

**Адрес редакции:**

125315, Москва, ул. Балтийская, 8.  
ФГБНУ «НИИ общей патологии  
и патофизиологии», к. 379

E-mail: path.physiol@yandex.ru

Сайт: www.pfnet.ru

Зав. редакцией Н.Р. Соболев  
+7 906 793 5467

Издатель: Иришкин Дмитрий  
E-mail: genius-me dia@mail.ru

Входит в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК России для публикации значимых результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук

Двухлетний импакт-фактор  
по версии РИНЦ на 2018 г.: 0,517

Подписной индекс по каталогам:  
«Роспечать»: 71456  
«Урал-Пресс»: 71456

Формат издания: 205×265 мм  
Печать: цифровая  
Тираж 300 экз.  
Цена свободная

Сдано в набор 09.09.2021  
Подписано к печати 20.09.2021  
Опубликовано 30.09.2021

Отпечатано: ООО «ПКФ «СОЮЗ-ПРЕСС»  
Адрес типографии:  
150062, г. Ярославль,  
проезд Доброхотова, д. 16

ISSN 0031-2991

Пат. физиол. и экспер. тер.  
2021. Том 65. № 3. 1–106

Перепечатка материалов и использование их в любой форме, в том числе и в электронных СМИ, возможны только с письменного разрешения издателя. За содержание рекламных публикаций ответственность несет рекламодатель.

© ИП Иришкин Дмитрий Андреевич, 2021.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

Российская академия наук  
Общество патофизиологов  
«НИИ Общей патологии и патофизиологии»

# ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

*Ежеквартальный рецензируемый научно-практический журнал  
Основан в 1957 г.*

Том 65 № 4 · 2021

Октябрь–Декабрь

**Главный редактор:**

**Б.Б. Мороз**, *акад. РАН, д.м.н., проф., ФМБЦ им. А.И. Бурназяна, Москва*

**Заместители главного редактора:**

**И.С. Гушин**, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., Институт иммунологии, Москва*

**Ответственный секретарь:**

**Н.С. Гурко**, *к.м.н., НИИОПП, Москва*

**Редакционная коллегия:**

**Ю.В. Архипенко**, *д.б.н., проф., МГУ, Москва*  
**Е.И. Асташкин**, *д.б.н., проф., Первый МГМУ, Москва*  
**С.В. Грачев**, *акад. РАН, д.м.н., проф., Первый МГМУ, Москва*  
**Т.А. Гуськова**, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., ЯГПУ, Ярославль*  
**Г. Дауни**, *д.б.н., проф., Университет Северного Техаса, Форт-Уэрт, Техас, США*  
**А.В. Ефремов**, *д.м.н., проф., НГМУ, Новосибирск*  
**В.Б. Кошелев**, *д.б.н., проф., МГУ, Москва*  
**Н.А. Крупина**, *д.б.н., НИИОПП, Москва*  
**А.А. Кубатиев**, *акад. РАН, д.м.н., проф., НИИОПП, Москва*  
**П.Ф. Литвицкий**, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., Первый МГМУ, Москва*  
**Р. Маллет**, *д.м.н., проф., Университет Северного Техаса, Форт-Уэрт, Техас, США*  
**О. Мацуо**, *д.б.н., проф., Университет Киндай, Хигасиосака, Япония*  
**Г.В. Порядин**, *чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., РНИМУ, Москва*  
**Р. Сьюелл**, *д.б.н., проф., Университет Кардиффа, Кардифф, Великобритания*

**Редакционный совет:**

**Ю.Ю. Бяловский**, *д.м.н., проф., РязГМУ, Рязань*  
**В.Т. Долгих**, *д.м.н., проф., ОГМУ, Омск*  
**А.М. Дыгай**, *акад. РАН, д.м.н., проф., Томский НИМЦ РАН, Томск*  
**Д.А. Еникеев**, *д.м.н., проф., БГМУ, Уфа*  
**В.П. Куликов**, *д.м.н., проф., АМИПДО, Барнаул*  
**В.П. Михайлов**, *д.м.н., проф., ЯГМУ, Ярославль*  
**В.Г. Овсянников**, *д.м.н., проф., РостГМУ, Ростов-на-Дону*  
**С.Н. Орлов**, *д.б.н., проф., МГУ, Москва*  
**Н.Н. Петрищев**, *д.м.н., проф., ПСПбГМУ, Санкт-Петербург*  
**Л.А. Северьянова**, *д.м.н., проф., КГМУ, Курск*  
**В. Шварц**, *д.м.н., проф., Саарский Университет, Холбург/Саар, Германия*

**Mailing address:**

Baltiyskaya str., 8, Moscow, 125315,  
Russian Federation,  
Institute of General Pathology  
and Pathophysiology, Room 379

**E-mail:** path.physiol@yandex.ru

**Home page:** www.pfiet.ru

Head of Editors N.R. Sobol  
+7 906 793 5467

**Publisher:** Dmitry Irishkin

**E-mail:** genius-media@mail.ru

The Journal is Included in the List of Leading Peer-reviewed Scientific Journals and Publications, recommended by the Higher Attestation Commission of Russia for publication of significant results of the theses of applicants for a PhD and DSc degrees.

Two-year impact factor  
according to RSCI on 2018 was 0.517

Subscription Index in «Rospechat»: 71456  
Subscription Index in «Ural Press»: 71456

Publication format: 205 × 265 mm  
Printing: DigitalCirculation: 300 copies  
The price is not fixed

Sent into set on 09.09.2021  
Signed for publication on 20.09.2021  
Published on 30.09.2021

Printed: LLC «PKF «SOYUZ-PRESS»  
Printing house address:  
16 Dobrokhotov passage  
150062, Yaroslavl, Russian Federation

**ISSN** 0031-2991

Pat Fiziol Eksp Ter  
2021. Volume 65. No 3. 1-106

Reprinting and use journal materials in any form, including electronic media, only possible with written permission of the publisher. The responsibility for the content of advertising publications is on the advertisers exclusively.

© IE Irishkin Dmitry Andreevich, 2021.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

Russian Academy of Sciences

Russian Society of Pathophysiologists

With the support of the Research Institute of General Pathology and Pathophysiology

# PATOLOGICHESKAYA FIZIOLOGIYA I EKSPERIMENTAL'NAYA TERAPIYA

*Pathological physiology and experimental therapy*

*Quarterly reviewed science and practical journal*

*Published since 1957*

Vol. 65 № 4 · 2021  
October–December

**Editor in chief:**

**B.B. Moroz**, *Acad. RAS, DSc, Prof., Federal Med. Biophysical Center, Moscow, Russia*

**Assistant editors in chief:**

I.S. Gushchin, *Corr. Member of RAS, Dsc, Prof., Inst. of Immunology, Moscow, Russia*

**Executive editor:**

N.S. Gourko, *PhD, Inst. of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*

**Editorial Board:**

Yu.V. Archipenko, *DSc, Prof., Moscow State University, Moscow, Russia*

E.I. Astashkin, *DSc, Prof., First Moscow State Medical University, Moscow, Russia*

H. Downey, *PhD, Prof., University of North Texas, Fort Worth (TX), USA*

S.V. Grachev, *Acad. RAS, DSc, Prof., First Mos. State Med. University, Moscow, Russia*

T.A. Guskova, *Corr. Member of RAS, Dsc, Prof., Inst. of Immunology, Moscow, Russia*

A.V. Efremov, *DSc, Prof., Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia*

V.B. Koshelev, *DSc, Prof., Moscow State University, Moscow, Russia*

N.A. Krupina, *DSc, Inst. of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*

A.A. Kubatiev, *Acad. RAS, DSc, Prof., Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*

P.F. Litvitskiy, *Corr. M. of RAS, DSc, Prof., Moscow State Med. Univ., Moscow, Russia*

R. Mallet, *PhD, Prof., University of North Texas, Fort Worth (TX), USA*

O. Matsuo, *PhD, Prof., Kindai University, Higashiosaka, Japan*

G.V. Poryadin, *Corr. M. of RAS, DSc, Prof., National Research Med. Univ., Mos., Russia*

R. Sewell, *PhD, Prof., Cardiff University, Cardiff, UK*

**Advisory Committee**

Yu.Yu. Byalovskiy, *DSc, Prof., Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia*

V.T. Dolgikh, *DSc, Prof., Omsk State Medical University, Omsk, Russia*

A.M. Dygay, *Acad. RAS, DSc, Prof., Tomsk National Research Medical Center of RAS, Tomsk, Russia*

D.A. Enikeev, *DSc, Prof., Bashkir State Medical University, Ufa, Russia*

V.P. Kulikov, *DSc, Prof., Altai Medical Inst. of Postgraduate Education, Barnaul, Russia*

V.P. Mikhailov, *DSc, Prof., Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia*

V.G. Ovsyannikov, *DSc, Prof., Rostov State Med. University, Rostov-na-Donu, Russia*

S.N. Orlov, *DSc, Prof., Moscow State University, Moscow, Russia*

N.N. Petrishchev, *DSc, Prof., First St.Petersburg State Med. Univ., St.Peterburg, Russia*

L.A. Severyanova, *DSc, Prof., Kursk State Medical University, Kursk, Russia*

V. Shvarz, *PhD, Prof., Saarland University, Homburg/Saar, Germany*

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Хлебникова Н.Н., Ширенова С.Д., Крупина Н.А.** Неонатальное действие ингибитора дипептидилпептидазы IV дипротина А приводит к формированию гиперактивного фенотипа и длительному повышению агрессивности у крыс . . . . . 4
- Плехова Н.Г., Зиновьев С.В., Радьков И.В., Шуматов В.Б.** Поведенческая реакция крыс и хромофилия эритроцитов при экспериментальной черепно-мозговой травме. . . . .
- Черпаков Р.А., Кузовлев А.Н., Макаревич Д.Г., Лобанов А.В., Ершов А.В., Гребенчиков О.А.** Влияние различных концентраций хлорида лития на уровень p-GSK-3 $\beta$  в модели ишемического инсульта . . . . . 12
- Кузник Б.И., Смоляков Ю.Н., Хавинсон В.Х., Шаповалов К.Г., Лукьянов С.А., Фефелова Е.В., Казанцева Л.С.** Нейтрофилы, лимфоциты и их соотношение как предикторы исходов у больных COVID-19 . . . . . 21
- Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Позина А.А.** Лиофилизированная форма ксеногенной суммарной РНК стимулирует гемопоэз при постлучевой миелосупрессии . . . . . 26
- Успенская М.С., Ляпина М.Г., Калугина М.Д.** Влияние на антикоагулянтную активность и степень полимеризации фибрина экстрактов из нового пиона «Иван Горожанкин» и пиона «молочноцветковый» в сравнительном аспекте . . . . . 34
- Шилин Д.С., Шаповалов К.Г.** Фактор алиментарно-конституционального ожирения в изменениях системного кровообращения при COVID-19 . . . . . 42
- Лысенко С.Н., Чечнева М.А., Бурумкулова Ф.Ф., Петрухин В.А., Будыкина Т.С.** Роль оценки размеров поджелудочной железы плода в прогнозе ранней неонатальной гипогликемии при сахарном диабете у матери. . . . . 48
- Франциянц Е.М., Нескубина И.В., Сурикова Е.И., Шихлярова А.И., Бандовкина В.А., Каплиева И.В., Немашкалова Л.А., Трепитаки Л.К., Шейко Е.А., Качесова П.С., Черярина Н.Д.** Показатели апоптоза в митохондриях клеток печени при росте меланомы B16/F10 на фоне хронической нейрогенной боли. . . . . 56
- Осиков М.В., Бойко М.С., Симонян Е.В.** Выраженность ответа острой фазы при экспериментальном язвенном колите в условиях применения витамина D3 в составе оригинальных ректальных суппозиториев . . . . . 64
- Верлов Н.А., Гулина Л.С., Бендт И.В., Ланда С.Б., Трашков А.П., Эмануэль В.Л.** Динамика содержания олигомерных форм уромодулина в моче крыс при развитии мочекаменной болезни . . . . . 73

## ОБЗОРЫ

- Меркулов Ю.А., Гореликов А.Е., Пятков А.А., Меркулова Д.М.** Ритмическая трансспинальная магнитная стимуляция в терапии хронической боли в нижней части спины. Метаанализ. (Часть II). . . . . 80
- Тадтаева З.Г., Яковлева Е.Е., Амелин А.В.** Полиморфизм гена фолатного обмена метилентетрагидрофолат-редуктазы (mthfr) и гипергомоцистеинемия при мигрени. . . . . 91
- Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б.** Интервальное голодание. . . . .

## МЕТОДИКА

- Сазонова М.А., Синёв В.В., Рыжкова А.И., Сазонова М.Д., Дорошук Н.А., Кириченко Т.В., Орехов А.Н., Собенин И.А.** Создание гибридных культур, содержащих мутацию митохондриального генома m.1555A>G (ген MT-RNR1), имеющую протективный эффект при атеросклерозе. . . . .
- Чеботарёва Ю.Ю., Овсыанников В.Г., Родина М.А., Подгорный И.В., Хутиева М.Я.** Современные аспекты биологического моделирования нарушений полового развития

## ORIGINAL ARTICLES

- Khlebnikova N.N. Shirenova S.D., Krupina N.A.** Neonatal action of the dipeptidyl peptidase iv inhibitor diprotin A leads to a hyperactive phenotype formation and a prolonged increase in aggressiveness in rats . . . . . 4
- Plekhova N.G., Zinoviev S.V., Radkov I.V., Shumatov V.B.** Behavioral response and erythrocyte chromophilia of rats in experimental traumatic brain injury
- Cherpakov R.A., Kuzovlev A.N., Makarevich D.G., Lobanov A.V., Ershov A.V., Grebenchikov O.A.** Effect of different concentrations of lithium chloride on p-GSK-3 $\beta$  content in a model of ischemic stroke . . . . . 12
- Kuznik B.I., Smolyakov Yu.N., Khavinson V.Kh., Shapovalov K.G., Lukyanov S.A., Fefelova E.V., Kazantseva L.S.** Neutrophils, lymphocytes and their ratio as predictors of outcome in patients with COVID-19 . . . . . 21
- Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Pozina A.A.** A lyophilized form of xenogeneic total RNA stimulates hematopoiesis in post-radiation myelosuppression . . . . . 26
- Uspenskaya M.S., Lyapina M.G., Kalugina M.D.** Comparative effects on anticoagulant activity and degree of fibrin polymerization of extracts from the new peony «Ivan Gorozhankin» and "Paeonia lactiflora" . . . . . 34
- Shilin D.S., Shapovalov K.G.** The impact of exogenous constitutional obesity on the systemic circulation in COVID-19 patients . . . . . 42
- Lysenko S.N., Chechneva M.A., Burumkulova F.F., Petrukhin V.A., Budykina T.S.** Role of the fetal pancreas size in prediction of early neonatal hypoglycemia in maternal diabetes mellitus . . . . . 48
- Frantsiyants E.M., Neskubina I.V., Surikova E.I., Shikhlyarova A.I., Bandovkina V.A., Kaplieva I.V., Nemashkalova L.A., Trepitaki L.K., Sheiko E.A., Kachesova P.S., Cheryarina N.D.** Indicators of apoptosis in mitochondria of liver cells in female C57BL/6 mice with B16/F10 melanoma growing in presence of chronic neurogenic pain . . . . . 56
- Osikov M.V., Boyko M.S., Simonyan E.V.** Severity of the acute phase response in experimental ulcerative colitis under conditions of the use of vitamin D3 in a novel rectal suppository . . . . . 64
- Verlov N.A., Gulina L.S., Bendt I.V., Landa S.B., Trashkov A.P., Emanuel V.L.** Changes in the urinary content of uromodulin oligomeric forms in rats during development of urolithiasis . . . . . 73

## REVEIWS

- Merkulov Y.A., Gorelikov A.E., Pyatkov A.A., Merkulova D.M.** Repetitive transspinal magnetic stimulation in the treatment of chronic low back pain. A meta-analysis (Part II) . . . . . 80
- Tadtaeva Z.G., Yakovleva E.E., Amelin A.V.** Polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (mthfr) folate metabolism gene and hyperhomocysteinemia in migraine . . . . . 91
- Paltsyn A.A., Sviridkina N.B.** Intermittent fasting

## METHODS

- Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Sazonova M.D., Doroshuk N.A., Kirichenko T.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A.** Creation of cybrid cultures containing the mitochondrial genome mutation m.1555A>G (MT-RNR1 gene), which has a protective effect in atherosclerosis . . . . . 98
- Chebotaryova Yu.Yu., Ovsyannikov V.G., Rodina M.A., Podgorniy I.V., Hutieva M.Ya.** Modern aspects of biological modeling of sexual development disorders

## Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092.9

Хлебникова Н.Н., Ширенова С.Д., Крупина Н.А.

# Неонатальное действие ингибитора дипептидилпептидазы IV дипротина А приводит к формированию гиперактивного фенотипа и длительному повышению агрессивности у крыс

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,  
125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

**Введение.** Ингибиторы пролинспецифической сериновой протеазы дипептидилпептидазы IV (ДПП-IV, CD26, EC 3.4.14.5), способные модулировать широкий спектр физиологических процессов, находят применение в клинике. В наших работах получены свидетельства влияния ингибиторов ДПП-IV при их введении в раннем постнатальном периоде на эмоционально-мотивационное поведение взрослых крыс. Более сильные изменения в поведении отмечались у крыс при действии ингибитора ДПП-IV дипротина А. Однако не ясно, как долго сохраняются такие изменения.

**Цель работы** – изучение отсроченных эффектов ингибитора ДПП-IV дипротина А на выраженность эмоционально-мотивационных расстройств, индуцированных действием ингибитора в раннем постнатальном периоде, в динамике взросления крыс от 2 до 7 мес.

**Методика.** Дипротин А вводили крысам ежедневно в 5–18-й постнатальные дни внутривенно (2 мг/кг), в объеме 0.1 мл на 10 г массы. Крысы контрольной группы получали инъекции физиологического раствора. Поведение взрослых крыс оценивали в возрасте 2 и 7 мес в тестах автоматизированного «открытого поля», «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), принудительного плавания и социального взаимодействия. Уровень кортикостерона в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа ELISA. Для статистической обработки результатов использовали двухфакторный дисперсионный анализ Two Way ANOVA и непараметрический U-критерий Манна-Уитни с поправкой на множественность сравнений.

**Результаты.** У крыс опытной группы по сравнению с контрольной группой в возрасте 2 и 7 мес была повышена двигательная активность и скорость перемещения в тесте ПКЛ. В возрасте 7 мес у них также была увеличена вертикальная исследовательская активность. Признаков повышения тревожности не выявлено. У крыс опытной группы выявлены признаки депрессивно-подобного поведения по нарушению биоритмологической структуры плавания, более выраженные в возрасте 7 мес. Неагрессивное социальное взаимодействие у крыс, получавших неонатально дипротин А, было снижено по сравнению с контролем в возрасте 2 мес, а в возрасте 7 мес, напротив, увеличено. У этих животных число и длительность агрессивных социальных контактов были увеличены по сравнению с контролем как в возрасте 2, так и в возрасте 7 мес. Уровень кортикостерона в сыворотке крови у крыс опытной группы в возрасте 7.5 мес был выше, чем в контроле.

**Заключение.** Данные настоящего исследования свидетельствуют о развитии гиперактивного фенотипа и длительных психоэмоциональных нарушений в виде повышенной агрессивности наряду с активацией гипоталамо-гипофизарно-адренальной оси у взрослых крыс, подвергнутых действию дипротина А в 5–18-й постнатальные дни, и поддерживают представления об участии дипептидилпептидазы-IV в генезе психоэмоциональных расстройств.

**Ключевые слова:** ингибитор дипептидилпептидазы IV дипротин А; гиперактивный фенотип; депрессивно-подобное поведение; агрессия; длительные эффекты; модель; крысы

**Для цитирования:** Хлебникова Н.Н., Ширенова С.Д., Крупина Н.А. Неонатальное действие ингибитора дипептидилпептидазы IV дипротина А приводит к формированию гиперактивного фенотипа и длительному повышению агрессивности у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): 4-16.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.4-16

**Для корреспонденции:** Хлебникова Надежда Николаевна, e-mail: nanich@yandex.ru

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А.; сбор и обработка материала, подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка, написание текста – Хлебникова Н.Н., Ширенова С.Д., Крупина Н.А.; редактирование – Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках Государственного задания по теме № 0520-2019-0031.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 19.02.2021

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021

**Khlebnikova N.N. Shirenova S.D., Krupina N.A.**

## Neonatal action of the dipeptidyl peptidase iv inhibitor diprotin A leads to a hyperactive phenotype formation and a prolonged increase in aggressiveness in rats

Institute of General Pathology and Pathophysiology,  
Baltiyskaya 8, Moscow 125315, Russian Federation

**Background.** Inhibitors of the proline-specific serine protease dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV, CD26, EC 3.4.14.5) may modulate a wide range of physiological processes and are used in the clinic. In our studies, we obtained evidence for the impact of DPP-IV inhibitors on adult rats' emotional and motivational behavior when administered in the early postnatal period. Diprotin A exhibited the most significant impact on the animals' behaviors. However, it is not clear how long the changes persist.

**Aim.** To study the delayed effects of the DPP-IV inhibitor diprotin A on the severity of emotional and motivational disorders induced by the inhibitor action in the early postnatal period, in the dynamics of rats maturation from 2 to 7 months.

**Methods.** Diprotin A was administered to rat pups daily on postnatal days 5–18, intraperitoneally, at a dose of 2 mg/kg, in a volume of 0.1 ml per 10 g of body weight. The rat pups of the control group received saline. The behavior of adult rats was assessed at the age of 2 and 7 months in the automated "open field," "Elevated Plus Maze" (EPM), forced swimming, and social interaction tests. Serum corticosterone levels were determined by ELISA. The results were statistically processed using Two Way ANOVA and non-parametric Mann-Whitney U-test adjusted for multiple comparisons.

**Results.** Experimental rats increased motor activity and travel speed in the EPM test compared with the control group at 2 and 7 months of age. At the age of 7 months, experimental rats also increased vertical (rearing) activity. There were no signs of increased anxiety. Experimental rats demonstrated depression-like behavior judged by the biorhythmologic structure of swimming, more pronounced at 7 months. Non-aggressive social interaction in rats treated neonatally with diprotin A was reduced compared with controls at the age of 2 months and, on the contrary, increased at the age of 7 months. In these animals, the number and duration of aggressive social contacts were increased compared with controls at the ages of 2 and 7 months. Serum corticosterone levels in experimental rats at the age of 7.5 months were higher than in control.

**Conclusion.** The present study results testify to the development of a hyperactive phenotype and prolonged psychoemotional disorders as increased aggressiveness along with hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in adult rats exposed to the action of diprotin A on postnatal days 5–18. The data support the dipeptidyl peptidase IV involvement in the genesis of psychoemotional disorders.

**Keywords:** Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor diprotin A; hyperactive phenotype; depression-like behavior; aggression; prolonged effects; model; rats

**For citation:** Khlebnikova N.N. Shirenova S.D., Krupina N.A. Neonatal action of the dipeptidyl peptidase iv inhibitor diprotin A leads to a hyperactive phenotype formation and a prolonged increase in aggressiveness in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(4): 4-16. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.4-16

**For correspondence:** *Nadezhda N. Khlebnikova*, Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher, Chief Researcher, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, e-mail: nanich@yandex.ru

**Contribution:** the concept and design of the study – Khlebnikova N.N., Krupina N.A.; collection and processing of material, preparing illustrative material, statistical processing, writing a text – Khlebnikova N.N., Shirenova S.D., Krupina N.A.; editing – Krupina N.A., Khlebnikova N.N. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

**Financing.** The study was carried out within the framework of the State Assignment on topic No. 0520-2019-0031

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

### Information about the authors:

Khlebnikova N.N., <https://orcid.org/0000-0002-0245-305X>

Shirenova S.D., <https://orcid.org/0000-0003-2942-1194>

Krupina N.A., <https://orcid.org/0000-0002-2462-899X>

Received 19.02.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

## Введение

Дипептидилпептидаза IV (ДПП-IV, CD26, EC 3.4.14.5) представляет собой трансмембранную сериновую протеазу, в качестве субстратов которой могут выступать секретрируемые мембранные и ядерные белки, в число которых входят хемокины, цитокины, факторы роста, нейропептиды и гормоны [1]. На поверхности плазматической мембраны ДПП-IV связывается с другими протеинами, вовлеченными в важнейшие процессы поддержания гомеостаза нервной ткани, нейрональной и синаптической пластичности, внесинаптической передачи и нейротрансмиссии [2, 3]. Активность и концентрация ДПП-IV коррелируют с рядом соматических заболеваний (прежде всего, с диабетом 2 типа) [4, 5] и психоневрологических нарушений [6, 7]. Ингибиторы ДПП-IV – глиптины, относящиеся к классу миметиков инкретинных, уже больше 10 лет применяются в качестве альтернативных терапевтических средств для управления гомеостазом глюкозы у пациентов, страдающих диабетом 2 типа [8]. Селективные ингибиторы дипептидилпептидазы IV, в частности, дипротин А, имеют потенциал для клинического использования в качестве анальгетиков [9]. Учитывая плейотропные эффекты ДПП-IV в организме, можно предположить, что ингибиторы этой пептидазы способны модулировать широкий спектр физиологических процессов [10].

Ранее в наших исследованиях было показано, что ингибиторы ДПП-IV с разным механизмом действия (метионил-2(S)-цианопирролидин, дипротин А, ситаглиптин) в условиях их введения на 2-й – 3-й нед постнатального онтогенеза приводят к развитию смешанного тревожно-депрессивного состояния, сопровождающегося повышенной стресс-провоцируемой агрессивностью, у крыс подросткового возраста и взрослых животных [11, 12].

Известно, что гипоталамо-гипофизарно-адреналовая (ГГА) ось вовлечена в регуляцию эмоционального и мотивационного поведения. Так, развитие депрессивности ассоциируют с повышенным уровнем гормона надпочечников (кортизола у человека и кортикостерона у грызунов) [13, 14]. В наших экспериментах такая связь измененного психоэмоционального статуса крыс с активацией ГГА-оси по показателю повышения уровня кортикостерона в сыворотке крови была показана для 2-месячных крыс с тревожно-депрессивными расстройствами, вызванными неонатальным действием ингибиторов ДПП-IV [15, 16].

Многие особенности течения психических заболеваний, в том числе их стойкость, длительность и переменчивость течения, связывают с эпигенетической

дизрегуляцией [17]. На моделях тревожно-депрессивных состояний, возникающих вследствие действия ингибиторов ДПП-IV в раннем онтогенезе, было показано, что у 3-месячных животных наблюдается повышение экспрессии генов пролинспецифических пептидаз. [18]. Эти данные хорошо согласуются с представлениями о нарушениях эпигенетической регуляции на ранних этапах развития организма как причине последующих расстройств психоэмоциональной сферы. Однако до настоящего времени только на модели тревожно-депрессивных состояний, вызванной неонатальным действием синтетического ингибитора ДПП-IV метионил-2(S)-цианопирролидина, было прослежено поведение крыс в отдаленном периоде после патогенного воздействия – вплоть до 6-месячного возраста – по целому ряду показателей тревожности, депрессивности и агрессивности [19]. На модели тревожно-депрессивного состояния, индуцированного неонатальным действием других ингибиторов ДПП-IV – дипротина А и ситаглиптина, – по оценкам тревожности и депрессивности было обнаружено что на протяжении 6 мес более сильные изменения в поведении отмечаются у крыс, которым вводили дипротин А. Полноценную оценку агрессивности в тесте социального взаимодействия у крыс на отдаленных сроках наблюдения провести не удалось. Представляло интерес оценить характер, воспроизводимость и длительность нарушений эмоционально-мотивационного поведения у крыс, подвергнутых на ранних этапах неонатального онтогенеза действию ингибитора ДПП-IV дипротина А и сопоставить эти изменения с состоянием ГГА-оси.

**Цель исследования** заключалась в изучении отсроченных эффектов ингибитора ДПП-IV дипротина А на выраженность эмоционально-мотивационных расстройств, индуцированных действием ингибитора в раннем постнатальном периоде, в динамике взросления крыс от 2 до 7 мес.

## Методика

Исследование выполнено на крысах-самцах популяции Wistar (разведение в питомнике «НИИОПП»: система «Меркурий», номер в реестре: RU 1487336). Работу с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики», утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016, и Межгосударственными стандартами ГОСТ 33215-2014, ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными», соответствующими Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS

№ 123, Страсбург, 18 марта 1986 г. с приложением от 15.06.2006), под контролем Этического комитета ФГБНУ НИИОПП (протокол № 3 от 16.06.2020). Проведено 2 серии экспериментов по изучению отдаленных последствий неонатального действия ингибитора ДПП-IV трипептида дипротина А (Н-Пе-Pro-Пе-ОН, MB 341.45, Sigma-Aldrich, USA) по показателям эмоционально-мотивационного состояния крыс. В обеих сериях крысам-самкам после родов оставляли по 4-6 детенышей-самцов из разных пометов, рожденных в один день. Пометы, а в дальнейшем крысят подросткового возраста и взрослых крыс содержали в стандартных условиях вивария с естественной сменой освещенности при свободном доступе к пище и воде. День родов считали нулевым постнатальным днем (ПНД 0). Дипротин А вводили крысятам опытных групп (Д) ежедневно в ПНД 5-18, внутривентриально, в дозе 2 мг/кг, в объеме 0.1 мл на 10 г массы тела (Серия 1,  $n = 14$ ; Серия 2,  $n = 19$ ). Крысята контрольной группы получали инъекции физиологического раствора (ФР) (Серия 1,  $n = 12$ ; Серия 2,  $n = 18$ ). Оценку поведения проводили у взрослых крыс в возрасте 2 и 7 мес. В серии 1 после окончания поведенческих исследований в возрасте 7.5 мес крыс декапитировали с помощью гильотины, отбирали пробы структур мозга для последующего биохимического исследования и собирали смешанную артериальную и венозную кровь для определения уровня кортикостерона в сыворотке. В серии 2 данный показатель не оценивали.

**Оценка двигательной и исследовательской активности.** Двигательную (горизонтальную, по пройденному пути, см) и исследовательскую (вертикальную, по числу стоек) активность крыс оценивали в тесте автоматизированного открытого поля (аОП, система «Opto-Varimex», «Columbus Instruments», США) при освещенности 42 люкса, в течение 10 мин. В серии 1 вертикальная активность у части животных ( $n = 16$ ) не была оценена.

**Оценка уровня тревожности.** Уровень тревожности крыс оценивали в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) с использованием системы VideoMot2 (TSE Systems GmbH, Germany). Лабиринт, изготовленный из черного непрозрачного поливинилхлорида, имеет 2 открытых рукава ( $42 \times 14$  см) (ОР) и 2 закрытых стенками рукава ( $42 \times 14 \times 22$  см) (ЗР), расположенных перпендикулярно друг другу, с площадкой в центре ( $14 \times 14$  см); ОР имеют низкие бортики (1 см) для предотвращения падения животного. ПКЛ расположен на высоте 70 см от пола. Освещенность в центре лабиринта составляла 29 лк, в ОР – 36 лк, в ЗР – 2 лк. Крысу помещали в центр ПКЛ го-

ловой в сторону ОР. Длительность тестирования составляла 5 мин. В автоматическом режиме измеряли: время в ОР (мс, суммарно по двум ОР); число посещений ОР (сумма числа заходов в оба ОР); пробег в ОР (см, сумма по двум ОР); время в ЗР (мс, суммарно по двум ЗР); число посещений ЗР (сумма числа заходов в оба ЗР); пробег в ЗР (см, сумма по двум ЗР); рассчитывали предпочтение ОР как отношение числа посещений ОР к суммарному числу посещений ОР+ЗР (%); оценивали также общий пробег в ПКЛ за время тестирования (см); среднюю скорость перемещения (см/с); число и длительность (с) стоек (вертикальная исследовательская активность), эпизодов груминга (число и длительность, с); свешивания с ОР (число и длительность, с). Увеличение выраженности груминга характеризует эмоциональное напряжение, увеличение свешиваний с ОР и/или заглядываний за край ОР, так называемых «сканирований», свидетельствует о сниженном уровне тревожности у грызунов [20-23]. В настоящей работе свешивания и заглядывания за край ОР оценивали суммарно и обозначали одним термином – «свешивания» с ОР.

**Оценка депрессивно-подобного поведения.** Применяли модифицированный метод Порсолта [24] при однократном помещении животного в неизбежную авersive ситуацию принудительного плавания [25]. Крыс помещали в цилиндрический пластмассовый бак (высота 47 см, внутренний диаметр 35 см), заполненный водой на высоту 35 см, температура воды составляла 25-26 °С. В течение 10 мин оценивали суммарную длительность и число периодов активного (энергичные движения всеми лапами с активным перемещением) и пассивного (слабые гребки лапами, необходимые для поддержания тела на плаву) плавания, а также суммарную длительность иммобильности (полное отсутствие плавательных движений, неподвижность). С использованием биоритмологического подхода, предложенного в работе Щетинина и соавт. [26], у крыс, демонстрировавших иммобильное поведение, рассчитывали индекс депрессивности (ИД, отношение числа кратких периодов иммобильности длительностью до 6 с к общему числу периодов активного плавания).

**Оценка социального взаимодействия.** Социальное взаимодействие оценивали в незнакомой крысам клетке из плексигласа ( $37.0 \times 57.0 \times 19.0$  см) при красном свете (7 лк). По схеме эксперимента крысы в течение двух-трех дней до тестирования находились в клетках поодиночке. Такое предварительное стрессирование усиливает последующее социальное взаимодействие [27]. Поведение оценивали в парах, состоявших из животных одной экспериментальной группы – опыт-

ной или контрольной. Подбор пар осуществляли таким образом, чтобы животные не были знакомы друг с другом, а различие в массе не превышало 15%. В течение 15 мин теста оценивали число и длительность активных неагрессивных и агрессивных социальных контактов. К активным неагрессивным социальным контактам относили обнюхивание, социальный груминг, залезание под или налезание на партнера, преследование, не заканчивавшиеся проявлением агрессии. К агрессивным контактам относили преследование, переходящее в агрессивное взаимодействие, атаки/драки, укусы, агрессивный груминг.

**Определение уровня кортикостерона в сыворотке крови.** Образцы сыворотки крови, полученные после декапитации животных, до использования хранили при -20 °С. Уровень кортикостерона оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием диагностического набора EIA-4164 (DRG ELISA, США) в соответствии с протоколом производителя. Содержание кортикостерона в крови выражали в нм/л.

**Статистическую обработку данных** проводили по алгоритмам программы «STATISTICA For Windows 7.0». По результатам предварительной проверки гипотезы о нормальном характере распределения данных по тестам Колмогорова-Смирнова и Лиллиефорса в случае, если гипотезу не отклоняли, применяли параметрические методы анализа, если гипотезу отклоняли – непараметрические методы.

В работе использовали параметрические методы. В работе использовали параметрический однофакторный дисперсионный анализ One Way ANOVA, двухфакторный дисперсионный анализ Two Way ANOVA с последующим *post hoc* сравнением по Fisher-LSD тесту. Оценивали факторы «Группа» (2 градации – неонатальное введение ФР или Д) и «Возраст» (2 градации – 2 мес и 7 мес). Для непараметрического анализа использовали U-критерий Манна-Уитни для независимых переменных (двусторонний). Для поправки на множественность сравнений рассчитывали критическое значение  $p$  ( $p_{кр}$ ) по методу FDR-контроля [28]. В случае  $p_{кр} < p < 0.05$  выявленные различия рассматривали как тенденцию. Принятый уровень значимости составлял 5%. В тесте социальных взаимодействий долю пар крыс, в которых хотя бы одно из животных демонстрировало агрессивное поведение, оценивали с помощью точного метода Фишера (ТМФ, двусторонний критерий). При использовании параметрических критериев данные представлены в виде  $M \pm S.E.M.$ , при использовании непараметрических критериев – в виде  $Me [Q1; Q3]$

**Результаты и обсуждение**

В возрасте 2 мес крысы опытных и контрольных групп в двух сериях исследований не различались по массе [One Way ANOVA:  $F(3, 59) = 2.358, p = 0.081$ ], двигательной [ $F(3, 59) = 0.871, p = 0.462$ ] и исследовательской [ $F(3, 59) = 1.029, p = 0.386$ ] активности (табл. 1).

Таблица 1/ Table 1

**Характеристика групп крыс в возрасте 2 мес в двух сериях исследований после неонатального действия ингибитора ДПП-IV дипротина А или физиологического раствора**

**Characteristics of the groups of 2-month-old rats in two experimental series after neonatal action of the DPP-IV inhibitor diprotin A or saline**

Серии	Показатели в группах	
	Физиологический раствор	Дипротин А
	Масса тела, г	
Серия 1	148.7 ± 8.3 (n = 12)	148.1 ± 6.1 (n = 14)
Серия 2	127.5 ± 6.5 (n = 18)	140.9 ± 5.4 (n = 19)
	Двигательная активность за 10 мин наблюдения в автоматизированном «открытом поле». см	
Серия 1	1580.9 ± 186.0	1617.4 ± 164.3
Серия 2	1452.8 ± 116.7	1748.5 ± 118.5
	Число стоек за 10 мин. наблюдения в автоматизированном «открытом поле»	
Серия 1	21.8 ± 2.4	20.5 ± 2.3
Серия 2	16.9 ± 3.0	14.7 ± 3.7

**Примечание.** n – число животных в группе.

**Note.** n – number of animals in the group.



В обеих сериях получены сходные результаты в поведенческих тестах, поэтому далее приведены объединенные результаты по двум сериям.

#### **Двигательная и исследовательская активность.**

Фактор «Группа» не оказывал влияния на двигательную [ $F(1, 119) = 0.897, p = 0.345$ ] и исследовательскую [ $F(1, 103) = 0.407, p = 0.525$ ] активность крыс в аОП. Фактор «Возраст» влиял как на горизонтальную [ $F(1, 119) = 4.262, p = 0.041$ ], так и на вертикальную [ $F(1, 103) = 93.704, p < 0.001$ ] активность крыс. В возрасте 7 мес двигательная активность крыс была выше, чем в возрасте 2 мес, хотя статистически значимые отличия отмечены только в контрольной группе (**табл. 2**). Исследовательская активность возрастала как в контрольной, так и в опытной группе. Взаимодействие факторов не выявлено.

**Уровень тревожности в тесте ПКЛ.** Выявлено влияние факторов «Возраст» и «Группа» на двигательную активность в ПКЛ: соответственно, общий пробег –  $F(1, 119) = 46.367, p < 0.001$  и  $F(1, 119) = 8.064, p = 0.005$ ; скорость перемещения –  $F(1, 119) = 46.296, p < 0.001$  и  $F(1, 119) = 8.067, p = 0.005$ ; суммарное число посещений ОР и ЗР –  $F(1, 119) = 11.69, p = 0.001$  и  $F(1, 119) = 7.804, p = 0.006$ . С возрастом двигательная активность снижалась в обеих группах (**табл. 3**). При этом у крыс, получавших в неонатальном периоде дипротин А, показатели

двигательной активности были выше, чем у животных, получавших ФР, как в возрасте 2 мес, так и в возрасте 7 мес (см. **табл. 3**). Взаимодействия факторов не выявлено.

На исследовательскую активность, которую оценивали по числу и длительности стоек, влиял фактор «Возраст», но не фактор «Группа»: соответственно, для числа стоек  $F(1, 119) = 3.789, p = 0.054$  и  $F(1, 119) = 0.032, p = 0.857$ ; для длительности стоек  $F(1, 119) = 75.653, p < 0.001$  и  $F(1, 119) = 0.615, p = 0.434$ . Взаимодействие факторов «Возраст» x «Группа» для показателя длительности стоек было статистически значимым ( $F(1, 119) = 6.168, p = 0.014$ ), тогда как для показателя числа стоек выявлена только тенденция ( $F(1, 119) = 2.904, p = 0.090$ ). Таким образом, в возрасте 2 мес вертикальная активность в опытной и контрольной группах не различалась, к 7 мес она увеличивалась в обеих группах, но в большей степени – в опытной группе (см. **табл. 3**).

Признаков повышения тревожности в ПКЛ у крыс с неонатальным введением дипротина А по сравнению с контролем ни на одном из сроков тестирования не выявлено. Влияния факторов «Возраст» и «Группа» на предпочтение ОР, а также взаимодействие этих факторов для этого показателя не обнаружено: соответственно,  $F(1, 119) = 0.755, p = 0.386$ ;  $F(1, 119) = 0.145, p = 0.704$ ;  $F(1, 119) = 0.451, p = 0.503$ . По величине пока-

Таблица 2 / Table 2

**Двигательная и исследовательская активность крыс, подвергнутых неонатальному действию ингибитора ДПП-IV дипротина А, в сравнении с крысами контрольной группы, получавшими физиологический раствор, суммарно за 10 мин наблюдения в автоматизированном «открытом поле»**

**The locomotor and exploratory activity in rats neonatally exposed to DPP-IV inhibitor diprotin A, in comparison with rats of the control group treated with saline, in total for 10 min in the automated “open field” test**

Показатели	Группы	
	Физиологический раствор	Дипротин А
Возраст 2 мес		
Двигательная активность, см	1504.1 ± 100.9 (n = 30)	1692.9 ± 96.6 (n = 33)
Число стоек	18.9 ± 2.1 (n = 30)	17.2 ± 2.4 (n = 33)
Возраст 7 мес		
Двигательная активность, см	1813.3 ± 127.5 # (n = 29)	1828.7 ± 106.3 (n = 31)
Число стоек	42.0 ± 2.0 # (n = 27)	40.6 ± 2.9 # (n = 17)

**Примечание.** #  $p < 0.05$  по сравнению со значением показателя в той же группе крыс в возрасте 2 мес (по Fisher LSD-тесту после Two Way ANOVA); n – число животных в группе.

**Note.** #  $p < 0.05$  in comparison with the rats at the age of 2 months in the same group (Two Way ANOVA followed by the Fisher LSD *post hoc* test); n – number of animals in the group.

зателей посещения ОР и ЗР (пробег, число и длительность заходов) различий между группами ни на одном из сроков не было обнаружено.

Межгрупповой анализ не выявил различий по числу и длительности свешиваний с ОР на каждом из сроков наблюдения (рис. 1, А, Б). Частота эпизодов и длительность груминга у крыс с неонатальным введением Дипротина А в возрасте 2 мес были ниже контрольных значений (рис. 1, В, Г). Внутригрупповой анализ показал статистически значимое снижение показателей свешиваний с ОР ПКЛ и груминга с возрастом только в контрольной группе.

**Депрессивно-подобное поведение.** Признаки депрессивно-подобного поведения выявлены у крыс опытной группы в возрасте 2 и 7 мес. По доле животных, демонстрировавших иммобильность, контрольная и опытная группы не различались в возрасте 2 и 7 мес (соответственно, для ФР: 40.0% и 58.6%; для Д: 57.6% и 63.3%). У крыс опытной группы в возрасте 7 мес наблюдали увеличение ИД и тенденцию к превышению числа периодов иммобильности по сравнению со значением в контрольной группе (табл. 4). По показателям активного и пассивного плавания не выявлено ни межгрупповых, ни внутригрупповых отличий.

**Социальное взаимодействие.** Выявлено взаимодействие факторов «Возраст» и «Группа» для показателей: число [F(1, 53)=14,663,  $p < 0.001$ ] и длительность [F(1, 53)=10.421,  $p = 0.002$ ] активных неагрессивных контактов, соответственно. У крыс опытной группы в возрас-

те 2 мес. наблюдали сниженное по сравнению с контролем неагрессивное социальное взаимодействие по показателям суммарного числа контактов и их длительности за 15 мин тестирования (рис. 2, А, Б). В возрасте 7 мес у крыс опытной группы число неагрессивных контактов возрастало по сравнению с предыдущим сроком тестирования, а у крыс контрольной группы – снижалось. Таким образом, в 7 мес неагрессивное социальное взаимодействие в группе с неонатальным введением Дипротина А было увеличено по сравнению с контролем. Влияние самих факторов «Возраст» и «Группа» не обнаружено.

