

Е. Н. Карева<sup>1</sup>, Д. А. Тихонов<sup>1</sup>, Н. П. Мищенко<sup>2</sup>, С. А. Федорев<sup>2</sup>,  
Н. Л. Шимановский<sup>1</sup>

## ВЛИЯНИЕ ГИСТОХРОМА НА ЭКСПРЕССИЮ p53 В КЛЕТКАХ КРАСНОГО КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА

<sup>1</sup> Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, Россия

<sup>2</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, 690022, Владивосток, 100 лет Владивостоку просп., д. 159, Россия

Клиническая эффективность препарата гистохром не может быть объяснена только его антиоксидантными свойствами. С целью установления возможного дополнительного механизма действия лекарственной субстанции (эхинохром А) препарата гистохром проведено исследование его влияния на экспрессию p53 в клетках костного мозга мышей SHK в условиях модели хронического стресса. Эхинохром А в дозе 1 мг/кг (внутрибрюшинно однократно в 1 сут, 7 сут перед стрессированием) нормализовал уровень экспрессии гена p53. Антиоксидантный препарат гистохром проявил антистрессовые свойства в условиях экспериментальной модели у мышей.

**Ключевые слова:** антиоксидантные свойства; экспрессия гена p53; гистохром; хронический стресс.

Антиоксидантный препарат Гистохром<sup>®</sup> создан на основе природного хиноидного пигмента морских беспозвоночных эхинохрома А. Поиск по базам органических соединений дает различные химические названия для эхинохрома А: 2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинон, 2,3,5,7,8-пентагидрокси-6-этил-1,4-нафтохинон, 7,3,5,6,8-пентагидрокси-2-этил-1,4-нафтохинон (“Merck”) (рис. 1).

Активная субстанция на основе эхинохрома А не имеет международного непатентованного названия (МНН), поэтому зарегистрирована и введена в Государственный реестр лекарственных средств под группировочным названием “Пентагидроксиэтилнафтохинон”.

Лекарственный препарат, разработанный в лаборатории химии природных хиноидных соединений ТИ-БОХ ДВО РАН, с торговым названием Гистохром<sup>®</sup> является водорастворимой натриевой солью пентагидроксиэтилнафтохинона (содержание основного вещества 98 – 100 %) и выпускается в двух лекарственных формах. Препарат в лекарственной форме “Гистохром<sup>®</sup> раствор для внутривенного введения 10 мг/мл” (регистрационное удостоверение Р N002363/01 – 2008) назначают при остром инфаркте миокарда в сочетании с тромболитическими препаратами для устранения вызываемых ими реперфузионных осложнений и при кардиохирургии [1]. Другая лекарственная форма этого препарата — “Гистохром<sup>®</sup> раствор для инъекций 0,2 мг/мл” (регистрационное удостоверение Р N002363/02 – 2008) применяется при дистрофических заболеваниях сетчатки [2], роговицы [3], диабетической ретинопатии сетчатки [4], при лечении травматических внутриглазных кровоизлияний [5 – 7], ожогов глаз [8, 9], глаукомы [10], атеросклеро-

тической макулодистрофии [11], ретинопатии недоношенных [12, 13].

Гистохром<sup>®</sup> относится к фармакотерапевтической группе “антиоксидантные средства”. Спектр биологического защитного действия антиоксидантов весьма разнообразен и обусловлен, в основном, их способностью нейтрализовать негативное действие свободных радикалов. Однако выявленные фармакологические эффекты трудно объяснить только его антиоксидантными свойствами.

В частности, экспериментально установлено, что в условиях длительного введения крысам препарат “Гистохром<sup>®</sup>” в дозе 10 мг/кг массы тела обладает сопоставимым с тиазидовыми диуретиками мочегонным действием при значительно менее выраженном натрий и калий уретическом эффекте [14].

В неврологии получены обнадеживающие результаты применения гистохрома при лечении экспериментального и клинического геморрагического инсульта [15, 16]. Методом МРТ установлено, что гистохром позитивно влияет на состояние сосудистого русла головного мозга преждевременно стареющих крыс линии OXYS, усиливает коллатеральный кровоток и проявляет свойства вазодилатора. С этими эффектами гистохрома связывают его способность активизировать ориентировочно-исследовательскую активность и снижать тревожность крыс OXYS [17 – 19].

