, Miroshkina IA, Ionova EO, et al. Comparative study of the trimetazidine and fabomotizole hydrochloride cardioprotective effect in rats with established alcoholic cardiomyopathy with the continued ethanol consumption. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2016;(3):38–41. (In Russ).]
7. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 2003;18(1):45–51.
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч.1. Методические рекомендации по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток в фармакологических исследованиях. – М.: Гриф и К; 2012. – С.115–128. [Guidance on Preclinical Evaluation of Medicines. Part 1. Metodicheskie rekomendatsii po otsenke DNK-povrezhdenii metodom shchelochnogo gel'elektroforeza ot del'nykh kletok v farmakologicheskikh issledovaniyakh. Moscow: Grif i K; 2012. P. 115–128. (In Russ).]
9. Сапожников А.Г., Доросевич А.Е. Гистологическая и микроскопическая техника: Руководство. – С.: САУ; 2000. [Sapozhnikov AG, Dorosevich AE. Gistologicheskaya i mikroskopicheskaya tekhnika: Rukovodstvo. Smolensk: SAU; 2000. (In Russ).]
10. Жанатаев А.К., Анисина Е.А., Чайка З.В., и др. Феномен атипичных ДНК-комет // *Цитология*. – 2017. – Т.59. – №3. – С.163–168. [Zhanataev AK, Anisina EA, Chayka ZV, et al. Phenomenon of atypical DNA comets. *Tsitologiya*. 2017;59 (3):163–168. (In Russ).]
11. Lorenzo Y, Costa S, Collins AR, et al. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*. 2013;28(4):427–432. DOI: 10.1093/mutage/get018
12. Hartmann A, Kiskinis E, Fjdlman A, et al. Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. *Mutat Res*. 2001;(497):199–212.
13. Akiyama K, Gluckman TL, Terhakopian A, et al. Apoptosis in experimental myocardial infarction in situ and in the perfused heart in vitro. *Tissue Cell*. 1997;(29):733–743.
14. Wang S, Ren J. Role of autophagy and regulatory mechanisms in alcoholic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018 Jun;1864(6 Pt A):2003–2009. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.03.016
15. Shimomura H, Terasaki F, Hayashi T, et al. Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J*. 2001;(65):965–968. DOI: 10.1253/jcj.65.965
16. Saito T, Asai K, Sato S, et al. Autophagic vacuoles in cardiomyocytes of dilated cardiomyopathy with initially decompensated heart failure predict improved prognosis. *Autophagy*. 2016;12(3):579–87. DOI: 10.1080/15548627.2016.1145326
17. Tu X, Wang C, Ru X, et al. Therapeutic effects of rapamycin on alcoholic cardiomyopathy. *Exp Ther Med*. 2017 Oct;14(4):2763–2770. DOI: 10.3892/etm.2017.4901
18. Fujiwara Y, Wada K, Kabuta T. Lysosomal degradation of intracellular nucleic acids-multiple autophagic pathways. *J Biochem*. 2017 Feb 1;161(2):145–154. DOI: 10.1093/jb/mvw085



# Дозозависимый хемотранскриптомный анализ дифференциального действия витамина D на экспрессию генов в клетках-предшественниках нейронов NPC и в опухолевых клетках MCF7 человека

Торшин И.Ю.<sup>1,2</sup>, Громова О.А.<sup>1,2</sup>, Фролова Д.Е.<sup>3</sup>,  
Гришина Т.Р.<sup>3</sup>, Лапочкина Н.П.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> – Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» Российской академии наук», Москва

<sup>2</sup> – Центр хранения и анализа больших данных, МГУ, Москва

<sup>3</sup> – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иваново

**Резюме.** Различные типы клеток по-разному откликаются на воздействие витамина D<sub>3</sub>. В работе представлены результаты дозозависимого дифференциального хемотранскриптомного анализа холекальциферола по отношению к клеткам опухоли молочной железы (линия MCF7) и к клеткам-предшественникам нейронов (линия NPC). В опухолевых клетках достоверно повышалась экспрессия генов, вовлечённых в иммуномодуляцию (192 гена) и во внутриклеточную передачу сигналов от рецепторов (275 генов), и снижалась экспрессия генов, вовлечённых в поддержание энергетического метаболизма (482 гена), деление/пролиферацию клеток (387 генов), ремонт ДНК (391 ген), синтез и транспорт белков (188 генов) и в поддержание хронического воспаления (факторы ФНО/NF-κB, 105 генов). В нейрональных клетках схожие изменения в экспрессии этих категорий генов происходили в значительно меньшей степени и не достигали статистической значимости. Снижение ремонта ДНК в опухолевых клетках стимулирует их апоптоз, снижение энергетического метаболизма снижает способность опухолевых клеток к делению и к сопротивлению терапевтическому воздействию. Интересно отметить, что витамин D<sub>3</sub> способствовал снижению экспрессии генов, поддерживающих клеточный ответ на гамма-излучение (9 генов) и способствовал усилению противоопухолевых эффектов витамина A (5 генов). Также, витамин D<sub>3</sub> снижал экспрессию генов, ингибиторы белков которых являются перспективными противоопухолевыми препаратами (казеинкиназа, c-src тирозинкиназа, c-тус и др). Таким образом, витамин D<sub>3</sub> дозозависимо подавлял деление именно опухолевых клеток, не оказывая негативного воздействия на выживаемость нейронов.

**Ключевые слова:** хемотранскриптомика; холекальциферол; интеллектуальный анализ данных; фармакоинформатика; противоопухолевое действие

## Для цитирования:

Торшин И.Ю., Громова О.А., Фролова Д.Е., Гришина Т.Р., Лапочкина Н.П. Дозозависимый хемотранскриптомный анализ дифференциального действия витамина D на экспрессию генов в клетках-предшественниках нейронов NPC и в опухолевых клетках MCF7 человека // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – №2. – С.35–51. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10013.

## Dose-dependent chemotranscriptomics analysis of the differential effects of vitamin D<sub>3</sub> on gene expression in human neuronal progenitor cells NPC and in MCF7 tumor cells

Torshin I.Yu.<sup>1,2</sup>, Gromova O.A.<sup>1,2</sup>, Frolova D.E.<sup>3</sup>, Grishina T.R.<sup>3</sup>, Lapochkina N.P.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> – Federal Research Center «Computer Science and Control» of the Russian Academy of Sciences, Moscow

<sup>2</sup> – Center for storage and analysis of big data, Moscow State University, Moscow

<sup>3</sup> – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Ivanovo State Medical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

**Resume.** Different cell types respond differently to the effects of vitamin D<sub>3</sub>. The paper presents the results of a dose-dependent differential chemotranscriptome analysis of vitamin D<sub>3</sub> in relation to breast tumor cells (MCF7 line) and neuron progenitor cells (NPC line). Expression of the genes involved in immunomodulation (192 genes) was significantly increased in tumor cells and in the intracellular signaling from receptors (275 genes) and the expression of genes involved in maintaining energy metabolism (482 genes), cell division / proliferation (387 genes), DNA repair (391 gene), synthesis and transport of proteins (188 genes) and in maintaining chronic inflammation (factors of TNF / NF-κB. 105 genes). In neuronal cells, similar changes in the expression of these categories of genes occurred to a much lesser extent and did not reach statistical significance. The reduction in DNA repair in tumor cells stimulates their apoptosis, the decrease in energy metabolism reduces the ability of tumor cells to divide and to resist therapeutic effects. It is interesting to note that vitamin D<sub>3</sub> contributed to a decrease in the expression of genes supporting the cellular response to gamma radiation (9 genes) and contributed to the enhancement