Стресс-провоцируемое агрессивное взаимодействие с возрастом снижалось в обеих группах (рис. 3, А, Б). Однако в опытной группе число и длительность агрессивных социальных контактов были увеличены по сравнению с контролем как в возрасте 2, так и в возрасте 7 мес.

Относительное число пар, в которых крысы в возрасте 7 мес, получившие неонатально дипротин А, демонстрировали агрессивное поведение, было выше, чем в контроле и составило, соответственно, 80.0% и 6.3% (ТМФ,  $p < 0.001$ ).

**Уровень кортикостерона в крови крыс** в сыворотке крови крыс опытной группы в возрасте 7.5 мес был статистически значимо выше, чем в контрольной группе (рис. 4).

Результаты проведенного исследования показывают, что ингибитор ДПП-IV дипротин А при его введении в период с 5-го по 18-й ПНД, индуцирует у самцов крыс Wistar изменения показателей поведения

Таблица 3 / Table 3

**Показатели поведения в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у крыс, получавших неонатально ингибитор ДПП-IV дипротин А или физиологический раствор**

**Behavior indices in the «Elevated Plus Maze» test in rats treated neonatally with the DPP-IV inhibitor diprotin A or saline**

Показатели	Группы			
	2 мес		7 мес	
	физиологический раствор (n = 30)	дипротин А (n = 33)	физиологический раствор (n = 29)	дипротин А (n = 31)
Пробег общий (см)	1831.3 ± 95.9	2032.7 ± 80.3 #	1319.3 ± 56.7w	1537.8 ± 52.1 *♦
Общая скорость (см/с)	6,1 ± 0.3	6.8 ± 0.3 #	4.4 ± 0.2 ♦	5.1 ± 0.2 *♦
Суммарное число посещений отделов ПКЛ	19.8 ± 1.6	24,6 ± 1.9*	15.1 ± 1.3 ♦	18.8 ± 1.1 ×♦
Число стоек	9.3 ± 0.8	8,1 ± 0.7	9.5 ± 0.7	10.9 ± 0.7♦
Длительность стоек (с)	13.8 ± 1.9	10.2 ± 1.1	27.1 ± 2.6 ♦	34.0 ± 2.7 *♦

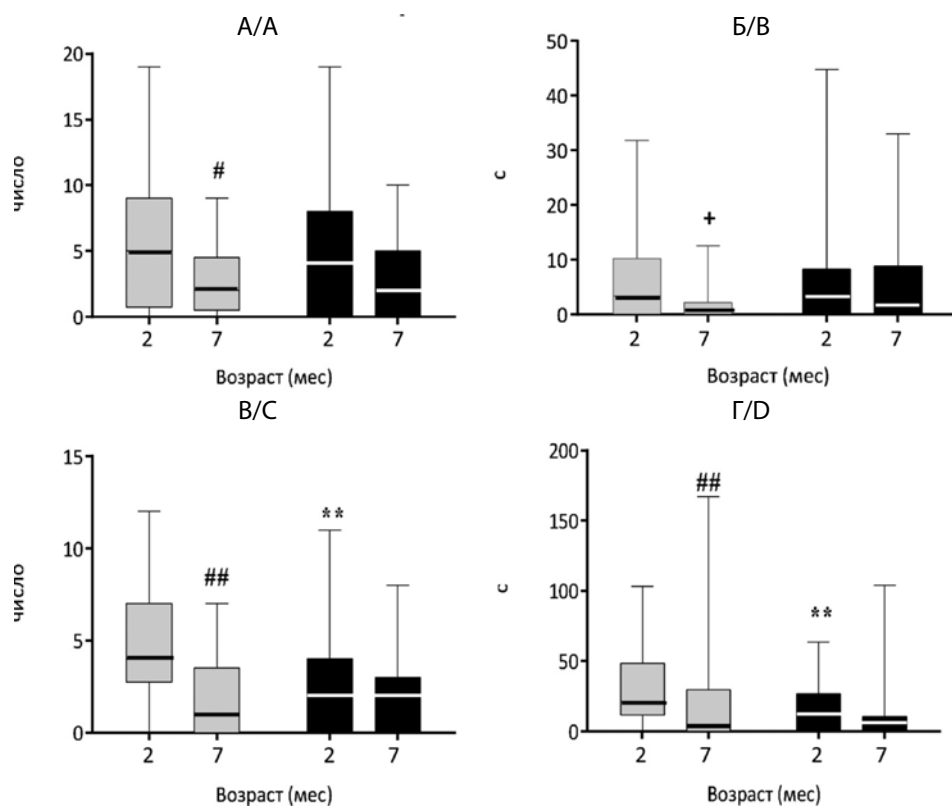
**Примечание.** \* $p < 0.05$ ; # $p = 0.053$ ; × $p = 0.094$  по сравнению со значением показателя в контрольной группе крыс на том же сроке наблюдения; ♦ $p < 0.05$  по сравнению со значением показателя в той же группе крыс на предыдущем сроке наблюдения (по Fisher LSD-тесту после Two Way ANOVA); n – число животных в группе.

**Note.** \* $p < 0.05$ ; # $p = 0.053$ ; × $p = 0.094$  in comparison with the rats of the same age in the control group; ♦ $p < 0.05$  in comparison with the rats of the previous age in the same group (Two Way ANOVA followed by the Fisher LSD *post hoc* test); n – number of animals in the group.

в тестах ПКЛ, принудительного плавания и социального взаимодействия, что согласуется с результатами наших предыдущих исследований с меньшим сроком наблюдения [12] и свидетельствует о принципиальной воспроизводимости данной модели эмоционально-мотивационных расстройств. В настоящем исследовании выявлено, что нарушения поведения сохраняются у животных, как минимум, до 7-месячного возраста (на протяжении всего периода наблюдения) и сопровождаются активацией ГГА-оси.

Мы не выявили межгрупповых различий в горизонтальной и вертикальной активности крыс в нестрессо-

генных условиях — при комнатной освещенности небольшого по площади аОП. Однако при сходном уровне освещенности в стрессогенных условиях ПКЛ у животных, подвергнутых действию дипротина А, двигательная активность на обоих сроках наблюдения была выше контрольных значений, а в возрасте 7 мес исследовательская активность (по числу стоек) также превысила контрольный уровень. У крыс контрольной группы мы не наблюдали изменения числа стоек в ПКЛ, однако выявили снижение исследовательских оценок риска по снижению свешиваний с ОП [29], что, вероятно, связано с увеличением уровня тревожности [30]. У крыс



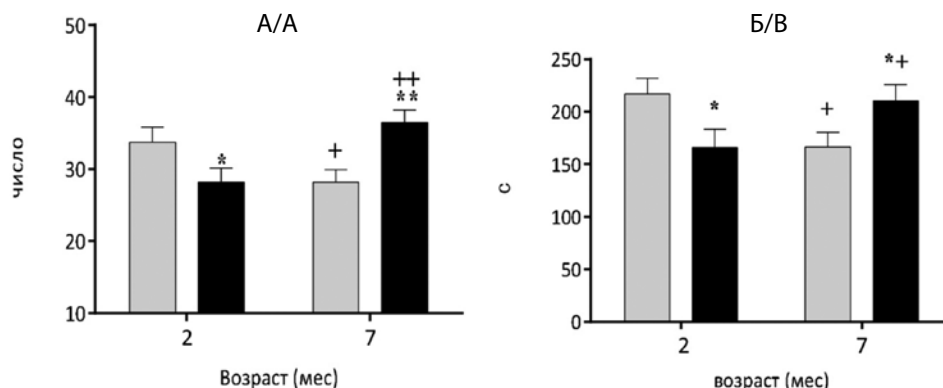
**Рис. 1.** Число (А) и длительность (с) (Б) свешиваний с открытых рукавов, число эпизодов (В) и длительность (с) (Г) груминга в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у крыс с неонатальным введением физиологического раствора (серые столбики) и дипротина А (черные столбики) в возрасте 2 и 7 мес. Медиана обозначена жирной чертой, границы столбика – Q1, Q3 (первый и третий квартили), разброс – минимальные и максимальные значения.

# $p < 0.01 < p_{кр}$ ; ## $p < 0.001 < p_{кр}$ ;  $p_{кр} < + p < 0.05$  по сравнению со значением в той же группе крыс в возрасте 2 мес; \*\* $p < 0.01 < p_{кр}$  по сравнению со значением в контрольной группе крыс в возрасте 2 мес (по двустороннему критерию Манна-Уитни с поправкой на множественность сравнений методом FDR-контроля);  $p_{кр} = 0.0125$  (здесь и далее).

**Fig. 1.** The number (A) and duration (s) (B) of head dipping in the open arms, the number of episodes (C) and duration (s) (D) of grooming in the “Elevated Plus Maze” test in rats with neonatal administration of saline (gray bars) and diprotin A (black bars) at the age of 2 and 7 months. A bold line indicates the median, the boundaries of the columns are Q1, Q3 (the first and third quartiles), the spread is the minimum and maximum values. # $p < 0.01 < p_{cr}$ ; ## $p < 0.001 < p_{cr}$ ;  $p_{cr} < + p < 0.05$  in comparison with the rats at the age of 2 months in the same group; \*\* $p < 0.01 < p_{cr}$  in comparison with the rats at the age of 2 months in the control group (two-tailed Mann-Whitney  $U$ -test with correction for multiple comparisons using the FDR control technique);  $p_{cr} = 0.0125$  (here and further).

опытной группы не было статистически значимых изменений в величине показателей свешиваний с ОР. По аналогии с интерпретацией изменения этих показателей у крыс контрольной группы результаты косвенно

свидетельствуют об отсутствии повышения уровня тревожности у взрослых крыс опытной группы. Следует отметить, что после неонатального введения дипротина А у крыс в возрасте 2 мес было обнаружено сниже-



**Рис. 2.** Показатели неагрессивного взаимодействия в тесте социальных контактов у крыс, подвергнутых неонатальному действию дипротина А (черный цвет) и контрольных животных, которым вводили физиологический раствор (серый цвет).

А – число неагрессивных контактов; Б – длительность неагрессивных контактов.

Число пар крыс в возрасте 2 мес и 7 мес составило в контрольной группе 14 и 16, соответственно; в опытной группе – 14 и 15, соответственно. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  по сравнению со значением показателя в контрольной группе крыс того же возраста; + $p < 0.05$ ; ++ $p < 0.01$  по сравнению со значением показателя в той же группе на предыдущем сроке тестирования (по Fisher LSD-тесту после Two Way ANOVA).

**Fig. 2.** Indicators of non-aggressive interaction in the social contact test in rats neonatally exposed to diprotin A (black) and control animals exposed to saline (gray).

A – The number of non-aggressive contacts; B – The duration of non-aggressive contacts.

The number of pairs of rats at the age of 2 and 7 months was 14 and 16 for the control group, respectively, and 14 and 15 for the experimental group, respectively.

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  in comparison with the control rats of the same age; + $p < 0.05$ ; ++ $p < 0.01$  in comparison with the rats of the previous age in the same group (Two Way ANOVA followed by the Fisher LSD *post hoc* test).

Таблица 4 / Table 4

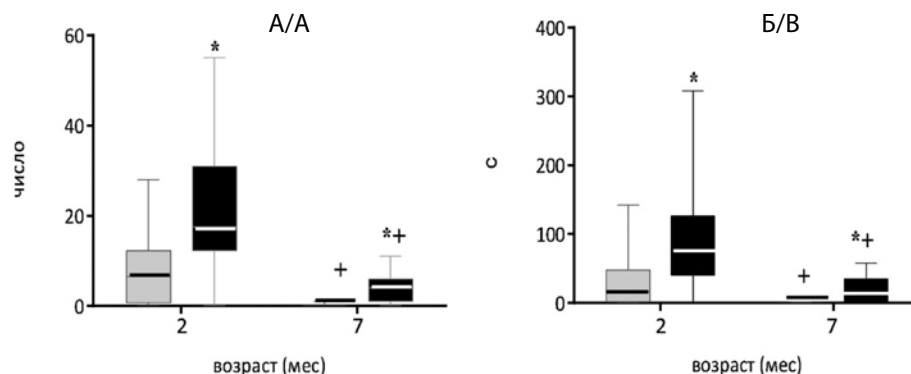
**Показатели поведения в тесте принудительного плавания у крыс, получавших неонатально ингибитор ДПП-IV дипротин А или физиологический раствор**

**Behavior indices in the forced swimming test in rats treated neonatally with the DPP-IV inhibitor diprotin A or saline solution**

Показатели	Группы			
	2 мес		7 мес	
	физиологический раствор (n = 30)	дипротин А (n = 33)	физиологический раствор (n = 29)	дипротин А (n = 31)
Длительность активного плавания, с	77.1 ± 50.4	75.9 ± 46.0	110.2 ± 49.5	94.6 ± 45.0
Длительность пассивного плавания, с	505.6 ± 61.6	519.2 ± 52.1	484.9 ± 51.2	494.7 ± 41.4
Длительность иммобильности, с	0,0 [0,0;5,0]	4,0 [0,0; 10,0]	2,0 [0,0; 6,0]	5,5 [0,0; 15,0]
Число периодов активного плавания	6.5 [5,0; 12,0]	7,0 [5,0; 10,0]	7,0 [5,0; 8,0]	6,0 [4,0; 8,0]
Число периодов иммобильности (до 6 с)	3.5 [3,0; 4,0]	5,0 [3,0; 14,0]	4,0 [2,0; 5,0]	5,0 [4,0; 11,0]#
Индекс депрессивности	0.5 [0,3; 0,6]	0.75 [0,4; 2,0]+	0.4 [0,2; 0,5]	1.2 [0,6; 2,0]**

**Примечание.** \*\* $p < 0.01 < p_{кр}; p_{кр} < p < 0.05$ ; + $p = 0.078$  по сравнению со значением показателя в контрольной группе крыс на том же сроке наблюдения (по непарному непараметрическому критерию Манна-Уитни с поправкой на множественность сравнений методом FDR-контроля); n – число животных в группе.

**Note.** \*\* $p < 0.01 < p_{cr}; p_{cr} < #p < 0.05$ ; + $p = 0.078$  in comparison with the rats of the same age in the control group (two-tailed Mann-Whitney *U*-test with correction for multiple comparisons using the FDR control technique); n – number of animals in the group.



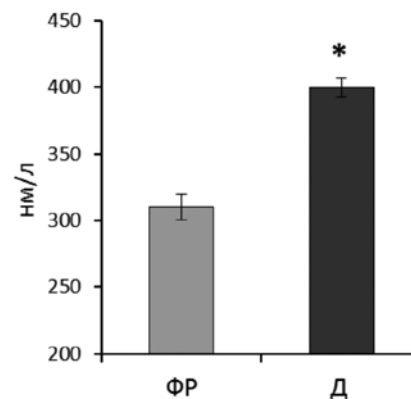
**Рис. 3.** Показатели агрессивного взаимодействия в тесте социальных контактов у крыс, подвергнутых действию дипротина А (черный цвет) в период с 5-го по 18-й постнатальные дни, и контрольных животных, которым вводили физиологический раствор (серый цвет). Остальные обозначения как на рис. 1.

А – число агрессивных контактов; Б – длительность агрессивных контактов. Число пар крыс в группах указано в подписи к рис. 2. \* $p < 0.001 < p_{кр}$  по сравнению со значением показателя в контрольной группе того же возраста; + $p < 0.001 < p_{кр}$  по сравнению со значением показателя в той же группе на предыдущем сроке тестирования (по двустороннему U-критерию Манна-Уитни с поправкой на множественность сравнений методом FDR-контроля).

**Fig. 3.** Indicators of aggressive interaction in the social contact test in rats exposed to diprotin A (black) at 5 to 18 postnatal days and in the control animals exposed to saline (gray). The other designations as in Fig. 1. А – The number of aggressive contacts; B – The duration of aggressive contacts. The number of pairs of rats in groups is indicated in the caption to Fig. 2. \* $p < 0.001 < p_{cr}$  in comparison with the rats of the same age in the control group; + $p < 0.001 < p_{cr}$  in comparison with the rats of the previous age in the same group (two-tailed Mann-Whitney U-test with correction for multiple comparisons using the FDR control technique).

ние выраженности груминга, и, в отличие от контрольных животных, не было выявлено его снижения в возрасте 7 мес. Интерпретация этологического показателя аутогруминга противоречива, однако многие исследователи разделяют представления о том, что этот тип поведения проявляется у грызунов в ситуациях, связанных со стрессом и конфликтом и не связан с уровнем тревожности [см. обзор 31]. Если исходить из этих представлений, то можно полагать, что снижение груминга у крыс опытной группы отражает их меньшую реактивность в стрессогенной ситуации, то есть свидетельствует об устойчивости к стрессу. У крыс опытной группы в ПКЛ было выявлено возрастание скорости перемещения, величины пробега, числа и длительности стоек, что, в совокупности с данными об отсутствии у них снижения с возрастом числа и длительности свешиваний с ОР, можно рассматривать как признаки формирования и длительного сохранения гиперактивного фенотипа после неонатального действия дипротина А. В пользу этой гипотезы свидетельствуют результаты, полученные в тесте социального взаимодействия, – увеличение числа и длительности неагрессивных социальных контактов в возрасте 7 мес у крыс опытной группы.

Результаты настоящего исследования хорошо согласуются с результатами работ, выполненных на грызунах с модификациями гена, кодирующего ДПП-IV. У крыс F344 со спонтанной мутацией гена *dpp4*, при-



**Рис. 4.** Уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс в возрасте 7.5 мес, которым вводили дипротин А (Д, 2 мг/кг) с 5-го по 18-й постнатальные дни, и контрольных животных, которым по той же схеме вводили физиологический раствор (ФР). \* $p < 0.05$  по сравнению со значением показателя в группе ФР (по двустороннему U-критерию Манна-Уитни).

**Fig. 4.** Blood serum corticosterone concentration in rats aged 7.5 months who were neonatally exposed to diprotin A (Д, 2 mg/kg) at 5 to 18 postnatal days, and control animals exposed to saline (ФР) according to the same scheme. \* $p < 0.05$  in comparison with the ФР group (two-tailed Mann-Whitney U-test).

водящей к почти полной потере ферментативной активности ДПП-IV, формируется стрессоустойчивый поведенческий фенотип, проявляющийся в снижении

уровня тревожности в ПКЛ, усилении исследовательской активности, увеличении продолжительности социального взаимодействия, а также в ряде других поведенческих и физиологических процессов [32-34]. Двигательная и исследовательская гиперактивность, то есть, повышенная поведенческая активация в условиях новизны выявлена у мышей с генотипом CD26-/- [35]. Авторы полагают, что подобные эффекты опосредуются через изменение взаимодействия белков-субстратов ДПП-IV (в первую очередь, нейропептида Y) с разными типами рецепторов в структурах мозга, отвечающих за реализацию стресс-реакции.

В нашей работе, наряду с признаками гиперактивности, у крыс с неонатальным действием дипротина А отмечены эмоционально-мотивационные нарушения, выявляемые в виде повышенной агрессивности в тесте социального взаимодействия и симптомов депрессивно-подобного поведения в тесте принудительного плавания.

Результаты экспериментальных исследований, свидетельствующие о вовлечении ДПП-IV в депрессивно-подобное поведение, противоречивы. Мыши, мутантные по гену CD26-/-, демонстрировали признаки снижения депрессивности по увеличению длительности пассивного плавания в тестах принудительного плавания и подвешивания за хвост [35]. Однако у крыс линии F344 с генетически сниженным уровнем функциональной активности ДПП-IV такого эффекта не наблюдали [32]. В нашем исследовании депрессивно-подобное поведение выявлялось только по биоритмологическим показателям плавания. Отсутствие изменений по таким общепринятым показателям, как длительность пассивного и активного плавания в этом тесте ставит под сомнение влияние неонатального действия дипротина А на депрессивную симптоматику на поздних сроках наблюдения. Напротив, повышение агрессивности, наблюдаемое у крыс опытной группы в возрасте как 2, так и 7 мес, можно отнести к устойчивым эффектам дипротина А на представленной модели эмоционально-мотивационных нарушений.

В научной литературе единичны исследования возможного участия ДПП-IV в реализации агрессивного поведения, однако есть работы, в которых показана прямая взаимосвязь между активностью ДПП-IV в сыворотке крови и агрессивностью у детей [36], работы, в которых приводятся доказательства вовлеченности субстратов ДПП-IV (в частности, нейропептида Y) в запуск и реализацию агрессии [37]. Имеются также данные о том, что отклоняющееся от нормы функционирование ГГА-оси часто сопровождается аномальной агрессивностью, а низкая или высокая реактив-

ность ГГА-оси в период развития связана с появлением агрессивных фенотипов [см. обзор 38].

Недавние исследования на животных показывают, что ДПП-IV функционирует как модулятор активности ГГА-оси и реакции на стресс [34, 39]. Возможно, действие ингибитора ДПП-IV в раннем постнатальном периоде повлияло на состояние ГГА-оси и изменило стресс-реактивность крыс.

### Заключение

Данные настоящего исследования свидетельствуют о развитии гиперактивного фенотипа и длительных психоэмоциональных нарушений в виде повышенной агрессивности наряду с длительной активацией ГГА-оси у взрослых крыс, подвергнутых действию дипротина А в ПНД 5–18. На основании полученных результатов можно высказать предположение о существовании патогенетической взаимосвязи между индуцированными неонатальным действием ингибитора ДПП-IV нарушениями поведения и состоянием ГГА-оси. Данные подтверждают развиваемые нами представления об участии дипептидилпептидазы-IV в генезе психоэмоциональных расстройств.

### Литература

#### (п.п. 1-14; 17-18; 20-25; 27-39 см. References)

15. Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А., Кушнарева Е.Ю. Уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс при экспериментальном моделировании депрессивно-подобных состояний. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 4: 3-9.
16. Хлебникова Н.Н., Крупина Н.А. Экспериментальное тревожно-депрессивное состояние у крыс, вызванное неонатальным действием ингибитора дипептидилпептидазы-IV дипротина А: эффекты имипрамина. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(4): 4-12.
19. Крупина Н.А., Кушнарева Е.Ю., Хлебникова Н.Н., Золотов Н.Н., Крыжановский Г.Н. Экспериментальная модель тревожно-депрессивного состояния у крыс, вызванная введением ингибитора дипептидилпептидазы IV метионил-2(S)-цианопирролидина в раннем постнатальном периоде. *Журнал высшей нервной деятельности имени И.П. Павлова*. 2009; 59(3): 360-72.
26. Шетинин Е.В., Батурин В.А., Арушанян Э.Б., Ованесов К.Б., Попов А.В. Биоритмологический подход к оценке принудительного плавания как экспериментальной модели «депрессивного» состояния. *Журнал высшей нервной деятельности имени И.П. Павлова*. 1989; 39(5): 958-64.

### References

1. Ropa J., Broxmeyer H.E. An expanded role for dipeptidyl peptidase 4 in cell regulation. *Curr Opin Hematol*. 2020; 27(4): 215-24.
2. Garcia-Gil M., Camici M., Allegrini S., Pesi R., Tozzi M.G. Metabolic Aspects of Adenosine Functions in the Brain. *Front Pharmacol*. 2021; 12: 672182.
3. Rodrigues-Amorim D., Rivera-Baltanás T., Fernández-Palleiro P., Iglesias-Martínez-Almeida M., Freiria-Martínez L., Jarmardo-Ro-

- driguez C., et al. Changes in the brain extracellular matrix composition in schizophrenia: a pathophysiological dysregulation and a potential therapeutic target. *Cell Mol Neurobiol.* 2021; Mar 12. <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01073-8> Online ahead of print.
4. Zhong J., Rao X., Rajagopalan S. An emerging role of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) beyond glucose control: potential implications in cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2013; 226(2): 305-14.
  5. Maremanda K.P., Sundar I.K., Li D., Rahman I. Age-Dependent assessment of genes involved in cellular senescence, telomere, and mitochondrial pathways in human lung tissue of smokers, COPD, and IPF: Associations With SARS-CoV-2 COVID-19 ACE2-TMPRSS2-Furin-DPP4 Axis. *Front Pharmacol.* 2020; 11:584637.
  6. Golub Y., Stonawski V., Plank A.C., Eichler A., Kratz O., Waltes R., et al. Anxiety is associated with DPPIV alterations in children with selective mutism and social anxiety disorder: A Pilot Study. *Front Psychiatry.* 2021 Jun 29; 12: 644553.
  7. Wagner L., Klemann C., Stephan M., von Hörsten S. Unravelling the immunological roles of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) activity and/or structure homologue (DASH) proteins. *Clin Exp Immunol.* 2016; 184: 265–83.
  8. Ahrén B. Glucose-lowering action through targeting islet dysfunction in type 2 diabetes: Focus on dipeptidyl peptidase-4 inhibition. *J Diabetes Investig.* 2021; 12(7): 1128-135.
  9. Sakurada C. Development of a new analgesic based on metabolism of endomorphin, an endogenous opioid peptide. *YAKUGAKU ZASSHI.* 2004; 124(8): 549-54. (In Japanese)
  10. Subrahmanyam N.A., Koshy R.M., Jacob K., Pappachan J.M. Efficacy and Cardiovascular Safety of DPP-4 Inhibitors. *Curr Drug Saf.* 2021; 16(2): 154-64.
  11. Krupina N.A., Kushnareva E.Yu., Khlebnikova N.N., Zolotov N.N., Kryzhanovskii G.N. Behavioral changes in rats induced by a dipeptidyl peptidase IV inhibitor methionyl-2(s)-cyanopyrrolidine: experimental model of anxiety-depression disorder. *Bull Exp Biol Med.* 2009; 147(3): 285-90.
  12. Krupina N.A., Khlebnikova N.N. Neonatal exposure to the dipeptidyl peptidase-iv inhibitors diprotin A and sitagliptin induces depression-like behavior, anxiety, and latent aggression in adolescent and adult rats. *J Behav Brain Sci.* 2016; 6(4):167-83. Pub. Date: April 15, 2016.
  13. Stetler C., Miller G.E. Depression and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Activation: A Quantitative Summary of Four Decades of Research. *Psychosom. Med.* 2011; 73: 114–26.
  14. Nishi M., Horii-Hayashi N., Sasagawa T. Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Front. Neurosci.* 2014 Jun 17; 8: 166.
  15. Khlebnikova N.N., Krupina N.A., Kushnareva E.Y. Blood serum corticosterone level in modeling depression-like states in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2013; (4): 3-9. (In Russian)
  16. Khlebnikova N.N., Krupina N.A. Experimental anxiety-depressive state in rats caused by neonatal exposure to the inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, diprotin A: effects of imipramine. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2017; 61 (4): 4-12. (In Russian)
  17. Ptak C., Petronis A. Epigenetic approaches to psychiatric disorders. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2010; 12(1): 25–35.
  18. Zubkov E.A., Zorkina Y.A., Orshanskaya E.V., Khlebnikova N.N., Krupina N.A., Chekhonin V.P. Changes in gene expression profiles in adult rat brain after neonatal action of dipeptidyl peptidase-IV inhibitors. *Neuropsychobiology.* 2017; 76(2): 89–99.
  19. Krupina N.A., Kushnareva E.Yu., Khlebnikova N.N., Zolotov N.N., Kryzhanovskii G.N. Experimental model of anxiety-depression state in rats exposed to inhibitor of dipeptidyl peptidase IV methionyl-2(S)-cyano-pyrrolidine in early postnatal period. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatelnosti imeni I.P. Pavlova.* 2009; 59(3): 360-72. (In Russian)
  20. Calabrese E.J. An assessment of anxiolytic drug screening tests: hormetic dose responses predominate. *Crit Rev Toxicol.* 2008; 38(6): 489-542.
  21. Belzung C., Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res.* 2001; 125(1-2): 141–49.
  22. Millan M.J. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol.* 2003; 70(2): 83–244.
  23. Pellow Sh., Chopin Ph., File S.E., Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Neuroscience Meth.* 1985; 14(3): 149-67.
  24. Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 1978; 47(4): 379-91.
  25. Overstreet D.H., Pucilowski O., Rezvani A.H., Janowsky D.S. Administration of antidepressants, diazepam and psychomotor stimulants further confirms the utility of Flinders Sensitive Line rats as an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl).* 1995; 121(1): 27-37.
  26. Shchetinin E.V., Baturin V.A., Arushanian E.B., Ovanesov K.B., Popov A.V. A biorhythmic approach to evaluating forced swimming as an experimental model of a “depressive” state. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatelnosti imeni I.P. Pavlova.* 1989; 39(5): 958-64. (In Russian)
  27. Niesink R.J.M., van Ree J.M. Involvement of opioid and dopaminergic systems in isolation-induced pinning and social grooming of young rats. *Neuropharmacology.* 1989; 28(4): 411–18.
  28. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B.* 1995; 57: 289-300.
  29. De Jesús-Burgos M., Torres-Llenza V., Pérez-Acevedo N.L. Activation of amygdalar metabotropic glutamate receptors modulates anxiety, and risk assessment behaviors in ovariectomized estradiol-treated female rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012; 101(3): 369–78.
  30. O’Leary, T.P., Gunn, R.K., Brown, R.E. What are we measuring when we test strain differences in anxiety in mice? *Behav. Genet.* 2013; 43: 34-50.
  31. Ennaceur A. Tests of unconditioned anxiety – Pitfalls and disappointments. *Physiol Behav.* 2014; 135: 55–71.
  32. Karl T., Hoffmann T., Pabst R., von Horsten S. Extreme reduction of dipeptidyl peptidase IV activity in F344 rat substrains is associated with various behavioral differences. *Physiol Behav.* 2003; 80: 123–34.
  33. Frerker N., Raber K., Bode F., Skripuletz T., Nave H., Klemann C., et al. Phenotyping of congenic dipeptidyl peptidase 4 (DP4) deficient Dark Agouti (DA) rats suggests involvement of DP4 in neuro-, endocrine, and immune functions. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47(3): 275-87.
  34. Canneva F., Golub Y., Distler J., Dobner J., Meyer S., von Hörsten S. DPP4-deficient congenic rats display blunted stress, improved fear extinction and increased central NPY. *Psychoneuroendocrinology.* 2015; 53: 195-206.
  35. El Yacoubi M., Vaugeois J.M., Marguet D., Sauze N., Guieu R., Costentin J., et al. Behavioral characterization of CD26 deficient

- mice in animal tests of anxiety and antidepressant-like activity. *Behav Brain Res.* 2006; 171(2): 279-85.
36. Frenssen F., Croonenberghs J., Van den Steene H., Maes M. Prolyl endopeptidase and dipeptidyl peptidase IV are associated with externalizing and aggressive behaviors in normal and autistic adolescents. *Life Sci.* 2015; 136: 157-62.
37. Karl T., Herzog H. Behavioral profiling of NPY in aggression and neuropsychiatric diseases. *Peptides.* 2007; 28(2): 326-33.
38. Walker S.E., Papilloud A., Huzard D., Sandi C. The link between aberrant hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity during development and the emergence of aggression-Animal studies. *Neurosci Biobehav. Rev.* 2018; 91: 138-52.
39. Golub Y., Schildbach E.M., Touma C., Kratz O., Moll G.H., von Hörsten S., Canneva F. Role of hypothalamus-pituitary-adrenal axis modulation in the stress-resilient phenotype of DPP4-deficient rats. *Behav Brain Res.* 2019; 356: 243-49.

**Сведения об авторах:**

**Хлебникова Надежда Николаевна**, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: nanich@yandex.ru;

**Крупина Наталья Александровна**, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы;

**Ширенова Софья Дмитриевна**, аспирант, мл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы.



© Коллектив авторов, 2021

УДК 616.71-001.5-007.234-089.819.843-092.9

Плехова Н.Г.<sup>1,2</sup>, Зиновьев С.В.<sup>1</sup>, Радьков И.В.<sup>1</sup>, Шуматов В.Б.<sup>1</sup>

## Поведенческая реакция крыс и хромофилия эритроцитов при экспериментальной черепно-мозговой травме

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России,

690002, Владивосток, Россия, пр. Острякова, д. 2;

<sup>2</sup>Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук,

690022, Владивосток, Россия, пр. 100-летия Владивостока, д. 159

**Введение.** Патогенетические основы изменения микроциркуляции крови в головном мозге вследствие черепно-мозговой травмы (ЧМТ) изучены не в полной мере по причине высокой инвазивности нейроморфологических методов. **Цель исследования** – изучение поведенческого статуса и информативности цитохимических критериев хромофилии эритроцитов в качестве маркеров вазореактивности микрососудов головного мозга при черепно-мозговой травме у крыс.

**Методика.** Объектом исследования являлись 3-месячные аутбредные крысы Wistar массой 250-270 г. Легкую и средней тяжести ЧМТ воспроизводили с применением модифицированной модели падающего груза для взрослых крыс. Через 2 ч, 1, 2, 8 и 14 сут после моделирования ЧМТ проводили неврологическое обследование животных по модифицированной шкале Neurological Severity Scores (mNSS), сенсомоторное – по степени тревожности в тесте «свет–темнота», поведение анализировали с использованием теста условной реакции пассивного избегания. С помощью хромофинной реакции исследовали функциональное состояние эритроцитов. Срезы тканей головного мозга, окрашивали по Ниссли и гематоксилин–эозином, микроскопировали, проводили морфометрию цифровых изображений.

**Результаты.** Неврологическое обследование при среднетяжелой ЧМТ показало очаговую симптоматику, соответствующую выраженным неврологическим расстройствам, тогда как после ЧМТ легкой степени у крыс отмечались незначительные нарушения координации. В тесте условной реакции пассивного избегания на 7-е сут у этих животных выявлено состояние повышенной тревожности. Морфометрический анализ препаратов головного мозга травмированных животных показал уменьшение диаметра просвета капилляров и выявил признаки гипоксии нейронов. Цитохимическая оценка эритроцитов, с привлечением количественного определения степени флуоресценции, выявила особенности окислительного метаболизма в клетках у травмированных крыс. Эти показатели коррелировали с морфологическими признаками гипоксии головного мозга.

**Заключение.** В начальный посттравматический период отмечено уменьшение диаметра просвета капилляров нервной ткани, наличие морфологических признаков компенсации нейронов, что является локальной ответной реакцией клеток на ишемию головного мозга. В капиллярах определяется нарушение гемореологии, что является следствием изменения окислительно-восстановительных процессов вследствие гипоксии при внутричерепной травме.

**Ключевые слова:** черепно-мозговая травма; поведенческий статус; эритроциты; хромофинная реакция

**Для цитирования:** Плехова Н.Г., Зиновьев С.В., Радьков И.В., Шуматов В.Б. Поведенческая реакция крыс и хромофилия эритроцитов при экспериментальной черепно-мозговой травме. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): 17-25.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.17-25

**Для корреспонденции:** Плехова Наталья Геннадьевна, e-mail: pl\_nat@hotmail.com

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Плехова Н.Г., Шуматов В.Б.; сбор и обработка материала – Радьков И.В., Зиновьев С.В.; подготовка иллюстративного материала – Плехова Н.Г., Зиновьев С.В., Радьков И.В.; статистическая обработка – Зиновьев С.В., Радьков И.В.; написание и редактирование текста – Плехова Н.Г., Зиновьев С.В.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке по программе внутривузовских грантов ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.01.2021

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021

Plekhnova N.G.<sup>1,2</sup>, Zinoviev S.V.<sup>1</sup>, Radkov I.V.<sup>1</sup>, Shumatov V.B.<sup>1</sup>**Behavioral response and erythrocyte chromophilia of rats in experimental traumatic brain injury**<sup>1</sup>Pacific State Medical University,

Prospekt Ostryakova 2, Vladivostok 690002, Russian Federation;

<sup>2</sup>Institute of Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences,

Prospekt 100-Itiya Vladivostoka 159, Vladivostok 690022, Russian Federation

The pathogenetic basis of changes in blood microcirculation in the brain due to traumatic brain injury (TBI) has not been fully studied due to the highly invasive nature of neuromorphological methods. **Aim:** To study the behavioral status and informative value of cytochemical criteria for erythrocyte chromophilia as markers of cerebral microvessel vasoreactivity in rats with TBI.

**Methods.** The study was conducted on 3-month-old Wistar albino, outbred rats weighing 250-270 g. Mild to moderate TBI was simulated using a modified falling weight model for adult rats. At 2 hrs, 1, 2, 8, and 14 days after TBI, a neurological examination was performed according to the modified Neurological Severity Score (mNSS) modified scale and a sensorimotor examination was performed according to the degree of anxiety in the light-dark test. Behavior was analyzed using the conditioned passive avoidance response test. The functional state of erythrocytes was studied using the chromaffin reaction. Brain tissue samples stained by Nissl and with hematoxylin–eosin were evaluated under a microscope, digital images were obtained, and morphometric processing was performed.

**Results.** Neurological examination after moderate TBI showed focal symptoms corresponding to severe neurological disorders, while after mild TBI, rats had minor coordination disorders. In the conditioned passive avoidance response test on the 7th day, the rats showed a state of increased anxiety. Morphometric analysis of the brains showed a decrease in the diameter of capillary lumen and changes in neurons, indicating signs of hypoxia. The cytochemical assessment of erythrocytes, involving a quantitative determination of the degree of fluorescence, revealed features of cell oxidative metabolism in injured rats. Moreover, these indicators correlated with morphological signs of hypoxia in brain neural tissue.

**Conclusion.** In the initial post-traumatic period, there was a decrease in the capillary lumen diameter of the brain neural tissue and the presence of morphological signs of neuronal compensation, which is a local response of cells to cerebral ischemia. Disorders of hemorheology were found. These changes were a consequence of altered redox processes due to hypoxia after intracranial injury.

**Keywords:** traumatic brain injury; behavioral status; erythrocytes; chromaffin reaction

**For citation:** Plekhova N.G., Zinoviev S.V., Radkov I.V., Shumatov V.B. Behavioral response and erythrocyte chromophilia of rats in experimental traumatic brain injury. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(4): 17-25. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.17-25

**For correspondence:** **Natalia G. Plekhova**, Doctor of Biological Sciences, Head of the Central Research Laboratory Pacific State Medical University, e-mail: pl\_nat@hotmail.com

**Contribution:** research concept and design – Plekhova N.G., Shumatov V.B.; collection and processing of material – Radkov I.V., Zinoviev S.V.; preparation of illustrative material – N.G. Plekhova, Zinoviev S.V., Radkov I.V.; statistical processing – S.V. Zinoviev, Radkov I.V.; text writing and editing – Plekhova N.G., Zinoviev S.V.

**Financing.** The work was supported by the program of intra-university grants of the Pacific State Medical University.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Information about the authors:**Plekhnova N.G., <https://orcid.org/0000-0002-8701-7213>Zinoviev S.V., <https://orcid.org/0000-0001-6022-6130>Radkov I.V., <https://orcid.org/0000-0002-4788-5489>

Received 27.01.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

**Введение**

По данным Всемирной организации здравоохранения, черепно-мозговая травма (ЧМТ) является основной причиной смертности молодых людей и согласно прогнозу к 2020 г. среди населения займёт третье место в ряду причин инвалидности [1]. В результате воздействия на голову сил ударного и/или трансляционного ускорения, а также сил ускорения/замедления по-

сле ЧМТ происходит повреждение тканей головного мозга (ГМ) и нарушение его кровообращения [2]. Показано, что посттравматические цереброваскулярные расстройства происходят при формировании циркуляторно-гипоксемической или венозной энцефалопатии с нарушением функционирования центральной нервной системы [3]. В дальнейшем, подобные дисфункции инициируют когнитивные расстройства, которые

рассматриваются в качестве независимого предиктора нарушений, характерных для посттравматического синдрома при ЧМТ. Причем, дисфункции нейронных связей приводят к изменениям в поведении, которые включают в себя исполнительные функции и нарушения памяти, сохранение страха и другие когнитивные изменения. Использование экспериментальных моделей воспроизведения ЧМТ позволяет патофизиологам изучать этиологию подобного состояния.

Патологические посттравматические изменения микроциркуляции крови в ГМ вследствие ЧМТ изучены не в полной мере по причине высокой инвазивности нейроморфологических методов.

Циркуляторная гипоксия после ЧМТ характеризуется изменением окислительно-восстановительных процессов в клетках, поэтому как один из вариантов косвенной оценки функционального состояния микрососудистой сети можно рассматривать исследование эритроцитов периферической крови [4]. Известен классический метод диагностики мегалобластной анемии — реакция Кассу, где используется окраска эритроидных клеток антрахиноновым красителем ализаринным красным С (АКС,  $C_{14}H_7NaO_7S$ ), который является кислотнo-основным индикатором ряда оксиантрахинонов. Указывается, что окраска АКС клеток крови с добавлением бихроматов даёт более объективную оценку количественных особенностей окисления биогенных аминов в эритроцитах, при этом изменение метаболизма эритроцитов сопровождается патологические изменения головного мозга [5]. Таким образом, определенный интерес представляет изучение хромофилии эритроцитов в патогенезе ЧМТ, которая сопровождается нарушением микроциркуляции и возникновением гипоксии головного мозга.

Цель исследования — изучение поведенческого статуса и информативности цитохимических критериев функционального состояния эритроцитов в качестве маркеров вазореактивности микрососудов головного мозга при черепно-мозговой травме у крыс.

### Методика

Эксперимент проводили на половозрелых крысах-самцах Wistar, (200-250 гр) в соответствии с положениями Хельсинкской декларации и рекомендациями Директивы Европейского сообщества (86/609 Г.С), дизайн исследования одобрен междисциплинарным этическим комитетом ФГБОУ ВО ТГМУ (Протокол № 3 от 20.09.2017). Животные были распределены на 4 группы: 1-я — контрольная, интактные животные ( $n=10$ ); 2-я — животные с моделированием ЧМТ легкой степени ( $n=30$ ) и среднетяжелой ( $n=30$ ). Все по-

тенциально болезненные вмешательства в проводимых экспериментах, а также эвтаназия осуществлялись под комбинированным инъекционным наркозом: золетил 0,003 мг/гр («Virbac» Франция), ксиланит 0,008 мг/гр (ЗАО «НИТА-ФАРМ», Россия, г. Саратов), раствор атропина сульфат 0,1% — 0.01 мл на 100 г.

Для воспроизведения ЛЧМТ использовали модифицированную модель падающего груза «weight-drop model» Muchasiuk и соавт., адаптированную для взрослых крыс<sup>1</sup> [6, 7]. Для нанесения травмы применяли установку, включающую штатив с направляющей падение груза (масса 200 г, высота конуса 1 см, площадь бойка 3,14 мм<sup>2</sup>) трубкой, который падает с высоты 1 м на затылочную область головы животного. Для исключения сопротивления от твердой поверхности использовали контейнер, внизу которого был помещен мягкий материал, а его верхняя часть покрыта фольгой, выдерживающий массу крысы в состоянии покоя, но разрывающийся при нанесении удара по голове. Ускорение и падение, вызванное ударом, включало горизонтальное вращение тела животного на 180°. С целью воспроизведения средней степени или среднетяжелой ЧМТ (СЧМТ) из описанной выше модели был исключён элемент падения животного в резервуар после удара. Травма наносилась по голове нефиксированного животного, свободно лежащего на поверхности при которой допускалось отклонение головы в сторону после удара.

Проводили неврологическое и сенсомоторное обследование, изучали тревожность в тесте «свет—темнота» и способность к обучению при формировании условной реакции пассивного избегания (УРПИ) животных через 2 ч, 1, 2, 8 и 14 сут после моделирования ЧМТ. После выхода из наркоза неврологический статус животных оценивался по шкале mNSS (Modified Neurological Severity Scores), которая включала тесты на выявление расстройств двигательной активности (мышечный статус и неестественные движения), чувствительной сферы (зрительной, тактильной и проприоцептивной), рефлексов и координации движений. Оценка проводилась по балльной системе от 0 до 10 в модификации для крыс [8]. Исследование тревожности проводили в тесте «свет—темнота», используя систему мониторинга активности (TSE, «PhenoMaster», США). Фиксировали латентный период первого захода в темный отсек, время нахождения животного в светлом и темном отсеках, а также количество переходов между отсеками. При оценке УРПИ регистрировался латентный период первичного захо-

<sup>1</sup>Патент Ru 2725287 2020.