Экспериментально показано, что превентивное применение гистохрома в дозе 10 мг/кг подавляет формирование индуцированного воспалительного отека, при этом эффект гистохрома сопоставим с действием ряда классических нестероидных противовоспалительных средств, и может быть обусловлен его вмешательством в пусковые механизмы воспалительного процесса [20].

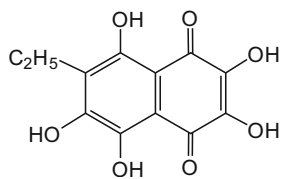


Рис. 1. Структурная формула эхинохрома А

Получены экспериментальные данные, показывающие возможность применения эхинохрома А для пренагальной профилактики и коррекции метаболических нарушений почек и органов дыхания [21, 22].

Эхинохром А играет положительную роль в метаболизме кардиомиоцитов, стимулируя биогенез митохондрий, при экспериментальной кардиопатологии, вызванной стрессом [23].

Исследование влияния антиоксидантных препаратов гистохрома и эмоксипина на биофизические характеристики изолированных нейронов из окологлоточных ганглиев моллюска *Lymnaea stagnalis* в нормальных условиях и при окислительном стрессе выявило разнонаправленность эффектов этих препаратов на потенциал покоя и трансмембранные ионные токи нервных клеток в нормальных условиях. Гистохром оказывал гиперполяризующее, эмоксипин — деполаризующее воздействие на мембраны интактных нейронов. В условиях окислительного стресса оба препарата проявляли превентивное антиоксидантное действие [24].

Однако полученные многочисленные экспериментальные данные до настоящего времени не позволяли приблизиться к пониманию молекулярных механизмов действия препаратов из серии “Гистохром”. В этой связи интерес представляет возможность влияния гистохрома на экспрессию проапоптотического белка p53, который может изменяться при стрессе в клетках иммунной системы [25], и уровень которого отрицательно коррелирует с экспрессией мРНК глюкокортикоидных рецепторов при иммобилизационном хроническом стрессе [26].

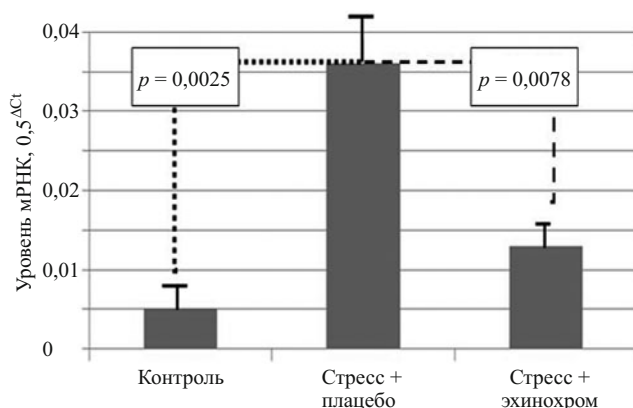


Рис. 2. Влияние эхинохрома на экспрессию гена p53 в клетках костного мозга мышей SHK на модели хронического стресса

Целью нашего исследования явилось изучение действия лекарственной субстанции (эхинохром А) препарата “гистохром” на экспрессию p53 в клетках костного мозга мышей SHK на модели хронического стресса.

#### Экспериментальная часть

В исследовании использованы белые мыши-самцы SHK (36 штук), средняя масса 12,5 г (Научный центр биомедицинских технологий РАМН филиал “Андреевка”). Всех мышей разделили на 3 группы по 12 животных с помощью окраски пикриновой кислотой: 1-я группа — интактные животные, на которых не оказывали стрессорного воздействия и не вводили препараты; 2-я группа — контрольная группа, которым внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в объеме 0,125 мл и оказывали стрессорное воздействие; 3-я группа — группа животных, получающая внутрибрюшинно раствор эхинохрома А (1 мг/кг — 0,125 мл) и получающая стрессорное воздействие. Доза эхинохрома в модельном эксперименте была подобрана и обоснована ранее [18].