да в темный отсек, после чего он закрывался и на дно его подавалось 12 ударов тока (50Гц, 1,5 мА, 1 с) с интервалами в 5 с, затем крысу возвращали в «жилую» клетку. Через 3 ч после обучения животное обследовалось повторно с регистрацией времени повторного захода в темный отсек, если таковой имел место. Подсчет анализируемых показателей осуществляли в течение 5 мин после адаптации животных к условиям эксперимента. Через 1 и 14 сут после травмы исследовали уровень тревожности в приподнятом крестообразном лабиринте (PhenoMaster, США) [9]. Время тестирования составило 3 мин; регистрируемые показатели: время пребывания в закрытых, открытых рукавах и на центральной площадке, количество заходов в них и свешиваний с рукава. Видеофиксация проводилась в режиме реального времени с использованием цифровой видеосистемы EthoVision® XT (США).

Цитохимическое исследование эритроцитов проводили с помощью хромаффинной реакции<sup>2</sup> с использованием ализарина красного S (АКС).

Мазки крови животных, окрашивали 5 % раствором АКС (Sigma-Aldrich, США) на основе 96<sup>0</sup> этилового спирта и водного раствора бихромата калия (БК, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, Sigma-Aldrich, США). Флуоресцентную микроскопию окрашенных препаратов изучали с помощью сканирующего конфокального микроскопа (Zeiss LSM 710, Германия) максимальная флуоресценция оценивалась в диапазоне длины волн 620–680 нм. В препарате изучали 300 клеток, после чего рассчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК) по формуле:

$$\text{СЦК} = \frac{1 \text{ балл} \times \text{N}_э + 2 \text{ балла} \times \text{N}_э + 3 \text{ балла} \times \text{N}_э + 4 \text{ балла} \times \text{N}_э + 5 \text{ баллов} \times \text{N}_э}{300}$$

где: N<sub>э</sub> – количество эритроцитов; 1 балл – эритроциты без свечения; 2 балла – гранулярная флуоресценция цитоплазмы (1–5 гранул); 3 балла – неполная гранулярная флуоресценция периферической части цитоплазмы; 4 балла – полная флуоресценция периферической части цитоплазмы с гранулярной зернистостью менее 0.5 мкм в диаметре; 5 баллов – полноценная гранулярная флуоресценция цитоплазмы эритроцитов с зернистостью более 0.5 мкм в диаметре.

Для гистологического исследования тканей головного мозга образцы фиксировали в 4% нейтральном формалине, готовили парафиновые срезы по классической технологии с последующим окрашиванием по Нисслю и гематоксилин–эозином. Препараты оценивали с помощью микроскопа СХ41, оснащен-

ного цифровой камерой (Olympus, Япония). Морфометрическую обработку изображений осуществляли с помощью программы NIS-Elements Imaging Software (Nikon, Япония), подсчитывали нейроны, распределяя на следующие группы: 1 – нормохромные; 2 – гипохромные; 3 – гиперхромные.

Статистический анализ результатов проводили с помощью Statistica 6.0 (StatSoft, США). Все значения представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (M±m). Данные по группам проанализированы с помощью t-критерия Стьюдента (ненаправленного) и Ньюмана-Кейлса для множественных сравнений. Для корреляции признаков использовали линейный регрессионный анализ с вычислением критерия Пирсона. Различия считались статистически значимыми при p<0,05.

### Результаты исследования

При воспроизведении ЛЧМТ и СЧМТ у животных отсутствовали летальные исходы и существенные двигательные расстройства. При анализе физиологических параметров, включающих время выхода из наркоза и оценку неврологического статуса по шкале mNSS, установлено, что у животных через несколько минут после нанесения легкой ЧМТ (ЛЧМТ) показатели были статистически значимо (p=0.005) выше, чем у здоровых (рис. 1). Так, если здоровые животные после наркоза переворачивались на задние лапы через 77.8±8.8 с, то пробуждение после нанесения ЛЧМТ составляло 110.73±9.1 с, а при СЧМТ 151.8±12.7. Оценка состояния согласно шкале mNSS показала, что у крыс в первые часы динамики ЛЧМТ отмечались нарушения координации, без четких двигательных расстройств, при значении общего среднего балла 1.4±0.31, сравнимого с показателем для здоровых животных (1.4±0.3, p=0.005).

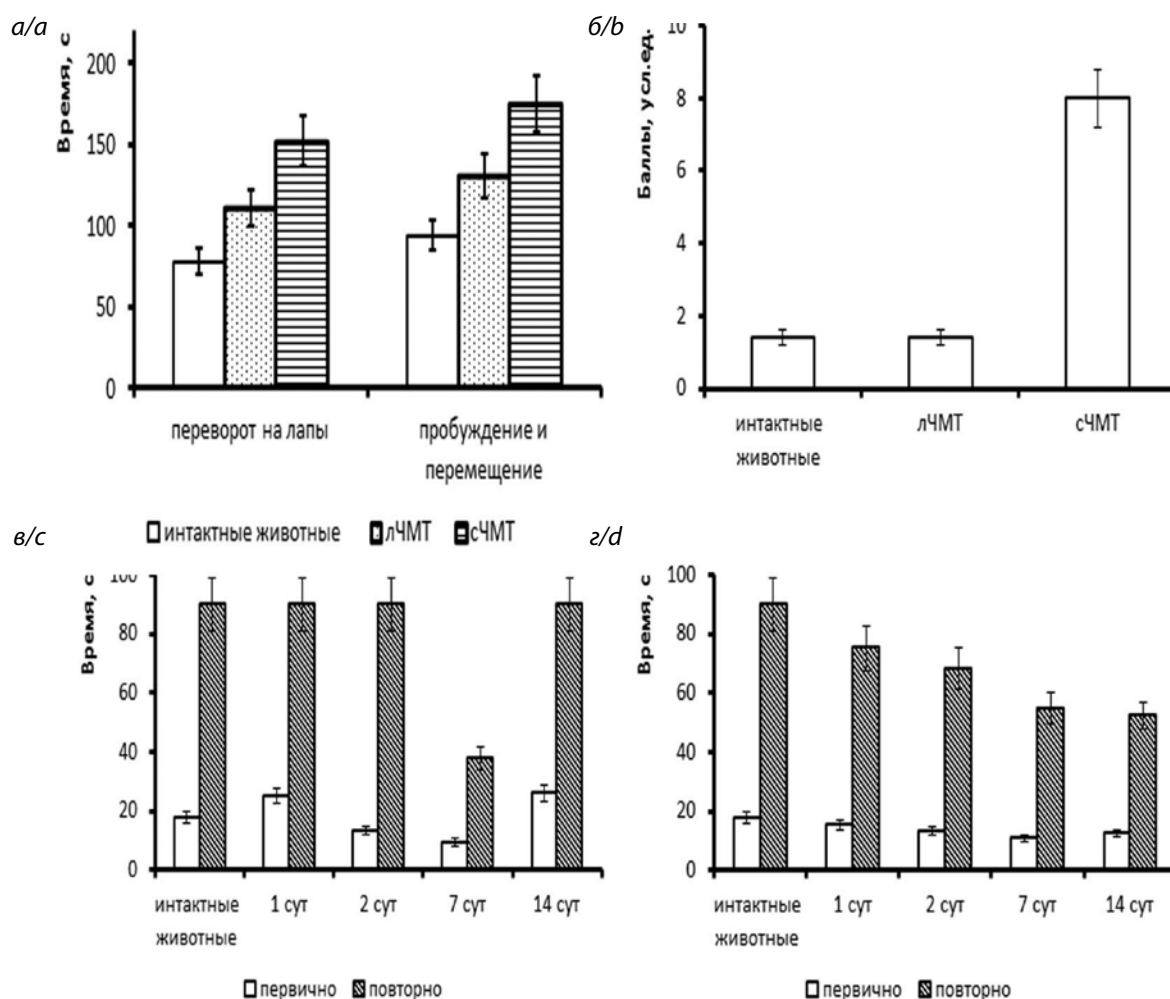
При изучении ситуативного поведения животных в тесте «черно-белая камера» определено, что время входа здоровых крыс в темную камеру составило 17.9±2.1 с, после обучения они не посещали темный отсек до 90 с и более, что было принято нами за норму для кратковременной памяти. После нанесения ЛЧМТ не было установлено различия с контролем между показателями латентного времени перехода в темный отсек (p=0.64) и количеством переходов между отсеками (p=0.14). Необходимо отметить, у крыс после ЛЧМТ, по сравнению со здоровыми (204.7±15.2 с), время нахождения в темном отсеке было более продолжительным (276.1±15.2 с, p=0.03), что указывало на повышенную тревожность. После ЛЧМТ у животных изменение показателей было за-

<sup>2</sup>Патент 2709212. Ru; 2019.

регистрировано на 7-е сут ( $p < 0.001$ ): среднее время захода в тёмную камеру при обучении составило  $9.38 \pm 0.9$  с, также было зарегистрировано угасание УРПИ, указывающее на нарушение кратковременной памяти. Среднее время повторного захода составило  $37.65 \pm 3.8$  с. У животных на 7-е сут после нанесения СЧМТ среднее время захода в тёмную камеру при обучении составило 11 с, а угасание УРПИ зарегистрировано у 4 из 5 животных, которые повторно заходили в тёмную камеру в среднем через  $54,86 \pm 5,6$  с (рис. 1). Общее среднее время повторного посещения тёмной камеры у животных с СЧМТ составило 65 с. При исследовании поведения животных в приподнятом крестообразном лабиринте определено нарастание уровня тревожности к 14-м сут после ЛЧМТ. Количество посещений открытых рукавов снизилось с 4 до 0, а закрытых рукавов повысилось с 8 до 13 на фоне повышения времени нахождения в них животных с  $101.2 \pm 11.3$  до  $167 \pm 14.3$  с.

В неокортексе через 1 сут после нанесения ЛЧМТ обнаружено сужение капилляров, значительное увеличение содержания гиперхромных нейронов и количества клеток с 2 ядрышками (таблица). Восстановление просвета капилляров с повышением

Восстановление просвета капилляров с повышением



**Рис. 1.** Неврологический и поведенческий статус животных при черепно-мозговой травме: а – показатели время выхода из наркоза (ось абсцисс, с); б – количество баллов по шкале mNSS (ось абсцисс, баллы, усл. ед.); в, г – время входа в темную камеру в тесте «черно-белая камера» животных после ЛЧМТ и СЧМТ соответственно (ось абсцисс, с).

**Fig. 1.** Neurological and behavioral status of animals with traumatic brain injury: а: time of recovery from anesthesia (abscissa, sec); б: mNSS scale score (abscissa, score in conventional units); в, г – time of entry into the dark chamber in the “black-and-white chamber” test after TBI, respectively (abscissa, sec).

ем количества гипохромных нейронов и увеличением диаметра ядрышек отмечалось к 7-м сут, тогда как к 14-м сут, напротив, обнаруживалось повышение содержания гиперхромных нейронов с 2 ядрышками. Снижение осмолярности цитоплазмы нейронов при изменении соотношения ионов калия морфологически проявляется гиперхромией. У травмированных животных увеличение количества гиперхромных нейронов и клеток с 2 ядрышками обнаружено к концу 2-й нед при высоком уровне тревожности животных (таблица).

В настоящем исследовании для выявления состояния окислительного метаболизма в эритроцитах применялся метод, основанный на свойстве амидных групп взаимодействовать с бихроматом калия (БК) и АКС. При длине волны спектра возбуждения 615 нм с помощью флуоресцентной. При микроскопии препаратов крови здоровых животных отмечалась незначительная флуоресценция эритроцитов (рис. 2, а, СЦК=2.735±0.064). На фоне стрессорной реакции организма отмечалась интенсивная хромаффинная реакция в эритроцитах травмированных животных через 2 ч после нанесения ЛЧМТ (3.383±0.144) и СЧМТ (3.853±0.214) (рис. 2, б, в). Затем показатели хромаффинной реакции эритроци-

тов снижались, и минимальное значение СЦК отмечалось через 2 сут при ЛЧМТ (1.1±0.033) и СЧМТ (1.918±0.12). В этот период преимущественно обнаруживались клетки с диффузной флуоресценцией цитоплазмы. Если принять во внимание, что в низкодифференцированных эритроидных клетках не определяется флуоресценция (рис. 2, г), а гранулярное свечение отмечается после энуклеации оксифильных нормоцитов, можно высказать предположение, что при гипоксии и развитии окислительного стресса после ЧМТ в периферической крови преобладают низкодифференцированные эритроциты. В таких условиях существенно изменяется способность эритроцитов к восстановлению Cr (VI), что отражает особенности их метаболизма. Корреляционный анализ показал статистически значимую связь между показателями морфометрического анализа и показателем СЦК хромаффинной реакции эритроцитов. Согласно шкале Чеддока сильная положительная связь определена между показателями диаметра сосудов головного мозга и СЦК. Коэффициент корреляции для показателей диаметра прекапилляров, капилляров, посткапилляров и СЦК хромофильной реакции эритроцитов составил 0.896, 0.984 и 0.993 соответственно (p<95%).

Таблица/Table

**Параметры морфометрического анализа неокортекса**

**Parameters of the neocortex morphometric analysis**

Показатель Parameters	Контроль Control	1 сут после ЛЧМТ 1 day after mTBI	8 сут после ЛЧМТ 8 day after mTBI	14 сут после ЛЧМТ 14 day after mTBI
Диаметр прекапилляров, мкм Precapillary diameter, μm	9.4±0.51	7.40±0.51*	7.8±0.4*	9.8±0.4*
Диаметр капилляров, мкм Capillary diameter μm	5.0±0.05	3.780±0.116*	4.2±0.07*	4.9±0.06
Диаметр посткапилляров, мкм Postcapillary diameter, μm	8.5±0.2	6.92±0.116*	7.5±0.2*	8.4±0.2
Количество гипохромных нейронов, % Number of hypochromic neurons, %	5.2±0.6	6.2±1.53*	19.0±4.5*	5.8±1.2
Количество гиперхромных нейронов, % Number of hyperchromic neurons, %	5.0±0.6	61.56±15.52*	22.9±6.7*	23.7±8.1*
Количество нормохромных нейронов, % Number of normochromic neurons, %	89.8±0.9	32.54±11.38*	58.1±9.7*	70.5±7.4
Размер ядрышек нейронов, мкм The size of the nucleoli of neurons, μm	0.5±0.03	0.68±0.05*	0.7±0.1*	0.6±0.03
Количество клеток с двумя ядрышками, % Number of cells with two nucleoli, %	4.5±1.7	7.5±1.2*	10.0±1.2*	10.0±2.2*

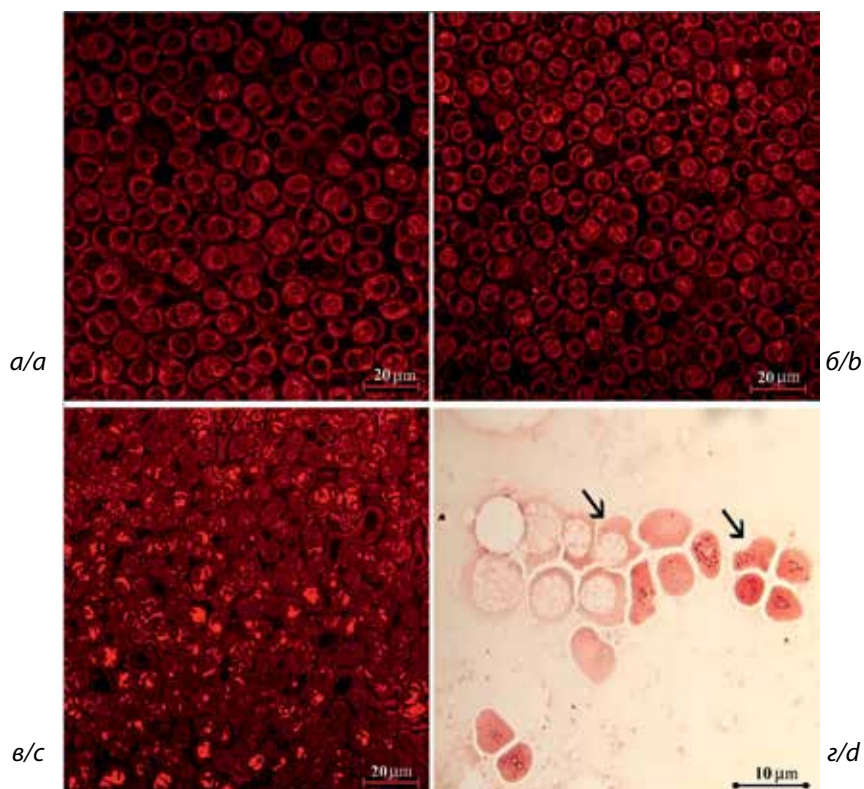
**Примечание.** \* – статистическая достоверность различия выборок животных (p<0,05).

**Note.** \* – statistical significance of the difference between animal samples (p<0,05).

## Обсуждение

Согласно нашим данным при моделировании ЧМТ выявляются значимые изменения неврологического и поведенческого статуса. У этих крыс обнаруживались нарушения координации и небольшие двигательные расстройства. Ситуативное поведение животных изменялось при наличии повышенной тревожности и нарушении кратковременной памяти. Причем, неврологические и поведенческие расстройства у крыс развивались на фоне дисциркуляции мозгового кровообращения. Эти данные подтверждаются другими авторами [10]. В ответ на локальные механизмы развития ЛЧМТ формируется генерализованный ответ целостного организма. При цитохимическом исследовании эритроцитов периферической крови было показано, что во время экспериментальной ЛЧМТ обнаруживаются данные говорящие о генерализованной реакции организма в ответ на поврежде-

ние ЦНС. Это обусловлено, тем, что повреждение ЦНС приводит к дестабилизации механизма регуляции физиологических и метаболических процессов, которые поддерживают гомеостаз. На эту точку зрения указывает то, что при ЛЧМТ происходит нейrogenная модуляция окислительно-восстановительных процессов обмена производных тирозина в цитоплазме эритроцитов периферической крови. В целях оценки дисфункции микроциркуляции во время ЛЧМТ нами был использован новый метод исследования эритроцитов периферической крови. Выбор этого метода обусловлен тем, что сейчас существенно пересмотрены механизмы флуоресценции целого ряда красителей, а также адгезия флуорохрома на объектах исследования [11]. Для флуоресценции физических тел выявлена существенная роль переноса электронов в химической системе [12]. Новыми видами флуоресценции являются: 1. Фотоиндуцированный перенос электронов, 2. Электронный обмен или



**Рис. 2.** Хромаффинная реакция в эритроцитах. *a* – контрольных животных; *b*, *в* – через 2 ч после легкой и среднетяжелой черепно-мозговой травмы; *г* – красный костный мозг здоровых животных, незрелые эритроидные клетки и эритроциты с отрицательной хромаффинной реакцией и зрелые с положительной. *a-в* – конфокальная микроскопия, *г* – световая микроскопия, окраска ализариновым красным и бихроматом калия.

**Fig. 2.** The chromaffin reaction of red blood cells: *a*: control animals; *b*, *c*: at 2 h after mild and moderate traumatic brain injury, respectively; *d*: red bone marrow of healthy animals, immature erythroid cells and erythrocytes with a negative chromaffin reaction and mature cells with a positive chromaffin reaction. *a-c*: confocal microscopy, *D*: light microscopy, staining with alizarin red and potassium dichromate.

взаимодействия типа Декстера, 3. Эмиссия индуцированной агрегацией (AIE) 4. Усиление флуоресценции инкапсулированных красителей. АКС является широко известным биохимическим маркером состояния функции доноров и акцепторов электронов в биологической системе содержащей кислоты и основания Льюиса [13]. Так же, изучается эксимерная флуоресценция АКС, которая характеризует образование радикалов фотодимеров этого красителя [14]. Установлен фотозависимый характер контакта АКС с оксидами металла, который инициирует образование активных форм кислорода – антрахиноновый процесс [15]. Поэтому мы для маркирования оксидации производных тирозина в эритроцитах использовали ализарин красный С и бихромат калия, которые образуют химические связи с ароматическими аминокислотами. На специфичность этой реакции указывает, как известно, то, что производные тирозина имеют основное значение в качестве важнейших мишеней для воздействия активных форм кислорода. Эта точка зрения сейчас подтверждена в большом количестве исследований конструкции современных хемосенсоров [16]. Следовательно, полученные нами данные об изменении метаболизма в эритроцитах животных после ЧМТ, сопряженной с гипоксией тканей головного мозга, подтверждают нарушение гемореологии, способствующей развитию генерализованного оксидативного стресса. Корреляционный анализ морфометрических данных и СЦК хромофильной реакции эритроцитов показал статистически значимую связь между ними. Была установлена согласно шкале Чеддока сильная положительная связь между показателями диаметра сосудов головного мозга и СЦК. Коэффициент корреляции для показателей диаметра прекапилляров, капилляров, посткапилляров и СЦК хромофильной реакции эритроцитов был равен 0.896, 0.984 и 0.993 соответственно ( $p < 0,05$ ).

### Заключение

Морфометрия капилляров нервной ткани показала уменьшение диаметра просвета в начальный посттравматический период, при этом отмечалась морфохимическая компенсация нейронов, которая является локальной ответной реакцией клеток на ишемию головного мозга. При внутричерепной травме следствием изменения окислительно-восстановительных процессов в эритроцитах является генерализованное нарушение гемореологии. Изменение этого показателя в динамике патологического процесса отражало наличие инициирующего воздействия нейродинамических повреждающих факторов на возникно-

вание генерализованных гемодинамических сдвигов в организме крыс.

### Литература

(п.п. 1-3; 6; 8-10; 12-16 см. References)

1. Зиновьев С.В., Целуйко С.С. Цитохимическая характеристика эритроцитов при экспериментальном антиортогастическом вывешивании крыс. *Амурский медицинский журнал*. 2017; 2(18): 54-7.
2. Глуткина Н.В., Пырошкин В.М. Кислородтранспортная функция и прооксидантноантиоксидантное состояние крови у пациентов с перенесенным инфарктом миокарда. *Кардиология в Беларуси*. 2012; 4: 95-106.
3. Плехова Н.Г., Радков И.В., Зиновьев С.В., Дюйзен И.В., Барышев А.Н., Шуматов В.Б. Поведенческая реакция животных и морфологическая структура неокортекса при экспериментальной черепно-мозговой травме лёгкой степени. *Бюл. экпер. биол. и мед.* 2020; 170(11): 640-5.
4. Реутов В.П., Черток В.М. Новые представления о роли вегетативной нервной системы и систем генерации оксида азота в сосудах мозга. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2016; 26: 10-20.

### References

1. Hyder A.A., Wunderlich C.A., Puvanachandra P., Gururaj G., Kobusingye O.C. The impact of traumatic brain injuries: a global perspective. *NeuroRehabilitation*. 2007; 22(5): 341-53.
2. Dadas A., Washington J., Diaz-Arrastia R., Janigro D. Biomarkers in traumatic brain injury (TBI): a review. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2018; 14: 2989-3000.
3. Dang B., Chen W., He W., Chen G. Rehabilitation treatment and progress of traumatic brain injury dysfunction. *Neural Plast*. 2017; 2017: 1582182.
4. Zinoviev S.V., Tseluyko S.S. Cytochemical characterization of erythrocytes during experimental antiarthostatic stiffening of rats. *Amurskiy meditsinskiy zhurnal*. 2017; 2(18): 54-7. (in Russian)
5. Glutkina N.V., Pyrochkin V.M. Oxygen transport functions and prooxidant antioxidant state of blood in patients with myocardial infarction. *Kardiologiya v Belarusi*. 2012; 4: 95-106. (in Russian)
6. Kane M.J., Angoa-Pérez M., Briggs D.I., Viano D.C., Kreipke C.W., Kuhn D.M. A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury. *J Neurosci Methods*. 2012; 203(1): 41-9.
7. Plekhova N.G., Radkov I.V., Zinoviev S.V., Dyuzhen I.V., Baryshav A.N., Shumatov V.B. Behavioral reaction of animals and the morphological structure of the neocortex in mild experimental traumatic brain injury. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2020; 170(11): 640-5. (in Russian)
8. Zhou J., Zhuang J., Li J., Ooi E., Bloom J., Poon C., et al. Long-term post-stroke changes include myelin loss, specific deficits in sensory and motor behaviors and complex cognitive impairment detected using active place avoidance. *PLoS ONE*. 2013; 8(3):e57503. 2013.
9. Walf A.A., Frye Ch.A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007; 2(2): 322-8.
10. Khaydarov F.G., Khasanova D.A. Study of behavioral and morphological disorders in animals with modeled pathology of mild traumatic brain injury. *Am J Medicine and Medical Sci*. 2020; 10(10): 803-8.



11. Reutov V.P., Chertok V.M. The new understanding of the autonomic nervous system role and the nitric oxide generating system in the brain vessels. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2016; 26: 10–20. (in Russian)
12. Mako T.L., Racicot J.M., & Levine M. (2018). Supramolecular Luminescent Sensors. *Chem Rev*. 2019; 119(1): 322-477.
13. Scarano W., Lu H., Stenzel M.H. Boronic acid ester with dopamine as a tool for bioconjugation and for visualization of cell apoptosis. *Chem Commun*. 2014; 50: 6390-3.
14. Haichao Liu, Dengli Cong, Bao Li, Ling Ye, Yunpeng Ge, Xiaohui Tang, at al. Discrete Dimeric Anthracene Stackings in Solids with Enhanced Excimer Fluorescence. *Cryst Growth Des*. 2017; 17(6): 2945–9.
15. Underwood Timothy M., Robinson Ross S. Enhancing the photo-efficacy of an organic visible-light-activated chromophore (alizarin red S) on zinc oxide with a Ag–Na electrolyte to photo-transform aromatic and aliphatic alcohols. *RSC Adv*. 2019; 9: 24259-66.
16. Zhang X., Wei Y., Ding Y. Electrocatalytic oxidation and voltammetric determination of ciprofloxacin employing poly(alizarin red)/graphene composite film in the presence of ascorbic acid, uric acid and dopamine. *Anal Chim Acta*. 2014; 835: 29-36.

**Сведения об авторах:**

**Плехова Наталья Геннадьевна**, доктор биол. наук, зав. Центральной научно-исследовательской лаб. ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, e-mail: pl\_nat@hotmail.com;

**Зиновьев Сергей Викторович**, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаб. ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России;

**Радьков Иван Валерьевич**, аспирант Центральной научно-исследовательской лаб. ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России;

**Шуматов Валентин Борисович**, доктор мед. наук, проф., ректор ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092.9

Черпаков Р.А.<sup>1,2</sup>, Кузовлев А.Н.<sup>1</sup>, Макаревич Д.Г.<sup>3</sup>, Лобанов А.В.<sup>4</sup>, Ершов А.В.<sup>1,5</sup>, Гребенчиков О.А.<sup>1,6</sup>

## Влияние различных концентраций хлорида лития на уровень р-GSK-3β в модели ишемического инсульта

<sup>1</sup>ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», 107031, Москва, Россия, ул. Петровка, д. 25, стр. 2;

<sup>2</sup>ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского», 129010, Москва, Россия, Большая Сухареvская площадь, д. 3;

<sup>3</sup>ГБУЗ «ГКБ им. В.П. Демикова» ДЗМ, 109263, Москва, Россия, ул. Шулева д. 4 стр. 13

<sup>4</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

<sup>5</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский институт им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет),

119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2;

<sup>6</sup>ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», 129110, Россия, Москва, ул. Щепкина, д. 61/2

**Введение.** В современном мире проблема инсультов постепенно выходит на лидирующие позиции. Отсутствие эффективных медикаментозных методов коррекции острого нарушения мозгового кровообращения приводит к необходимости поиска новых препаратов с нейропротекторным потенциалом, способных если не предотвратить, то значительно минимизировать последствия и тяжесть ишемического инсульта. **Цель исследования** – оценка влияния различных доз хлорида лития на фосфорилирование GSK-3β и выживаемость животных на модели ишемического инсульта.

**Методика.** В исследовании были использованы беспородные крысы – самцы, разделённые на 5 групп: ложнопериорванные ( $n=9$ ), контрольная группа (ишемический инсульт с введением раствора NaCl 0,9% в объёме, эквивалентном вводимым лекарственным средствам в других группах,  $n=5$ ), и группы с введением хлорида лития в дозах 4,2 мг/кг ( $n=5$ ), 21 мг/кг ( $n=5$ ) и 63 мг/кг ( $n=5$ ). Ишемический инсульт моделировали по методу Лонга. По истечении 7 сут от начала эксперимента животные подвергались гуманной эвтаназии с извлечением головного мозга и дальнейшим определением уровня фосфорилированной формы GSK-3β (р-GSK-3β) методом вестерн-блоттинга. Нейропротекторный эффект солей лития реализуется благодаря прямому ингибированию ключевой киназы аптотического механизма клеточной сигнализации – гликоген-синтазы киназы-3β (GSK-3β) с переводом её в фосфорилированную форму (р-GSK-3β). На 7-е сут также был проведен анализ показателей летальности в группах. Для множественных сравнений рассчитывали критический уровень значимости при использовании поправки Бонферрони.

**Результат.** Хлорид лития в дозе 4,2 мг/кг оказывал минимальное влияние как на уровень р-GSK-3β ( $p=0,8$ ), так и на летальность по отношению к контрольной группе ( $p>0,017$ ). Доза 21 мг/кг, в свою очередь, значительно повышала уровень р-GSK-3β ( $p=0,008$ ), но не снижала летальность ( $p>0,017$ ) по отношению к группе контроля. При использовании дозировки 63 мг/кг уровень р-GSK-3β был максимально приближен к группе ложнопериорванных животных ( $p=0,007$ ), а летальность на 7 сут была значительно ниже ( $p>0,017$ ).

**Заключение.** Хлорид лития обладает отчётливым дозозависимым нейропротекторным эффектом. Нейропротекторный эффект солей лития реализуется благодаря прямому ингибированию ключевой киназы аптотического механизма клеточной сигнализации – гликоген-синтазы киназы-3β (GSK-3β) с переводом её в фосфорилированную форму (р-GSK-3β). Реализация нейропротекторного эффекта данного препарата потенциально способна улучшить прогнозы течения ишемического инсульта.

**Ключевые слова:** хлорид лития; нейропротекция; ишемический инсульт; GSK-3β

**Для цитирования:** Черпаков Р.А., Кузовлев А.Н., Макаревич Д.Г., Лобанов А.В., Ершов А.В., Гребенчиков О.А. Влияние различных концентраций хлорида лития на уровень р-GSK-3β в модели ишемического инсульта. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): 26-33.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.26-33

**Для корреспонденции:** Черпаков Ростислав Александрович, e-mail rcherpakov@fnkcr.ru

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Гребенчиков О.А., Ершов А.В., Черпаков Р.А.; сбор и обработка материала – Кузовлев А.Н., Черпаков Р.А., Макаревич Д.Г.; подготовка иллюстративного материала – Гребенчиков О.А., Ершов А.В., Черпаков Р.А.; статистическая обработка результатов – Лобанов А.В. и Ершов А.В.; написание текста – Черпаков Р.А., Гребенчиков О.А., Ершов А.В., Макаревич Д.Г.; редактирование – Черпаков Р.А., Кузовлев А.Н., Макаревич Д.Г., Лобанов А.В., Ершов А.В., Гребенчиков О.А.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки  
**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
Поступила 24.03.2021  
Принята к печати 02.11.2021  
Опубликована 20.12.2021

**Cherpakov R.A.<sup>1,2</sup>, Kuzovlev A.N.<sup>1</sup>, Makarevich D.G.<sup>3</sup>, Lobanov A.V.<sup>4</sup>, Ershov A.V.<sup>1,5</sup>, Grebenchikov O.A.<sup>1,6</sup>**

## Effect of different concentrations of lithium chloride on p-GSK-3 $\beta$ content in a model of ischemic stroke

<sup>1</sup>Federal Scientific and Clinical Center for Resuscitation and Rehabilitation, Petrovka St. 25, Bld. 2 Moscow 107031, Russian Federation;

<sup>2</sup>N.N. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care, Bolshaya Sukharevskaya Ploshchad 3, Moscow 129010, Russian Federation;

<sup>3</sup>V.P. Demikhov State Clinical Hospital, Shkuleva St. 4, Bld. 13, Moscow 109263, Russian Federation;

<sup>4</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation;

<sup>5</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya St. 8, Bld. 2, Moscow 119991, Russian Federation;

<sup>6</sup>M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Shchepkina St. 61/2, Moscow 129110, Russian Federation

**Background.** Ischemic stroke is becoming a major medical concern worldwide. Reasons for this include the aging population, which experiences an increasing frequency of cardiovascular problems. Additionally, social factors, e.g., smoking, fatigue, substance abuse, lead to strokes in young and middle-aged people. The lack of effective medical methods for correcting acute cerebral circulatory disorders underscores the need for new drugs whose neuroprotective potential can prevent or significantly minimize the consequences and severity of ischemic stroke. **Aim.** To evaluate the effect of different doses of lithium chloride on GSK-3 $\beta$  phosphorylation and on animal survival in a model of ischemic stroke.

**Methods.** 29 male rats were divided into five groups: Sham-operated ( $n=9$ ); control, ischemic stroke with administration of a volume of 0.9% NaCl solution equivalent to the volume of the administered drugs in other groups ( $n=5$ ); and groups with administration of lithium chloride at doses of 4.2 mg/kg ( $n=5$ ), 21 mg/kg ( $n=5$ ), and 63 mg/kg ( $n=5$ ). Ischemic stroke was produced by the Long method. After 7 days, the animals were subjected to humane euthanasia. The brain was excised, and the phosphorylated form of GSK-3 $\beta$  (p-GSK-3 $\beta$ ) was measured by Western blotting. The neuroprotective effect of lithium salts occurs due to a direct inhibition of the key kinase of the apoptotic mechanism of cell signaling, glycogen-synthase kinase (GSK-3 $\beta$ ), that is transformed into a phosphorylated form. Also, the group mortality rates were analyzed on day 7. For multiple comparisons, a critical level of significance was calculated using the Bonferroni correction.

**Results.** Lithium chloride, 4.2 mg/kg, had a minimal effect on both p-GSK-3 $\beta$  ( $p=0.8$ ) and mortality compared to the control group ( $p>0.017$ ). A dose of 21 mg/kg significantly increased p-GSK-3 $\beta$  ( $p=0.008$ ), but did not reduce mortality ( $p>0.017$ ), relative to the control group. At a dose of 63 mg/kg, p-GSK-3 $\beta$  was similar to that of the sham operated animals ( $p=0.007$ ), and the mortality on day 7 was significantly lower ( $p>0.017$ ).

**Conclusion.** Lithium chloride produces a dose-dependent, neuroprotective effect. This protective effect occurs due to a direct inhibition of the key kinase of the apoptotic mechanism of cell signaling, glycogen-synthase kinase (GSK-3 $\beta$ ), that is transformed into a phosphorylated form. This neuroprotection is potentially able to improve the prognosis of ischemic stroke.

**Key words:** lithium chloride; neuroprotection; ischemic stroke; GSK-3 $\beta$

**For citation:** Cherpakov R.A., Kuzovlev A.N., Makarevich D.G., Lobanov A.V., Ershov A.V., Grebenchikov O.A. Effect of different concentrations of lithium chloride on p-GSK-3 $\beta$  content in a model of ischemic stroke. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(4): 26-33. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.26-33

**For correspondence:** Rostislav A. Cherpakov, Researcher, «Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology», 107031, Moscow, Russia, Petrovka str., 25, p. 2, e-mail cherpakov@fnkcr.ru

**Contribution:** research concept and design – Grebenchikov O. A., Ershov A. V., Cherpakov R. A.; collection and processing of material – Kuzovlev A.N., Cherpakov R.A., Makarevich D.G.; preparation of illustrative material – Grebenchikov O.A., Ershov A.V. and Cherpakov R.A.; statistical processing – Lobanov A.V. and Ershov A.V.; text writing – Cherpakov R.A., Grebenchikov O.A., Ershov A.V., Makarevich D.G.; editing – Cherpakov R.A., Kuzovlev A.N., Makarevich D.G., Lobanov A.V., Ershov A.V., Grebenchikov O.A.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Information about the authors:**Kuzovlev A.N., <https://orcid.org/0000-0002-5930-0118>Makarevich D.G., <https://orcid.org/0000-0001-7913-3946>Lobanov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5159-3227>Ershov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-5758-8552>Grebenchikov O.A., <https://orcid.org/0000-0001-9045-6017>

Received 24.03.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

**Введение**

Ишемический инсульт, наряду с другими церебро-вазкулярными заболеваниями, последнее время начинает занимать одно из лидирующих мест в структуре причин как смертности, так и инвалидизации пациентов всех возрастов [1, 2]. Поиск эффективных методов лечения инсульта на ранних этапах является приоритетным в рамках минимизации последствий церебральной ишемии [3].

Препараты лития были одобрены к применению ещё в 1970 г. [4], что позволило накопить обширный клинический опыт его применения. В 2007 г. в работе Н. Lin и соавт. было отмечено практически двукратное увеличение риска развития инсультов у пациентов с биполярными расстройствами (2,97% в группе психических заболеваний против 1,5% в группе пациентов, перенесших аппендэктомию,  $p < 0,05$ ) [5]. Позже, в статье С. Lan и соавт., в рамках ретроспективного анализа риска инсультов у пациентов с биполярными расстройствами было отмечено почти двукратное снижение частоты инсультов ( $p < 0,05$ ) у пациентов, получавших терапию на основе лития (2,8%) по отношению к пациентам, получавших терапию антипсихотическими препаратами и антидепрессантами (5,4%) [6]. В экспериментальной работе М. Ren и соавт. [7] эффект лития при ишемическом инсульте оценивался путем сравнения объема поражения в зависимости от вводимой дозы препарата. Однако наиболее эффективной оказалась доза 127 мг/кг, что практически в 4 раза превышало токсическую концентрацию для человека [8].

Нейропротекторный эффект солей лития реализуется благодаря прямому ингибированию ключевой киназы аптотического механизма клеточной сигнализации – гликоген-синтазы киназы-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) с переводом её в фосфорилированную форму (p-GSK-3 $\beta$ ) [9]. В предыдущих работах, однако, не оценивалось влияние различных доз лития на уровень p-GSK-3 $\beta$  в очаге ишемического инсульта, а также и на летальность.

Учитывая имеющуюся на сегодняшний день информацию о нейропротекторных эффектах лития, а также роли клеточных киназ в патогенезе повреж-

дения тканей головного мозга и была сформулирована цель данного исследования.

**Цель исследования** – оценка влияния различных доз хлорида лития на фосфорилирование GSK-3 $\beta$  и выживаемость животных на модели ишемического инсульта.

**Методика**

Исследование выполнено в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными европейским научным фондом и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным. Протокол проведения эксперимента утвержден локальным Этическим комитетом ФГБНУ НИИОПП. В работе использовались беспородные крысы самцы массой  $315 \pm 11,5$  г. С целью моделирования фокальной ишемии использована классическая модель ишемии Лонга [10]. С целью исключения субъективных предпочтений на формирование экспериментальных групп, распределение животных осуществляли методом модифицированной блочной рандомизации [11]. Все животные, включенные в исследование, случайным образом размещались в ячейках блока рандомизации (число ячеек блока рандомизации кратно числу групп в эксперименте). Далее, пользуясь генератором случайных чисел, составлялся перечень данных, включающий номера ячеек с животными и соответствующие им номера групп, куда были помещены животные [12]. На каждом этапе каждое животное было маркировано нанесением перманентного маркера на основание хвоста. В соответствии с нанесённой отметкой каждому животному был присвоен индивидуальный номер.

Животные были разделены на 5 групп. Группа I ( $n=9$ , средняя масса  $311,3 \pm 12,4$  г) состояла из ложнооперированных животных, которым был выполнен срединный разрез кожи по линии проекции трахеи с дальнейшим выделением общей сонной артерии, после чего рана была послойно ушита и обработана антисептиком. Группа II являлась контрольной ( $n=5$ , средняя масса  $307 \pm 11,3$  г). Животным выполнялась окклюзия среднемозговой артерии с целью моделирования

фокальной церебральной ишемии. В данной группе на протяжении 7 сут ежедневно однократно внутривенно вводился раствор NaCl 0,9% из расчета 1,5 мл/кг, что было сопоставимо с объёмом вводимого препарата в остальных группах. Группа III ( $n=5$ , средняя масса  $308 \pm 12,6$  г) – животным после моделирования фокальной ишемии однократно ежедневно вводился хлорид лития в дозе 4,2 мг/кг внутривенно. В группах IV и V ( $n=5$  в каждой группе, средняя масса 304–308 г) животным после окклюзии ежедневно, так же на протяжении 7 сут, однократно внутривенно вводился хлорид лития в дозе 21 и 63 мг/кг соответственно

В завершающее исследование входили животные, выжившие в течении 7 сут. Изначально в каждую группу было включено большее количество животных. Исходное количество животных было сформировано исходя из поправок на предполагаемую летальность. При расчете дозировок хлорида лития учитывались полученные ранее данные о хронической и острой токсичности препарата [8]. В ряде работ [13, 14] авторы указывают дозу карбоната лития 45 мг/кг (1,5 ммоль/кг) как предельно-допустимую. Эквивалентная доза хлорида лития составляет 63 мг/кг, которая и являлась максимальной в рамках проводимого эксперимента. При использовании как карбоната лития в дозе 45 мг/кг, так и хлорида лития в дозе 63 мг/кг, количество активного вещества (Li) составляет 8,6 мг/кг. Доза хлорида лития 21 мг/кг была эквивалента 0,5 ммоль/кг, а 4,2 мг/кг была эквивалентна 0,1 ммоль/кг и взята для определения возможности качественной реализации нейропротекторного эффекта.

На 7-е сут крысы подверглись гуманной эвтаназии с применением диоксида углерода CO<sub>2</sub> с последующим обескровливанием из полостей сердца. Данный метод осуществлялся в соответствии с Директивой Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях от 22 сентября 2010 г. [15].

Вестерн-блоттинг выполнялся по следующей схеме [16]. Образцы ткани мозга в количестве 500 мг были забраны в перифокальной зоне ишемического инсульта у 20 (по 5 образцов из группы контроля, а так же групп с введением хлорида лития в дозах 4,2 мг/кг, 21 мг/кг и 63 мг/кг) животных, а так же у 9 животных из ложнооперированной группы. Определение сигнальной киназы было выполнено методом вестерн-блоттинга с антителами против p-GSK-3 $\beta$  (все антитела производства – Cell Signaling, США) на спектрофотометре Hitachi-557 (Hitachi Ltd., Япония), с блоттинг-панелью SuperSignal West Pico (ThermoFisher, США).

Мозг крыс лизировали в горячем буфере (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 10% глицерина; 50 mM ДТТ, 0,01% бромфенолового синего) в течение 4 мин при 94 °С. Белки разделяли в 12%-ном ПААГ и переносили на PVDF-мембраны (Amersham, США). Далее 5% БСА в буфере ТБСТ (25 mM Tris pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween20) блокировали сайты неспецифического связывания. Затем мембраны инкубировали в течение ночи при температуре +4 °С с антителами в 5% растворе БСА/ТБСТ (антитела против  $\beta$ -актина, ГАФД, p-38, фосфо-p38, p-ERK1/2, p-GSK-3 $\beta$ , все – Cell Signaling, США). Со вторыми антителами (против мышинных или кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированных с пероксидазой хрена и разведенных в 5% растворе БСА/ТБСТ) мембраны инкубировали в течение 1 ч. Визуализацию проводили набором SuperSignal West Pico (ThermoFisher, США). Для денситометрического анализа использовали программу ImageJ. Содержание фосфорилированной формы GSK-3 $\beta$  выражали в условных единицах хемиллюминесценции (у.е.л).

Для статистического анализа использовали программы Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.) и MedCalc 12.5.0.0 (MedCalc Software bvba). Описательные статистики представлены медианой с межквартильным интервалом (для количественных переменных) и абсолютными частотами с указанием относительных частот в процентах (для категориальных переменных). Межгрупповые различия количественных показателей оценивали при помощи Н-критерия Краскела–Уоллиса с дальнейшим попарным сравнением U-критерием Уитни–Манна, точный критерий Фишера использован для сравнения частот. Различия принимались статистически значимыми при уровне  $p < 0,05$ , использованный критический уровень значимости при использовании поправки Бонферрони для множественных сравнений указан в таблицах.

## Результаты

Исследование показало, что концентрация хлорида лития 4,2 мг/кг оказывала минимальное влияние на уровень фосфорилированной формы GSK-3 $\beta$  по отношению к контрольной группе. При дозе 21 мг/кг эффект был более отчетливым, а при введении препарата в дозе 63 мг/кг уровень p-GSK-3 $\beta$  был максимально приближен к группе ложнооперированных животных, что свидетельствовало о высоком адаптивном потенциале головного мозга. В контрольной группе уровень p-GSK-3 $\beta$  снизился на 69,28% относительно группы ложнооперированных животных, что косвенно позволяет предположить выраженное

снижение адаптивного потенциала в зоне поражения и, как следствие, увеличение как объёма инсульта, так и тяжести последствий. В группе III (LiCl 4,2 мг/кг) уровень p-GSK-3β по отношению к ложнооперированным животным был ниже на 58,12%, что было значимым отличием, а тенденция к снижению уровня данного фермента также свидетельствовала об истощении адаптивных механизмов головного мозга. По отношению к контрольной группе уровень p-GSK-3β был выше на 36%, что не было статистически значимо. В группе IV (LiCl 21 мг/кг) по отношению к группе ложнооперированных животных уровень p-GSK-3β был ниже на 29%, однако с учетом поправки на множественные сравнения нельзя сделать вывод об эффективности данной дозы в рамках реализации механизмов нейропротекции. По отношению к контрольной группе уровень p-GSK-3β был выше на 130,83%, что было расценено как значимое повышение адаптивного потенциала головного мозга. В группе V (LiCl 63 мг/кг) был отмечен уровень фермента p-GSK-3β максимально приближенный к группе ложнооперированных животных (снижение на 16,65%), а также наиболее существенное увеличе-

ние по отношению к контрольной группе (уровень p-GSK-3β был выше на 171%). Полученные результаты позволяют говорить об отчетливом дозозависимом влиянии хлорида лития на уровень p-GSK-3β и, как следствие, пониженной толерантности к повреждению при ишемическом инсульте (табл. 1).

Помимо уровня p-GSK-3β нами также оценивалась летальность к 7-м суткам с определением значимости полученных различий с использованием точного критерия Фишера. Различие считалось статистически значимым при  $p < 0,017$  (с учетом поправки Бонферрони). Полученные результаты представлены в таблице 2.

### Обсуждение

Уровень фосфорилированной формы GSK-3β напрямую указывал на реализацию защитного эффекта хлорида лития. Данная киназа была открыта еще в 1979 г. [17], а её роль в механизмах апоптоза впервые была описана в 2000 году, когда была отчетливо показана взаимосвязь ингибирования данного фермента и гибели нейронов [18]. В более поздних работах авторы уже

Таблица 1/ Table 1

**Результаты определения фосфорилированной формы GSK-3β в тканях мозга лабораторных животных. Уровень содержания p-GSK-3β в группе I принимался за 100%, в группах II-V указан % от группы I. Межгрупповые различия показателей оценивались при помощи U-критерия Уитни-Манна. Для проведения множественного сравнения между группами использовался дисперсный анализ согласно критерию Краскела-Уоллиса**

**Brain phosphorylated p-GSK-3β. Data are Me (Q1;Q3). p-GSK-3β in Group I was taken as 100%. For Groups II-V, values are % of Group I. Intergroup differences were assessed with the Whitney-Mann U-test. Multiple comparisons between groups were made according to the Kruskal-Wallis test for normality**

Группа	Содержание фосфорилированной киназы GSK-3β (у.е.л.)	%	p, значимость относительно ложнооперированных животных (U-критерий) <sup>1</sup>	p, значимость относительно контрольных животных (U-критерий) <sup>2</sup>
Группа I (ложнооперированные) n=10	1558917 [1334828–1787225]	100		
Группа II (Инсульт + 0,9% p-p NaCl) n=5	478798 [412786–499434]	31	0,001*	
Группа III (Инсульт + LiCl 4,2 мг/кг) n=5	652799 [598344 – 878444]	41	0,007*	0,8
Группа IV (Инсульт + LiCl 21 мг/кг) n=5	1105472 [1005400 – 1277338]	71	0,04	0,008*
Группа V (инсульт + LiCl 63 мг/кг) n=5	1299323 [1187 556– 1375121]	83	0,04	0,007*
p-value (I – V, критерий Краскела-Уоллиса)	H-Краскела-Уоллиса: 21,5 p < 0,001			

**Примечание.** \* – различия статистически значимы. <sup>1</sup>Использована поправка Бонферрони (4 пары сравнений: критический p-value = 0,0125). <sup>2</sup>Использована поправка Бонферрони (3 пары сравнений: критический p-value = 0,0167)

**Note.**\*Significant differences. <sup>1</sup>Bonferroni correction was used (4 pairs of comparisons: critical p-value = 0.0125). <sup>2</sup>Bonferroni correction was used (3 pairs of comparisons: critical p-value = 0.0167).

## Показатель летальности в группах

## Group mortality rate

Индукция патологии	Препараты	Доза, мг/кг	Исход (умело/всего)
Нет (ложнооперированные)	нет	0	0/9 (0%)
Есть	(контроль) NaCl 0,9%	эквивалентная	13/22 (59%)
	Лития хлорид	4,2	8/14 (57%)
	«-----»	21	6/15 (40%)
	«-----»	63	4/15 (27%)*

**Примечание.** \* – значимая разница по отношению к контрольной группе ( $p < 0,017$ ). Межгрупповые различия показателей оценивались при помощи точного критерия Фишера.

**Note.** \* – significantly different from the control group ( $p < 0.017$ ). Intergroup differences were evaluated with Fisher's exact test.

достаточно часто опирались на уровень p-GSK-3 $\beta$ , когда речь шла о поиске органопротекторных эффектов у различных препаратов [19]. В результате проведенных исследований было отчетливо показано, что ингибирование GSK-3 $\beta$  (перевод в фосфорилированную форму) предотвращало открытие гигантской митохондриальной поры с дальнейшим выходом проапоптотических ферментов в цитозоль клетки и, как следствие, препятствовало цитолизу [20, 21].

В ранее опубликованных исследованиях на моделях тотальной ишемии головного мозга [22, 23] и геморрагического инсульта [24] хлорид лития также продемонстрировал отчетливые нейропротекторные эффекты. Кроме того, реализация универсального цитопротекторного механизма путём прямого фосфорилирования GSK-3 $\beta$  была показана на примере инфаркта миокарда [25] и гентамициновой нефротоксичности [26] у крыс. Универсальность цитопротекторного эффекта хлорида лития в целом, и нейропротекторного эффекта в частности, осуществляется благодаря 3 основным механизмам. Первый – ингибирование основного фермента в реализации механизма ишемического и фармакологического прекодиционирования GSK-3 $\beta$  с переводом его в фосфорилированную форму [19]. Второй – инактивация NMDA-рецепторов, что приводит к снижению активности проапоптотического белка p53 и повышение активности анти-апоптотических белков Bcl2 [8]. Третий механизм – активация сигнального пути PI3K/Akt, отвечающего за выживание клетки [23].

### Закключение

Полученные результаты в рамках проведенного исследования позволили сделать несколько важных выво-

дов. 1 – нейропротекторный эффект лития напрямую связан с вводимой дозой; 2 – реализация нейропротекции осуществляется за счет прямого ингибирования GSK-3 $\beta$ , уровень которого в пораженном участке головного мозга, возможно, являлся маркером адаптивных механизмов клеток; 3 – концентрация 63 мг/кг, являющаяся пороговой при определении токсичности, оказывала наиболее выраженный эффект, что потенциально может способствовать дальнейшему изучению использования лития как нейропротектора; 4 – дозы в 4,2 мг/кг и 21 мг/кг не оказывали существенного влияния на итоговую летальность, в отличие от дозы 63 мг/кг, при применении которой она была значимо ниже по отношению к контрольной группе.

### Литература

#### (п.п. 1-7; 9-14; 16-22; 24 см. References)

- Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Янкаускас С.С., Зоров С.Д. и др. Соли лития – простые, но магические (обзор). *Биохимия*. 2014; 79(8): 932–43. <https://doi.org/10.1134/S0006297914080021>
- Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях* / пер. с англ. Под ред. М.С. Красильщиковой, И.В. Белозерцевой. 2012. URL: <https://docplayer.ru/49033909-Direktiva-2010-63-eu-evropeyskogo-parlamenta-i-soveta-evropeyskogo-soyuz.html>
- Острова И.В., Гребенчиков О.А., Голубева Н.В. Нейропротективное действие хлорида лития на модели остановки сердца у крыс. *Общая реаниматология*. 2019; 15(3): 73–82. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2019-3-73-82>
- Гребенчиков О.А., Лобанов А.В., Шайхутдинова Э.Р., Кузовлев А.Н., Ершов А.В., Лихванцев В.В. Кардиопротекторные свойства хлорида лития на модели инфаркта миокарда у крыс. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2019; 23(2): 43–9. <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2019-2-43-49>

26. Черпаков Р.А., Гребенчиков О.А., Плотников Е.Ю., Лихванцев В.В. Сравнительная эффективность фармакологического preconditionирования на основе Даларгина и лития на модели гентамициновой нефротоксичности. *Анестезиология и реаниматология*. 2015; 60(1): 58–63.

### References

- Roth G.A., et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019: Update from the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*. 2020; 76(25): 2982–3021. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>
- Cucchiara B., Elm J., Easton J.D., Coutts S.B., Willey J.Z., Biros M.H., et al. Disability After Minor Stroke and Transient Ischemic Attack in the POINT Trial. *Stroke*. 2020; 51(3): 792–9. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.027465>
- Muresanu D.F., Strilciuc S., Stan A. Current Drug Treatment of Acute Ischemic Stroke: Challenges and Opportunities. *CNS Drugs*. 2019; 33(9): 841–7. <https://doi.org/10.1007/s40263-019-00663-x>
- Johnson G., Gershon S. Early North American research on lithium. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*. 1999; 33: 48–53. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1614.1999.000668.x>
- Lin H.C., Tsai S.Y., Lee H.C. Increased risk of developing stroke among patients with bipolar disorder after an acute mood episode: A six-year follow-up study. *Journal of Affective Disorders*. 2007; 100(1–3): 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2006.09.016>
- Lan C.C., Liu C.C., Lin C.H., Lan T.Y., McInnis M.G., Chan C.H., et al. A reduced risk of stroke with lithium exposure in bipolar disorder: a population-based retrospective cohort study. *Bipolar Disorders*. 2015; 17(7): 705–14. <https://doi.org/10.1111/bdi.12336>
- Ren M., Senatorov V.V., Chen R.W., Chuang D.M. Postinsult treatment with lithium reduces brain damage and facilitates neurological recovery in a rat ischemia/reperfusion model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100(10): 6210–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0937423100>
- Plotnikov E.Y., Silachev D.N., Zorova L.D., Pevzner I.B., Jankauskas S.S., Zorov S.D., et al. Lithium salts – simple but magic. *Biochemistry (Mosc)*. 2014; 79(8): 932–43. (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0006297914080021>
- Li X., Bijur G.N., Jope R.S. Glycogen synthase kinase-3beta, mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar Disord*. 2002; 4(2): 137–44. <https://doi.org/10.1034/j.1399-5618.2002.40201.x>
- Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989; 20(1): 84–91. <https://doi.org/10.1161/01.str.20.1.84>
- Altman D.G., Bland J.M. How to randomize. *BMJ*. 1999; 11(319): 703–4. <https://doi.org/10.1136/bmj.319.7211.703>
- Bland M. An Introduction to Medical Statistics (3rd edition). *Oxford Medical Publications*. 2000.
- Izsak J., Seth H., Iljin M., Theiss S., Ågren H., Funa K., et al. Differential acute impact of therapeutically effective and overdose concentrations of lithium on human neuronal single cell and network function. *Transl Psychiatry*. 2021 May 12; 11(1): 281. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01399-3>
- Van Deun K., Hatch H., Jacobi S., Köhl W. Lithium carbonate: Updated reproductive and developmental toxicity assessment using scientific literature and guideline compliant studies. *Toxicology*. 2021 Sep; 461: 152907. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152907>
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes. [Direktiva 2010/63/EU Evropejskogo Parlamenta i Soveta Evropejskogo Soyuza po okhrane zhivotnykh, ispol'zuemykh v nauchnykh tselyakh] / Ed. M.S. Krasil'shchikovoy, I.V. Belozertsevoy. 2012; 48. (in Russian) URL: <https://docplayer.ru/49033909-Direktiva-2010-63-eu-evropejskogo-parlamenta-i-soveta-evropejskogo-soyuza.html>
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America journal*. 1979; 76(9): 4350 – 4. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
- Itarte E., Huang K.P. Purification and properties of cyclic AMP-independent glycogen synthase kinase 1 from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1979; 254(10): 4052–7.
- Hetman M., Cavanaugh J.E., Kimelman D., Xia Z. Role of glycogen synthase kinase-3beta in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci*. 2000; 20(7): 2567–74. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-07-02567.2000>
- Juhaszova M., Zorov D.B., Kim S.H., Pepe S., Fu Q., Fishbein K.W., et al. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest*. 2004; 113(11): 1535–49. <https://doi.org/10.1172/JCI19906>
- Kelly S., Zhao H., Hua Sun G., Cheng D., Qiao Y., Luo J., et al. Glycogen synthase kinase 3beta inhibitor Chir295 reduces neuronal death resulting from oxygen-glucose deprivation, glutamate excitotoxicity, and cerebral ischemia. *Exp Neurol*. 2004; 188(2): 378–86. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.04.004>
- Plotnikov E.Y., Grebenchikov O.A., Babenko V.A., Pevzner I.B., Zorova L.D., Likhvantsev V.V., et al. Nephroprotective effect of GSK-3β inhibition by lithium ions and δ-opioid receptor agonist dalargin on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett*. 2013; 220(3): 303–8. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.04.023>
- Yan X.B., Wang S.S., Hou H.L., Ji R., Zhou J.N. Lithium improves the behavioral disorder in rats subjected to transient global cerebral ischemia. *Behav Brain Res*. 2007; 177(2): 282–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.11.021>
- Ostrova I.V., Grebenchikov O.A., Golubeva N.V. Neuroprotective Effect of Lithium Chloride in Rat Model of Cardiac Arrest. *General Reanimatology*. 2019; 15(3): 73–82. (in Russian). <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2019-3-73-82>
- Liu Z., Li R., Jiang C., Zhao S., Li W., Tang X. The neuroprotective effect of lithium chloride on cognitive impairment through glycogen synthasekinase-3β inhibition in intracerebral hemorrhage rats. *Eur J Pharmacol*. 2018; 840: 50–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.10.019>
- Grebenchikov O.A., Lobanov A.V., Shayhutdinova E.R., Kuzovlev A.N., Ershov A.V., Likhvantsev V.V. Cardioprotective effect of lithium chloride on a rat model of myocardial infarction. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya*. 2019; 23(2): 43–9. (in Russian). <https://doi.org/10.21688/1681-3472-2019-2-43-49>
- Cherpakov R.A., Grebenchikov O.A., Plotnikov E.JU., Likhvantsev V.V. Comparison of pharmacological renal preconditioning with dalargin and lithium ions in the model of gentamycin-induced acute renal failure. *Russian Journal of Anaesthesiology and Reanimatology*. 2015; 60(1): 58–63. (in Russian)



**Сведения об авторах:**

**Черпаков Ростислав Александрович**, науч. сотр. лаб. органопротекции при критических состояниях ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», врач анестезиолог-реаниматолог ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского», e-mail: rcherpakov@fnkcrf.ru;

**Кузовлев Артём Николаевич**, доктор мед. наук, заместитель директора — руководитель НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского;

**Макаревич Дмитрий Геннадьевич**, канд. мед. наук, зав. отд-нием анестезиологии—реаниматологии, врач-анестезиолог-реаниматолог ГБУЗ «Городская клиническая больница им. В.П. Демикова» Департамента здравоохранения города Москвы»;

**Лобанов Александр Владимирович**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП;

**Ершов Антон Валерьевич**, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. экспериментальных исследований ФНКЦ РР; проф. каф. паталогической физиологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);

**Гребенчиков Олег Александрович**, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. органопротекции при критических состояниях ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии»; вед. науч. сотр. отд-ния реаниматологии ГБУЗ МО МОНИКИ ИМ. М.Ф. Владимирского.

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092

**Кузник Б.И.<sup>1</sup>, Смоляков Ю.Н.<sup>1</sup>, Хавинсон В.Х.<sup>2,3</sup>, Шаповалов К.Г.<sup>1</sup>, Лукьянов С.А.<sup>1</sup>, Фефелова Е.В.<sup>1</sup>, Казанцева Л.С.<sup>1</sup>**

## Нейтрофилы, лимфоциты и их соотношение как предикторы исходов у больных COVID-19

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», 672000, Чита, Россия, ул. Горького, д. 39 а;<sup>2</sup>ФГБУ «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, 199034, Санкт-Петербург, Россия, наб. Макарова, д. 6;<sup>3</sup>АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», 197110, Санкт-Петербург, Россия, пр. Динамо, д. 3

**Актуальность.** До сих пор в литературе практически не существует работ, в которых бы описывались на ранних стадиях COVID-19 простые методы исследования, позволяющие прогнозировать исход этого коварного заболевания. Вместе с тем, наличие предикторов благоприятного и летального исходов при COVID-19 имеет важное значение, так как своевременно позволяет клиницисту вмешаться в тактику лечения больного. **Цель исследования** – разработка простых и доступных предикторов, позволяющих с большой долей вероятности на ранних стадиях заболевания COVID-19 прогнозировать его исход.

**Методика.** Исследования проведены на 125 больных COVID-19, у которых на 1-, 5-, 7-, 10-, 14-е и 21-е сут пребывания в стационаре определялось число лейкоцитов нейтрофилов, лимфоцитов и отношение нейтрофилы/лимфоциты (NEU/LYM). Для расчета пороговых значений выживаемости и летальности, имеющих предиктивную ценность, проводился ROC-анализ. Для оценки значимости роста AUC в динамике заболевания сопоставление ROC кривых производили попарно (1-, 5-, 5-7, 7-10, 10-14 и 14-е – 21-е сут с использованием непараметрического алгоритма E.R. DeLong.

**Результаты.** Установлено, что между числом лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и отношением NEU/LYM у больных с благоприятным исходом и больных впоследствии умерших существуют значительные различия. Наиболее значимыми предикторами исхода заболевания при COVID-19 являются число нейтрофилов и особенно индекс NEU/LYM, при повышении которого резко возрастает вероятность летального исхода. С помощью ROC-анализа установлено, что уже в 1-е сут заболевания предсказательная способность (AUC) для отношения NEU/LYM в качестве предиктора исхода заболевания соответствовала 79%, к 5-м сут 84%, начиная с 10-х сут и до окончания исследования баланс качества этого теста превышал 90%. При высоких значениях показателей возможного летального исхода необходимо вводить иммуномодуляторы. Мы рекомендуем с этой целью применять комплекс полипептидов вилочковой железы – тималин, хорошо зарекомендовавший себя при лечении больных со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19.

**Заключение.** Предиктором тяжелого течения и неблагоприятного исхода COVID-19 с высокой чувствительностью и специфичностью является отношение нейтрофилы/лимфоциты (индекс NEU/LYM).

**Ключевые слова:** COVID-19; нейтрофилы; лимфоциты

**Для цитирования:** Кузник Б.И., Смоляков Ю.Н., Хавинсон В.Х., Шаповалов К.Г., Лукьянов С.А., Фефелова Е.В., Казанцева Л.С. Нейтрофилы, лимфоциты и их соотношение как предикторы исходов у больных COVID-19. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): –.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**Для корреспонденции:** Кузник Борис Ильич, e-mail: bi\_kuznik@mail.ru

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Кузник Б.И., Смоляков Ю.Н., Шаповалов К.Г., Фефелова Е.В.; сбор и обработка материала – Лукьянов С.А.<sup>1</sup>, Казанцева Л.С.; подготовка иллюстративного материала – Смоляков Ю.Н.; статистическая обработка – Смоляков Ю.Н.; написание текста – Кузник Б.И.; редактирование – Хавинсон В.Х.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.02.2021

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021

Kuznik B.I.<sup>1</sup>, Smolyakov Y.N.<sup>1</sup>, Khavinson V.K.<sup>2,3</sup>, Shapovalov K.G.<sup>1</sup>, Lukyanov S.A.<sup>1</sup>, Fefelova E.V.<sup>1</sup>, Kazantseva L.S.<sup>1</sup>

## Neutrophils, lymphocytes and their ratio as predictors of outcome in patients with COVID-19

<sup>1</sup> Chita State Medical Academy, Chita;

<sup>2</sup> I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg;

<sup>3</sup> Research Center "Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology", St. Petersburg

**Background.** There have been practically no reports that describe, in early stages of COVID-19, simple methods to predict the outcome of this insidious disease. At the same time, predictors of favorable or fatal COVID-19 outcome are important, since they would allow clinicians to adjust treatment in a timely manner. **Aim.** To develop simple and affordable predictors that are highly likely to forecast outcome at early stages of COVID-19.

**Methods.** The study was conducted in 125 patients with COVID-19, in whom the number of leukocytes, neutrophils, lymphocytes, and the neutrophil/lymphocyte ratio (NEU/LYM) were determined on days 1, 5, 7, 10, 14, and 21 of hospitalization. To calculate predictive threshold values of survival and mortality, ROC analyses were performed. To assess the significance of changes in the areas under the ROC curves (AUC) in the illness dynamics, the ROC curves were compared in pairs (1-5, 5-7, 7-10, 10-14, 14-21 days) using the DeLong nonparametric algorithm.

**Results.** There were significant differences between the number of leukocytes, neutrophils, lymphocytes, and the NEU/LYM ratio in patients with a favorable outcome and those that later died. The most significant outcome predictors were the number of neutrophils and, especially, the NEU/LYM index, with an increase in which, the likelihood of death sharply increased. The ROC-analysis showed that on day 1, the outcome predictive ability of AUC for the NEU/LYM ratio was 79%; by day 5, it increased to 84%; from day 10 to day 21, it exceeded 90 %. In the presence of high indicators for potentially lethal outcomes, it is necessary to administer immunomodulators. For this purpose, we recommend using a complex of polypeptides from the thymus gland, i.e., thymalin, which has proven beneficial for treatment of patients with moderate to severe COVID-19.

**Conclusion.** The neutrophil/lymphocyte ratio predicts of the outcome of severe COVID-19 with high sensitivity and specificity.

**Keywords:** COVID-19; neutrophils; lymphocytes

**For citation:** Kuznik B.I., Smolyakov Yu.N., Khavinson V.Kh., Shapovalov K.G., Lukyanov S.A., Fefelova E.V., Kazantseva L.S. Neutrophils, lymphocytes and their ratio as predictors of outcome in patients with COVID-19. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. Pathological physiology and experimental therapy.* 2021; 65(4): -. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**For correspondence:** Boris I. Kuznik, MD, Professor of the Department of Normal Physiology, Chita State Medical Academy, e-mail: bi\_kuznik@mail.ru

**Contribution:** study conception and design – Kuznik B.I., Smolyakov Y.N., Shapovalov K.G., Fefelova E.V.; material collection and processing – Lukyanov S.A., Kazantseva L.S.; preparation of illustrative material – Smolyakov Y.N.; statistical processing – Smolyakov Y.N.; text writing – Kuznik B.I.; editing – Havinson V.H.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

### Information about the authors:

Kuznik B.I., <https://orcid.org/0000-0002-2502-9411>

Smolyakov Y.N., <https://orcid.org/0000-0001-7920-7642>

Khavinson V.H., <https://orcid.org/0000-0001-7547-7725>

Shapovalov K.G., <https://orcid.org/0000-0002-3485-5176>

Lukyanov S.A., <https://orcid.org/0000-0001-7997-9116>

Fefelova E.V., <http://orcid.org/0000-0002-0724-0352>

Received 02.02.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

## Введение

В настоящее время не вызывает сомнения, что коронавирусное заболевание COVID-19 сопровождается не только развитием тяжелейших осложнений, но и нередко приводит к летальному исходу. Особенно тяжело эта инфекция протекает у лиц пожилого и старческого возраста, а также у пациентов с наличием сопутствующ-

щих заболеваний – сахарный диабет, гипертоническая болезнь, почечная недостаточность и др. [1-3].

Установлено, что предикторами тяжелого течения COVID-19 является высокая концентрация провоспалительных цитокинов, приводящих к запуску системного гипервоспалительного синдрома, так называемого «цитокинового шторма» [4,5], с последующей супрес-

сией иммунного ответа [6-9]. Кроме того, у пациентов с тяжелым течением заболевания зачастую наблюдается лимфоцитопения, нейтрофилёз и увеличение соотношения NEU/LYM [5, 10-12].

В то же время в доступной литературе мы нашли лишь одну статью [13], в которой сообщалось, что ранними предикторами смерти при COVID-19 является наличие в сыворотке или плазме двух компонентов системы комплемента – лектина, связывающего маннозу, и пентраксина 3. Однако эти методики сложны в реализации и вряд в ближайшее время найдут применение в клинической практике.

Вместе с тем, мы не встретили работ, в которых бы сообщалось, что с помощью легко доступных методов уже в первые дни заболевания можно было бы не только свидетельствовать о тяжести патологического процесса, но и предсказывать вероятность летального исхода. Само собой разумеется, если такие показатели будут выявлены, то клиницисты смогут уже в первые дни заболевания предпринять необходимые меры для предупреждения развития «цитокинового шторма» и часто сопутствующей ему полиорганной недостаточности с летальным исходом.

Учитывая сказанное, мы решили в качестве метода выявления предикторов тяжести течения патологического процесса воспользоваться методом ROC (Receiver Operating Characteristic) анализа. Следует отметить, что ROC анализ позволяет графически охарактеризовать качество бинарной классификации исхода (выздоровление/летальный), исследуя зависимость доли верных положительных классификаций (True Positive Rate, Sensitivity, Чувствительность) от доли ложных положительных классификаций = 100% – доля истинных отрицательных классификаций (True Negative Rate, Specificity, Специфичность) при варьировании порога принятия прогностического решения (Cutoff). Таким образом находится оптимальная точка принятия решения в которой баланс точности (индекс Юдена J = Специфичность + Чувствительность – 100%) максимален.

Помимо этого, имеется возможность усредненной оценки качества предсказания, при использовании параметра AUC (Area Under Curve, Площадь под кривой). Для оценки значимости роста AUC в динамике суток заболевания сопоставление ROC кривых производится попарно (1-е – 5-е, 5-7, 7-10, 10-14, 14-е–21-е сут) с использованием непараметрического алгоритма E.R. DeLong и соавт. [14], при этом тестируется нулевая гипотеза отсутствия различий в AUC двух кривых.

**Цель исследования** – разработка простых и доступных предикторов, позволяющих с большой долей ве-

роятности на ранних стадиях заболевания COVID-19 прогнозировать его исход.

### Методика

Выполнено ретроспективное исследование динамики содержания в крови лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и соотношения нейтрофилы/лимфоциты (NEU/LYM) у 125 больных с тяжелым и крайне тяжелым течением COVID-19. Средний возраст пациентов составлял  $64.5 \pm 11.2$  лет. Больные находились на лечении в моностационаре на базе ГУЗ «Городская клиническая больница №1» г. Читы. Госпитализация всех включенных в исследование лиц проводилась с 6-х по 10-е сут с момента появления симптомов заболевания. Определение степени тяжести течения COVID-19 и схема лечения соответствовали актуальной версии временных методических рекомендаций Минздрава РФ «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции COVID-19». Назначалась противовирусная, антибактериальная, антикоагулянтная, респираторная, инфузионная, нутритивно-метаболическая терапия. Показатели гемограммы оценивались на 1-, 5-, 7-, 10-, 14-е и 21-е сут с момента госпитализации. Критериями «невключения» в исследование являлись онкопатология, иммунодефицит любого генеза, беременность, наличие на момент госпитализации декомпенсированной хронической патологии, заболевания крови. Критерии исключения: развитие кровотечения, гематомы.

Все проводимые мероприятия соответствовали этическим стандартам, разработанным на основе Хельсинкской декларации всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2008 г., и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266. Работа одобрена Комиссией по биомедицинской этике Читинской государственной медицинской академии.

Подсчет общего количества лейкоцитов ( $10^9/л$ ) и их популяций в крови производился на гемоанализаторе PENTRA-80, Horiba ABX Diagnostics (USA).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием специализированного языка программирования R версии 4.1.0. Количественные характеристики признаков были представлены медианой (Me, Q2 – второй квартиль), первым и третьим квартилем (Q1 и Q3 соответственно). Для расчета пороговых значений летальности, имеющих предиктивную ценность, проводился ROC-анализ [15-16]. При построении ROC-кривой происходит изменение вели-

чины (порога) исследуемого фактора, при принятии решения о возможной летальности и на заданном пороге по экспериментальным данным рассчитывается чувствительность и специфичность прогнозирования. Цикл испытания начинается с 0% чувствительности и 100% специфичности, заканчивается при 100% чувствительности, 0% специфичности. В ходе этой процедуры строится ROC кривая и определяется точка баланса чувствительности/специфичности, в которой эти показатели максимальны. Полученная в этой точке величина исследуемого признака может считаться оптимальным порогом принятия прогностического решения, выше (ниже) которого можно говорить о вероятности летального исхода. Оценку эффективности предсказания проводили по экспертной шкале показателей площади под ROC кривой (Area Under Curve). Корректность оценки результатов классификации оценивалась при помощи индекса Юдена ( $J = 2 \cdot AUC - 1$ ): чем выше его значение, тем больше ценность исследуемого показателя [17-20]. Экспертную шкалу оценки можно принять в следующем виде: 0.9-1.0 – отличная; 0.8-0.9 – хорошая; 0.7-0.8 – приемлемая; 0.6-0.7 – слабая; 0.5-0.6 – неудовлетворительная [21-22].

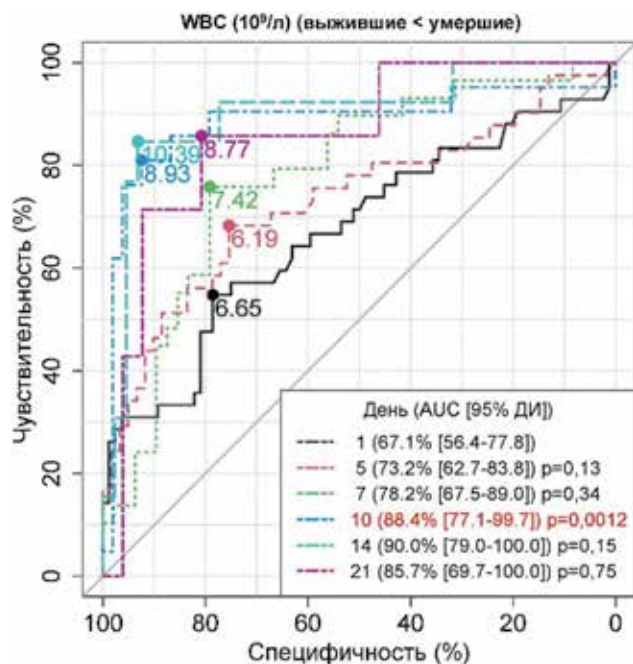


Рис. 1. Кривые ROC анализа прогностической точности лейкоцитов [ $10^9/\text{л}$ ] по дням заболевания.

Fig. 1. ROC curves of leukocyte prognostic accuracy analysis [ $10^9/\text{L}$ ] by day of disease.

## Результаты исследования

Наши наблюдения показали, что во все исследуемые сроки число лейкоцитов у умерших, по сравнению с выжившими, оказалось значительно больше. Причем, чем дольше продолжалось пребывание больных в стационаре, тем сильнее в группе умерших возрастало количество лейкоцитов. Так в 1-е сут исследования их количество у выживших соответствовало 4.97 [3.90-6.00], а в группе умерших – 6.02 [4.73-8.44] ( $p=0.009$ ), на 5-е сут 5.15 [4.23-6.18] у выживших и 6.54 [5.16-9.33] в группе умерших ( $p=0.004$ ), тогда как на 14-е сут число лейкоцитов возрастало почти в 2 раза (у выживших – 5.87 [4.91-6.99], у умерших – 13.4 [9.34-14] ( $p=0.002$ )). К 21-м суткам число лейкоцитов у выживших оставалось приблизительно на прежнем уровне 5.91 [4.86-8.22], тогда как в группе умерших несколько снизилось – 10.9 [8.18-13.4] ( $p=0.051$ ). Вместе с тем, как показывает ROC-анализ (рис. 1) по числу лейкоцитов судить с высокой долей вероятности о возможности летального исхода можно лишь на 10-, 14-е и 21-е сут пребывания пациентов в стационаре.

Число нейтрофилов, начиная с 1-х сут исследования, постепенно в группе умерших по сравнению с выжившими возрастает. В 1-е и 5-е сут их количество в группе умерших увеличивается незначительно: тогда как к 10-м сут эта разница возрастает почти в 2 раза (у выживших – 5.56 [4.84-7.08], у умерших 10.8 [9.47-12.7],  $p<0.0001$ ). К 14-м сут пребывания больных в стационаре в крови больных «группы умерших» число нейтрофилов по сравнению с выжившими пациентами оказалось увеличенным почти в 3 раза (у выживших 3.62 [2.58-4.54], в группе умерших – 11.7 [9.65-13.5],  $p<0.0001$ ). Наконец, к 21-м сут эта разница значительно сгладилась за счет снижения более чем в 2 раза числа нейтрофилов в крови больных впоследствии умерших.

При этом ROC-анализ показал (рис. 2), что на 7-е сут баланс точности прогнозирования равен 81%, а на 10-е, 14-е и 21-е сут более чем 90%.

Уже в 1-е сут исследования число лимфоцитов в группе умерших оказалось значительно сниженным (1.08 [0.79-1.5],  $p<0.0001$ ). На 5-е сут число лимфоцитов снижается в обеих группах, однако разница в их числе остается существенной (0.93 [0.73-1.27] против 0.64 [0.41-0.78],  $p<0.0001$ ). На 7-е сут количество лимфоцитов и в той, и в другой группе существенно не изменилось. Вместе с тем, на 10-е – содержание лимфоцитов в группе выживших (1.37 [0.918-1.88]) оказалось в 2 раза больше, чем в группе умерших – 0.64 [0.42-1.38]. На 14-е сут содержание лимфоцитов и в той, и в другой группе несколько увеличилось, но соотношение осталось преж-

ним. Наконец, на 21-е сут разброс в количестве лимфоцитов был настолько велик, что разница в их содержании оказалась несущественной.

Исследования, проведенные с применением ROC-анализа, свидетельствуют о том, что число лимфоцитов является относительно слабым тестом для предсказания исхода заболевания (рис. 3).

Учитывая высокую разницу в содержании нейтрофилов и лимфоцитов на всех сроках исследования, было решено выяснить, как изменяется в динамике соотношение NEU/LYM и может ли этот показатель служить предиктором летального исхода при COVID-19.

Уже в 1-е сут исследования отношение NEU/LYM (индекс NEU/LYM) в группе впоследствии умерших по сравнению с выжившими было увеличено более чем в 2 раза: 7.07 [3.57-9.74] и 3.01 [1.92-4.21], соответственно,  $p < 0.0001$ . На 5-е и 7-е сут этот показатель сохранялся практически на том же уровне (на 5-е 8.42 [6.56-12.8] и 3.59 [2.23-6.02],  $p < 0.0001$ ), на 7-е — 8.44 [5.63-10.6] и 3.76 [1.66-6.52],  $p = 0.0003$  соответственно. К 10-м сут разница в отношении NEU/LYM резко возрастала (более чем в 4 раза), главным образом за счет снижения этого показателя у выживших боль-

ных (9.22 [7.04-12.6] и 2.21 [1.67-3.74],  $p < 0.0001$ ). К 14-м сут NEU/LYM в группе умерших был более чем в 6 раз выше, чем у выживших (13.3 [11.9-21.4] и 2.08 [1.46-3.97],  $p < 0.0001$ , соответственно). Наконец, к 21-м сут у умерших (6.21 [4.79-8.79]) этот показатель резко падал главным образом за счет уменьшения числа нейтрофилов, тогда как у выживших он приблизительно сохранялся на прежнем уровне (2.47 [1.28-3.75]). В то же время в группе умерших он более чем в 2.5 раза превышал аналогичный показатель у выживших ( $p = 0.013$ ).

Как и следовало ожидать, показатель NEU/LYM оказался у больных COVID-19 самым точным предиктором выживаемости и возможного летального исхода (рис. 4). Уже в 1-е сут исследования его прогностическая точность в отношении исхода соответствовала 79.3%, к 5-м суткам 84%, а начиная с 10-х и до окончания исследования прогностическая точность этого теста превышала 90%.

### Обсуждение результатов

Почему же именно число нейтрофилов и особенно их сочетание с лимфоцитами являются наиважнейшими предикторами летального исхода при COVID-19?

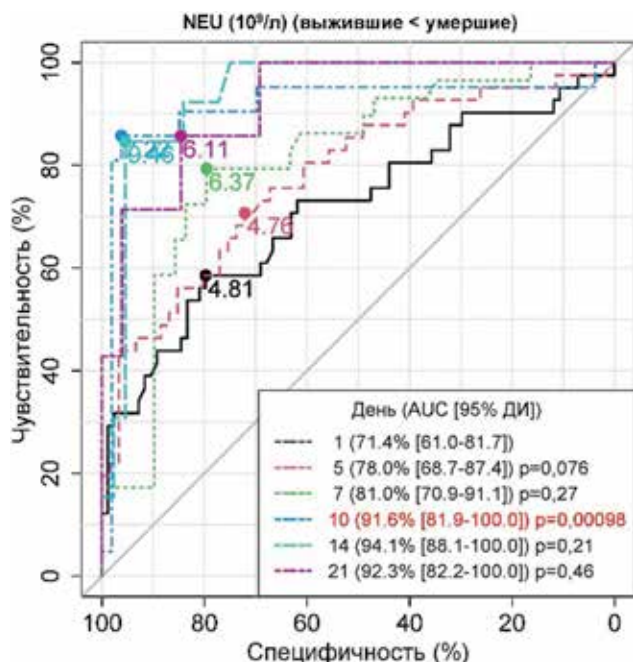


Рис. 2. Кривые ROC анализа прогностической точности нейтрофилов [10<sup>9</sup>/л] по суткам заболевания.

Fig. 2. ROC curves of neutrophil prognostic accuracy analysis [10<sup>9</sup>/L] by day of disease.

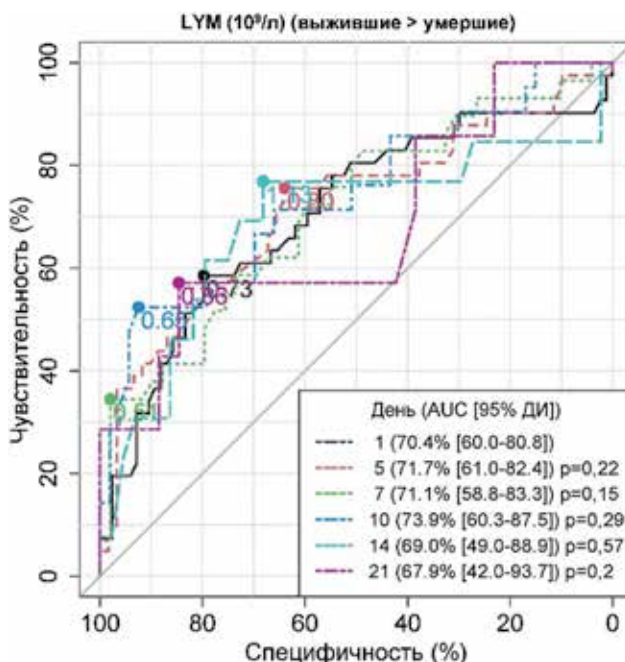


Рис. 3. Кривые ROC анализа прогностической точности лимфоцитов [10<sup>9</sup>/л] по суткам заболевания.

Fig. 3. ROC curves of lymphocyte prognostic accuracy analysis [10<sup>9</sup>/L] by day of disease.

Р. Mehta и соавт. [5] указывают, что высвобождение медиаторов и хемокинов инфицированными клетками быстро приводит к локальному накоплению нейтрофилов в месте инфекции. Хотя такие нейтрофилы могут выполнять важные противовирусные эффекторные функции, они также секретируют цитокины и хемокины, которые привлекают дополнительные иммунные клетки, такие как моноциты и Т-лимфоциты. Таким образом, они могут вносить вклад в «преувеличенные» иммунные ответы. В то же время недостаточный клиренс инфекции, приводит к тому, что многие пациенты с COVID-19 с прогрессирующей пневмонией, ARDS и полиорганной недостаточностью страдают от чрезмерно выраженного воспалительного процесса и синдрома цитокинового шторма. В конечном итоге цитокиновый шторм при COVID-19 может привести к вторичному гемофагocитарному лимфогистиоцитозу, гипертрофическому процессу, полиорганной недостаточности и высокой летальности [5], что согласно нашим данным, у пациентов «группы умерших» от COVID-19 количество нейтрофилов был больше, чем у выживших.

В то же время важнейшую роль в патогенезе COVID-19 играют лимфоциты. S.F. Pedersen и соавт.

[10] указывают, что, лейкопения, лимфоцитопения, снижение числа Т-лимфоцитов CD4+ и CD8+, пониженная экспрессия IFN- $\gamma$  в CD4-лимфоцитах, связаны с тяжелым и неблагоприятным течением COVID-19. Более того, инфекция SARS-CoV-2 может поражать главным образом Т-лимфоциты, в частности CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты, приводя к уменьшению их количества, а также продукции IFN- $\gamma$  Т-хелперами, что на заключительных этапах заболевания приводит к выраженной супрессии иммунного ответа и летальному исходу [2, 9, 23].

Наконец, С Wu et al. [2020] указывают, что у лиц с тяжелой формой COVID-19 наблюдается более низкое количество лимфоцитов, более высокое число нейтрофилов, повышенное отношение нейтрофил/лимфоцит. Нейтрофилия оказалась фактором риска развития ОРДС с быстрым прогрессированием вплоть до летального исхода [12] Лимфоцитопения является отличительной чертой у пациентов с тяжелыми течением COVID-19.

Представленные данные, с нашей точки зрения, объясняют, почему именно коэффициент NEU/LYM является наиболее чувствительным показателем возможности летального исхода. Увеличение числа нейтрофилов при одновременном снижении количества лейкоцитов, в том числе лимфоцитов и их фракций, способствует супрессии иммунного ответа, что и сказывается на состоянии больных. Вот почему при изменении этих показателей может оказаться полезным иммуномодулирующий препарат тималин [24-28], или другие препараты, обладающие подобным действием [6-8]. В то же время Тималин уже апробирован в 2020 году в клиниках Санкт-Петербурга и Читы у пациентов с COVID-19, причем предварительные результаты подтверждают нашу научную гипотезу [28].