Растворы готовили из сухого препарата гистохром на стерильном физиологическом растворе из расчета

#### Описательная статистика данных о влиянии эхинохрома А на экспрессию гена p53 в клетках костного мозга мышей SHK на модели хронического стресса\*

Параметр описательной статистики	Уровень мРНК, 0,5 <sup>ΔCt</sup>		
	Контроль	Стресс + плацебо	Стресс + эхинохром
Минимум	0,0003	0,022	0,001
25 % перцентиль	0,0018	0,022	0,007
Медиана	0,0054	0,036	0,011
75 % перцентиль	0,0086	0,052	0,020
Максимум	0,0094	0,063	0,025
Среднее	0,0052	0,036	0,013
Стандартное отклонение	0,0039	0,016	0,008
Стандартная ошибка	0,0016	0,006	0,003
Нижняя граница 95 % ДИ	0,0011	0,022	0,005
Верхняя граница 95 % ДИ	0,0093	0,051	0,020
W критерий	0,8603	0,8681	0,9736

\* В каждой группе по 12 животных.

вводимого раствора 100 мкл на 10 г массы — гистохром в дозе 1 мг/кг.

В течение 7 дней (ежедневно однократно) вводили по 125 мкл физиологического раствора и раствора “гистохрома” 2-й и 3-й группам соответственно за 30 мин до кормления.

С 8 по 14 день (ежедневно однократно) оказывали стрессорное воздействие в виде иммобилизационного стресса (подвешивание за шейную складку) [27]. Иммобилизацию проводили в течение 4 ч.

На 14 день сразу после стрессорного воздействия мышей забивали под легким эфирным наркозом и выделяли красный костный мозг из губчатого вещества полостей костей задних конечностей с помощью инсулиновых шприцов с физиологическим раствором.

Из клеток красного костного мозга мышей выделяли мРНК с помощью набора “Рибо-преп” (“AmpliSens”) согласно инструкции производителя. Получали кДНК на матрице мРНК с использованием комплекта готовых реагентов “Реверта-Л” (“AmpliSens”) согласно инструкции производителя. Полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили с “Реакционной смесью 2,5х для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I” (“Синтол”, Россия) на приборе iCycler iQ5 real-time PCR (BioRad, Германия). Праймеры подобраны и синтезированы фирмой “Синтол”, Москва.

Последовательности праймеров:

Ген “домашнего хозяйства” глицер альдегид фосфатдегидрогеназы GAPDH (мышь): верхний — аас ttg ggc att gtg gaa gg; нижний — gga tgc agg gat gat gtt ct; р53 (мышь): верхний — gcg taa acg ctt cga gat gt; нижний — tat ggc ggg aag tag act gg.

Программа амплификации: 1 цикл: 10:00 мин — 95 °С; 2 – 40 циклы: (00:15 мин — 95 °С и 01:00 мин — 60 °С). Для оценки числа копий мРНК применяли  $\Delta C_t$ -метод относительного определения их количества в виде  $(1/2)^{\Delta C_t}$ , где  $\Delta C_t = C_t(p53) - C_t(GAPDH)$ .  $C_t$  — пороговый цикл — означает номер цикла, при котором количество амплифицированной мишени достигает заданного порога.

Нормальность распределения по тесту Шапиро-Вилка проверяли непараметрическими методами статистической обработки экспериментальных данных [28].

### Результаты и их обсуждение

Параметры описательной статистики полученных данных приведены в таблице.

Колоночный анализ данных с помощью U критерия Манна-Уитни показал, что хронический стресс вызвал повышение уровня мРНК р53 (средние значения в 7 раз) в клетках костного мозга экспериментальных животных ( $p = 0,0025$ ) по сравнению с контролем. Предварительное введение эхинохрома в дозе 1 мг/кг однократно внутривенно в течение 7 сут нормализовало исследованный параметр (рис. 2).

Белок р53 становится активным при различных стрессовых воздействиях, которые не ограничиваются повреждением ДНК и включают также окислительный стресс [29], осмотический шок и др. Результатом активации р53 является остановка клеточного цикла и репликации ДНК; при сильном стрессовом сигнале — запуск апоптоза [30].