Следует напомнить, что Тималин® представляет собой комплекс пептидов с молекулярной массой до 10 кДа, выделенных из тимуса крупного рогатого скота. Основным свойством препарата Тималин® является его способность воздействовать на состояние врожденного и адаптивного иммунитета, а также системы гемостаза [29, 30]. Наши исследования свидетельствуют о том, что применение тималина у взрослых и детей, больных пневмонией, острыми респираторными и инфекционными заболеваниями приводит к нормализации иммунограммы и системы гемостаза, а также способствует более быстрому выздоровлению пациентов [31-34]. Более того, применение тималина у больных COVID-19 со среднетяжелым и тяжелым течением болезни, в значительной степени ликвидируют

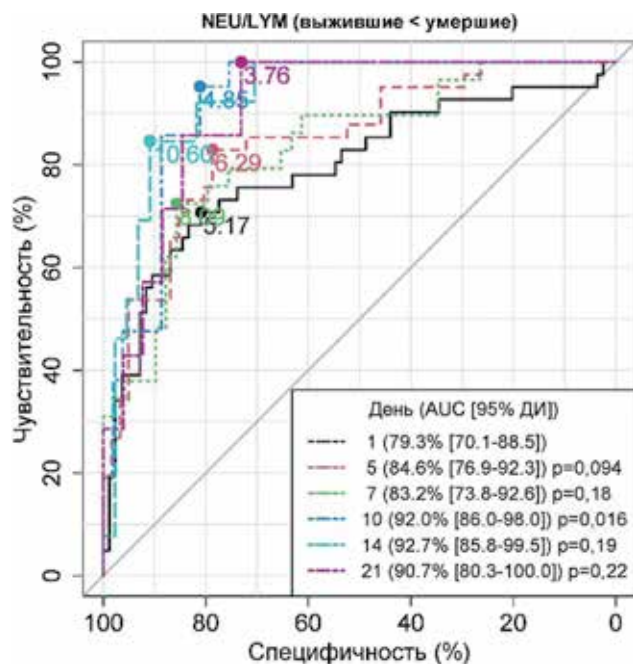


Рис. 4. Кривые ROC анализа прогностической точности соотношения NEU/LYM по суткам заболевания

Fig. 4. ROC curves of the prognostic accuracy analysis of the NEU/LYM ratio by day of disease.

нарушения в системе иммунитета и гемостаза, способствуют снижению индекса NEU/LYM, что в конечном итоге сопровождается не только улучшением состояния больных, но и снижением летальности, а также сроков пребывания больных в стационаре.

### Заключение

Предиктором исхода тяжелого течения COVID-19 с высокой чувствительностью и специфичностью является соотношение нейтрофилы/лимфоциты, то-есть индекс NEU/LYM.

### Литература

(п.п. 1; 3-14; 16-21; 24; 25; 34 см. References)

2. Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Смирнов В.С. Особенности патогенеза и течения COVID-19 у лиц пожилого и старческого возраста. *Успехи геронтологии*. 2020; 33(6): 1032-42. <https://doi.org/10.34922/AE.2020.33.6.003>
15. Григорьев С.Г., Лобзин Ю.В., Скрипченко Н.В. Роль и место логистической регрессии и ROC- анализа в решении медицинских диагностических задач. *Журнал инфектологии*. 2016. 8(4). 36-45. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2016-8-4-36-45>
22. Файнзильберг Л.С., Жук Т.Н. Гарантированная оценка эффективности диагностических тестов на основе усиленного ROC-анализа. *Управляющие системы и машины*. 2009; (5): 3-13.
23. Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Линькова Н.С. COVID-19: влияние на иммунитет, систему гемостаза и возможные пути коррекции. *Успехи физиологических наук*. 2020; 51(4): 51-63. <https://doi.org/10.31857/S0301179820040037>
26. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Стуров В.Г., Гладкий П.А. Применение препарата Тималин® при заболеваниях органов дыхания. Перспективы использования при COVID-19. *РМЖ*. 2020; 9: 24-30.
27. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И. Осложнения у больных COVID-19. Предполагаемые механизмы коррекции. *Клиническая медицина*. 2020; 4: 256-65. <https://doi.org/10.30629/0023-2149-2020-98-4-256-265>
28. Лукьянов С.А., Кузник Б.И., Хавинсон В.Х. Использование Тималина для коррекции отклонений иммунного статуса при COVID-19 (клинический случай). *Врач*. 2020; 31(8): 74-82. <https://doi.org/10.29296/25877305-2020-08-12>
29. Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. *Цитомедины*. СПб.; 1998.
30. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Рыжак Г.А. *Пептидные герпротекторы – эпигенетические регуляторы физиологических функций организма*. СПб.: РГПУ им. А.И. Герцена, 2014.
31. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Малинин В.В. *Пептидные тимомиметики*. СПб.; 2000.
32. Хавинсон В.Х. Кузник Б.И., Волчков В.А., Рукавишникова С.А., Титова О.Н., Ахмедов Т.А. и др. Влияние тималина на адаптивный иммунитет при проведении комплексной терапии пациентов с covid-19. *Клиническая медицина*. 2020; 98(8): 593-9. <https://doi.org/10.30629/0023-2149-2020-98-8-593-599>
33. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Выделение из костного мозга, лимфоцитов и тимуса полипептидов, регулирующих процессы межклеточной кооперации в системе иммунитета. *Докл. АН СССР*. 1981; 261(1): 235–9.

### References

1. Goh K.J., Choong M.C., Cheong E.H., Kalimuddin S., Duu Wen S., Phua G.C., et al. Mohideen Rapid Progression to Acute Respiratory Distress Syndrome: Review of Current Understanding of Critical Illness from COVID-19 Infection. *S. Ann Acad Med Singapore*. 2020; 49(3): 108-18.
2. Kuznik B.I., Khavinson V.Kh., Smirnov V.S. Features of the pathogenesis and course of COVID-19 in elderly and senile people. *Uspekhi Gerontologii*. 2020; 33(6): 1032-42. (in Russian). <https://doi.org/10.34922/AE.2020.33.6.003>
3. Masic Izet, Naser Nabil, Zildzic Muharem. Public health aspects of COVID-19 infection with focus on cardiovascular disease. *Mater Sociomed*. 2020; 32(1): 71-6. <https://doi.org/10.5455/msm.2020.32.71-76>
4. Gao Y., Li T., Han M., et al. Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. *J Med Virol*. 2020; 92(27): 791-6. <https://doi.org/10.1002/jmv.25770>
5. Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. HLH Across Speciality Collaboration, UK Lancet; 395(10229): 1033-14. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
6. Rizwan K., Rasheed T., Khan S.A., Bilal M., Mahmood T. Current perspective on diagnosis, epidemiological assessment, prevention strategies, and potential therapeutic interventions for severe acute respiratory infections caused by 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Hum Vaccin Immunother*. 2020; 16(12): 3001-10. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1794684>
7. Prompetchara E., Ketloy C., Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2020; 38(1): 1–9. <https://doi.org/10.12932/AP-200220-0772>
8. Lu C.C., Chen M.Y., Lee W.S., et al. Potential therapeutic agents against COVID-19: What we know so far. *J Chin Med Assoc*. 2020; 83(6): 534–6. <https://doi.org/10.1097/JCMA.0000000000000318>
9. Kenneth E. Remy, Lyle L. Moldawer, Richard S. Hotchkiss JCI Insight. Severe immunosuppression and not a cytokine storm characterizes COVID-19 infections 2020. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.140329>
10. Pedersen S.F., Ho Y.C. SARS-CoV-2: a storm is raging. *J. Clin. Invest*. 2020; 130(5): 2202-5. <https://doi.org/10.1172/JCI137647>
11. Chen G., Wu D., Guo W., et al. Clinical and immunologic features in severe and moderate Coronavirus Disease 2019. *J. Clin. Invest*. 2020; 130(5): 2620-9. <https://doi.org/10.1172/JCI137244>
12. Wu C., Chen X., Cai Y., et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern. Med*. 2020. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.0994>
13. Gutmann C., Takov K., Burnap S.A., Singh B., Ali H., Theofilatos K., et al. SARS-CoV-2 RNAemia and proteomic trajectories inform prognostication in COVID-19 patients admitted to intensive care. *Nature Commun*. 2021; 12: 3406 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23494-1>
14. DeLong E.R., DeLong D.M., Clarke-Pearson D.L. Comparing the Areas under Two or More Correlated Receiver Operating Characteristic Curves: A Nonparametric Approach. *Biometrics*. 1988; 44(3): 837-45. <https://doi.org/10.2307/2531595>
15. Grigoriev S.G., Lobzin Y.V., Skripchenko N.V. The role and place of logistic regression and ROC analysis in solving medical diagnos-



- tic problems. *Zhurnal infektologii*. 2016; 8(4): 36-45. (in Russian). <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2016-8-4-36-45>
16. Hughes G., Kopetzky J., McRoberts N. Mutual Information as a Performance Measure for Binary Predictors Characterized by Both ROC Curve and PROC Curve Analysis. *Entropy* (Basel). 2020 Aug 26. 22(9): 938. <https://doi.org/10.3390/e22090938>
  17. Saad M, Lee IH. Leveraging hybrid biomarkers in clinical endpoint prediction. *BMC Med Inform Decis Mak*. 2020; 20(1): 255. <https://doi.org/10.1186/s12911-020-01262-3>
  18. Li M, Yang T, He R, Li A, Dang W, Liu X, Chen M. The Value of Inflammatory Biomarkers in Differentiating Asthma-COPD Overlap from COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2020; 15: 3025-37. <https://doi.org/10.2147/COPD.S273422>
  19. Hughes G. *Entropy* (Basel). On the Binormal Predictive Receiver Operating Characteristic Curve for the Joint Assessment of Positive and Negative Predictive Values. 2020; May 26. 22(6): 593. <https://doi.org/10.3390/e22060593>
  20. Brindisi G., De Vittori V., De Nola R., Di Mauro A., De Castro G., Baldassarre M. E., Cicinelli E., Cincicola B., Duse M., Zicari A. M. The Role of Nasal Nitric Oxide and Anterior Active Rhinomanometry in the Diagnosis of Allergic Rhinitis and Asthma: A Message for Pediatric Clinical Practice. *J Asthma Allergy*. 2021. 14. 265-74. <https://doi.org/10.2147/JAA.S275692>
  21. Hosmer S., Lemeshow S.L. *Applied Logistic Regression*. John Wiley & Sons, 2013.
  22. Fainzilberg L.S., Zhuk T.N. Guaranteed assessment of the effectiveness of diagnostic tests based on enhanced ROC analysis. *Upravlyayushhie sistemy i mashiny*. 2009; (5): 3-13. (in Russian)
  23. Kuznik B.I., Khavinson V.Kh., Linkova N.S. COVID-19: impact on immunity, hemostasis system and possible ways of correction. *Uspekhi fiziolicheskikh nauk*. 2020; 51 (4): 51-63. (in Russian). <https://doi.org/10.31857/S0301179820040037>
  24. Khavinson V., Linkova N., Dyatlova A., Kuznik B., Umnov R. Peptides: prospects for use in the treatment of COVID-19// *J Molecules*. Special Issue "Peptide Therapeutics 2.0". 2020; 25(10): 4389. <https://doi.org/10.3390/molecules25194389>
  25. Khavinson V.K., Kuznik B.I., Trofimova S.V., Volchkov V.A., Rukavishnikova S.A., Titova O.N., Magen, E. (2021). Results and prospects of using activator of hematopoietic stem cell differentiation in complex therapy for patients with COVID-19. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2021; 17: 285-90. <https://doi.org/10.1007/s12015-020-10087-6>
  26. Khavinson V.K., Kuznik B.I., Sturov V.G., Gladkiy P.A. The use of the drug Timalin® for respiratory diseases. Prospects for use in COVID-19. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2020; 9: 24-30. (in Russian)
  27. Khavinson V.K., Kuznik B.I. Complications in patients with COVID-19. Supposed correction mechanisms. *Klinicheskaya meditsina*. 2020; 4: 256-265. (in Russian). <https://doi.org/10.30629/0023-2149-2020-98-4-256-265>
  28. Lukyanov S.A., Kuznik B.I., Khavinson V.Kh. Use of Timalin to correct deviations in the immune status in COVID-19 (clinical case). *Vrach*. 2020; 31 (8): 74-82. (in Russian). <https://doi.org/10.29296/25877305-2020-08-12>
  29. Kuznik B.I., Morozov V.G., Khavinson V.K. *Cytomedins*. [Citomediny]. Sankt Peterburg; 1998.
  30. Khavinson V.Kh., Kuznik B.I., Ryzhak G.A. *Peptide geroprotectors are epigenetic regulators of the physiological functions of the body*. [Peptidnye geroprotektory – epigeneticheskie regulatory fiziologicheskikh funktsiy organizma]. Sankt Peterburg, 2014. (in Russian)
  31. Morozov V.G., Khavinson V.K., Malinin V.V. Peptide thymomimetics. [Peptidnye timomimetiki]. St. Petersburg: Science, 2000. (in Russian)
  32. Khavinson V.K., Kuznik B.I., Volchkov V.A., Rukavishnikova S.A., Titova O.N., Akhmedov T.A., et al. Influence of thymalin on adaptive immunity during complex therapy of patients with COVID-19. *Klinicheskaya meditsina*. 2020; 98(8): 593-9. (in Russian). <https://doi.org/10.30629/0023-2149-2020-98-8-593-599>
  33. Morozov V.G., Khavinson V.Kh. Isolation of polypeptides from the bone marrow, lymphocytes and thymus that regulate the processes of intercellular cooperation in the immune system. *Doklady Akademii nauk SSSR*. 1981; 261(1): 235-9. (in Russian)
  34. Khavinson V., Linkova N., Dyatlova A., Kuznik B., Umnov R. Peptides: prospects for use in the treatment of COVID-19. *J Molecules*. Special Issue "Peptide Therapeutics 2.0". 2020; 25(10): 4389. <https://doi.org/10.3390/molecules25194389>

#### Сведения об авторах:

**Кузник Борис Ильич**, доктор мед. наук, проф. каф. нормальной физиологии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: bi\_kuznik@mail.ru;  
**Смоляков Юрий Николаевич**, канд. мед. наук, доцент, зав. каф. медицинской физики и информатики ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: smolyakov@rambler.ru;

**Хавинсон Владимир Хацкелевич**, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, директор АННО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», руководитель научной группы пептидной регуляции старения Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, e-mail: vladimir@khavinson.ru;

**Шановалов Константин Геннадьевич**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: shkg26@mail.ru;

**Лукьянов Сергей Анатольевич**, канд. мед. наук, доцент каф. пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: lukyanov-sergei@mail.ru;

**Фефелова Елена Викторовна**, канд. мед. наук, доцент каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: fefelova.elena@mail.ru;

**Казанцева Людмила Сергеевна**, зав. отд-нием реанимации и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: mila-kazantseva93@mail.ru

© Коллектив авторов, 2021

УДК 577.214.5 + 616.155.321

Тишевская Н.В.<sup>1</sup>, Геворкян Н.М.<sup>2</sup>, Позина А.А.<sup>1</sup>

## Лиофилизированная форма ксеногенной суммарной РНК стимулирует гемопоэз при постлучевой миелосупрессии

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», 454092, Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», 119121, Москва, Россия, ул. Погодинская, 10, стр. 8

**Введение.** Аллогенная суммарная РНК, выделенная из клеток лимфоидных органов, стимулирует регенерацию кроветворной ткани после острого и хронического нарушения кроветворной функции. **Цель исследования:** 1) доказательство отсутствия ксеногенных ограничений механизмов лимфоцитарного контроля регенеративных процессов на примере гемостимулирующего действия суммарной РНК лимфоцитов бычьей селезенки в отношении кроветворения крыс, подвергшихся гамма-облучению в сублетальной дозе; 2) сравнительный анализ эффективности нативной и лиофилизированной форм указанной РНК.

**Методика.** Работа выполнена на белых нелинейных крысах-самцах массой 200-220 г. Суммарную РНК выделяли методом фенол – хлороформной экстракции из лимфоидных клеток бычьей селезенки. Для создания исходной миелосупрессии 30 крыс подвергли однократному общему воздействию гамма-излучения с источником <sup>60</sup>Co в дозе 6 Гр при мощности дозы 0,1 Гр/с, после чего разделили их на 3 равные группы. Через 2 ч после облучения крысам контрольной группы внутрибрюшинно ввели по 0,5 мл 0,9% NaCl; крысам 2-й группы – нативную суммарную РНК в дозе 30 мкг/100г массы, крысам 3-й группы – лиофилизированную суммарную РНК в аналогичной дозе. На 3-и, 7-е и 12-е сут в периферической крови определяли количество ретикулоцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, после чего крысы были выведены из эксперимента с целью исследования костномозгового кроветворения. Через 12 сут в костном мозге определяли количество эритроидных, лимфоидных, мегакариоцитарных и миелоидных клеток. Из костного мозга выделяли эритробластические островки (ЭО) и дифференцировали их на пролиферирующие (ЭО 1,2 классов и реконструирующиеся ЭО) и зрелые (ЭО 3 класса и инволюционирующие ЭО) морфо-функциональные клеточные ассоциации.

**Результаты.** Под влиянием ксеногенной суммарной РНК в периферической крови крыс в 2-3 раза увеличилось количество лейкоцитов и в 1,6-1,75 раза возросло число ретикулоцитов. В костном мозге увеличилось количество пролиферирующих миелоидных и лимфоидных элементов, а также общее число клеток эритроидного ряда. Ксеногенная суммарная РНК стимулировала образование ЭО как на основе контакта свободных костномозговых макрофагов с молодыми эритроидными клетками (ЭО 1 и 2 классов), так и на базе реконструкции (ЭО реконструирующиеся). Сравнительный анализ эффектов нативной и лиофилизированной суммарной РНК не выявил различий между гемопоэтическими показателями у крыс, получивших эти препаратов.

**Заключение.** Суммарная РНК, выделенная из лимфоидных клеток бычьей селезенки, активирует гемопоэз у крыс с постлучевой миелосупрессией, что свидетельствует об отсутствии ксеногенных ограничений у млекопитающих в механизмах лимфоцитарного контроля восстановительных процессов. Лиофилизированная суммарная РНК активирует костномозговое кроветворение в те же сроки и в том же объеме, что и нативная форма.

**Ключевые слова:** суммарная РНК; лимфоциты; гемопоэз; регенерация; гамма-облучение

**Для цитирования:** Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Позина А.А. Лиофилизированная форма ксеногенной суммарной РНК стимулирует гемопоэз при постлучевой миелосупрессии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): –.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**Для корреспонденции:** Геворкян Нина Михайловна, e-mail: gevorkiann@yandex.ru

**Участие авторов:** дизайн исследования и выделение препаратов РНК – Геворкян Н.М.; проведение экспериментов на животных и статистическая обработка полученных данных – Тишевская Н.В., Позина А.А.; обсуждение полученных данных, написание текста, редактирование – Тишевская Н.В., Геворкян Н.М.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы по теме «Создание клеточных моделей молекулярных процессов в органах и тканях»

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.01.2021

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021

Tishevskaya N.V.<sup>1</sup>, Gevorkyan N.M.<sup>2</sup>, Pozina A.A.<sup>1</sup>

## A lyophilized form of xenogeneic total RNA stimulates hematopoiesis in post-radiation myelosuppression

<sup>1</sup>South Ural State Medical University, Russia, Vorovskogo St. 64, Chelyabinsk 454092, Russian Federation;<sup>2</sup>V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya St.,10, Moscow 119121, Russian Federation

**Introduction.** Allogeneic total RNA isolated from cells of lymphoid organs stimulates regeneration of hematopoietic tissue after acute and chronic disturbance of hematopoietic function. **Aim.** 1) To prove the absence of xenogeneic limitation for the lymphocytic regulation of regenerative processes using an example of the hemo-stimulating effect of total RNA from bovine spleen lymphocytes on hematopoiesis in rats exposed to sublethal gamma-irradiation; 2) To perform a comparative analysis of the effectiveness of the native and lyophilized forms of the total RNA.

**Methods.** Experiments were performed on white outbred male rats weighing 200-220 g. Total RNA was isolated from bovine spleen lymphoid cells by phenol-chloroform extraction. To create the initial myelosuppression, 30 rats were exposed to a single general <sup>60</sup>Co gamma radiation (6 Gy at 0.1 Gy/s). The rats were then divided into 3 equal groups. Two hrs after irradiation, the rats of the control group were injected intraperitoneally with 0.5 ml of 0.9% NaCl; rats of the second group received native total RNA, 30 µg/100 g body weight, and rats of the third group received lyophilized total RNA at a similar dose. On days 3, 7, and 12, the number of peripheral blood reticulocytes, leukocytes, and platelets was measured. The rats were then sacrificed, and bone marrow hematopoiesis was studied. After 12 days, the number of bone marrow erythroid, lymphoid, megakaryocytic, and myeloid cells was measured. Erythroblastic islets (EIs) were isolated from the bone marrow and differentiated into proliferating (class 1 and 2 EIs and reconstructing EIs) and mature (class 3 EIs and involving EIs) morpho-functional cell associations.

**Results.** Under the influence of xenogeneic total RNA, the number of peripheral blood leukocytes increased by 2-3 times, and the number of reticulocytes increased by 1.6-1.75 times. In the bone marrow, the number of proliferating myeloid and lymphoid cells increased, as did the total number of erythroid cells. Xenogeneic total RNA stimulated formation of EIs, based both on the contact of free bone marrow macrophages with young erythroid cells (class 1 and 2 EIs) and on reconstruction (reconstructing EIs). Comparative analysis of the effects of native and lyophilized total RNA did not reveal differences between hematopoietic parameters in rats that received these agents.

**Conclusion.** Total RNA isolated from bovine spleen lymphoid cells activates hematopoiesis in rats with post-radiation myelosuppression. This indicates the absence of mammalian xenogenic limitation of lymphocytic control of recovery processes. Lyophilized total RNA activates bone marrow hematopoiesis at the same rate and to the same extent as the native form.

**Keywords:** total RNA; lymphocytes; hematopoiesis; regeneration; gamma irradiation

**For citation:** Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Pozina A.A. A lyophilized form of xenogeneic total RNA stimulates hematopoiesis in post-radiation myelosuppression. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(4): -. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**For correspondence:** *Nina M. Gevorkyan*, Researcher, Laboratory for Protein Biosynthesis of «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of Biomedical Chemistry», e-mail: gevorkiann@yandex.ru

**Contribution:** Study design and isolation of RNA preparations – Gevorkyan N.M.; conducting experiments on animals and statistical processing of the data obtained – Tishevskaya N.V., Pozina A.A.; discussion of the received data, writing text, editing – Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M.

**Financing.** The study had no sponsorship. This work was carried out in the framework of the Program of fundamental scientific research of state academies of sciences for 2013-2020 «Creation of cellular models of molecular processes in organs and tissues».

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Information about the authors:**

Gevorkyan N.M., <https://orcid.org/0000-0002-0386-4010>

Tishevskaya N.V., <https://orcid.org/0000-0002-4912-3111>

Received 09.01.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

### Введение

Ранее нами было показано, что аллогенная суммарная РНК, выделенная из клеток лимфоидных органов, стимулирует регенерацию кроветворной ткани после острого повреждения у облученных животных [1] и при

хроническом угнетении кроветворения [2]. При изучении ксеногенных эффектов было установлено, что РНК лимфоцитов человека активирует все ростки кроветворения у крыс с токсической апластической анемией [3]. Целью настоящего исследования явилось изучение действия суммарной РНК лимфоцитов бычьей селезенки

на гемопоэз крыс, подвергшихся гамма-облучению в сублетальной дозе, а также сравнение эффективности нативной и лиофилизированной форм указанной РНК.

**Методика**

Работа выполнена на 30 белых нелинейных крысах-самцах массой 200-220 г. Эксперименты с животными, содержащимися в стандартных условиях вивария, на стандартном рационе и при свободном доступе к воде, проводили в соответствии с Национальным стандартом РФ «Принципы надлежащей лабораторной практики». Суммарную РНК выделяли методом фенол – хлороформной экстракции из лимфоидных клеток бычьей селезенки. Для создания исходной миелосупрессии всех подопытных животных подвергали однократному общему воздействию гамма-излучения с источником <sup>60</sup>Co на установке Theratron Elite 80 (MDS Nordion, Канада) в дозе 6 Гр при мощности дозы 0,1 Гр/с. Облученных крыс разделили на 3 группы (по 10 крыс в каждой группе). Через 2 ч после облучения крысам контрольной группы внутривенно вводили по 0,5 мл 0,9% NaCl; крысам группы «РНКн» – нативную суммарную РНК, разведенную в 0,5 мл 0,9% NaCl (доза РНК 30 мкг/100г массы), крысам группы «РНКл» – лиофилизированную суммарную РНК, растворенную в 0,5 мл стерильного 0,9% NaCl (доза РНК 30 мкг/100г мас-

сы). На 3-и, 7-е и 12-е сут в периферической крови облученных крыс определяли количество ретикулоцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, после чего животные были выведены из эксперимента с целью исследования костномозгового кроветворения. В мазках костного мозга, окрашенных по Романовскому-Гимза, определяли количество эритроидных, лимфоидных, мегакариоцитарных и разных форм миелоидных клеток. Для детальной характеристики центрального звена эритрона [4] из костного мозга выделяли эритробластические островки (ЭО) (erythroblastic islets, EIs), оценивая их состояние методами, разработанными в лаборатории культур тканей костного мозга Южно-Уральского медицинского университета [5,6]. ЭО дифференцировали на пролиферирующие (ЭО 1,2 классов и реконструирующиеся ЭО) и зрелые (ЭО 3 класса и инволюцирующие ЭО) морфо-функциональные клеточные ассоциации [7, 8]. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью компьютерной программы IBM SPSS Statistics 19,0. Сравнения групп проводились с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни и хи-квадрат, различия считались значимыми при *p*<0,05.

**Результаты**

Под влиянием ксеногенной суммарной РНК в периферической крови крыс (табл. 1) в 2-3 раза увеличи-

Таблица 1/ Table 1

**Влияние нативной (РНКн) и лиофилизированной (РНКл) форм ксеногенной суммарной РНК на показатели периферической крови у облученных крыс**

**Influence of native (RNA<sub>n</sub>) and lyophilized (RNA<sub>l</sub>) forms xenogeneic total RNA on peripheral blood parameters in irradiated rats**

Группы Groups	Ретикулоциты Reticulocytes (x 10 <sup>9</sup> /л)	Лейкоциты Leukocytes (x 10 <sup>9</sup> /л)	Тромбоциты Thrombocytes (x 10 <sup>9</sup> /л)
3-и сутки (day)			
Контроль Control	0,8±0,3	0,01±0,01	93,8±18,3
РНКн (RNA <sub>n</sub> )	1,0±0,4	0,03±0,02	101,8±15,2
РНКл (RNA <sub>l</sub> )	1,2±0,5	0,02±0,01	94,2±9,5
7-е сутки (day)			
Контроль Control	2,4±0,5	0,08±0,01	112,4±8,6
РНКн (RNA <sub>n</sub> )	3,6±0,8	0,20±0,05*	116,4±12,9
РНКл (RNA <sub>l</sub> )	3,4±0,7	0,26±0,03*	103,0±8,8
12-е сутки (day)			
Контроль Control	5,6±0,7	0,77±0,06	115,0±8,9
РНКн (RNA <sub>n</sub> )	9,8±0,6*	1,12±0,1*	123,0±9,9
РНКл (RNA <sub>l</sub> )	8,8±0,7*	1,06±0,05*	109,6±6,8

**Примечание.** 1) \* – статистическая значимость различий по отношению к контрольной группе; 2) между опытными группами РНКн и РНКл значимых различий не выявлено.

**Note.** 1) means the reliability of differences in relation to the control group; 2) no significant differences were found between the experimental groups of RNA<sub>n</sub> and RNA<sub>l</sub>).

Таблица 2/ Table 2

**Влияние нативной (РНКн) и лиофилизированной (РНКл) форм ксеногенной суммарной РНК на показатели миелограммы у облученных крыс**

**Influence of native (RNA<sub>n</sub>) and lyophilized (RNA<sub>l</sub>) forms xenogeneic total RNA on effect on myelogram indices in irradiated rats**

% Клеток (% of cells)	Контроль (Control)	РНКн (RNA <sub>n</sub> )	РНКл (RNA <sub>l</sub> )
Миелобласты Myeloblasts	0	0,2±0,05*	0,1±0,03*
Промиелоциты Promyeloblasts	0	1,6±0,04*	1,8±0,2*
Миелоциты Myelocytes	1,1±0,2	3,1±0,1*	3,3±0,2*
Метамиелоциты Metamyelocytes	2,1±0,3	5,3±0,2*	4,9±0,1
Палочкоядерные нейтрофилы Rod neutrophils	30,2±0,9	18,6±0,7*	19,2±1,2*
Сегментоядерные нейтрофилы Segmented neutrophils	31,5±0,5	21,9±0,3*	21,3±0,8*
Эозинофилы Eosinophils	7,4±0,3	7,8±0,5	6,9±0,4
Базофилы Basophils	1,7±0,2	1,3±0,4	1,4±0,2
Лимфоидные клетки Lymphoid cells	0,2±0,05	9,5±0,4*	9,2±0,3*
Клетки эритроидного ряда (Erythroid cells)	25,3±0,6	32,6±0,8*	32±0,6*

**Примечания.** 1) \* – статистическая значимость различий по отношению к контрольной группе 2) между опытными группами РНКн и РНКл значимых различий не выявлено.

**Note.** 1) means the reliability of differences in relation to the control group; 2) no significant differences were found between the experimental groups of RNA<sub>n</sub> and RNA<sub>l</sub>.

Таблица 1/ Table 1

**Влияние нативной (РНКн) и лиофилизированной (РНКл) форм ксеногенной суммарной РНК на показатели периферической крови у облученных крыс**

**Influence of native (RNA<sub>n</sub>) and lyophilized (RNA<sub>l</sub>) forms xenogeneic total RNA on peripheral blood parameters in irradiated rats**

Группы Groups	Ретикулоциты Reticulocytes (x 10 <sup>9</sup> /л)	Лейкоциты Leukocytes (x 10 <sup>9</sup> /л)	Тромбоциты Thrombocytes (x 10 <sup>9</sup> /л)
3-и сутки (day)			
Контроль Control	0,8±0,3	0,01±0,01	93,8±18,3
РНКн (RNA <sub>n</sub> )	1,0±0,4	0,03±0,02	101,8±15,2
РНКл (RNA <sub>l</sub> )	1,2±0,5	0,02±0,01	94,2±9,5
7-е сутки (day)			
Контроль Control	2,4±0,5	0,08±0,01	112,4±8,6
РНКн (RNA <sub>n</sub> )	3,6±0,8	0,20±0,05*	116,4±12,9
РНКл (RNA <sub>l</sub> )	3,4±0,7	0,26±0,03*	103,0±8,8
12-е сутки (day)			
Контроль Control	5,6±0,7	0,77±0,06	115,0±8,9
РНКн (RNA <sub>n</sub> )	9,8±0,6*	1,12±0,1*	123,0±9,9
РНКл (RNA <sub>l</sub> )	8,8±0,7*	1,06±0,05*	109,6±6,8

**Примечание.** 1) \* – статистическая значимость различий по отношению к контрольной группе; 2) между опытными группами РНКн и РНКл значимых различий не выявлено.

**Note.** 1) means the reliability of differences in relation to the control group; 2) no significant differences were found between the experimental groups of RNA<sub>n</sub> and RNA<sub>l</sub>).

лось количество лейкоцитов и в 1,6-1,75 раза возросло число ретикулоцитов. В костном мозге (табл. 2) наблюдались увеличение количества пролиферирующих миелоидных и лимфоидных элементов, а также рост общего числа клеток эритроидного ряда. При углубленном изучении состояния костномозгового эритропоэза было установлено (табл. 3), что ксеногенная суммарная РНК стимулирует образование ЕIs как на основе контакта свободных костномозговых макрофагов с молодыми эритроидными клетками (ЭО 1 и 2 классов), так и на основе процесса реконструкции (ЭО реконструирующиеся). При сравнительном анализе эффектов нативной и лиофилизированной суммарной РНК были получены данные об отсутствии различий между используемыми формами введенных животным препаратов.

### Заключение

Суммарная РНК, выделенная из лимфоидных клеток бычьей селезенки, активирует гемопоэз у крыс с постлучевой миелосупрессией, что свидетельствует об отсутствии ксеногенных ограничений у млекопитающих в известных механизмах лимфоцитарного контроля восстановительных процессов [9, 10]. Лиофилизированная форма препарата суммарной РНК активирует костномозговое кроветворение в те же сроки и в том же объеме, что и нативная форма.

### Литература

1. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Захаров Ю.М. Коррекция постлучевых нарушений эритропоэза суммарной РНК клеток костного мозга и тимуса. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2017; 57(4): 384-90.
2. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Сравнительный анализ гемопоэтической активности суммарной РНК костного мозга и лимфоидных клеток селезенки при хронической бензолной анемии у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(2): 56-64.
3. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Головкина Л.Л., Муратова Ю.О., Рагимов А.А. О гемопоэтических свойствах рибонуклеиновой кислоты лимфоцитов периферической крови больных истинной полицитемией и здоровых доноров. *Онкогематология*. 2015; 10(2): 58-62.
4. Харченко М.Ф., Корнилова Н.В., Захаров Ю.М., Битюкова Е.С. Гликозаминогликаны эритробластических островков костного мозга крыс. *Физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 1994; 80(11): 32-6.
5. Тишевская Н.В., Шевяков С.А., Захаров Ю.М. Влияние гуморальных факторов на фагоцитарную активность центральных макрофагов в культуре эритробластических островков. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2002; 88(9): 1191-8.

### Сведения об авторах:

**Тишевская Наталья Викторовна**, доктор мед. наук, проф. каф. нормальной физиологии им. акад. Ю.М. Захарова ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»;

**Геворкян Нина Михайловна**, науч. сотр. лаб. биосинтеза белков, ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича» РАН, e-mail: gevorkiann@yandex.ru;

**Позина Анастасия Александровна**, студентка 6 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет».

6. Тишевская Н.В., Шевяков С.А., Захаров Ю.М. Влияние эритропоэтина и макрофагального колониестимулирующего фактора на пролиферативную активность эритроидных клеток в культуре эритробластических островков. *Медицинский академический журнал*. 2003; 3(3): 67-72.
7. Волчегорский И.А., Тишевская Н.В., Дементьева Е.В. Антианемическое действие реамберина в остром периоде аллоксанового диабета у крыс. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2008; 71(6): 23-7.
8. Тишевская Н.В., Болотов А.А., Захаров Ю.М. Математическое моделирование межклеточных взаимодействий в культуре эритробластических островков. *Медицинский академический журнал*. 2005; 5(4): 50-9.
9. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Современный взгляд на роль Т-лимфоцитов в регуляции эритропоэза. *Успехи современной биологии*. 2016; 136(1): 83-96.
10. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Роль лимфоцитарных РНК в межклеточном информационном обмене и регуляции регенеративных процессов. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2016; 102(11): 1280-301.

### References

1. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Zakharov Y.M. Correction of radiation damage of erythropoiesis using bone marrow and thymus total RNA. *Radiation biology. Radioecology*. 2017; 57(4): 384-90. (In Russian)
2. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. Comparative analysis of hematopoietic activity of total RNA from bone marrow cells and splenocytes of rats with chronic benzene-induced anemia. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2019; 63(2): 56-64.
3. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Golovkina L.L., Muratova Ju.O., Ragimov A.A. On the hematopoietic properties of ribonucleic acid of peripheral blood lymphocytes in patients with true polycythemia and healthy donors. *Onkogematologiya*. 2015; 10(2): 58-62. (In Russian)
4. Kharchenko M.F., Kornilova N.V., Zakharov Yu.M., Bitjukova E.S. Glycosaminoglycans of rat bone marrow erythroblastic islets. *Physiological journal im. Sechenova*. 1994; 80(11): 32-6. (In Russian)
5. Tishevskaya N.V., Shevyakov S.A., Zakharov Yu. M. The effect of humoral factors on phagocytic activity of central macrophages in the erythroblastic islets culture. *Rossiyskiy fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2002; 88(9): 1191-8. (In Russian)
6. Tishevskaya N.V., Shevyakov S.A., Zakharov Yu.M. The effect of erythropoietin and macrophage colony stimulating factor on the proliferative activity of erythroid cells in erythroblastic islets cultures. *Meditsinskiy akademicheskii zhurnal*. 2003; 3(3): 67-72. (In Russian)
7. Volchegorskii I.A., Tishevskaya N.V., Dement'eva E.V. Antianemic effect of reamberin in rats with acute alloxan-induced diabetes. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2008; 71(6): 23-7. (In Russian)
8. Tishevskaya N.V., Bolotov A.A., Zakharov Yu.M. Mathematical modeling of intercellular interactions in the erythroblastic islets culture. *Meditsinskiy akademicheskii zhurnal*. 2005; 5(4): 50-9. (In Russian)
9. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. A modern view of the role of T-lymphocytes in regulation of erythropoiesis. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2016; 136(1): 83-96. (In Russian)
10. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. The role of lymphocytic RNA in intercellular information exchange and regulation of regenerative processes. *Rossiyskiy fiziologicheskii Zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2016; 102(11): 1280-301. (In Russian)

© Коллектив авторов, 2021

УДК 612.115.3-612.115.064

Успенская М.С., Ляпина М.Г., Калугина М.Д.

## Влияние на антикоагулянтную активность и степень полимеризации фибрина экстрактов из нового пиона «Иван Горожанкин» и пиона «молочноцветковый» в сравнительном аспекте

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

119234, Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

**Введение.** Актуальность темы исследования обусловлена проблемой борьбы с тромбозами и тромбоэмболиями безопасными для организма методами. Во многих растениях обнаружены антикоагулянты разной природы (гепариноподобные, пептиды).

**Цель исследования** – изучение возможности проявления синергических эффектов на антикоагулянтную и фибринолитическую активность крови и процессы полимеризации фибрина экстракта из корней пиона «Иван Горожанкин» в сравнительном аспекте с действием экстракта из корней пиона «молочноцветковый».

**Методика.** Объектом исследования служили корни пионов «Иван Горожанкин» и «молочноцветковый», произрастающих в Ботаническом саду МГУ. Пион «Иван Горожанкин» был создан скрещиванием пиона «молочноцветкового» и «лекарственного». Разработаны методы получения экстрактов из корней различных пионов. При различных разведениях экстрактов (0,1, 1, 5%) определены антикоагулянтная активность по тестам, характеризующим внутренний, внешний и общий пути свертывания крови, а также степень полимеризации фибрина плазмы крови крыс. Для сравнения был использован стандартный препарат низкомолекулярного гепарина (LMWH) животного происхождения фирмы «Celsus» (США). Проведены выделение и очистка активного начала (гепариноидов) из сухих препаратов и измерены их активности.

**Результаты.** Показано, что экстракты из обоих препаратов пионов обладали антикоагулянтной и суммарной фибринолитической активностью на нестабилизированном фибрине, но в разной степени. В экстрактах из корней пиона «Иван Горожанкин» отмечались преимущественные синергические эффекты, а именно превышение антикоагулянтной активности на 20-30%, суммарной фибринолитической – на 40% по сравнению с таковыми, отмечаемыми в экстрактах из корней пиона «молочноцветковый». Подобные результаты выявлены и при изучении степени полимеризации фибрина под влиянием очищенных препаратов из пионов. Рассмотрены возможные механизмы активирующего действия экстракта из пиона «Иван Горожанкин» на антикоагулянтные свойства плазмы, суммарную фибринолитическую активность и степень полимеризации фибрина. Это связано с блокадой активности тромбина и факторов внутреннего механизма свертывания крови. При этом антикоагулянтный эффект от применения экстракта из пиона «Иван Горожанкин» по тесту АРТТ (activated partial thromboplastin time) превышал на 20-30% ту же активность, выявленную у пиона «молочноцветковый», которая соответствовала антикоагулянтной активности препарата сравнения LMWH. В экстракте из пиона «Иван Горожанкин» впервые обнаружено наличие антикоагулянтного гепариноподобного вещества.

**Заключение.** Впервые установлена способность экстракта из корней пиона «Иван Горожанкин» проявлять синергические антикоагулянтные и фибриндеполимеризационные эффекты, превышающие таковые у экстракта из пиона «молочноцветковый». На основе полученных данных возникает необходимость исследования пиона «Иван Горожанкин» в качестве антитромботического, а возможно, и антиатеросклеротического агента.

**Ключевые слова:** экстракт пиона; система гемостаза; тромбоз; антикоагулянт; гепариноид; синергические эффекты

**Для цитирования:** Успенская М.С., Ляпина М.Г., Калугина М.Д. Влияние на антикоагулянтную активность и степень полимеризации фибрина экстрактов из нового пиона «Иван Горожанкин» и пиона «молочноцветковый» в сравнительном аспекте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): –. DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**Для корреспонденции:** Успенская Марианна Сергеевна, e-mail: lyapinal@mail.ru

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Успенская М.С.; написание текста – Ляпина М.Г.; редактирование – Калугина М.Д.; определение параметров крови – Ляпина М.Г., Калугина М.Д. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.12.2020

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021

Uspenskaya M.S., Lyapina M.G., Kalugina M.D.

**Comparative effects on anticoagulant activity and degree of fibrin polymerization of extracts from the new peony «Ivan Gorozhankin» and «*Paeonia lactiflora*»**

M.V. Lomonosov Moscow State University,  
Leninskie Gory 1, Bld. 12, Moscow 119234, Russian Federation

**Introduction.** The research topic is relevant due to the problem of safely combating thrombosis and thromboembolism. Anticoagulants of various kinds, e.g., heparin-like and peptides, have been found in many plants. **Aim.** To investigate the possibility of synergistic effects on the blood anticoagulant and fibrinolytic activity and on processes of fibrin polymerization by an extract from the roots of the "Ivan Gorozhankin" peony compared with the root extract from "*Paeonia lactiflora*".

**Methods.** The focus of the study was the roots of the "Ivan Gorozhankin" peony and the *Paeonia lactiflora* growing in the Botanical Garden of the Moscow State University. The "Ivan Gorozhankin" peony was created by crossing *P. lactiflora* and the "medicinal" peony. Methods for obtaining extracts from the roots of various peonies have been developed. In 1%, 3%, and 5% dilutions of the extracts, the anticoagulant activity was determined according to tests characterizing the internal, external and general blood coagulation pathways, as well as by the degree of polymerization of rat blood plasma fibrin. For comparison, we used a standard preparation of low molecular weight heparin (LMWH) of animal origin (Celsus, USA). Isolation and purification of the active substances, heparinoids, were isolated from dry preparations and purified, and their activities were measured.

**Results.** Extracts from both peony preparations had anticoagulant and total fibrinolytic activity on unstabilized fibrin, but to different extents. In the extracts from the roots of the "Ivan Gorozhankin" peony, preferential synergistic effects were noted, namely, the anticoagulant activity was higher by 20-30%, and the total fibrinolytic activity was higher by 40% compared to those of extracts from *Paeonia lactiflora* roots. Similar results were obtained when studying the degree of fibrin polymerization as influenced by purified peony preparations. Possible mechanisms of the activating action of the "Ivan Gorozhankin" peony extract on the anticoagulant properties of plasma, the total fibrinolytic activity, and the degree of fibrin polymerization are considered. This action is due to the inhibition of thrombin activity and factors of the internal mechanism of blood coagulation. According to the activated partial thromboplastin time (APTT) test, the anticoagulant effect of extracts from the "Ivan Gorozhankin" peony exceeded by 20-30% the activity of *Paeonia lactiflora* extract, which corresponded to the anticoagulant activity of the LMWH comparator drug. Using the described biochemical methods, the presence of an anticoagulant heparin-like substance in an extract from the peony "Ivan Gorozhankin" has been discovered.

**Conclusion.** For the first time, the ability of an extract from the roots of the «Ivan Gorozhankin» peony to exhibit synergistic anticoagulant and fibrin-depolymerization effects was demonstrated. These effects exceeded those of the *Paeonia lactiflora* extract. Based on these data, it appears necessary to study the "Ivan Gorozhankin" peony as an antithrombotic, and possibly as an anti-atherosclerotic agent.

**Keywords:** peony extract; hemostasis system; thrombosis; anticoagulant; heparinoid; synergistic effects

**For citation:** Uspenskaya M.S., Lyapina M.G., Kalugina M.D. Comparative effects on anticoagulant activity and degree of fibrin polymerization of extracts from the new peony «Ivan Gorozhankin» and "*Paeonia lactiflora*". *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy Journal)*. 2021; 65(4): -. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**For correspondence:** *Marianna S. Uspenskaya*, cand. of Biol. Scien., senior scientific researcher Ph.D. in Biology, Principal Researcher Botanical Garden of M.V. Lomonosov Moscow State University, e-mail: lyapinal@mail.ru

**Contribution:** concept and design of the study – Uspenskaya M.S.; writing of the text – Lyapina M.G.; editing – Kalugina M.D.; determination of blood parameters – Lyapina M.G., Kalugina M.D. Approval of the final version of the article – all authors.

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

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

Received 20.12.2020

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

## Введение

Нормальный гемостаз обеспечивается регуляторными взаимоотношениями свертывающей и противосвертывающей систем крови [1]. В случае нарушения этих взаимоотношений возможно возникновение тромботических осложнений. Для борьбы с ними

в настоящее время используются новые оральные антикоагулянты непрямого действия [2], которые по скорости действия уступают прямым низкомолекулярным гепаринам (LMWH). В то же время препараты LMWH относительно безопасны и не вызывают кровоточивости [3]. Получают эти препараты или путем деполиме-



ризации высокомолекулярного гепарина животного происхождения, или непосредственно из тканей животных (свиней, крупного рогатого скота). Отмечается, что LMWH проявляет значительную антитромботическую активность. Обычно эти препараты применяют подкожно или внутривенно [4]. Значительный интерес представляет поиск пероральных препаратов растительной природы. Известно, что многие растения служат источником лекарственного сырья для получения антикоагулянтов, фибринолитиков и тромболитиков [5-8].

Некоторые растения содержат компоненты, являющиеся составной частью гепарина и других гликозаминогликанов [9, 10]. Из коры березы был получен антикоагулянт гепариновой природы, который ингибировал активность фактора Ха и тромбина [11]. В корнях травянистых пионов также обнаружено гепариноподобное вещество, оказывающее антикоагулянтное действие в исследованиях *in vitro* и при внутривенном введении животным [12]. На современном уровне борьбы с Covid-19 препаратам LMWH отводится особая роль, поскольку они активно применяются при этом заболевании. Разработка препаратов LMWH разной природы без побочных отрицательных эффектов приобретает в настоящее время значение особой актуальности.

Цель работы – изучение возможности проявления синергических эффектов на антикоагулянтную и фибринолитическую активность крови и процессы полимеризации фибрина экстракта из корней пиона «Иван Горожанкин» в сравнительном аспекте с действием экстракта из корней пиона «молочноцветковый».

### Методика

Использованы крысы-самцы Wistar массой 220-250 г выращенные в питомнике станции «Столбовая» Московской области. До начала экспериментов и в период проведения опытов животные находились на стандартном лабораторном рационе и содержались в условиях вивария биологического факультета МГУ при свободном доступе к воде и пище с соблюдением 12-часового светового режима дня. Все эксперименты осуществлялись в соответствии с этическими принципами и документами, соответствующими требованиям Директивы ЕС 2010/63/ЕС (используется в научных целях с 1 января 2013 г.) для экспериментов на животных. Исследование одобрено локальным Комитетом по этике биомедицинских исследований Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (протокол № 97а от 30 октября 2019 г.).

В качестве препаратов использовали экстракты из травянистых пионов «Иван Горожанкин», который

был получен в результате скрещивания «*Paeonia peregrina* Mill» (лекарственного) с «*Paeonia lactiflora* Pall» (молочноцветковый), Корни пионов (*lactiflora* и *Горожанкин*) были получены из экологически чистых растений, произрастающих в Ботаническом саду МГУ (Москва, Россия). Виды пионов определяли сотрудники Ботанического сада МГУ под руководством М.С. Успенской. Сырье заготавливали в осенний период (с конца августа до середины октября) и хранили при температуре +3-5 °С. Для экспериментов готовили исходный 5%-й экстракт из сухих чистых корней, которые растирали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния. В экстракте определяли наличие гепариноподобных компонентов (ГП) [12] с использованием фотоэлектроколориметрического метода при применении Азура А (красителя на гепарин) и протаминсульфата (ингибитора гепарина). ГП из обоих видов пионов растворяли в физиологическом растворе натрия хлорида (по 0,5 мг в 0,5 мл NaCl), подобные образцы содержали от 37,5 МЕ до 40 МЕ гепарина. Далее экстракты, содержащие ГП, разводили в 5 и 50 раз, и исследовали на наличие антикоагулянтно-фибринолитической активности и изменение степени полимеризации фибрина. Препаратом сравнения служил LMWH фирмы «Celsus» (США). Для проведения исследований кровь у крыс брали из яремной вены (*vena jugularis*). Использовали анестезию телазолом (общепринятый метод для взятия крови у животных). В качестве консерванта использовали 3,8% цитрат натрия в соотношении 9:1. Для получения бедной тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали при 3000 g в течение 10-12 мин.

Проведено 2 серии экспериментов В 1-й серии исследовали экстракты растений в одинаковых концентрациях (5, 1 и 0.1%). Во 2-й серии производили выделение и очистку гепариноидов из сухих препаратов по методу М.Г. Ляпиной [12]. К плазме крови (0.2 мл) добавляли по 0.05 мл экстрактов каждого разведения (1-я серия), или в том же объеме растворы очищенных препаратов ГП (2-я серия). Пробы инкубировали в течение 10-12 мин при 37 °С, после чего их использовали для проведения анализов. По каждому разведенному образцу плазмы с экстрактами или очищенными препаратами ГП делали от 5 до 7 повторов.

Для характеристики параметров фибринолитического звена противосвертывающей системы (ПСС) крови готовили пластины нестабилизированного фактором XIIIa фибрина, характеризующиеся наличием непрочных водородных связей в растворимом фибрин-полимере. В плазме крови определяли следующие биохимические параметры гемостаза: на нестабилизированных фибриновых пластинах – суммар-

ную фибринолитическую активность (SFA), включающую активность комплексов гепарина с компонентами плазмы крови и активность плазмينا; степень полимеризации под влиянием препаратов измеряли в тесте фибриндеполимеризационной активности (FDPA), отражающей процессы деполимеризации фибрина; Об антикоагулянтной активности плазмы судили по увеличению времени свертывания в тестах активированного частичного тромбoplastинового времени (АРТТ), характеризующему внутренний механизм свертывания крови, протромбинового времени (РТ), относящегося к внешнему пути свертывания, и тромбинового времени (ТТ), отражающему общий путь свертывания крови. Кроме того, проводили измерение концентрации фибриногена [1].

Статистический анализ данных осуществляли, используя пакет статистических программ Statistica 8 (StatSoft Inc., США), а также графических программ Microsoft Excel. Эмпирические распределения проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для полярного сравнения независимых групп применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

### Результаты

Как видно из **таблицы 1**, при разных разведениях экстрактов из корней пионов «Иван Горожанкин» (ЭПГ) или «молочноцветковый» (ЭПМ) отмечается увеличение параметров АРТТ, ТТ и РТ по сравнению с контролем, где вместо экстрактов к плазме крови был добавлен физиологический раствор NaCl. При сравнении действия обоих экстрактов выявлен наибольший антикоагулянтный эффект у ЭПГ. При этом АРТТ увеличивалось на 19-25-46% под влиянием ЭПМ и на 26-55-66% при действии ЭПГ, РТ – на 13-30-42% (ЭПГ) и на 13-19-22% (ЭПМ) соответственно, а ТТ соответственно – на 17-19-20% (ЭПГ) и 17-16% (ЭПМ).

SFA увеличилась на 41-53-70% (ЭПГ), а при действии ЭПМ в разных концентрациях только на 12-18%. Особый интерес представляет изменение степени полимеризации фибрина по тесту FDPA, которая по сравнению с контролем повышалась при действии каждого из экстрактов на 50-116% с максимальными значениями после действия ЭПГ. Концентрация фибриногена в обоих случаях не имела статистически значимых изменений, хотя следует отметить тенденцию к снижению, особенно при действии ЭПГ.

Итак, максимальные изменения после воздействия экстрактов из пионов по сравнению с контролем отмечались у пиона «Иван Горожанкин». Значительные от-

личия от контроля в этих условиях обнаружены по активности FDPA, которая также существенно превысила контрольный уровень (**табл. 1**).

Вторая серия экспериментов предусматривала выделение из экстрактов очищенного гепариноподобного компонента и определение его антикоагулянтной активности по тестам АРТТ, ТТ и FDPA (**табл. 2**). Выделение ГП осуществляли из 5%-ных экстрактов корней пионов, при этом содержание ГП в них составляло от 37.5 до 40 мкг//мл. Готовили раствор коммерческого препарата, содержащего 40 мкг в мл физиологического раствора.

У гепариноидов из пионов (ГПГ, ГПМ) была увеличена антикоагулянтная активность по тесту АРТТ и незначительно по тесту ТТ с максимальными показателями у ГПГ. Препарат сравнения повышал АРТТ, но не изменял ТТ, что характерно для LMWH. Однако, в препарате ГПГ все же отмечается тенденция к снижению ТТ, что указывает на ингибирование тромбина этим препаратом, видимо, за счет дополнительных компонентов, которые подлежат дальнейшему изучению. Это же можно сказать и в отношении влияния препаратов на степень полимеризации фибрина: стандартный коммерческий LNWH ее не изменял, в то время как исследуемые растительные гепариноиды снижали степень полимеризации фибрина, обладая достаточной фибриндеполимеризационной активностью.

### Обсуждение результатов

Анализируя полученные результаты, необходимо отметить, что экстракт из корней пиона молочноцветкового, как и LMWH [13], оказывает не только антикоагулянтный эффект, но и фибриндеполимеризационное действие. По данным литературы при действии других растительных антикоагулянтов [14] выявлено их фибринолитическое действие. Нами впервые установлен факт, что растительный гепариноид из пиона «Иван Горожанкин» препятствует полимеризации фибрина, вследствие чего увеличивается его FDPA в плазме крови более чем на 50-60%. Ранее [15] сообщалось об ограничении взаимодействия тромбина с фибриногеном под влиянием ингибиторов растительного происхождения, что мы и наблюдали в наших исследованиях. Возможными механизмами активирующего действия экстракта из пиона «Иван Горожанкин» на антикоагулянтные свойства плазмы и суммарную фибринолитическую активность является блокада активности фермента тромбина и факторов внутреннего механизма свертывания крови. При этом антикоагулянтный эффект по тесту АРТТ при применении экстракта из корней пиона «Иван Горожанкина» превышал

на 20–30% ту же активность у пиона *молочноцветкового*. Экстракт из корней пиона *молочноцветкового* был равноценен по антикоагулянтной активности препарату сравнения LMWH. Установлена способность экстракта из пиона «Иван Горожанкин» снижать степень полимеризации фибрина, о чем свидетельствует высокая фибриндеполимеризационная активность. По данным биохимического метода с использованием ингибиторов гепарина и изменением метахромазии обнаружено наличие гепариноподобного вещества в экстракте из пиона «Иван Горожанкин». Этот гепариноид представляет фармакологический интерес в плане его применения для профилактики заболеваний, осложняющихся тромбозами.

Многие растения обладают способностью модифицировать гемостаз. Антикоагулянтная активность извлечений из растений обусловлена содержанием в них гликопептидов, механизм действия которых имеет сходство с N-концевыми аналогами участка а-цепи фибриногена, ограничивающими ферментативное превращение фибриногена в фибрин. Интересен тот факт, что антикоагулянты растительного происхождения по механизму действия принципиально отличаются от используемых в настоящее время прямых антикоагулянтов [15], они не обладают выраженным токсическим действием на организм лабораторного животного и вызывают продолжительную гипокоагулемию. Таким образом, можно заключить, что остается акту-

Таблица 1/Table 1

**Изменение временных интервалов свертывания плазмы с включением экстрактов из корней пионов «Иван Горожанкин» (ЭПГ) или «молочноцветковый» (ЭПМ) по тестам АРТТ, РТ, ТТ и степени полимеризации фибрина по тесту FDPА, а также концентрации фибриногена, ( $M \pm m$ )**

**Changes in plasma coagulation time intervals with the inclusion of extracts from the roots of Ivan Gorozhankin peonies (EPG) or *Paonia lactiflora* (EPL) according to APTT, PT, TT tests and the degree of fibrin polymerization according to the FDPА test and fibrinogen concentration ( $M \pm m$ )**

Показатели крови при концентрациях экстрактов в плазме – 5%, 1% и 0,1% Blood parameters at concentrations of extracts in plasma – 5%, 1%, 0.1%	Экстракты из Extracts from		Контроль 0,85%-й раствор натрия хлорида The Control 0.85% sodium Chloride solution
	корней пиона «Иван Горожанкин» (peony roots «Ivan Gorozhankin» (EPG))	корней пиона «молочноцветковый» (ЭПМ) peony roots <i>lactiflora</i> (EPL)	
АРТТ, с (%) АРТТ (sec, %) 5% 1% 0,1%	52,7±0,8**(166%) 49,0±0,6(155%) 40,0±1,4**(126%)	44,5±1,4**(146%) 39,7±1,4**(125%) 37,6±2,0**(119%)	31,6±1,7 (100%)
РТ, с (%) РТ (sec, %) 1. 5%э 2. 1% 3. 0,1%	42,7±0,8**(142%) 39,0±0,6**(130%) 34,0±1,4(113%)	36,5±1,4**(122%) 35,7±1,4**(119%) 34,0±0,9(113%)	30,0±0,7 (100%)
ТТ, с (%) ТТ (sec, %) 1. 5% 2. 1% 3. 0,1%	34,0±1,1(120%) 33,5±1,0(118%) 33,4±0,9(117%)	33,0±0,9(116%) 33,0±0,9(116%) 33,1±0,9 (117%)	28,3±1,5 (100%)
SFA (мм <sup>2</sup> , %) SFA (mm <sup>2</sup> , %) 1. 5% 2. 1% 3. 0,1%	72,0±1,2**(170%) 65,0±10,0(153%) 60,0±11,3(141%)	64,5±1,1*(152%) 60,0±1,1**(141%) 54,5±8,3(129%)	423±1,3 (100%)
FDPА, мм <sup>2</sup> (%) FDPА (mm <sup>2</sup> , %) 1. 5% 2. 1% 3. 0,1%	26,0±1,1**(216%) 25,0±1,1**(208%) 20,0±1,1**(166%)	20,9±1,3**(175%) 20,0±1,0**(166%) 18,0±0,8*(150%)	12±1,1(100%)
Концентрация фибриногена, мг, % (Fibrinogen concentration, mg, %) 1. 5% 2. 1%	182,0±13,2*(86%) 184,0±5,2(88%)	190,0±9,8 (90,4%) 190,3±9,8 (90,4%)	210±7,0(100%)

**Примечание.** Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля, принятых за 100%. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Обозначения: АРТТ – активированное частичное тромбопластиновое время, РТ – протромбиновое время, ТТ – тромбиновое время, SFA – суммарная фибринолитическая активность, FDPА – фибриндеполимеризационная активность.

**Note.** Statistical comparisons were made relative to the corresponding control samples taken as 100%. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; APTT, activated partial thromboplastin time; PT, prothrombin time; TT, thrombin time; SFA, total fibrinolytic activity, FDPА, fibrin-depolymerizing activity.

Таблица 2/Table 2

**Антикоагулянтная активность (по тестам АРТТ и ТТ), степень полимеризации по тесту FDPА гепариноподобного компонента из корней пиона «Иван Горожанкин» (ГПГ) и «молочноцветковый» (ГПМ) сравнительно с препаратом LMWH «Celsus»**

**Anticoagulant activity (APTT and TT tests) and the degree of fibrin polymerization (FD test) of the heparin-like component from the roots of the peony «Ivan Gorozhankin» (HPG) and *Paeonia lactiflora* (HPL) compared with the LMWH**

Показатели крови Blood parameters	ГПГ (HPG)	ГПМ (HPL)	Препарат сравнения «Celsus» (Comparison drug «Celsus»)	Контрольная плазма (Control blood plasma)
Антикоагулянтная активность (с, %) Anticoagulant activity (sec, with (%))				
по тесту АРТТ according to the АРТТ	40,5±1,8** (128,5%)	40,5±1,4** (128,5%)	42,0±1,1** (132,6%)	31,6±1,7 (100%)
по тесту ТТ test according to the test TT	31,0±1,1 (110%)	30,0±0,9 (107%)	29,0±0,9 (102%)	28,3±1,5 (100%)
Степень полимеризации (мм <sup>2</sup> , %) Degree of polymerization				
FDPА, (мм <sup>2</sup> , %) FDPА, (mm <sup>2</sup> , %)	26,0 ±1,1** (216%)	20,5±1,4** (170%)	12,5±1,4** (102%)	12±1,1 (100%)

**Примечание.** Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля, принятых за 100%. \**p* < 0.05; \*\* *p* < 0.01.  
**Note.** Statistical comparisons were made relative to the corresponding control samples taken as 100%. \**p* < 0.05; \*\* *p* < 0.01.

альным поиск и изучение новых средств направленного воздействия на гемостаз, оказывающих быстрый и достаточно продолжительный эффект, т.е. новых антикоагулянтов прямого действия. Значительное место в этих исследованиях занимают растения, прежде всего потому, что содержащиеся в них фармакологически активные соединения прошли через своеобразный биологический фильтр и вследствие этого, по сравнению с синтетическими, отличаются наиболее благоприятным воздействием на организм человека.

**Заключение**

Впервые установлена способность экстракта из корней пиона «Иван Горожанкина» проявлять синергические антикоагулянтное и фибриндеполимеризационные эффекты, превышающие таковые у экстракта из корней пиона «молочноветковый» в тех же концентрациях.

Исследованный нами гепариноид из пиона «Иван Горожанкин» обладает как ингибирующим эффектом на внутренний механизм свертывания, так и, возможно, антитромботической активностью.

**Литература**

(п.п. 2; 4-9; 13; 14 см. References)

1. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. *Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови.* М.; Адвансед Солюшнз. 2012.
3. Кричевский Л.А. Низкомолекулярные гепарины в современной системе управления свертываемостью крови. *Анестезиология и реаниматология. Медицинская реабилитация.* 2015; 117(16): 42–8.

10. Криштанов Н.А., Сафонова М.Ю., Болотова В.Ц., Павлова Е.Д., Саканян Е.И. Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лечебных и лечебно-профилактических средств. *Вестник ВГУ, сер. Биология. Химия. Фармация.* 2005; 1: 212–21.
11. Кузнецова С.А., Дрозд Н.Н., Кузнецов Б.Н., Макаров В.А., Левданский В.А., Мифтаков Н.Т. Антикоагулянтное, средство Патент № 2399377. Россия. 2009.
12. Ляпина М.Г., Успенская М.С., Майстренко Е.С. О механизме антикоагулянтного действия экстракта из корней пиона молочноцветкового. *Межд. журн. прикл. и фундамент. исследований.* 2016; 11: 1091–93.
15. Бышевский А.Ш., Галян С.Л., Калинин Е.П., Карпова И.А., Русакова О.А., Самойлов М.А. и др. Ингибиторы самосборки фибрина растительного происхождения. *Медицинская наука и образование Урала.* 2012; 13(1): 163-70.

**References**

1. Lyapina L.A., Grigorieva M.E., Obergan T.Yu., Shubina T.A. *Theoretical and practical issues of studying the functional state of the Anticoagulant, blood system. [Teoreticheskie i prakticheskie voprosy izucheniya funktsional'nogo sostoyaniya protivosvertvyvayushchey sistemy krovi].* Moscow: Advanced Solutions. 2012. (in Russian)
2. Buerke M., Hoffmeister H.M. Management of NOAK administration during invasive or surgical interventions. When and how to pause and when to restart? *Med Klin Intensivmed Notfallmed.* 2017; 112(2): 105–10. Epub 2017 Jan 10
3. Krichevsky L.A. Low Molecular weight heparins in the modern blood coagulation control system. *Anesthesiology and resuscitation. Medical rehabilitation.* 2015; 15(116) – № 16(117): 42-8. (in Russian)
4. Xiao C., Lian W., Zhou L., Gao N., Xu L., Chen J., et al. Interactions between depolymerized fucosylated glycosaminoglycan and coagulation proteases or inhibitors. *Thromb Res.* 2016. 146. 59–68. <http://doi.org/10.1016/j.thromb.2016.08.027>. Epub 2016 28 avg
5. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Gerbst A.G., Ushakova N.A., Tsvetkova E.A., Dmitrienko A.S., et al. Anticoagulant and antithrombot-

- ic activity of modified xylophone sulfate from the brown Alga *Punctaria plantaginea*. *Carbohydr. Polym.* 2016; 136: 826–33. <http://doi.org/10.1016/j.carboh.2015.09.102>. Epub 2015
6. Bilan M.I., Shashkov A.S., Usov A.I. Structure of a sulfated xylofucan from the brown alga *Punctaria plantaginea*. *Carbohydr Res.* 2014; 393: 1–8. Epub 2014 May 10
  7. Wu M., Xu L., Zhao L., Xiao C., Gao N., Luo L., et al. Structural analysis and anticoagulant activities of the novel sulfated fucan possessing a regular well-defined repeating unit from sea cucumber. *Mar. Drugs.* 2015; 13(4): 2063–84. <http://doi.org/10.3390/md13042063>
  8. Zhang S.B. In vitro antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates *Food Chem.* 2016; 202: 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.108>. Epub 2016 27 yanv
  9. Pomin V.H., Mourão P.A. Specific sulfation and glycosylation—a structural combination for the anticoagulation of marine carbohydrates. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4 (33). Epub 2014 Mar 6
  10. Krishtanov N.A., Safonova M.Yu., Bolotova V.Z., Pavlova E.D., Sakanian E.I. Perspektivi ispolzovania rastitelnykh polisacharidov v kachestve lechebnykh i lechebno-profilacticheskikh sredstv. *Vestnik VGU, ser. Biologiya. Chimia. Farmacia.* 2005; 1: 212–21. (in Russian)
  11. Kuznetsova S.A., Drozd N.N., Kuznetsov B.N., Makarov V.A., Levdansky V.A., Miftakhov N.T. *Anticoagulant remedy*. 2009; Patent No. 2399377. Russia. (in Russian)
  12. Lyapina M.G., Uspenskaya M.S., Maystrenko E.S. O mekhanizme antikoagulantnogo deistvia ekstrakta iz korney piona molochnozvetkovogo *Mechdunar.churnal prikladnich i fundamentalnich issledovaniy.* 2016; 11: 1091–93. Russia. (in Russian)
  13. Van Montfoort M L., Meijers J.C. Anticoagulation beyond direct thrombin and factor Xa inhibitors: indications for targeting the intrinsic pathway. *Thromb. Haemost.* 2013; 110(2): 223–32. <http://doi.org/10.1160/TH12-11-0803>. Epub 2013 6 Jun
  14. Nsimba M.M., Yamamoto C., Lami J.N., Hayakawa Y., Kaji T. Effect of a Congolese herbal medicine used in sickle cell anemia on the expression of plasminogen activators in human coronary aortic endothelial cells culture. *J. Ethnopharmacol.* 2013; 146(2): 594–99. <http://doi.org/10.1016/j.jethnoph.2013.01.031>. Epub 2013
  15. Byshevsky A.Sh., Galyan S.L., Kalinin E.P., Karpova I.A., Rusakova O.A., Samoïlov M.A., et al. Inhibitors of self-Assembly of fibrin of plant origin. *Medical science and education of the Urals.* 2012; 13(1): 163–70. (in Russian)

**Сведения об авторах:**

**Успенская Марианна Сергеевна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Ботанического сада биологического факультета МГУ, e-mail: ms-uspenskaya@yandex.ru;

**Ляпина Маргарита Григорьевна**, вед. специалист лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, e-mail: lyapinal@mail.ru;

**Калугина Марина Дмитриевна**, науч. сотр. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, e-mail: laboratory7@mail.ru

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092.9

Шилин Д.С.<sup>1,2</sup>, Шаповалов К.Г.<sup>1,2</sup>

## Фактор алиментарно-конституционального ожирения в изменениях системного кровообращения при COVID-19

<sup>1</sup> ГУЗ Городская клиническая больница № 1,

672010, Чита, Россия, ул. Ленина, д. 8;

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России,

672000, Чита, Россия, ул. Горького, 39А

**Актуальность:** ожирение является одной из самых распространенных в мире причин развития сопутствующих заболеваний. у человека. В настоящий момент проблема COVID-19 приводит к развитию и обострению сердечно-сосудистой патологии, сопровождающейся изменениями гемодинамики. **Цель исследования** – оценка зависимости изменений гемодинамики у пациентов с COVID-19 от алиментарно-конституционального ожирения.

**Методика.** Исследование выполнено у 73 пациентов обоего пола с внебольничной полисегментарной вирусно-бактериальной пневмонией на фоне COVID-19. Пациенты были разделены на 3 группы по индексу массы тела. В 1-ю группу вошли пациенты без избытка массы тела, 2-ю составили пациенты с избыточной массой тела, 3-ю – с ожирением 1 степени. Исползован комплекс аппаратно-программного неинвазивного исследования центральной гемодинамики методом объемной компрессионной осциллометрии «КАП ЦГ осм- «Глобус» (Россия).

**Результаты.** У пациентов с COVID-19, страдающих ожирением I степени (30,0 - 34,9 кг/м<sup>2</sup>). выявлено статистически значимое снижение сердечного индекса относительно лиц с нормальной массой тела (на 10,8%,  $p=0,010$ ). Пациенты с избытком массы тела имели более высокое диастолическое давление (на 10,5%,  $p=0,011$ ) Показатель периферического сосудистого сопротивления у пациентов с COVID-19 без избыточной массы тела был на 16.5% ниже, чем у пациентов с ожирением 1 степени. Удельное периферическое сопротивление сосудов у пациентов 1-й группы было на 10.3% меньше, чем у пациентов с избыточной массой тела. Податливость сосудистой стенки у пациентов 1-й группы была ниже на 22.5%, чем у пациентов с COVID-19 и ожирением 1 степени.

**Заключение.** У пациентов с внебольничной полисегментарной вирусно-бактериальной пневмонией на фоне COVID-19 при ожирении 1 степени и избыточной массе тела выявляются значимые изменения гемодинамики относительно больных с нормальной массой тела.

**Ключевые слова:** ожирение; Covid-19; гемодинамика; диастолическое давление; периферическое сосудистое сопротивление

**Для цитирования:** Шилин Д.С., Шаповалов К.Г. Фактор алиментарно-конституционального ожирения в изменениях системного кровообращения при COVID-19. *Патологическая физиология и экспериментальная медицина.* 2021; 65 (4): –. DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**Для корреспонденции:** Шилин Дмитрий Сергеевич, e-mail: Untara100@gmail.com

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Шилин Д.С., Шаповалов К.Г.; сбор и переработка материала – Шилин Д.С.; статистическая обработка – Шилин Д.С.; написание и редактирование текста – Шилин Д.С., Шаповалов К.Г.; окончательная версия статьи – Шилин Д.С., Шаповалов К.Г.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.06.2021

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021

Shilin D.S.<sup>1,2</sup>, Shapovalov K.G.<sup>1,2</sup>**The impact of exogenous constitutional obesity on the systemic circulation in COVID-19 patients**<sup>1</sup>Chita Clinical Hospital #1,  
Lenina St. 8, Chita 672010, Russian Federation,<sup>2</sup>Chita State Medical Academy,  
Gorkogo St. 39A, Chita 672000, Russian Federation

**Background:** Obesity is one of the most common causes of comorbidities worldwide. During the COVID-19 pandemic, development and increasing severity of cardiovascular disorders associated with hemodynamic changes has become increasingly relevant. **Aims:** The study aimed to evaluate the hemodynamic changes in COVID-19 patients depending on the severity of their exogenous constitutional obesity.

**Methods.** 73 male and female patients with community-acquired polysegmental pneumonia of viral and bacterial origin associated with COVID-19 were enrolled in the study. The patients were allocated to three groups depending on the value of their body mass index (BMI). Group 1 included patients with normal body weight; Group 2 included overweight patients, and Group 3 included patients with grade 1 obesity (BMI 30.0-34.9 kg/m<sup>2</sup>). The measurements were performed using a technique of volumetric compression oscillometry on a non-invasive hemodynamic monitoring system KAP CG osm (Globus, Russia).

**Results.** COVID-19 patients with grade 1 obesity (BMI 30.0-34.9 kg/m<sup>2</sup>) demonstrated a statistically significant 10.8% decrease in the cardiac index compared to patients with normal body weight ( $p=0.010$ ). Overweight patients had 10.5% higher diastolic blood pressure ( $p=0.011$ ). Peripheral vascular resistance (PVR) in COVID-19 patients with normal body weight was 16.5% lower than in patients with grade 1 obesity. PVR adjusted for body surface area in patients with normal body weight was 10.3% lower than in overweight patients. The compliance of the vascular wall in Group 1 patients was 22.5% lower than in COVID-19 patients with grade 1 obesity.

**Conclusion.** COVID-19 patients with community-acquired, polysegmental pneumonia of viral and bacterial origin demonstrate significant hemodynamic changes compared to patients with normal body weights.

**Keywords:** obesity; COVID-19; hemodynamics; diastolic blood pressure; peripheral vascular resistance

For citation: Shilin D.S., Shapovalov K.G. The impact of exogenous constitutional obesity on the systemic circulation in COVID-19 patients. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'nyayaterapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(4): -. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**For correspondence:** *Dmitriy S. Shilin*, Anesthesiology-reanimatologist, teacher of the Department of Physical Culture of the Chita State Medical Academy; 39A Gorkogo Str., 672000, Chita, Russian Federation, e-mail: Untara100@gmail.com

**Contribution:** research concept and design – Shilin D.S., Shapovalov K.G.; material collecting and processing – Shilin D.S.; statistical processing – Shilin D.S., Shapovalov K.G.; text writing – Shilin D.S., Shapovalov K.G.; editing final version of the article – Shilin D.S., Shapovalov K.G.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Information about the authors:**

Shilin D.S., <https://orcid.org/0000-0003-4665-1960>

Received 29.06.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

## Введение

Население нашей планеты с трансформацией в информационное общество все чаще начало сталкиваться с так называемыми болезнями цивилизации. Человек переходит к менее энергозатратному образу жизни. В результате все чаще наблюдаются гиподинамия и, как следствие, возникающая с ним проблема ожирения. По официальным данным ВОЗ, в 2016 году 39% взрослых в возрасте 18 лет и старше имели избыточную массу тела, а 13% страдали ожирением [1].

Доказана роль избыточной массы тела в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, таких как: гипертония, сахарный диабет, ишемическая болезнь сердца, и другие [2]. Избыточная масса тела влияет на жизнедеятельность, состояние органов и систем, как правило, негативно сказывается на здоровье.

Эпидемии вирусных инфекций все чаще стали появляться в повестке дня [3]. Эти процессы ранее носили, как правило, локальный характер. Однако, в насто-

ящее время вирус SARS-CoV-2 имеет широкое и пролонгированное распространение по всему миру [4].

Известно, что ожирение является фактором тяжелого течения гриппа А/Н1N1 и COVID-19 [5]. Вирус SARS-Cov-2 имеет высокое сродство к человеческому ангиотензинпревращающему ферменту 2 (АПФ2) [5]. Было показано, что АПФ2 является предполагаемым рецептором для проникновения COVID-19 в клетки-хозяина. Тканевая экспрессия АПФ2 различается в почках, сердце и легких у здоровых пациентов и пациентов, инфицированных коронавирусом [6]. Уровень экспрессии АПФ2 в жировой ткани выше, чем в ткани легких, основной ткани-мишени, пораженной COVID-19 [7]. При этом жировая ткань также может быть уязвима для COVID-19. Однако следует отметить, что не было различий в экспрессии белка АПФ2 адипоцитами и жировыми клетками-предшественниками между людьми с ожирением и без ожирения [7].

При попадании в кровоток вирус SARS-CoV-2, связываясь с рецепторами АПФ2, влияет на состояние гемодинамики через ренин-ангиотензин-альдостероновую систему, отвечающую за тонус сосудистой стенки [8,9]. При гипоксии возникает индуцированная ангиотензином II вазоконстрикция легких, направленная на оптимизацию соотношения вентиляции и перфузии, но одновременно вызывающая неблагоприятные гемодинамические эффекты [10].

Тяжелые формы вирусных пневмоний вызывают не только нарушения респираторной функции организма, но и критические нарушения состояния гемодинамики, коррекция которых является основной целью для поддержания жизнедеятельности пациентов. У пациентов с ожирением и COVID-19 чаще, чем у пациентов с нормальным индексом массы тела (ИМТ) возникают тромбоэмболические осложнения [11,12]. Замечено увеличение летальности с увеличением массы тела пациентов, так 88,2% выживших в городе Ухань имели ИМТ до 24,9 кг / м<sup>2</sup> [11].

Цель исследования -- оценка зависимости изменений гемодинамики у пациентов с COVID-19 от алиментарно-конституционального ожирения.

### Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004)

Проспективное нерандомизированное исследование включало 73 пациента обоего пола с внебольничной полисегментарной вирусно-бактериальной пневмонией на фоне COVID-19. Возраст пациентов от 42 до 84 лет. Все больные нуждались в респираторной поддержке и находились в реанимационных отделениях. Больным назначалось необходимое лечение, согласно актуальной версии временных методических рекомендаций министерства здравоохранения РФ «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции COVID-19». Исследование выполнялось на базе «ГУЗ» Городская клиническая больница №1 г. Читы. Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО Читинская государственная медицинская академия МЗРФ (протокол №102 от 15.05.2020). Диагноз верифицировали в соответствии с принятыми временными методическими рекомендациями министерства здравоохранения РФ «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции COVID-19». У всех пациентов выявлялась фоновая и сопутствующая патология: ИБС, сахарный диабет. Рентгенологическая картина поражения при компьютерной томографии – не менее 25% легочных полей. Критерии «невключения» в исследование: наличие онкологических заболеваний, тяжелого иммунодефицита, нестабильной гемодинамики, инфузии вазопрессоров, признаки гиповолемии.

Пациенты были разбиты на 3 группы в зависимости от индекса массы тела. Индекс массы тела рассчитывался по формуле вес/рост<sup>2</sup>. В 1-ю группу вошли 22 пациента (13 мужчин, 9 женщин) без избытка массы тела (индекс до 24,9 кг/м<sup>2</sup>). Среднее значение возраста группы 65,5 лет. Вторую группу составили 26 пациентов (15 мужчин и 11 женщин) с ИМТ от 25,0 до 29,9 кг/м<sup>2</sup>, средний возраст пациентов в группе составил 65,6 лет. Численность пациентов 3-й группы с ожирением 1 степени и ИМТ от 30,0 до 34,9 кг/м<sup>2</sup> составляла 25 человек (табл. 1).

В ходе анализа частоты встречаемости заболеваний не было выявлено значимых различий между группами. Исследования состояния гемодинамики осуществляли комплексом аппаратно-программного неинвазивного исследования центральной гемодинамики методом объемной компрессионной осциллометрии «КАП ЦГ осм- «Глобус» (Россия). Оцененные макрогемодинамические параметры были разбиты на 3 блока. В первый блок включены показатели, относящиеся к системному артериальному давлению, такие как систолическое артериальное давление/systolic blood pressure (САД/SBP), диастолическое артериальное давление/diastolic blood pressure (ДАД/DBP), среднее артериальное давление/mean blood pressure (СрАД/МВР), боковое артериальное давление/oscillometric true systolic blood pressure (БАД/ОТСП), пульсовое артериальное давление/pulse blood



pressure (АДп/РВР) ударное артериальное давление / stroke blood pressure (АДуд/StBP), скорость пульсового артериального давления/pulse blood pressure velocity (СКАДп/РВРВ). **Второй блок** составили показатели сердечной деятельности: параметры сердечного выброса/cardiac output (СВ/СО), сердечного индекса/cardiac index (СИ/СИ), ударного объема /stroke volume (УО/SV), ударного индекса stroke index (УИ/СИ), объемная скорость выброса /volume ejection rate (ОСВ/VER), расход энергии на 1л сердечного выброса за минуту/energy expenditure (РЭ/ЕЕ) per 1 liter of cardiac output per minute.

**Третий блок** представлен показателями сосудистого русла: скоростью линейного кровотока/linear blood flow rate (СКлин/LBFR), пульсовой волны/pulse wave velocity (ПВ/PWV), податливостью сосудистой системы/vascular compliance (ПСС/VC), общее периферическое сосудистое сопротивление/total peripheral resistance (ОПСС/TPR), удельное периферическое сосудистое сопротивление/normalized peripheral resistance (УПСС/NPR), УПСС фактическое/УПСС рабочее/ NPR actual/NPR estimated ratio.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения «AnalystSoft Inc., StatPlus:mac» (v8.1, AnalystSoft Inc.).

Полученные данные не соответствовали нормальному распределению. Нормальность проверяли с помощью критериев Шапиро-Уилка. Далее вычисляли медиану и 25 и 75 квартиль исследуемых параметров.

Для сравнения частоты заболеваемости между группами использовали критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса на непрерывность. При сравнении медианных значений между группами по возрасту и гемодинамике использовали критерии Манна-Уитни. Различия между величинами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$

### Результаты исследования

При сравнении группы показателей артериального давления было обнаружено, что у пациентов без избытка массы тела в сравнении с пациентами, чей индекс массы тела составлял от 25-29 кг/м<sup>2</sup>, медианные значения диастолического артериального давления уве-

Таблица 1/Table 1

#### Характеристика групп пациентов (M[25;75])

#### Characteristics of patient groups (M[25;75])

Показатели	1 группа. Без избытка массы тела Group 1. Without excess body weight, n=22	2 группа. Избыточная масса тела Group 2. Excess body weight, n=26	3 группа. Ожирение I степени Group 3. Obesity degree I, n=25	Статистическая значимость Statistical significance
Средний возраст, годы Mean age, years I) BSCOPD	65,5	65,61	64,8	p1=0,895 p2=0,546 p3=0,667
ИБС Coronary heart disease	10 (45,5%)	13 (50,0%)	11 (44,0%)	p1=0,981 p2=0,847 p3=0,882
ХОБЛ Chronic obstructive pulmonary disease	6 (27,3%)	1(3,8%)	4(16,0%)	p1=0,060 p2=0,559 p3=0,324
Гипертоническая болезнь Hypertensive Disease	11 (50,0%)	12 (46,1%)	13 (52,0%)	p1=0,981 p2=0,877 p3=0,891
Сахарный диабет Diabetes mellitus	1 (4,5%)	7 (26,9%)	3 (12,0%)	p1=0,093 p2=0,697 p3=0,323
Летальность Lethality	10 (45,5%)	11 (42,3%)	9 (36,0%)	p1=0,959 p2=0,620 p3=0,773

**Примечание.** p1 – статистическая значимость различий между 1-й и 2-й группой; p2 – значимость между 1-й и 3-й группой; p3 – между 2-й и 3-й группой.

**Note.** p1, statistical significance between Groups 1 and 2; p2, statistical significance between Groups 1 and 3; p3, statistical significance between Groups 2 and 3.

личивались на 10,5% ( $p=0,011$ ) (табл. 2). Иных изменений первой группы параметров гемодинамики у пациентов на кислородотерапии не выявили ( $p > 0,05$ ).

При оценке группы показателей сердечной деятельности у пациентов, страдающих ожирением I степени (30,0–34,9) кг/м<sup>2</sup>, выявили статистически значимое различие сердечного индекса относительно лиц с нормальной массой тела. Снижение медианных значений составляло 10,8% при  $p=0,010$ . Иных изменений параметров данного блока не отмечали (табл. 3).

При оценке группы сосудистых показателей выявилось больше всего статистически значимых различий между группами (табл. 4). 1 – Показатель периферического сосудистого сопротивления у пациентов без

избыточной массы тела был на 16.5% ниже, чем у пациентов с ожирением 1 степени. 2–Удельное периферическое сопротивление сосудов у пациентов 1 группы было на 10.3% меньше, чем у пациентов с избыточной массой тела. 3–Податливость сосудистой стенки у пациентов первой группы была ниже на 22.5%, чем у пациентов с ожирением 1 типа.

**Обсуждение**

Ожирение становится все более распространенным явлением и связано со значительным риском сердечно-сосудистых заболеваний [13]. Распределение и морфология жировой ткани играют ключевую роль в определении степени побочных эффектов, и ключевым фактором в процессе заболевания, по-видимому, является популяция воспалительных клеток в жировой

Таблица 2/Table 2

Изменение показателей артериального давления в зависимости от выраженности алиментарно-конституционального ожирения (М [25;75])  
Changes in blood pressure depending on the severity of exogenous constitutional obesity (M [25;75])

Показатель гемодинамики (Hemodynamics index)	1 группа Без избытка массы тела Group 1. Without excess body weight, n=22	2 группа Избыточная масса тела Group 2. Excess body weight, n=26	3 группа Ожирение I степени Group 3 Obesity degree I, n=25	Статистическая значимость Statistical significance
САД, мм рт.ст. (SBP, mm Hg.)	125,000 [108,750;135,750]	131,000 [124,750;138,500]	122,000 [118,000;130,000]	p1=0,270 p2=0,955 p3=0,068
ДАД, мм рт.ст. (DBP, mm Hg.)	72,000 [61,000;78,750]	80,500 [75,500;88,500]	74,000 [69,000;85,000]	p1=0,011 p2=0,241 p3=0,237
БАД мм рт.ст. (OTSBP, mm Hg.)	105,000 [100,000;121,500]	119,000 [100,000;127,000]	107,000 [100,000;115,000]	p1=0,439 p2=0,616 p3=0,187
СрАД, мм рт.ст. (MBP, mm Hg.)	84,500 [77,250;96,000]	93,500 [85,000;103,000]	89,000 [79,000;94,000]	p1=0,133 p2=0,750 p3=0,155
Адп, мм рт.ст. (PBP, mm Hg.)	53,500 [44,250;59,750]	47,500 [42,250;60,750]	46,000 [37,000;53,000]	p1=0,683 p2=0,194 p3=0,412
СКАДп мм рт.ст./с. (PBPV, mm Hg./sec.)	301,500 [262,250;335,250]	284,000 [243,000;334,500]	257,000 [233,000;299,000]	p1=0,408 p2=0,250 p3=0,689
Адуд мм рт.ст. (StBP, mm Hg.)	26,000 [21,000;28,500]	25,500 [21,000;30,500]	28,000 [23,000;30,000]	p1=0,493 p2=0,061 p3=0,389

**Примечание.** САД – систолическое артериальное давление; ДАД – диастолическое артериальное давление; СрАД – среднее артериальное давление; БАД – боковое артериальное давление; Адп – пульсовое артериальное давление; СКАДп – скорость пульсового артериального давления; Адуд – ударное артериальное давление; p1 – статистическая значимость различий между 1-й и 2-й группой; p2 – между 1-й и 3-й группой; p3 – между 2-й и 3-й группой.

**Note.** SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; MBP, mean blood pressure; OTSBP, oscillometric ‘true’ systolic blood pressure; PBP, pulse blood pressure; PBPV, pulse blood pressure velocity; StBP, stroke blood pressure; p1, statistical significance between Groups 1 and 2; p2, statistical significance between Groups 1 and 3; p3, statistical significance between Groups 2 and 3.

ткани. Здоровая жировая ткань секретирует ряд вазоактивных адипокинов и противовоспалительных цитокинов, и изменения этого секреторного профиля будут способствовать развитию ожирения [14].

В первом блоке исследуемых гемодинамических функций, выявлено статистически значимое увеличение диастолического артериального давления на 10,5% при  $p=0,011$  (табл. 2) у пациентов 1 и 2 групп. В диастолу главным образом происходит перфузия сердечной мышцы, при увеличении массы тела нагрузка возрастает и, как следствие, увеличивается потребность в нутритивной поддержке.

Замечено, что у больных ИБС с метаболическим синдромом по мере увеличения степени ожирения возрастает степень диастолической дисфункции [15]. В то же время встречаемость гипертрофии левого желудочка выше только у больных с ожирением II степени [15]. Диастолическая дисфункция является прямым следствием структурных, динамических и метаболиче-

ски индуцированных патофизиологических процессов в миокарде [16].