Описан целый ряд состояний, в которых активируется р53. К ним относится истощение запасов нуклеотидов, нарушения цитоскелета, биогенеза рибосом, гипоксия, дефектные интегрин, появление полиплоидных клеток, образование микроядер, гипер- и гипотермия, действие оксида азота и многое другое [30].

На уровне р53 сходятся сигналы об отклонениях от оптимума многих процессов, а также о наличии структурных повреждений, что, в зависимости от степени отклонения, приводит либо к ускорению процессов репарации и защиты, либо к остановке клеточных делений или апоптозу [29].

Поэтому не удивительно, что хронический стресс вызывает активацию экспрессии гена р53 в клетках костного мозга у мышей. Снижение этого показателя в результате профилактического введения препарата гистохром с достижением нормального уровня свидетельствует об антистрессовых свойствах препарата и возможности его действия на генном уровне, изменяя биосинтез одного из универсальных регуляторов клеточного цикла белка р53.

Работа поддержана грантами РФФИ и Президиума ДВО РАН.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Н. П. Мищенко, С. А. Федорев, В. Л. Багирова, *Хим.-фарм. журн.*, **37**(1), 49 – 53 (2003).
2. А. С. Басинский, С. Н. Басинский, В. Н. Красногорская, *Клин. офтальмология (Б-ка РМЖ)*, № 1, 3 – 5 (2007).
3. Ю. Ф. Майчук, В. В. Позднякова, Л. А. Ларина, В. И. Поздняков, *Рефракц. хирург. и офтальмол.*, № 3, 48 – 52 (2005).
4. М. И. Алешаев, Ж. Н. Лазарева, *Рефракц. хирург. и офтальмол.*, № 3, 42 – 47 (2005).
5. И. М. Чиненов, М. Р. Гусева, Е. Д. Горбунова и др., *Вестн. офтальмологии*, № 2, 24 – 28 (2005).
6. Е. А. Кравчук, Т. Н. Киселева, *Мед. визуализация*, № 3, 58 – 63 (2008).
7. М. Р. Гусева, М. Б. Бесланеева, *Рос. педиатр. офтальмология*, № 1, 36 – 45 (2008).
8. А. Г. Травкин, Н. А. Шульгина, *Вестн. офтальмологии*, № 5, 26 – 28 (2004).
9. Ф. С. Гахраманов, К. Т. Керимов, А. И. Джафаров, *Бюл. экп. биол. мед.*, **142**(12), 652 – 655 (2006).
10. Э. А. Михальский, И. В. Лысяк, *Дальневосточный мед. ж.*, № 2, 126 – 129 (2009).
11. В. Н. Красногорская, С. Н. Басинский, Е. В. Соломина, *Бюл. физиол. патол. дыхания*, № 24, 94 – 95 (2007).
12. Н. И. Петрова, А. Ю. Расческов, Л. П. Болгова, Н. М. Хабибуллина, *Казанский мед. ж.*, № 6, 978 – 981 (2012).
13. Г. В. Николаева, М. Р. Гусева, М. Б. Бесланеева, *Вестн. офтальмологии*, № 6, 57 – 61 (2012).
14. О. С. Талалаева, А. Ю. Жариков, С. А. Федорев и др., *Бюл. сиб. мед.*, **5**(5), 101 – 104 (2011).
15. Н. П. Мищенко, С. А. Федорев, Е. И. Гусев и др., *Ж. неврологии и психиатрии. Инсульт*, № 15, 61 – 66 (2005).
16. В. А. Стоник, Е. И. Гусев, М. Ю. Мартынов и др., *Докл. Академии наук*, **405**(5), 1 – 3 (2005).