При небольшом изменении массы тела сердечная деятельность адаптировалась функционально, это не сопровождалось ремоделированием сердца. А значит и не приводило к потребности к увеличению питания миокарда.

При оценки второго блока, отражающих изменения в сердечной деятельности, выявили изменения показателя сердечного индекса, который отражает отношения сердечного выброса на единицу поверхности тела человека. У пациентов первой группы он был выше на 10,8% при  $p=0,010$  (табл. 3). С увеличением массы тела сердечный выброс статистически значимо не изменялся, однако в пересчете на площадь поверхности тела, была выявлена главным образом функциональная декомпенсация сердца. Возможно при сравнении 1-й и 2-й группы поверхность тела изменялась незначительно и не приводила к отклонениям параметра. При ожирении 1 сте-

Таблица 3/Table 3

**Изменение показателей сердечной деятельности в зависимости от выраженности алиментарно-конституционального ожирения (М [25;75])**  
**Changes in cardiac performance depending on the severity of exogenous constitutional obesity (M [25;75])**

Показатель гемодинамики Hemodynamics index	1 группа Без избытка массы тела Group 1. Without excess body weight, $n=22$	2 группа Избыточная масса тела Group 2. Excess body weight, $n=26$	3 группа Ожирение I степени Group 3 Obesity degree I, $n=25$	Статистическая значимость Statistical significance
СВ, л/мин (CO, l/min)	5,750 [4,725;6,275]	6,100 [5,550;6,575]	5,700 [5,200;6,200]	$p1=0,216$ $p2=0,724$ $p3=0,279$
СИ, л/(мин $\times$ м <sup>2</sup> ) (CI, l/(min $\times$ m <sup>2</sup> ))	3,250 [3,025;3,400]	3,200 [2,900;3,500]	2,900 [2,800;3,200]	$p1=0,506$ $p2=0,010$ $p3=0,082$
УО, мл (SV, ml)	77,000 [58,250;84,000]	75,000 [66,250;90,250]	73,000 [61,000;93,000]	$p1=0,724$ $p2=0,909$ $p3=0,968$
УИ, мл/м <sup>2</sup> (SI, ml/m <sup>2</sup> )	43,000 [36,750; 48,500]	39,000 [35,000;47,250]	38,000 [32,000;43,000]	$p1=0,200$ $p2=0,124$ $p3=0,741$
ОСВ, мл/с (VER, ml/sec)	227,000 [180,250;262,750]	226,500 [208,000;275,000]	221,000 [184,000;262,000]	$p1=0,651$ $p2=0,767$ $p3=0,589$
РЭ, Вт (EE, W)	11,000 [10,325;12,725]	12,500 [11,250;13,675]	11,700 [10,600;12,600]	$p1=0,122$ $p2=0,716$ $p3=0,131$

**Примечание.** Показатели сердечной деятельности: СВ – сердечного выброса; СИ – сердечного индекса; УО – ударного объема; УИ – ударного индекса; ОСВ – объемная скорость выброса; РЭ – расход энергии на 1л сердечного выброса за минуту;  $p1$  – статистическая значимость различий между 1-й и 2-й группой;  $p2$  – между 1-й и 3-й группой;  $p3$  – между 2-й и 3-й группой.

**Note.** CO, cardiac output; CI, cardiac index; SV, stroke volume; SI, stroke index; VER, volume ejection rate; EE, energy expenditure per 1 liter of cardiac output per minute;  $p1$ , statistical significance between the Groups 1 and 2;  $p2$ , statistical significance between Groups 1 and 3;  $p3$ , statistical significance between Groups 2 and 3.

пени и тяжелом течении COVID-19 сердечная мышца не может обеспечить полноценный сердечный выброс.

При оценке третьего блока, отражающих состояния сосудистого русла, было выявлено больше всего изменений. У пациентов без избыточной массы тела в сравнении с пациентами с ожирением 1 степени, показатель податливости сосудистой стенки увеличивался (табл. 4). При увеличении массы тела увеличивалось и количество, и протяженность капиллярной сети. Адаптация сердечно-сосудистой системы происходила за счет увеличения податливости сосудистой стенки, из-за расширения объема и протяженности капиллярного русла. При сравнения соседних групп между собой, статистически значимых изменений выявлено не было.

Удельное периферическое сопротивление сосудов было значительно ниже у пациентов без избыточной массы тела, в сравнении с другими двумя группами. Вследствие особенности расчета показателя, кото-

рое учитывает площадь поверхности тела, достигалась большая степень его чувствительности к изменениям антропометрических данных.

Сдвиги гормонально-метаболического статуса при метаболическом синдроме обуславливают раннее развитие эндотелиальной дисфункции (ЭД) и атеросклеротических изменений сосудов, что создает предпосылки для возникновения и быстрого прогрессирования ряда тяжелых сердечно-сосудистых заболеваний, приводящих к ранней инвалидизации и преждевременной смерти этой категории больных [17-19]. Известно, что местное кровообращение также регулируется тканевыми метаболитами по механизму обратной связи. В условиях повышения АД происходит нарушение метаболизма эндотелиальной клетки, соответственно, изменяется продукция ряда факторов, в частности, эндотелий-зависимого релаксирующего фактора (ЭРФ), снижающего тонус сосуда, а также вазоконстрикторов,

Таблица 4/Table 4

**Изменение сосудистых показателей в зависимости от выраженности алиментарно-конституционального ожирения (М [25;75])**

**Changes in vascular indices depending on the severity of alimentary-constitutional obesity (M [25;75])**

Показатель гемодинамики Hemodynamics index	1 группа Без избытка массы тела Group 1. Without excess body weight, n=22	2 группа Избыточная масса тела Group 2. Excess body weight, n=26	3 группа Ожирение I степени Group 3 Obesity degree I, n=25	Статистическая значимость Statistical significance
СКлин, см/с (LBFR, cm/sec)	40,000 [36,000; 41,750]	39,500 [35,500; 42,750]	37,000 [34,000; 40,000]	p1=1,000 p2=0,320 p3=0,372
ПВ, см/с (PWV, cm/sec)	1000,500 [965,250; 1086,250]	946,500 [903,500; 1114,500]	901,000 [832,000; 1009,000]	p1=0,390 p2=0,052 p3=0,103
ПСС, мл/мм рт.ст. (VC, ml/mm Hg.)	1,265 [1,073; 1,505]	1,315 [1,233; 1,500]	1,550 [1,230; 1,670]	p1=0,659 p2= <b>0,048</b> p3=0,150
ОПСС, дин×с/см <sup>5</sup> (TPR, dyn×sec/cm <sup>5</sup> )	1210,000 [1123,500; 1351,750]	1209,500 [1151,750; 1329,000]	1206,000 [1134,000; 1329,000]	p1=0,589 p2=0,946 p3=0,522
УПСС, мм.рт.ст./л/ (мин×м <sup>2</sup> ) (NPR, mm.Hg/l/(min×m <sup>2</sup> ))	26,000 [24,250; 29,000]	30,000 [26,500; 32,000]	29,000 [28,000; 33,000]	p1= <b>0,005</b> p2= <b>0,002</b> p3=0,825
УПСС фактическое/УПСС рабочее, отн. ед. (NPR actual/NPR estimated ratio, relative unit)	0,347 [0,276; 0,577]	0,329 [0,207; 0,527]	0,529 [0,249; 0,605]	p1=0,501 p2=0,682 p3=0,289

**Примечание.** Показатели сосудистого русла: СКлин – скорость линейного кровотока; ПВ – пульсовой волны; ПСС – податливость сосудистой системы; ОПСС – общее периферическое сосудистое сопротивление; УПСС – удельное периферическое сосудистое сопротивление; УПСС фактическое/УПСС рабочее; p1– статистическая значимость различий между 1-й и 2-й группой; p2 – между 1-й и 3-й группой; p3 – между 2-й и 3-й группой.

**Note.** LBFR, linear blood flow rate; PWV, pulse wave velocity; VC, vascular compliance; TPR, total peripheral resistance; NPR, normalized peripheral resistance; NPR actual/NPR estimated ratio; p1, statistical significance between the Groups 1 and 2; p2, statistical significance between Groups 1 and 3; p3, statistical significance between Groups 2 and 3.

из которых в качестве наиболее активного рассматривается эндотелин. При этом уровень ЭРФ снижается, а эндотелина и других вазоконстрикторов – увеличивается; эти сдвиги способствуют развитию гипертрофии сосудистой артериальной стенки [20, 21].

### Заключение

У пациентов с избыточной массой тела (ИМТ от 25,0 до 29,9 кг/м<sup>2</sup>) диастолическое артериальное давления и удельное периферическое сосудистое сопротивление было выше, чем у пациентов без избытка массы тела (ИМТ > 24,9 кг/м<sup>2</sup>).

У пациентов с ожирением 1 степени (ИМТ от 30,0 до 34,9 кг/м<sup>2</sup>) в сравнении с пациентами без избытка массы тела (ИМТ > 24,99 кг/м<sup>2</sup>) выявили изменения сердечного индекса, податливости сосудистой стенки, удельно периферического сосудистого сопротивления.

### Литература

(п.п. 1-15; 17 см. References)

16. Шуваев И.П., Асымбекова Э.У., Шерстянникова О.М., Ахмедьярова Н.К., Рахимов А.З. Мацкеплишвили С.Т. Влияние нарушения жирового обмена на тяжесть диастолической дисфункции миокарда у больных ишемической болезнью сердца с метаболическим синдромом. *Сердечно-сосудистые заболевания. Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН*. 2018; 19(6): 800–10.
18. Мустафаева А.Г. Взаимосвязь эндотелиальной дисфункции и развития осложнений метаболического синдрома *Казанский медицинский журнал*. 2018; 99(5): 784–91.
19. Ледаев М.Я., Черненко Ю.В., Черкасов Н.С. и др. Оценка факторов риска и профилактика развития артериальной гипертензии у подростков. *Лечащий врач*. 2012; (6): 27–31.
20. Стрюк Р.И., Брыткова Я.В. Дисфункция эндотелия – ранний маркер дебюта артериальной гипертензии. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014; 13(2): 110.
21. Табаров М.С., Таштемирова З.М., Саидмурадова Р.А., и др. Физиология и патология эндотелия. *Вестник Авиценны*. 2012; (2): 196–202.

### References

1. The World Health Organization (2021) Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
2. Lorenzo A.D., Gratteri S., Gualtieri P., Cammarano A., Bertucci P., Renzo L.D. Why is primary obesity a disease? *J Transl Med*. 2019; 17(1): 169.
3. Standing up to infectious disease. *Nat Microbiol* 2019; 4(1):1.
4. Khan M., Adil S.F., Alkhatlan H.Z., Tahir M.N., Saif S., Khan M., Khan S.T. COVID-19: A Global Challenge with Old History, Epidemiology and Progress So Far. *Molecules*. 2020; 26(1): 39.

5. Milner J.J., Rebeles J., Dhungana S., et al. Obesity increases mortality and modulates the lung metabolism during pandemic H1N1 influenza virus infection in mice. *J Immunol*. 2015; 194(10): 4846–59.
6. Zhou P., Yang X., Wang X., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579: 270–3.
7. Bozkurt B., Kovacs R., Harrington B. Joint HFSA/ACC/AHA Statement Addresses Concerns Re: Using RAAS Antagonists in COVID-19 *ACC News Story*. 2020; 26(5): 370.
8. Jia X., Yin C., Lu S., et al. Two things about COVID-19 might need attention. *Preprints*. 2020;2020020315.
9. Pinheiro T.A., Barcala-Jorge A.S., Andrade J.M.O., et al. Obesity and malnutrition similarly alter the renin-angiotensin system and inflammation in mice and human adipose. *J Nutr Biochem*. 2017; 48: 74–82.
10. Bourgonje A.R., Abdulle A.E., Timens W., Hillebrands J.-L., Navis G.J., Gordijn S.J., et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J Pathol*. 2020; 251(3): 228–48.
11. Cao Y., Li L., Feng Z., Wan S., Huang P., Sun X., et al. Comparative genetic analysis of the novel coronavirus (2019-nCoV/SARS-CoV-2) receptor ACE2 in different populations. *Cell Discov*. 2020; 6: 11.
12. Peng Y.D., Meng K., Guan H.Q. Clinical characteristics and outcomes of 112 cardiovascular disease patients infected by 2019-nCoV. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2020 Jun 24; 48(6): 450–5.
13. Movahed M.R., Khoubyari R., Hashemzadeh M., Hashemzadeh M. Obesity is strongly and independently associated with a higher prevalence of pulmonary embolism. *Respir Investig*. 2019; 57(4): 376–9.
14. Alpert M.A., Omran J., Bostick B.P. Effects of Obesity on Cardiovascular Hemodynamics, Cardiac Morphology, and Ventricular Function Review. *Curr Obes Rep*. 2016; 5(4): 424–34.
15. Kachur S., Lavie C.J., Schutter A., Milani R.V., Ventura H.O. Obesity and cardiovascular diseases. *Minerva Med*. 2017 Jun; 108(3): 212–28.
16. Shuvaev I.P., Asymbekova E.U., Sherstyannikova O.M., Akhmedyarova N.K., Rakhimov A.Z. Matskeplishvili S.T. Influence of lipid metabolism disorders on the severity of diastolic myocardial dysfunction in patients with ischemic heart disease with metabolic syndrome. *Serdchno-sosudistye zabolevaniya. Byulleten' NCSSKH im. A.N. Bakuleva RAMN*. 2018; 19(6): 800–10. (in Russian)
17. Von Bibra H., Sutton M.S.J. Diastolic dysfunction in diabetes and the metabolic syndrome: promising potential for diagnosis and prognosis. *Diabetologia*. 2010; 53(6): 1033–45.
18. Mustafayeva A.G. The relationship of endothelial dysfunction and the development of complications of the metabolic syndrome *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; 99(5): 784–91. (in Russian)
19. Ledayev M.Ya., Chernenkov Yu.V., Cherkasov N.S. Evaluation of risk factors and prevention of the development of arterial hypertension in adolescents. *Lechashchiy vrach*. 2012; (6): 27–31. (in Russian)
20. Stryuk R.I., Brytkova Ya.V. Endothelial dysfunction is an early marker of the onset of arterial hypertension. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika*. 2014; 13(2): 110. (in Russian)
21. Tabarov M.S., Toshtemirova Z.M., Saidmuradova R.A., et al. Physiology and pathology of the endothelium. *Vestnik Avicenny*. 2012; (2): 196–202. (in Russian)

### Сведения об авторах:

**Шилин Дмитрий Сергеевич**, врач анестезиолог-реаниматолог, отд-ние реанимации и интенсивной терапии для больных с острым нарушением кровообращения, преподаватель каф. физической культуры Читинской государственной медицинской академии.

**Шаповалов Константин Геннадьевич**, доктор мед. наук, проф., врач анестезиолог-реаниматолог, зав. каф. анестезиологии и реанимации Читинской государственной медицинской академии.

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092

Лысенко С.Н., Чечнева М.А., Бурумкулова Ф.Ф., Петрухин В.А., Будыкина Т.С.

## Роль оценки размеров поджелудочной железы плода в прогнозе ранней неонатальной гипогликемии при сахарном диабете у матери

ГБУЗ МО «Московский областной НИИ акушерства и гинекологии»,  
101000, Москва, Россия, ул. Покровка д. 22а

**Введение.** Поджелудочная железа (ПЖ) плода играет роль в регуляции гликемии как у плода, так и у матери. Гипергликемия матери, независимо от типа сахарного диабета (СД) сопровождается гипергликемией у плода. Напряжение функции ПЖ плода обуславливает компенсаторное увеличение её размеров, формирование фетальной гиперинсулинемии и развитие в первые часы жизни неонатальной гипогликемии. Клинические симптомы гипогликемии присутствуют в 25–33% случаев, частота лабораторной гипогликемии – в 21–60%. Цель – оценка прогностического значения увеличения размеров ПЖ плода накануне родов в качестве предиктора неонатальной гипогликемии при СД у матери.

**Методика.** Проведена ультразвуковая морфометрия ПЖ у 241 беременной с СД (основная группа) и у 427 здоровых беременных (контрольная группа). В основной группе у 141 (58,5%) беременной родились дети с признаками диабетической фетопатии (ДФ). Оценивались размеры ПЖ плода. У новорождённых оценивалась гликемия в динамике в 1-е и 3-и сут жизни. Проведён ретроспективный корреляционный анализ размеров поджелудочной железы плода и характер гликемии новорождённых в 1-е и 3-и сут жизни.

**Результаты.** Выявлена отрицательная корреляция толщины ПЖ и гипогликемии новорождённого в 1-е сут жизни с линейным коэффициентом корреляции (R) минус 0,66. В 1-е сут жизни у 87,5 % этих детей возникает гипогликемия, более выраженная у недоношенных, у 50% из них, сохраняющаяся к 3-м сут жизни.

**Заключение.** Толщина ПЖ плода более (информативный, важный) воспроизводимый показатель, чем её длина, статистически значимый как в группе ДФ, так и без неё. Неудовлетворительный контроль за течением СД у матерей увеличивает риск гипогликемии новорождённого до 100%. Более выраженная гипогликемия выявляется у недоношенных детей, у половины которых гипогликемия сохраняется к 3-м сут жизни.

**Ключевые слова:** сахарный диабет; диабетическая фетопатия; поджелудочная железа плода; гипогликемия новорождённого

**Для цитирования:** Лысенко С.Н., Чечнева М.А., Бурумкулова Ф.Ф., Петрухин В.А., Будыкина Т.С. Роль оценки размеров поджелудочной железы плода в прогнозе ранней неонатальной гипогликемии при сахарном диабете у матери. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): –.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**Для корреспонденции:** Лысенко Сергей Николаевич, e-mail: serzwer@mail.ru

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Лысенко С.Н., Бурумкулова Ф.Ф.; сбор и обработка материала – Лысенко С.Н., Будыкина Т.С.; подготовка иллюстративного материала – Лысенко С.Н., Чечнева М.А.; статистическая обработка – Лысенко С.Н.; написание текста – Лысенко С.Н.; редактирование – Лысенко С.Н., Бурумкулова Ф.Ф., Чечнева М.А., Петрухин В.А.

**Финансирование.** Настоящее исследование инициировано в рамках гранта Российского научного фонда №16-15-10408 и в рамках научной работы Московского областного центра «Сахарный диабет и беременность».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.01.2021

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021

Lysenko S.N., Chechneva M.A., Burumkulova F.F., Petrukhin V.A., Budykina T.S.

## Role of the fetal pancreas size in prediction of early neonatal hypoglycemia in maternal diabetes mellitus

Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology,  
Moscow, Russian Federation

**Background.** The fetal pancreas is involved in regulation of glucose levels in both fetal and maternal plasma. Maternal hyperglycemia, regardless of the type of diabetes mellitus (DM), is accompanied by fetal hyperglycemia. This stress of the fetal pancreatic function causes a compensatory increase in the pancreas size, the development of fetal hyperinsulinemia and of neonatal hypoglycemia in the first hours of life. The frequency of laboratory hypoglycemia varies 21-60%, while its clinical symptoms are present in 25-33% of cases. **Aim.** To assess the prognostic value of the increase in fetal pancreas size on the eve of delivery as a predictor of neonatal hypoglycemia in maternal DM.

**Methods.** Ultrasound of the fetal pancreas was performed in 241 pregnant women with DM (main group) and in 427 healthy pregnant women (control group). In the main group, 141 (58.5%) pregnant women had children with signs of diabetic fetopathy (DF). The size of the fetal pancreas was estimated. In newborns, glycemia was measured on the 1st and 3rd days of life. A retrospective correlation analysis of the fetal pancreas size and the neonatal glycemia was performed on the 1st and the 3rd days of life.

**Results.** A negative linear correlation was found between the pancreas thickness and neonatal hypoglycemia on the 1st day of life (linear correlation coefficient,  $R, -0.66$ ). On the 1st day of life in 87.5-100% of these newborns, hypoglycemia is observed, which is more pronounced in premature infants and which remains through the 3<sup>rd</sup> day of life in 50% of them.

**Conclusion.** The thickness of the fetal pancreas is a more informative and reproducible indicator than its length, which was statistically significant in groups both with and without DF. Poor glycemic control in mothers increases the risk of neonatal hypoglycemia up to 100%. More pronounced hypoglycemia is observed in premature infants and persists through the 3rd day of life in half of them.

**Keyword:** diabetes mellitus; diabetic fetopathy; pancreas of the fetus; hypoglycemia of the newborn

**For citation:** Lysenko C.N., Chechneva M.A., Burumkulova F.F., Petrukhin V.A., Budykina T.C. Role of the fetal pancreas size in prediction of early neonatal hypoglycemia in maternal diabetes mellitus. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(4): -. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**For correspondence:** *Sergey N. Lysenko*, Doctor of Medical Sciences, art. sci. sotr. Departments of ultrasound diagnostics of MONIAG, e-mail: server@mail.ru

**Contribution:** concept and design of the study – Lysenko C.N., Burumkulova F.F.; collection and processing of the material – Lysenko C.N., Budykina T.C.; preparation of illustrative material – Lysenko C.N., Chechneva M.A.; statistical processing – Lysenko C.N.; writing of the text – Lysenko C.N.; editing – Lysenko C.N., Chechneva M.A., Burumkulova F.F., Petrukhin V.A.

**Financing.** This study was initiated as part of grant #16-15-10408 from the Russian Science Foundation and as part of the research work of the Moscow Regional Center «Diabetes Mellitus and Pregnancy».

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

### Information about the authors:

Lysenko S.N., <https://orcid.org/0000-0003-3280-2799>

Burumkulova F.F., <https://orcid.org/0000-0001-9943-0964>

Received 11.01.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

## Введение

При СД у матери плод по-разному реагирует на гипо- и гипергликемию в зависимости от срока гестации. До 20-й нед гестации островковые клетки поджелудочной железы (ПЖ) плода не могут отвечать и контролировать материнскую гипергликемию, что может привести к врожденным порокам развития плода или неразвивающейся беременности. Во 2-м триместре (после 20-й нед) плод уже реагирует: в ответ на собственную гипергликемию отвечает гипер-

плазией бета-клеток островков и фетальным гиперинсулинизмом [2]. В нормальных условиях постнатально активность инсулярного аппарата у ребенка снижается, а выработка глюкагона повышается. При ДФ сохраняется гиперинсулинемия и высокая толерантность к глюкозе, ввиду этого гипогликемия развивается, несмотря на большие запасы гликогена и жира, а глюконеогенез строится за счет белков (глюкокортикоиды усиливают их катаболизм). Этого недостаточно для сохранения нормальной гликемии

и тканевого метаболизма, что приводит к неонатальной гипогликемии различной тяжести. При СД 1-го типа у матери через 1 ч после рождения в крови новорожденного возникает гипогликемия. При СД 2-го типа скорость возникновения гипогликемии более низкая и возникает через 2 ч. При гестационном СД (ГСД) её возникновение происходит в промежутке 2-3 ч. У здоровых новорожденных при развитии транзиторной гипогликемии возникает выработка и утилизация кетонов, как источника энергии. [3, 4]. Гипогликемией новорожденных принято считать уровень гликемии в цельной капиллярной крови менее 1,7 ммоль/л у недоношенных, и менее 2,6 ммоль/л у доношенных детей. При беременности нижняя граница уровня глюкозы у плода составляет 3 ммоль/л, а уровень глюкозы снижается примерно до 2,8 ммоль/л к 2 ч и восстанавливается до уровня 3,9 ммоль/л к 72 ч жизни [4].

Частота лабораторно подтвержденной гипогликемии у новорожденных детей варьирует от 21 до 60%, тогда как клинические симптомы гипогликемии обнаруживаются лишь у 25-30% новорожденных<sup>1</sup>.

**Цель исследования.** Оценить прогностическое значение размеров ПЖ плода накануне родов в качестве предиктора неонатальной гипогликемии при СД у матери.

### Методика

*Для достижения цели исследования поставлены следующие задачи:* 1) На основании УЗИ брюшной полости плода у здоровых беременных и беременных с СД, выявить размеры его ПЖ. 2) Определить величину длины и ширины ПЖ плода. 3) Провести ретроспективный корреляционный анализ размеров ПЖ у новорожденных с гипогликемией в 1-е и 3-и сут жизни. 4) Оценить роль УЗИ ПЖ плода накануне родов в прогнозе неонатальной гипогликемии.

Проведена ультразвуковая морфометрия ПЖ плода у 241 беременной с СД (основная группа) и у 427 здоровых беременных (контрольная группа). Из 241 беременной основной группы СД 1-го типа был верифицирован у 126 беременных (52,3%), СД 2-го типа – у 20 пациенток (8,3%) и гестационный сахарный диабет (ГСД) – у 95 беременных (39,4%). В основной группе у 141 (58,5%) беременной родились дети с фенотипическими признаками диабетической фетопа-

тии (ДФ). У новорожденных проводился анализ гликемии в 1-е сут (в первые 6 ч после рождения) и 3-и сут жизни. Ретроспективный анализ размеров ПЖ плода проводился после оценки гликемии новорожденного и уточнения признаков ДФ. Оценивались длина ПЖ плода и её толщина.

Критерии исключения: 1) многоплодная беременность; 2) подтвержденные хромосомные аномалии и врожденные пороки развития у плода; 3) возраст беременной моложе 18 лет.

Клиническое обследование пациенток и их родо-разрешение проведено на базе ГБУЗ МО Московский областной НИИ акушерства и гинекологии МОНИ-ИАГ. Продолжительность исследования 2016 – 2018 г.

**Описание медицинского вмешательства.** Качество компенсации оценивалось по уровню гликированного гемоглобина и показателям суточного мониторинга гликемии, который проводился беременными амбулаторно с использованием персональных глюкометров и ведением дневника самоконтроля. Инсулинотерапия при ГСД назначалась в случае неэффективности диетотерапии. Критерием неэффективности диетотерапии считали превышение гликемии натощак более 5,1 ммоль/л или после еды выше 7,0 ммоль/л чаще чем 2 раза в неделю.

Глюкоза венозной плазмы у новорожденных оценивалась амперометрическим ферментным методом с использованием сенсорной технологии (Daisy's Germany Dr Muller).

Диагноз «Диабетическая фетопатия (ДФ)» новорожденному устанавливался на основании: увеличения массы тела при рождении выше 2 или более 90 перцентили (по шкале Г.М. Деметьевой, программа «Auxology» (Pfizer). в сочетании с признаками диспропорционального телосложения (увеличение размеров внутренних органов, короткая шея и относительно короткие конечности, маленькая голова, широкий плечевой пояс, толстая шейная складка), утолщения и отека подкожного жирового слоя, признаков неонатальной гипогликемии.

ПЖ плода оценивалась с помощью УЗ аппарата Medison V-20 компании Samsung в группе контроля с 16 нед, в основной группе после 30 нед гестации. ПЖ плода определялась в брюшной полости плода на уровне левого надпочечника, имела слегка изогнутую форму. Эхогенность её выше, чем у печени и селезенки, и сопоставима с эхогенностью кишечника. Головка ПЖ граничила справа с желчным пузырем, печенью и двенадцатиперстной кишкой плода, справа и сзади с аортой, нижней полой веной и почечными сосудами плода. Тело сзади граничит с позвоночником и селезеночной веной плода, которая служит ориентиром её визуализации. Ниже желудка она соприкасается с кишечником плода. При наличии гиперэхогенного кишечника определить её границы затруднительно. Хвост ПЖ плода слева ла-

<sup>1</sup> Патент на изобретение №2550282 от 8.04.2015 г. «Способ прогнозирования гипогликемии новорожденного от беременных с сахарным диабетом». Авт: Лысенко С.Н., Петрухин В.А., Чечнева М.А. Ермакова Л.Б. Башакин Н.Ф.



теральна граничит с селезёнкой и её воротами, слева сзади с левым надпочечником плода, спереди – с желудком. Чаще всего ПЖ удаётся визуализировать на поперечном «срезе» живота, одновременно с желудком, селезёночной веной, внутрибрюшным отделом вены пуповины, и шейкой желчного пузыря. В этом случае ПЖ выглядит в виде гиперэхогенного дугообразного образования с чёткими границами (рис. 1).

Результаты наблюдения за течением беременности, показатели гликемии, данные УЗИ размеров ПЖ плода, росто-весовые показатели и гликемия новорождённых, признаки ДФ, результаты молекулярно-генетического исследования, метод лечения (диета или инсулинотерапия), уровень глюкозы крови у новорождённых, гликированный гемоглобин были занесены в базу данных, специально разработанную с учётом цели исследования.

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004).

Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом ГБУЗ МО МОНИИАГ (протокол №87 от 16/06/2016 и протокол №89 от 30/06/2016). Информированное согласие было получено от всех пациентов, в том числе, и на обследование их детей.

Статистическая обработка материала проводилась с использованием программ Microsoft Office Excel 2010. Статистическую значимость различий определяли, используя критерий Манна-Уитни. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Проводили дисперсионный анализ Краскелла-Уоллиса, а также корреляционный анализ с определением коэффициента Спирмена (R) и Гамма (G). Данные представлены как медиана (нижний квартиль; верхний квартиль).

## Результаты исследования

Ретроспективно проведен анализ размеров ПЖ плодов от беременных контрольной и основной групп. У 135 (56,0%) беременных с СД родились дети, у которых развилась гипогликемия в 1-е сут жизни, у 34 (14,1%) гипогликемия сохранялась к 3-м сут жизни. Медиана возраста беременных в обеих группах был сопоставима и составила 30 лет [20 – 43 года]. Неудовлетворительным контролем СД к моменту родов считали гликированный гемоглобин более 6,0% (27,0%, 34 беременные) (табл. 1).

Ультразвуковая диагностика диабетической фетопатии включает в себя оценку состояния поджелудочной железы плода. Увеличение толщины поджелудочной железы является критерием тяжести диабетической фетопатии и отражает степень компенсации сахарного диабета матери. На УЗИ железа плода выглядит в виде гиперэхогенного дугообразного образования с чёткими границами (рис. 1, 2). Получение изображения ПЖ плода при доношенном сроке возможно у 96,8 % беременных. Неудачи связаны с наличием гиперэхогенного кишечника плода или значительным подкожным жировым слоем у женщины.

Как орган, ПЖ плода сформирована после 12 нед гестации. В нашем исследовании успешное изображение ПЖ было получено у более чем половины плодов после 17 нед. В 14 – 15 нед ПЖ плода визуализировалась только у одной пациентки, а в 16 – 17 нед – у 6-каждой 6-й. После 20 нед возможно получить изображения ПЖ плода у большинства пациенток. Полноценная визуализация и оценка размеров ПЖ плода в доношенном сроке возможна у 95 % обследуемых.

У плодов от матерей без СД толщина ПЖ увеличивается с ростом плода и срока гестации от 2,3 [2,1 – 2,7]

Таблица 1/Table 1

### Уровень гликированного гемоглобина у обследованных беременных с различными типами СД

#### Glycated hemoglobin in pregnant women with different types of diabetes

Тип диабета Type of diabetes	Гликированный гемоглобин (%) Glycogenated hemoglobin (%)	
	34-35 нед (34-35 week)	36-37 нед (36-37 week)
СД1 типа Type 1 diabetes	6,19 (5,64-6,97)	6,54 (5,79-6,63)
СД 2 типа Type 2 diabetes	7,50 (6,65 – 8,35)	5,81 (5,73 – 5,92)
ГСД (GD)	5,44 (5,06-6,34)	5,57 (5,21-5,99)

**Примечание.** ГСД – гестационный диабет.

**Note.** GD – Gestational diabetes.

мм в 16-17 нед до 7,0 [6,2 – 7,6] мм в 40 нед. На основании УЗ исследования ПЖ плода у здоровых беременных нами была разработана процентильная шкала её толщины по срокам беременности (табл. 2).

Использование длины ПЖ плода для диагностики ДФ возможно с высокой чувствительностью (до 91,6%), специфичностью (до 76,7%) и точностью

(до 82,3%). Однако, следует помнить о вариабельности её хода и высокой вероятности диагностической ошибки – прогностическая ценность положительного результата в нашем исследовании оказалась не более 68,7%.

При анализе изображения поджелудочной железы плода при диабетической фетопатии в проекции хвоста



A/A



B/B

Рис. 1. А – сахарный диабет I типа. Толщина поджелудочной железы 1,22 см (более 97П). Б – фрагмент рисунка 1. Островки отмечены стрелкой.  
 Fig. 1. A: Type I diabetes mellitus. The pancreas thickness is 1.22 cm (over 97P). B – a fragment of Figure 1. Islets are marked with an arrow.

Таблица 2/ Table 2

Процентильная шкала толщины поджелудочной железы плода в разные сроки гестации

Percentile thickness scale fetal pancreatic at different gestational ages

Недели (week)	Процентили (Percentile)								
	3	5	10	25	50	75	90	95	97
	Толщина ПЖ плода (мм) thickness fetal pancreatic (mm)								
16-17			2,0	2,1	2,3	2,7	3,0		
18-19	2,1	2,2	2,5	2,6	2,8	3,6	4,6	4,9	5,1
20-21	2,4	2,50	2,55	3,05	3,2	3,60	4,0	4,1	4,2
22-23	2,7	3,0	3,2	3,38	4,0	4,5	4,9	5,3	5,5
24-25	2,9	3,0	3,1	3,5	4,1	4,5	5,3	5,5	5,7
26-27	2,6	2,8	3,2	3,45	4,1	4,9	5,1	5,3	5,5
28-29	2,8	3,0	3,1	4,1	4,5	5,0	5,8	6,0	6,1
30-31	3,87	3,93	4,2	5,3	5,7	6,1	6,7	7,2	7,5
32-33	2,8	3,0	3,8	5,2	6,2	6,8	7,0	7,2	7,3
34-35	4,5	4,9	5,3	5,7	7,2	7,8	9,2	9,3	9,4
36-37	4,7	5,1	5,6	6,5	7,7	8,3	8,5	8,56	8,62
38-39	5,7	5,8	6,3	6,7	8,3	8,8	8,9	8,95	9,0
40	4,7	4,8	4,9	6,2	7,0	7,6	8,0	8,6	8,7

Примечание. ПЖ – поджелудочная железа плода

Note. Pancreas – the pancreas of the fetus.

визуализируются анэхогенные округлые включения без картируемого кровотока. По данным А.В. Савищева [2] в эксперименте при гипертермии в эндокринной части поджелудочной железы отмечается набухание панкреатических островков и функциональное многообразие в накоплении секреторных гранул в панкреатических островках. В литературе нет упоминаний об анэхогенных включениях в поджелудочную железу плода. На наш взгляд появление этих включений указывает на гипертрофию и функциональный ответ островкового аппарата ПЖ у плодов с ДФ на хроническую гипергликемию матери.



Рис. 2. Вид поджелудочной железы плода у беременной без сахарного диабета. Толщина поджелудочной железы 0,76 см.

Fig. 2. View of the fetal pancreas in a pregnant woman without diabetes mellitus. The pancreas thickness is 0.76 cm.

Предпочтительнее использовать толщину ПЖ плода для диагностики ДФ. Статистически значимые различия между группами контроля и ДФ по длине ПЖ плода выявлены в 34 – 39 нед. По толщине ПЖ статистически значимые различия с группой контроля были как в группе ДФ (32 – 37 нед), так и у плодов без ДФ (34 – 37 нед). Толщина ПЖ плода более воспроизводимый показатель. Утолщение ПЖ явилось статистически значимым признаком как в группе ДФ, так и без неё (табл. 3).

Более высокой была и диагностическая точность этого показателя. Чувствительность до 100%, точность до 85%, специфичность сопоставима с измерением её длины – 76,5%. Выше также была прогностическая ценность как положительного (до 77,8%), так и отрицательного результата (до 100%).

Один из наиболее значимых показателей состояния новорождённого от матерей с СД – уровень гликемии. Гипогликемия, развивающаяся в первые часы после рождения, приводит к нарушению ранней адаптации детей. Гипогликемия в 1-е сут жизни более выражена у новорождённых от матерей с ГСД, а также у недоношенных с признаками ДФ. Худшие показатели стабилизации гликемии в раннем неонатальном периоде имели дети, рождённые в 36 нед гестации при СД 1 типа матери и наличии антенатальных признаков ДФ, а также при неудовлетворительном контроле диабета у матери (табл. 4). При ГСД наибольшего внимания требовали дети, родившиеся в 37 нед гестации.

У новорождённых от матерей с неудовлетворительным контролем СД к моменту родов увеличение размеров поджелудочной железы встречалась от 88,9% (в 38–39 нед) до 100% (в 36 нед) наблюдений. В 1-е сут

Таблица 3/Table 3

Толщина поджелудочной железы плода, мм

Thickness of fetal pancreas, mm

Срок нед (week)	Контроль Control	Без ДФ (Without DF)	ДФ (DF)
30-31	5,7 [5,3 – 6,1]	6,4 (83П) [5,5 – 7,2]	8,0 (99П) [7,9 – 8,1]
32-33	6,2 [5,2 – 6,8]	6,1 (48П) [5,8 – 6,3]	<b>8,3* (&gt;99П) [8,1 – 8,4]</b>
34-35	7,2 [5,7 – 7,8]	<b>8,6** (84П) [7,4 – 9,5]</b>	<b>10,2* (&gt;99П) [8,8 – 11,0]</b>
36-37	7,7 [6,5 – 8,3]	<b>9,3* (&gt;99П) [8,5 – 10,9]</b>	<b>11,1* (&gt;99П) [9,3 – 12,0]</b>
38-39	8,3 [6,7 – 8,8]	8,8 (75П) [8,1 – 9,3]	8,8 (75П) [8,2 – 10,3]
40	7,0 [6,2 – 7,6]	5,6 (18П) [4,8 – 6,2]	-

Примечание. ДФ – диабетическая фетопатия. Медиана толщины поджелудочной железы плода (мм) по группам (в скобках указан 25-й и 75-й процентиль); \* –  $p < 0,01$ . \*\* –  $p < 0,05$ .

Note. DF – diabetic fetopathy. Median thickness of the fetal pancreas (mm) by group (25th and 75th percentiles); \*  $p < 0.01$ . \*\*  $p < 0.05$ .

жизни у 87,5% этих детей происходило снижение концентрации глюкозы крови, более выраженное (до 1,0 ммоль/л) гипогликемия была при преждевременных родах.

**Обсуждение**

Состояние ПЖ плода при СД матери в литературе описано недостаточно, при этом основная масса исследований морфометрические либо гистохимические [5, 6].

Органогенез ПЖ начинается на 4–5-й акушерских неделях внутриутробного развития [5]. Идентификация единой закладки ПЖ, визуализация активности её аденилатциклазы и ультраструктурная идентификация эндокринных гранул α- и β-клеток островков Лангерганса определяется на 7–8-й нед эмбриогенеза [2]. Дифференцировка ПЖ на экзокринный и эндокринный отделы происходит в конце эмбрионального периода. С 12-й нед начинается функционирование фетальной ПЖ [7, 8]. Постоянная гипергликемия у женщины в этот период является причиной реактивной гипертрофии ПЖ и гиперплазии β-клеток у её плода — развивается гиперинсулинемия [9, 10], являющаяся характерной особенностью ДФ [1, 11]. Иммуногистохимические исследования показали гиперплазию островковой ткани ПЖ плода с увеличением как инсулин-позитивных, так и инсулин-негативных клеток [1, 11, 12].

В ПЖ новорождённого при плохо контролируемом СД матери происходит дегрануляция большинства β-клеток с набуханием митохондрий [10]. Однако, длительная декомпенсация СД у матери во время

первых двух триместров беременности может, наоборот, привести к истощению β-клеток плода, к гипоинсулинемии и впоследствии к развитию СЗРП [1]. Количество инсулин-продуцирующих β-клеток и общий объём эндокринной ткани ПЖ у новорождённых с гипотрофией снижены [11].

Глюкоза материнской плазмы легко преодолевает плацентарный барьер. Гипергликемия матери сопровождается гипергликемией у плода. При этом ПЖ плода участвует в регуляции уровня глюкозы как в плазме плода, так и в плазме матери.

Нами было выявлено, что для прогноза ранней неонатальной гипогликемии предпочтительнее использовать толщину ПЖ плода, так как её утолщение демонстрирует большую эффективность для диагностики ДФ.

При большей толщине ПЖ плода более выражена гипогликемия у новорождённого в 1-е сут жизни. Наиболее неблагоприятными критериями прогноза развития гипогликемии в 1-е –3-и сут неонатального периода оказались **неудовлетворительный контроль СД** в течение беременности, антенатально выявленная **диабетическая фетопатия** и **утолщение ПЖ плода**. У новорождённых с толщиной ПЖ 1,25 см и более при доношенном сроке беременности (после 37 нед гестации), у всех была выявлена гипогликемия в 1-е сут жизни. Сохраняющаяся к 3-м сут жизни гипогликемия свидетельствует о сохранности функции ПЖ новорождённого. Однако, при этом, нарушена чувствительность её рецепторов к уровню гликемии и регуляция её функции. Метод родоразрешения беременных при ДФ не влияет на частоту возникновения гипоглике-

Таблица 4/Table 4

**Относительное количество новорождённых с гипогликемией в 1-е и 3-и сутки жизни**

**Relative number of newborns with hypoglycemia on days 1 and 3 of life**

Срок недели (week)	ГСД		СД 1-го типа (type 1 diabetes)		СД 2-го типа (type 2 diabetes)		ДФ (DF)		Без ДФ (Without DF)		НК (UK)	
	1 сут	3 сут	1 сут	3 сут	1 сут	3 сут	1 сут	3 сут	1 сут	3 сут	1 сут	3 сут
36 нед (week)	33%	0%	50%	100%			50%	100%	50%	0%	100%	50%
37 нед	75%	50%	64%	75%	50%	0%	63%	80%	100%	67%	54%	50%
38-39 нед (week)	67%	8,3%	44%	33%	50%	0%	58%	25%	43%	0%	87%	38%
40 нед (week)	67%	0%							100%	0%		

**Примечание.** Новорожденные от матерей при разных типах СД, наличии и отсутствии у ребёнка ДФ и при неудовлетворительном контроле СД; ДФ – диабетическая фетопатия; ГСД – гестационный сахарный диабет; НК – неудовлетворительный контроль СД;

**Note.** Newborns from mothers with different types of DM, with or without DF, and with poor DM control; DF – diabetic fetopathy. GDM – gestational diabetes mellitus. UK – Unsatisfactory counter DM.

мии новорождённого в 1-е сут жизни. Количество новорождённых с гипогликемией в 1-е сут жизни после кесарева сечения составило 52,0%, после родов через естественные родовые пути 53,8%.

Выявлена отрицательная линейная корреляция между утолщением ПЖ и гипогликемией новорождённого в 1-е сут жизни ( $r=-0,66$ ). У новорождённых от матерей с неудовлетворительным контролем за течением сахарного утолщение ПЖ встречалась в 88,9–100% наблюдений. В 1-е сут жизни у 87,5 – 100% этих детей происходит снижение концентрации глюкозы крови, более выраженное (до 1,0 ммоль/л) у недоношенных детей (в сроках гестации 37 нед и менее), у 50% этих детей, сохраняющееся к 3-м сут жизни.

В литературе нет сведений об ультразвуковой визуализации анэхогенных включений в поджелудочную железу плода. На наш взгляд появление этих включений указывает на гипертрофию и функциональный ответ островкового аппарата ПЖ у плодов с ДФ на хроническую гипергликемию матери. Описано набухание панкреатических островков и накопление секреторных гранул в них в эксперименте [1, 11, 12].

**Ограничение исследования.** Невозможность получения изображения ПЖ плода у 100% беременных и отсутствие процентильных норм для размеров ПЖ плода.