17. И. Г. Агафонова, Н. Г. Колосова, Н. П. Мищенко и др., *Бюл. эксперим. биол. мед.*, № 4, 446 – 450 (2007).
18. И. Г. Агафонова, В. Н. Котельников, Н. П. Мищенко и др. *Бюл. эксперим. биол. мед.*, № 12, 686 – 690 (2010).
19. Н. М. Лупач, В. Н. Потапов, Е. А. Хлудеева и др., *Бюл. физиол. патол. дыхания*, № 25, 51 – 54 (2007).
20. О. С. Талалаева, Н. П. Мищенко, В. М. Брюханов и др., *Бюл. СО РАМН*, **32**(4), 28 – 31 (2012).
21. Е. Ю. Приезжева, О. А. Лебедько, Б. Я. Рьжавский и др., *Здоровье. Мед. экология. Наука*, № 4 – 5, 151 – 153 (2009).
22. В. К. Козлов, М. В. Козлов, О. А. Лебедько и др., *Дальневосточный мед. ж.*, № 2, 61 – 64 (2009).
23. А. В. Цыбульский, А. М. Попов, А. А. Артюков и др., *Биомед. химия*, № 3, 314 – 325 (2011).
24. Н. П. Мищенко, С. А. Федореев, Т. А. Запара, А. С. Рагушняк, *Бюл. эксперим. биол. мед.*, **147**(2), 155 – 159 (2009).
25. D. Yin, Y. Zhang, C. Stuart, et al., *J. Neuroimmunol.*, **200**(1 – 2), 71 – 76 (2008).
26. K. Nishimura, S. Makino, Y. Tanaka, et al., *J. Neuroendocrinol.*, **16**(1), 84 – 91 (2004).
27. Ф. И. Ингель, Д. А. Бодягин, Э. Р. Переверзева, Ю. А. Реванова, *Бюл. эксперим. биол. мед.*, № 2, 18 – 21 (1997).
28. С. Гланц, *Медико-биологическая статистика*, Практика, Москва (1998).
29. E. S. Han, F. L. Muller, A. Pérez, et al., *Physiol. Genomics.*, **34**(1), 112 – 126 (2008).
30. O. Laptenko and C. Prives, *Cell. Cycle*, **11**(16), 2975 (2012).

Поступила 12.07.13

## EFFECT OF HISTOCHROME ON p53 GENE EXPRESSION IN RED BONE MARROW CELLS OF MICE UNDER MODEL CHRONIC STRESS CONDITIONS

E. N. Kareva<sup>1</sup>, D. A. Tikhonov<sup>1</sup>, N. P. Mishchenko<sup>2</sup>, S. A. Fedoreev<sup>2</sup>, and N. L. Shimanovsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia;

<sup>2</sup> Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

Despite considerable antioxidant effect of histochrome preparation, its clinical effectiveness cannot be explained only by its antioxidant properties. In order to establish the possible additional mechanism of medicinal action of the active substance (echinochrome A) of histochrome, we have studied the impact of echinochrome A on the p53 gene expression in cells of the red bone marrow of SHK mice on a model of chronic stress. In a dose of 1 mg/kg intraperitoneally injected once a day during 7 days before stress induction, echinochrome A normalized the level of p53 gene expression as compared to that in the group injected with the physiological solution. This result indicates that histochrome exhibits an anti-stress effect in mice.

**Keywords:** antioxidant properties; P53 gene expression; histochrome; chronic stress



### Стандарты GMP и GLP в России: проблемы и перспективы

Биотехнологический  
Бизнес-Инкубатор  
МГУ

Вот уже несколько лет внедрение международных стандартов надлежащей производственной практики и надлежащей лабораторной практики (GMP и GLP) в России является предметом оживлённых дискуссий. При этом необходимость нововведений уже не вызывает сомнений. В центре обсуждения поиски оптимальных механизмов перехода с учётом специфики и состояния российского рынка, интересов производителей и потребителей.

«Проблемные зоны» в переходе на международные стандарты GMP и GLP и возможные подходы к решению существующих проблем с учетом международного опыта обсудили 14 марта на конференции в Биотехнологическом инкубаторе МГУ. Мероприятие собрало более 50 участников – представителей власти, бизнеса, науки, СМИ, зарубежных инспекторов и специалистов. Примечательно, что инициатором встречи выступила французская фармацевтическая компания «Bioscodex», благодаря которой иностранные эксперты мирового уровня в области GMP и GLP приняли участие в работе круглого стола. Таким образом, конференция продемонстрировала высокую актуальность развития ситуации на российском фармацевтическом рынке не только для отечественных, но и для иностранных производителей.

В завершении конференции состоялась экскурсия, на которой посетители ознакомились с оснащением Биотехнологического инкубатора МГУ – ведущего в стране центра по решению задач в области GLP и подготовки кадров для инновационных исследований.