### Заключение

Таким образом, к ультразвуковым критериям для уточнения тяжести диабетической фетопатии следует относить утолщение ПЖ плода. Коэффициент линейной корреляции между утолщением поджелудочной железы и гипогликемией новорождённого в 1-е сут жизни составляет  $-0,66$  ( $r = -0,66$ ). У новорождённых от матерей с неудовлетворительным контролем за течением СД утолщение ПЖ встречалось почти в 100% наблюдений. В 1-е сут жизни у 87,5 – 100% этих детей возникает гипогликемия, более выраженная (до 1,0 ммоль/л) у недоношенных детей, а у 50% этих детей, сохраняется к 3-м сут жизни, что говорит о сохранении функции ПЖ новорождённого, но при этом, нарушена чувствительность её рецепторов к уровню гликемии. Метод родоразрешения не влияет на частоту возникновения у детей с диабетической фетопатией гипогликемии в 1-е сут жизни.

### Литература

#### (п.п. 3-6; 11; 12 см. References)

1. Рагозин А.К. Гестационный сахарный диабет. *Проблемы женского здоровья*. 2009; 4(4): 64-74.

2. Савишев А.В., Молдавская А.А. Морфогенез поджелудочной железы на этапах онтогенеза и при экспериментальном моделировании под воздействием стрессогенных факторов. Астрахань-Москва; 2011.
7. *Внутриутробное развитие человека: руководство для врачей*. Под ред. А.П. Милованова, С.В. Савельева. М.; 2006.
8. Гафарова Е.А. Новый подход к своевременной диагностике сахарного диабета во время беременности. *Практическая медицина*. 2014; 3: 41-5.
9. Суханов С.Г., Ковров К.Н., Дынина С.А. Пренатальный риск и морфогенез эндокринных желез плода. *Фундаментальные исследования*. 2004; 1: 116-7.
10. Коваленко Т.В. Диабетическая фетопатия. *Практическая медицина*. 2008; 3: 48-50.

### References

1. Ragozin A.K. Gestational diabetes mellitus. *Problemy shenskogo zdorov'ya*. 2009; 4(4): 64-74. (In Russian)
2. Savishev A.V., Moldavskaja A.A. *Morphogenesis of the pancreas at the stages of ontogenesis and experimental modeling under the control of stress factors*. [Morfogenez podzheludochnoy zhelezy na etapakh ontogeneza i pri eksperimental'nom modelirovanii pod vozdeystviem stressogennykh faktopov]. Astpahan-Moscow; 2011. (In Russian)
3. Kalhan S.C. Metabolism of glucose and methods of investigation in the fetus and the newborn. editors. *Fetal and Neonatal Physiology*. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2004: 449–64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35214-7.00039-1>
4. Cowett R.M., Farrag H.M. Selected principles of perinatal-neonatal glucose metabolism. *Semin Neonatol*. 2004; 9(1): 37–47. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1084-2756\(03\)00113-1](https://doi.org/10.1016/S1084-2756(03)00113-1)
5. Hill L.M., Peterson C., Rivello D., Hixson J., Belfar H.L. Sonographic detection of the fetal pancreas. *J Clin Ultrasound*. 1989; Sep; 17(7): 475-9. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcu.1870170704/>
6. Kivilevitch Zvi, Achiron Reuven, Perlman Sharon, Gilboa Yinon The Normal Fetal Pancreas. *J Ultrasound Med*. 2017 Oct; 36(10): 1997-2005. <https://doi.org/10.1002/jum.14233>
7. Milovanov A.P., Savel'ev S.V., ed. *Intrauterine human development: guide for physicians*. [Vnutriutrobnoe rasvitiye cheloveka: rukovodstvo dlya vrachey]. Moscow: MDV; 2006. (In Russian)
8. Gafarova E.A. A New approach to the timely diagnosis of diabetes during pregnancy. *Prakticheskaya meditsina*. 2014; (3): 41-5. (In Russian)
9. Suhanov S.G., Kovrov K.N., Dyndina S.A. Prenatal risk and morphogenesis of the endocrine glands of the fetus. *Fundamental'nye issledovaniya*. Moscow, RAEN. 2004; (1): 116-7. (In Russian)
10. Kovalenko T.V. Diabetic fetopathy. *Prakticheskaya meditsina*. 2008; (3): 48-50. (In Russian)
11. Holemans K., Aerts L., Van Assche F.A. Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. *J Physiol*. 2003; (547): 11-20. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.036582>
12. Calvo R.M., Forcen R., Obregon M.J., Del Rey F.E., De Escobar G.M., Regadera J.V. Immunohistochemical and Morphometric Studies of the Fetal Pancreas in Diabetic Pregnant Rats. Effects of Insulin Administration. *The Anatomical Record*. 1998; (251): 173-80. <https://doi.org/10.1002>

**Сведения об авторах:**

**Лысенко Сергей Николаевич**, доктор мед. наук, ст. науч. сотр. отд-ния ультразвуковой диагностики ГБУЗ МО «Московский областной НИИ акушерства и гинекологии», e-mail: serzwer@mail.ru, eLibrary SPIN: 3442-6268;

**Чечнева Марина Александровна**, доктор мед. наук, руководитель отд-ния ультразвуковой диагностики ГБУЗ МО «Московский областной НИИ акушерства и гинекологии», e-mail: marina-chechneva@yandex.ru, eLibrary SPIN: 2292-6321;

**Бурумкулова Фатима Фархадовна**, доктор мед. наук, вед науч сотр. терапевтической группы ГБУЗ МО «Московский областной НИИ акушерства и гинекологии», e-mail: fatima-burumkulova@yandex.ru, eLibrary SPIN: 6592-7736;

**Петрухин Василий Алексеевич**, доктор мед. наук, проф., директор «Московского областного НИИ акушерства и гинекологии», e-mail: petruhin271058@mail.ru, eLibrary SPIN: 9236-6783;

**Будыкина Татьяна Сергеевна**, доктор мед. наук, руководитель лаб. ГБУЗ МО «Московский областной НИИ акушерства и гинекологии», e-mail: budyt@mail.ru

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616(006+009.7):[616.36:576.311.347:576.367]:616.092.9

Франциянц Е.М., Нескубина И.В., Сурикова Е.И., Шихлярова А.И., Бандовкина В.А.,  
Каплиева И.В., Немашкалова Л.А., Трепитаки Л.К., Шейко Е.А., Качесова П.С., Черярина Н.Д.

## Показатели апоптоза в митохондриях клеток печени при росте меланомы B16/F10 на фоне хронической нейрогенной боли

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России,  
344037, Ростов-на-Дону, Россия 14 линия, д. 63

**Введение.** Печень по количеству, плотности митохондрий один из самых богатых органов, который также является критическим местом для множества метаболических путей. **Цель исследования** – изучение показателей апоптоза в митохондриях печени самок мышей линии C57BL/6 при самостоятельном росте меланомы B16/F10 и на фоне коморбидной патологии – хронической нейрогенной боли.

**Методика.** В эксперименте использовали мышей-самок ( $n=168$ ) линии C57BL/6. Группы: интактная ( $n=21$ ); контрольная ( $n=21$ ) – создание модели хронической нейрогенной боли (ХНБ), путем двусторонней перевязки седалищных нервов; группа сравнения ( $n=63$ ) – подкожная трансплантация меланомы B16/F10; основная группа (ХНБ+B16/F10) ( $n=63$ ) – подкожная трансплантация меланомы B16/F10 через 3 нед после моделирования ХНБ. В митохондриях печени методом ИФА определяли концентрацию: цитохрома С (нг/г белка), каспазы 9 (нг/г белка), Vcl-2 (нг/г белка), AIF (нг/г белка), кальция (Ca<sup>2+</sup>) (мМоль/г белка).

**Результаты.** В митохондриях клеток печени через 1 неделю роста меланомы относительно интактных значений фиксировали нарастание уровней AIF в 2,2 раза, цитохрома С в 1,7 раза ( $p<0,05$ ) и снижение каспазы 9 в 2,0 раза; через 3 нед – падение кальция в 4,7 раза, AIF в 7,1 раза и цитохрома С в 1,7 раза ( $p<0,05$ ) и накопление каспазы 9 – 1,6 раза ( $p<0,05$ ). Развитие опухоли при ХНБ через 1 нед сопровождалось уменьшением концентрации AIF в 29,3 раза и цитохрома С в 2,0 раза по сравнению с контрольными значениями (ХНБ). Через 3 недели роста меланомы на фоне ХНБ фиксировали снижение уровней AIF в 6,6 раза, цитохрома С в 4,7 раза и кальция в 32,8 раза, уровень каспазы 9, напротив, повышался в 1,5 раза ( $p<0,05$ ).

**Заключение.** Наличие коморбидной патологии – ХНБ при опухолевом процессе способствует раннему возникновению нарушений в электронно-транспортной цепи митохондрий клеток печени.

**Ключевые слова:** митохондрии клеток; печень; апоптоз; мыши-самки; экспериментальная меланома B16/F10; коморбидные заболевания; хроническая нейрогенная боль

**Для цитирования.** Франциянц Е.М., Нескубина И.В., Сурикова Е.И., Шихлярова А.И., Бандовкина В.А., Каплиева И.В., Немашкалова Л.А., Трепитаки Л.К., Шейко Е.А., Качесова П.С., Черярина Н.Д. Показатели апоптоза в митохондриях печени при росте меланомы B16/F10 на фоне хронической нейрогенной боли. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4):

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.

**Для корреспонденции:** Нескубина Ирина Валерьевна, e-mail: nes Kubina.irina@mail.ru

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Франциянц Е.М., Нескубина И.В.; сбор и обработка материала – Трепитаки Л.К., Шейко Е.А., Качесова П.С., Немашкалова, Л.А., Черярина Н.Д.; статистическая обработка – Сурикова Е.И., Бандовкина В.А.; написание текста – Франциянц Е.М., Нескубина И.В.; редактирование – Шихлярова А.И., Каплиева И.В.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.06.2021

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021

Frantsiyants E.M., Neskubina I.V., Surikova E.I., Shikhlyarova A.I., Bandovkina V.A., Kaplieva I.V., Nemashkalova L.A., Trepitaki L.K., Sheiko E.A., Kachesova P.S., Cheryarina N.D.

## Indicators of apoptosis in mitochondria of liver cells in female C57BL/6 mice with B16/F10 melanoma growing in presence of chronic neurogenic pain

National Medical Research Centre for Oncology,  
Rostov-on-Don, 14<sup>th</sup> Liniya 63, Bld. 8, Rostov-on-Don 344037, Russian Federation

**Background.** The liver is one of the richest organs in terms of the number and density of mitochondria; it is also a critical site for many metabolic pathways. **The aim** of the study was to analyze indicators of apoptosis in liver mitochondria in female C57BL/6 mice with B16/F10 melanoma growing alone and in presence of chronic neurogenic pain.

**Methods.** Female C57BL/6 mice ( $n=168$ ) were studied. Animals were divided into groups: intact group ( $n=21$ ); controls ( $n=21$ ) with a model of chronic neurogenic pain (CNP) created by bilateral sciatic nerve ligation; comparison group ( $n=63$ ) with subcutaneous transplantation of B16/F10 melanoma; main group (CNP+B16/F10) ( $n=63$ ) with subcutaneous transplantation of B16/F10 melanoma 3 wks after modeling CNP. Cytochrome C (ng/g protein), caspase-9 (ng/g protein), Bcl-2 (ng/g protein), AIF (ng/g protein), and calcium (Ca<sup>2+</sup>) (mmol/g protein) were measured by ELISA in the liver mitochondrial fraction.

**Results.** After 1 wk of melanoma growth, AIF increased by 2.2 times, cytochrome C increased by 1.7 times ( $p<0.05$ ), and caspase-9 decreased by 2.0 times compared to the intact group values. After 3 wks, calcium decreased by 4.7 times, AIF by 7.1 times, cytochrome C by 1.7 times ( $p<0.05$ ), and caspase-9 increased by 1.6 times ( $p<0.05$ ). After 1 wk, tumor development in the presence of CNP was accompanied by decreases in AIF by 29.3 times and cytochrome C by 2.0 times, compared to control CNP values. After 3 wks of melanoma growth in presence of CNP, AIF decreased by 6.6 times, cytochrome C by 4.7 times, and calcium by 32.8 times. Caspase-9, on the contrary, increased by 1.5 times ( $p<0.05$ ).

**Conclusions.** The presence of CNP comorbidity during the tumor development facilitates earlier occurrence of disorders in the electron transport chain of hepatocyte mitochondria.

**Keywords:** cell mitochondria; liver; apoptosis; female mice; experimental B16/F10 melanoma; comorbidity; chronic neurogenic pain

**For citation:** Frantsiyants E.M., Neskubina I.V., Surikova E.I., Shikhlyarova A.I., Bandovkina V.A., Kaplieva I.V., Nemashkalova L.A., Trepitaki L.K., Sheiko E.A., Kachesova P.S., Cheryarina N.D. Indicators of apoptosis in mitochondria of liver cells in female C57BL/6 mice with B16/F10 melanoma growing in presence of chronic neurogenic pain. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(4): -. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.

**For correspondence:** Irina V. Neskubina, e-mail: nes kubina.irina@mail.ru

**Contribution:** concept and design of the study – Frantsiyants E.M., Neskubina I.V.; collection and processing of the material – Trepitaki L.K., Sheiko E.A., Kachesova P.S., Nemashkalova L.A., Cheryarina N.D.; statistical processing – Surikova E.I., Bandovkina V.A.; writing of the text – Frantsiyants E.M., Neskubina I.V.; editing – Shikhlyarova A.I., Kaplieva I.V.

**Acknowledgment.** The study was not sponsored.

**Conflict of interests.** Authors declare no conflict of interests.

### Information about the authors:

Frantsiyants E.M., <https://orcid.org/0000-0003-3618-6890>

Neskubina I.V., <https://orcid.org/0000-0002-7395-3086>

Surikova E.I., <https://orcid.org/0000-0002-4318-7587>

Shikhlyarova A.I., <https://orcid.org/0000-0003-2943-7655>

Bandovkina V.A., <https://orcid.org/0000-0002-2302-8271>

Kaplieva I.V., <https://orcid.org/0000-0002-3972-2452>

Nemashkalova L.A., <https://orcid.org/0000-0003-2713-8598>

Trepitaki L.K., <https://orcid.org/0000-0002-9749-2747>

Sheiko E.A., <https://orcid.org/0000-0002-9616-8996>

Kachesova P.S., <https://orcid.org/0000-0001-6928-5014>

Received 23.06.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

## Введение

Печень – это многофункциональный орган, который играет ключевую роль в метаболическом гомеостазе, иммунной защите, и постоянно перестраивается

для обеспечения энергетических потребностей всего организма. Несмотря на замечательную адаптационную способность, длительное воздействие на клетки вредных факторов приводит к развитию хронических заболеваний печени. Существуют данные, свидетель-



ствующие о том, что дисфункция или дезадаптация митохондрий пагубно влияет на биоэнергетику гепатоцитов, которая выражается в нарушении гомеостаза активных форм кислорода (АФК), стрессе эндоплазматического ретикулума (ЭР), воспалении и гибели клеток [1]. Печень один из самых богатых органов с точки зрения количества и плотности расположения митохондрий.

Митохондрии представляют собой внутриклеточные органеллы, которые участвуют в биоэнергетическом метаболизме и клеточном гомеостазе, включая генерацию АТФ посредством транспорта электронов и окислительного фосфорилирования в сочетании с окислением метаболитов в цикле трикарбоновых кислот (ТСА) и катаболизме жирных кислот в реакциях  $\beta$ -окисления [3]. Митохондрии участвуют в производстве активных форм кислорода (АФК), а также иницировании и реализации апоптоза. Роль митохондрий в регулировании выживания или смерти клеток зависит от их исходного состояния [2]. Сообщалось, что здоровые митохондрии обеспечивают энергией соматические клетки, способствуют выживаемости и росту клеток [4, 5].

Митохондрии разных клеток различаются по размеру, плотности распределения, участию в метаболизме, скорости старения и апоптоза клеток [6]. В специализированных клетках органов (печени, мышц, сердца, почек и т. д.) митохондрии практически не делятся, а образуются предположительно в виде зародышевых прото-митохондрий диаметром менее 0,2 мкм, постепенно вырастают до зрелых органелл размером около 1 мкм и со временем деградируют до, так называемых, пост-митохондрий диаметром 1-6 мкм [7]. Учитывая важность митохондрий в функциональной активности печени, неудивительно, что возникает модификация работы митохондрий, как вероятного «центрального игрока» в развитии патологических процессов. Остается загадкой, почему митохондрии не могут адаптироваться к метаболическим проблемам и может ли прицельное воздействие на митохондрии предотвращать или обращать вспять прогрессирование их дисфункции [1].

Ранее было показано, что злокачественная опухоль не растет сама по себе в организме [8], а онкопроцесс – это опухолевая болезнь, которая предполагает участие всех внутренних органов в обеспечении опухолевого роста.

В свете этого исследования интересным представлялось изучение показателей апоптоза в митохондриях клеток печени на этапах подкожного роста меланомы.

Цель исследования – изучение апоптоза в митохондриях печени самок мышей линии C57BL/6 при самостоятельном росте меланомы B16/F10 и на фоне коморбидной патологии – хронической нейрогенной боли.

### Методика

Работа выполнена на мышах-самках линии C57BL/6 ( $n=168$ ), возраст 8 нед, начальная масса 21-22 г. Животные были получены из ФГБУ МНИЦ Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА (Московская область). В работе использовали клеточную линию мышинной меланомы B16/F10, метастазирующую в легкие. Опухолевый штамм получен из ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Работа с животными проводилась в соответствии с правилами «Европейской конвенции о защите животных, используемых в экспериментах» (Директива 86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, а также в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава России от 19 июня 2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики». Животные содержались при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России от 31.05.2018, был одобрен протокол исследования (протокол этического комитета № 2). Манипуляции с животными производили в боксе с соблюдением общепринятых правил асептики и антисептики.

Животные ( $n=168$ ) были рандомизированы на 4 группы: **интактная группа** ( $n=21$ ), **контрольная группа** ( $n=21$ ) – моделирование хронической нейрогенной боли (ХНБ). (Кит О.И., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Тренички Л.К., Котиева И.М. Способ модификации хронической болью злокачественного роста меланомы B16 у мышей)<sup>1</sup>. **Группа сравнения** ( $n=63$ ) – мыши со стандартной подкожной перевивкой меланомы B16/F10, **основная группа** ( $n=63$ ) (ХНБ+B16/F10) – мыши, которым меланому B16/F10 перевивали через 3 нед после моделирования ХНБ.

Мышам основной группы (ХНБ+B16/F10) осуществляли двустороннюю перевязку седалищных нервов под ксила-золетилловым наркозом: ксилазин (препарат Ксила) внутримышечно (0,05 мл/кг, по инструкции), через 10 мин – Золетил-50 (10 мг на 100 г). Через 3 нед после заживления операционной раны

<sup>1</sup>Патент на изобретение RU 2650587 С1, 16.04.2018.

подкожно под правую лопатку вводили 0,5 мл взвеси опухолевых клеток меланомы B16/F10 в физиологическом растворе в разведении 1:10. Животным из группы сравнения трансплантировали меланому B16/F10 подкожно в той же дозе и объёме, что и в основной группе, но без моделирования хронической боли. Декапитацию всех животных производили на гильотине. Животных из основной группы и группы сравнения декапитировали в следующие сроки роста меланомы B16/F10: 1-я нед (7-е сут роста), 2-я нед (14 – сут роста) и 3-я нед (21-е сут роста).

После декапитации у животных с применением хладагентов быстро извлекали печень и выделяли митохондрии по методу М.В. Егоровой, С.А. Афанасьева [9] с применением дифференциального центрифугирования на высокоскоростной рефрижераторной центрифуге Avanti J-E, BECMAN COULTER, США. Ткани промывали ледяным 0,9% раствором KCl. Для разрушения межклеточных связей, клеточной стенки и плазматических мембран применяли механическую обработку тканей с измельчением ножницами и гомогенизацией в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (гомогенизатор Поттера-Эльвегейма). На каждый грамм ткани добавляли по 10 мл среды выделения (0,22 М маннитол, 0,3 М сахароза, 1мМ ЭДТА, 2 мМ TRIS-HCL, 10мМ HEPES, pH 7,4). Ткани центрифугировали 1-й раз 10 мин при скорости 1000 g, температура 0-2 °С, 2-е и 3-е центрифугирование осуществлялось при 20 000 g, 20 мин, температура 0-2 °С. Между центрифугированием проводили процедуру ресуспендирования осадка митохондрий в среде выделения. Митохондрии дополнительно очищали от лизосом, пероксисом, меланосом, центрифугируя в 23% градиенте Перколла. Суспензию субклеточных структур наслаивали на градиент Перколла, центрифугировали 15 мин при 21 000 g, после чего наблюдалось разделение на 3 фазы, оставляли нижний слой митохондрий и ресуспендировали средой выделения. Следующую промывку митохондрий осуществляли путем центрифугирования в течение 10 мин при 15 000 g, температура 0-2 °С. Полученные митохондриальные образцы (концентрация белка 4-6 г/л) до анализа хранили при -80 °С в среде выделения. В митохондриальных образцах с помощью тест-систем на ИФА-анализаторе (Infinite F50 Tecan, Австрия) определяли концентрацию: цитохрома С (нг/г белка), каспазы-9 (нг/г белка) (Bioscience, Австрия); Bcl-2 (нг/г белка) (Thermo Fisher Scientific, Австрия); AIF (нг/г белка) (RayBiotech, США); кальция (Ca<sup>2+</sup>) (мМоль/г белка) (Абрис, Россия) и концентрацию белка в мг/мл – биуретовым методом (Ольвекс Диагностикум, Россия)

на автоматическом анализаторе ChemWell (Awareness Technology INC, США).

Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0. Полученные данные подвергали анализу на соответствие нормальному закону распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка (для малых выборок). Сравнение количественных данных в группах (независимые выборки) проводили с использованием критерия Краскала-Уоллиса (множественные сравнения). Данные представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое значение,  $m$  – стандартная ошибка среднего, за уровень статистической значимости принимали  $p < 0,05$ . Полученные результаты статистически обрабатывали с соблюдением общих рекомендаций для медицинских исследований.

### Результаты исследования

При изучении влияния ХНБ на митохондрии клеток печени обнаружили, что показатели характеризующие апоптоз в митохондриях печени у животных контрольной группы (ХНБ) статистически значимо отличались по ряду показателей от соответствующих значений у интактных животных (**таблица**). Так, уровень кальция был снижен в 2,7 раза. При этом повышенным оказался уровень AIF – в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) и уровень цитохрома С – в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ), уровень Bcl-2 и каспазы 9 не изменялся.

В митохондриях клеток печени при стандартном развитии меланомы у самок мышей обнаружено, что через 1 нед после перевивки опухоли в митохондриях печени относительно показателя в митохондриях печени интактных животных изменялись величины показателей: AIF – возрастал в 2,2 раза, цитохром С – в 1,7 раза ( $p < 0,05$ ), а уровень каспазы 9 – снижался в 1,95 раза (**таблица**). Не было выявлено изменений уровней кальция и Bcl-2. Через 2 нед от момента перевивки меланомы все исследуемые показатели оказались в пределах значений интактных животных. При этом относительно предыдущего срока исследования (1 нед), уровень AIF и цитохрома С были снижены в 2,7 и 2,2 раза, а уровень каспазы 9, напротив, повышен в 2,0 раза. Через 3 нед роста меланомы в митохондриях печени отмечено резкое снижение ряда показателей: уровень кальция снизился в 4,7 раза, уровень AIF – в 7,1 раза, уровень цитохрома С – 1,7 раза ( $p < 0,05$ ). В то же время уровень каспазы 9, напротив, возрос в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ). Не отмечено изменений в содержании Bcl-2. По сравнению с предыдущим сроком исследования ряд изучаемых показателей был снижен: каль-

ций в 6 раз, AIF в 5,8 раза, а уровень каспазы 9 увеличился в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ).

В данном исследовании в качестве коморбидной патологии при злокачественном процессе использовали модель ХНБ. Известно, что онкологические больные испытывают боль различного характера [10]. Ранее нами было показано стимулирующее влияние ХНБ на рост перевивной меланомы у мышей-самок, что выражалось в более раннем выходе опухоли и метастазировании, в том числе, на нетрадиционные сайты, а также сокращении сроков жизни животных [11].

После перевивки опухоли на фоне ХНБ через 1 нед найдено резкое падение уровня AIF в 29,3 раза и прак-

тически двукратное снижение уровня цитохрома С. Через 2 нед уровень AIF вернулся к показателям у контрольных мышей, т.е. увеличился относительно предыдущего срока исследования в 24,5 раза, в 2,1 раза увеличился уровень каспазы 9. При этом не обнаружено изменений в содержании цитохрома С, а уровень кальция снизился в 33,5 раза относительно предыдущего срока и стал в 29,5 раза ниже значений контрольных животных. Через 3 нед от момента перевивки меланомы на фоне ХНБ уровень кальция оставался низким, как и в предыдущий срок, уровень цитохрома С относительно контрольного показателя снизился в 4,7 раза, а по сравнению со значениями на 2-й нед – в 5,5 раза.

Таблица/Table

**Показатели апоптоза в митохондриях клеток печени самок мышей с меланомой B16/ F10 и меланомой сочетанной с хронической нейрогенной болью**

**Indicators of apoptosis in liver cell mitochondria in female mice with B16/F10 melanoma and with melanoma combined with chronic neurogenic pain**

Показатели (indicators)	Ca <sup>2+</sup> мМоль/г белка (Ca <sup>2+</sup> +mMol/g protein)	AIF нг/г белка (AIF ng/g protein)	Bcl-2 нг/г белка (Bcl-2 ng/g protein)	Цитохром С нг/г белка (Cytochrome C ng/g protein)	Каспаза 9 нг/г белка (Caspase 9 ng/g protein)
Интактная группа (intact group)	0,790±0,031	341,533±15,038	96,335±4,561	8,458±0,472	0,238±0,019
Группа с ХНБ контроль (CNP group control)	0,295±0,019 <sup>1</sup> <sup>1</sup> p=0,0000	511,413±36,675 <sup>1</sup> <sup>1</sup> p=0,0010	107,348±3,806	11,775±0,563 <sup>1</sup> <sup>1</sup> p=0,0007	0,238±0,019
Рост меланомы B16/F10 (группа сравнения) B16/F10 melanoma growth (comparison group)					
1 нед (1 week)	0,761±0,027	753,838±32,529 <sup>1</sup> <sup>1</sup> p=0,0000	112,189±4,405	14,748±0,756 <sup>1</sup> <sup>1</sup> p=0,0000	0,122±0,018 <sup>1</sup> <sup>1</sup> p=0,0009
2 нед (2 weeks)	1,014±0,035	278,963±26,065 <sup>3</sup> <sup>3</sup> p=0,00000	103,349±3,766	6,587±0,613 <sup>3</sup> <sup>3</sup> p=0,0000	0,236±0,019 <sup>3</sup> <sup>3</sup> p=0,0009
3 нед (3 weeks)	0,167±0,013 <sup>1,3</sup> <sup>1</sup> p=0,0000 <sup>3</sup> p=0,0000	47,822±4,283 <sup>1,3</sup> <sup>1</sup> p=0,0000 <sup>3</sup> p=0,0000	103,384±3,413	4,96±0,375 <sup>1</sup> <sup>1</sup> p=0,0000	0,373±0,022 <sup>1,3</sup> <sup>1</sup> p=0,0006 <sup>3</sup> p=0,0005
ХНБ + рост меланомы B16/F10 (основная группа) CNP + B16/F10 melanoma growth (main group)					
1 нед (1 week)	0,335±0,017	17,446±2,677 <sup>2</sup> <sup>2</sup> p=0,0000	102,353±3,805	6,017±0,332 <sup>2</sup> <sup>2</sup> p=0,0000	0,251±0,016
2 нед (2 weeks)	0,010±0,0004 <sup>2,3</sup> <sup>2</sup> p=0,0000 <sup>3</sup> p=0,0000	427,886±27,375 <sup>3</sup> <sup>3</sup> p=0,0000	98,077±3,501	6,42±0,647 <sup>2</sup> <sup>2</sup> p=0,0000	0,527±0,020 <sup>2,3</sup> <sup>2</sup> p=0,0000 <sup>3</sup> p=0,0000
3 нед (3 weeks)	0,009±0,0009 <sup>2</sup> <sup>2</sup> p=0,0000	77,326±4,774 <sup>2,3</sup> <sup>2</sup> p=0,0000 <sup>3</sup> p=0,0000	89,653±10,933	2,513±0,491 <sup>2,3</sup> <sup>2</sup> p=0,0000 <sup>3</sup> p=0,0004	0,356±0,022 <sup>2,3</sup> <sup>2</sup> p=0,0017 <sup>3</sup> p=0,0000

**Примечание.** Статистически значимые различия 1 – по отношению к уровню в интактной группе; 2 – по отношению к уровню в группе ХНБ (контроль); 3 – по отношению к уровню на предыдущем сроке исследования.

**Note.** Statistically significant differences: 1 – compared to the intact group; 2 – compared to the CNPgroup (control); 3 compared to the previous study period.

Содержание AIF и каспазы 9 было ниже контрольных величин в 6,6 раза и 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно, а также ниже значений предыдущего срока в 5,5 раза и 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. Ни в один из изученных сроков исследования не отмечено изменений в содержании Bcl-2.

Таким образом, было определено, что начало (1 нед) изолированного роста меланомы характеризуется нарастанием уровня AIF, цитохрома С и снижением уровня каспазы 9 в митохондриях клеток печени, к 3-й нед роста меланомы фиксировали падение уровней кальция, AIF и цитохрома С, при этом уровень каспазы 9 имел в динамике противоположную направленность и к 3-й нед отмечался рост уровня каспазы 9. Рост опухоли в условиях коморбидной патологии (ХНБ) на начальном этапе (1 нед) сопровождался падением AIF и цитохрома С в митохондриях клеток печени. На терминальном этапе (3 нед) роста меланомы на фоне ХНБ фиксировали снижение уровня AIF, цитохрома С и кальция, которое начиналось уже на 2-й нед. Уровень каспазы 9 при росте опухоли в условиях ХНБ повысился через 2 нед и оставался таковым до конца 3-й нед.

### Обсуждение

Основное различие между опухолевыми и нормальными клетками заключается в метаболическом перепрограммировании опухолевых клеток, при этом митохондрии опухоли играют решающую роль в этом процессе. Накапливающиеся данные указывают на то, что митохондрии опухоли по мере развития изменяют свою структуру и функцию, а аномальные митохондрии впоследствии ускоряют прогрессирование опухоли, что вызвано снижением способности окислительного фосфорилирования и индукции апоптоза [12, 13]. Однако внутренняя причина изменения митохондриальной функции все еще неясна. Наряду со способностью контролировать энергетический метаболизм клеток митохондрии принимают участие во многих других физиологических процессах, таких как апоптоз, аутофагия, редокс-сигнализация и перепрограммирование стволовых клеток [14-17]. Все эти явления зависят от количества ионов кальция, содержащихся в органеллах [18, 19].

Как основная буферная система большой емкости для ионов кальция, митохондрии участвуют в регуляции его внутриклеточного гомеостаза [20]. Изменения уровня кальция в митохондриях модулирует ключевые клеточные процессы, начиная от аэробного метаболизма (через чувствительные к кальцию дегидрогеназы и ферменты цикла Кребса) до высвобождения про-

апоптотических факторов, а также локальную модуляцию активности каналов и ферментов [21-23].

В настоящем исследовании показано снижение уровня кальция в митохондриях печени как при развитии ХНБ, так и по мере роста меланомы в самостоятельном варианте и на фоне ХНБ. Вероятно, это связано с изменением соотношения унипортеров переноса кальция (MCU), так как именно соотношение между  $Ca^{2+}$ -чувствительными регуляторами (MICU1) и поровой единицей MCU рассматривают как физиологический регулятор митохондриального захвата кальция в тканях, что способствует тканеспецифическому колебанию уровня кальция в направлении дифференциальной регуляции окислительного метаболизма в печени [24].

Семейство белков Bcl-2 строго регулирует внутренний путь апоптоза. Эти белки контролируют высвобождение из митохондрий специфических факторов активации каспаз. Некоторые из белков семейства Bcl-2 могут действовать как агонисты клеточной смерти, а такие как Bcl-2 и Bcl-xL могут действовать как антагонисты гибели клеток [25-27]. Внутренний путь апоптоза активируется множеством внутриклеточных сигналов, включая повреждение ДНК из-за онкогенного стресса [28]. Этот путь связан с нарушением потенциала внешней мембраны митохондрий и приводит к активации каспазы 9. Платформа, активирующая каспазу 9, содержит AIF и цитохром С. Внутриклеточные сигналы помогают в образовании пор во внешней митохондриальной мембране, что нарушает потенциал митохондриальной мембраны и вызывает высвобождение цитохрома С из внутренней мембраны митохондрий. Высвободившийся цитохром С образует комплекс с APAF1 и приводит к активации каспазы 9. Инициация каспазы 9, в свою очередь, активирует другие каспазы-эффекторы, что в конечном итоге приводит к гибели клеток [29].

Поскольку в настоящем исследовании уровень Bcl-2 не претерпевал изменений ни в случае действия ХНБ, ни в динамике стандартного или индуцированного роста меланомы, по-видимому, нельзя говорить о влиянии исследуемых факторов на апоптоз, тем более что практически у всех из них имеются и другие функции.

Вместе с тем, в настоящем исследовании обнаружены низкие значения уровня AIF и цитохрома С в митохондриях клеток печени при опухолевом процессе, сопряженном с коморбидной патологией – ХНБ, что по всей видимости приводит к подавлению активности комплексов I и IV дыхательной цепи митохондрий.

Цитохром С представляет собой небольшой глобулярный ядерно-кодируемый белок с ковалентно

присоединенной гемовой группой. Он расположен в митохондриальном межмембранном пространстве (IMS) в качестве мобильного одноэлектронного переносчика между комплексами III (комплекс  $Bc1$ ) и IV (цитохром C оксидаза, COX) электронно-транспортной цепи – ETC [30]. AIF играет биоэнергетическую роль, регулируя главным образом активность комплекса I дыхательной цепи митохондрий [31]. Было обнаружено, что в клетках человека или мыши подавление AIF приводит к серьезному снижению активности комплекса I дыхательной цепи. Дальнейшие исследования показали, что без AIF происходит снижение активности комплекса I дыхательной цепи, т.е. AIF необходим для нормального процесса окислительного фосфорилирования [32].

Печень является органом детоксикации, кроветворения, продуцентом факторов роста, местом метаболизации гормонов, центром синтеза белков. Функция печени регулируется как во времени, так и в пространстве: циркадные ритмы и потребление пищи, вместе с высоко структурно и функционально организованной архитектурой печени, разделение функций между типами клеток печени и половой диморфизм – все это вносит свой вклад в физиологию печени [33]. Поэтому полагаем, что через системы биологических путей или молекул происходит взаимодействие опухоли с печенью, что отражается на функционировании субклеточных структур печени и это можно отнести к патогенетическим характеристикам развития злокачественного процесса. С другой стороны, A. Fu и соавт. [2] установили, что здоровые митохондрии печени изменяют патогенез меланомы у мышей. Авторы исследовали влияние «нормальных» митохондрий печени, введенных внутривенно, на аномальный метаболизм опухоли у мышей с метастазами меланомы в легких. Результаты показали, что митохондрии здоровой печени значительно замедляли рост опухоли и увеличивали продолжительность жизни животных. Противоопухолевый эффект митохондрий был связан с изменением нарушенного метаболизма опухолевых клеток, таким как снижение гликолиза и образование «окислительной» внутриклеточной среды, а также с усилением апоптоза, некроза и митофагией клеток опухоли.

### Заключение

Согласно полученным данным, по изменению изучаемых показателей ( $Bc1-2$ , AIF, цитохром C, каспаза 9, кальций) в митохондриях клеток печени при самостоятельном и сопряженном с коморбидной патологией (ХНБ) ростом меланомы полагаем, что в митохондриях печени показатели, относящиеся

к факторам апоптоза выполняют несколько иные функции, которыми данные факторы обладают помимо осуществления программы апоптоза. Эти функции связаны с прямым или опосредованным участием в функционировании электронно-транспортной цепи митохондрий. В данном эксперименте было обнаружено, что у митохондрий клеток печени заблокирована способность поглощать кальций из цитозоля. Блокировка поглощения кальция в случае стандартного роста меланомы возникает на терминальном этапе (3-я нед) развития меланомы, а при росте меланомы на фоне коморбидной патологии неспособность митохондрий поглощать кальций возникает на 1 нед раньше -- на этапе логарифмического роста опухоли (2-я нед). Снижение не только уровня кальция, но и AIF, и цитохрома C может свидетельствовать о нарушении в функционировании электронно-транспортной цепи митохондрий клеток печени, которое возникает в случае стандартного роста меланомы на терминальном этапе, а при сочетании коморбидной патологии и опухолевого процесса на более раннем сроке развития опухоли, начиная с 1-й нед. Накопление каспазы 9 и стабильный уровень  $Bc1-2$  в митохондриях печени при всех исследуемых патологических процессах, по всей видимости, свидетельствует об отсутствии активации апоптоза вследствие закрытого состояния пор во внешней митохондриальной мембране. В результате эксперимента было выявлено, что наличие коморбидной патологии при опухолевом процессе способствует более раннему возникновению нарушений в электронно-транспортной цепи митохондрий клеток печени.

### Литература

#### (п.п. 1-7; 12-32 см. References)

8. Франциянц Е.М., Сидоренко Ю.С., Розенко Л.Я. *Перекисное окисление липидов в патогенезе опухолевой болезни*. Ростов-на-Дону; 1995.
9. Егорова М.В., Афанасьев С.А. Выделение митохондрий из клеток и тканей животных и человека: Современные методические приемы. *Сибирский медицинский журнал*. 2011; 26(1-1): 22-8.
10. Розенко Д.А., Шихлярова А.И., Попова Н.Н., Вереникина Е.В., Меньшенина А.П., Арджа А.Ю. и др. Оценка эффективности купирования послеоперационной боли и нормализация адаптационного статуса у пациенток с онкопатологией репродуктивной системы. *Южно-Российский онкологический журнал*. 2021; 2(1): 14-25. <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2021-2-1-2>
11. Кит О.И., Котиева И.М., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Трепятаки Л.К., Бандовкина В.А. и др. Влияние хронической нейропатической боли на течение злокачественного процесса меланомы в16/f10 у самцов мышей. *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки*. 2019; 1(201): 106-11.

## References

- Léveillé M., Estall J.L. Mitochondrial Dysfunction in the Transition from NASH to HCC. *Metabolites*. 2019; 9(10): 233. <https://doi.org/10.3390/metabo9100233>
- Fu A., Hou Y., Yu Z., Zhao Z., Liu Z. Healthy mitochondria inhibit the metastatic melanoma in lungs. *International journal of biological sciences*. 2019; 15(12): 2707–18. <https://doi.org/10.7150/ijbs.38104>
- Shi X., Zhao M., Fu C., Fu A. Intravenous administration of mitochondria for treating experimental Parkinson's disease. *Mitochondrion*. 2017; 34: 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.02.005>
- Robicsek O., Ene H.M., Karry R., et al. Isolated mitochondria transfer improves neuronal differentiation of schizophrenia-derived induced pluripotent stem cells and rescues deficits in a rat model of the disorder. *Schizophrenia Bull.* 2018; 44: 432–42. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbx077>
- Friedman J.R., Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature*. 2014; 505: 335–43. <https://doi.org/10.1038/nature12985>
- Vekshin N., Kovalev V., Chaplygina A. Germinal proto-mitochondria from rat liver. *Biochemistry and biophysics reports*. 2019; 20: 100710. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100710>
- Degli Esposti D., Hamelin J., Bosselut N., Saffroy R., Sebah M., Pommier A., et al. Mitochondrial roles and cytoprotection in chronic liver injury. *Biochem. Res. Int.* 2012; 2012: 387626. <https://doi.org/10.1155/2012/387626>
- Frantsyants E.M., Sidorenko Yu.S., Rosenko L.Ya. *Lipid peroxidation in the pathogenesis of tumor disease. [Perekisnoe okislenie lipidov v patogeneze opukholevoy bolezni]*. Rostov-on-Don; 1995. (in Russian)
- Egorova M.V., Afanasyev S.A. Isolation of mitochondria from cells and tissues of animals and human: modern methodical approaches. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2011; 26(1-1): 22-8. (in Russian)
- Rozenko D.A., Shikhlyarova A.I., Popova N.N., Verenikina E.V., Menshenina A.P., Ardzha A.Yu., et al. Efficiency mark postoperative pain management and normalization of adaptation status in patients with reproductive system oncopathology. *Yuzhno-Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal*. 2021; 2(1): 14-25. (in Russian). <https://doi.org/10.37748/2686-9039-2021-2-1-2>
- Kit O.I., Kotieva I.M., Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Bandovkina V.A., et al. *Influence of chronic neuropathic pain on the course of malignant 16/f10 melanoma in male mice. Byulletin of higher educational institutions. North Caucasus region. Natural sciences. [Severo-Kavkazskiy region. Seriya: Estestvennye nauki]*. 2019; 1(201): 106-11. (in Russian)
- Jan C.I., Tsai M.H., Chiu C.F., et al. Fenofibrate suppresses oral tumorigenesis via reprogramming metabolic processes: potential drug repurposing for oral cancer. *Int J Biol Sci*. 2016; 12: 786–98. <https://doi.org/10.7150/ijbs.13851>
- Ullmann P., Nurmik M., Begaj R., et al. Hypoxia- and microRNA-induced metabolic reprogramming of tumor-initiating cells. *Cells*. 2019; 8: E528. <https://doi.org/10.3390/cells8060528>
- Nikoletopoulou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N. Cross-talk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1833: 3448-59. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2013.06.001>
- Kamer K.J., Mootha V.K. The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter. *Nat. Rev. Mol Cell Biol*. 2015; 16: 545-53. <https://doi.org/10.1038/nrm4039>
- Rambold A.S., Pearce E.L. Mitochondrial dynamics at the interface of immune cell metabolism and function. *Trends Immunol*. 2018; 39: 6-18. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.08.006>
- Tilokani L., Nagashima S., Paupe V., Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem*. 2018; 62: 341-60. <https://doi.org/10.1042/EBC20170104>
- Rizzuto R. De Stefan, D.i, Raffaello A., Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2012; 13: 566-78. <https://doi.org/10.1038/nrm3412>
- Pallafacchina G., Zanin S., Rizzuto R. Recent advances in the molecular mechanism of mitochondrial calcium uptake. *F1000Res. Faculty Rev-1858. eCollection*. 2018. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15723.1>
- Belosludtsev K.N., Dubinin M.V., Belosludtseva N.V., Mironova G.D. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport: Mechanisms, molecular structures, and role in cells. *Biochemistry (Moscow)*. 2019; 84: 593–607. <https://doi.org/10.1134/S0006297919060026>
- Gilbert J.A., Parekh A.B. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca<sup>2+</sup> current I (CRAC). *EMBO J*. 2000; 19: 6401–7. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.23.6401>
- Giorgi C., Marchi S., Pinton P. The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. *Nat. Rev Mol Cell Biol*. 2018; 19: 713–30. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0052-8>
- Belosludtsev N.K., V Dubinin M., Yu Talanov E., S Starinets, V., S Tenkov K., M Zakharova, N., et al. Transport of Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-Dependent Permeability Transition in the Liver and Heart Mitochondria of Rats with Different Tolerance to Acute Hypoxia. *Biomolecules*. 2020; 10(1): 114. <https://doi.org/10.3390/biom10010114>
- Paillard M., Csordás G., Szanda G., Golenár T., Debattisti V., Bartok A., et al. Tissue-Specific Mitochondrial Decoding of Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> Signals Is Controlled by the Stoichiometry of MICU1/2 and MCU. *Cell reports*. 2017; 18(10): 2291–300. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.032>
- Dai H., Meng X.W., Kaufmann S.H. Mitochondrial apoptosis and BH3 mimetics. *F1000Res*. 2016; 5: 2804. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9629.1>
- Sarosiek K.A., Letai A. Directly targeting the mitochondrial pathway of apoptosis for cancer therapy using BH3 mimetics - recent successes, current challenges and future promise. *FEBS J*. 2016; 283: 3523–33. <https://doi.org/10.1111/febs.13714>
- Strasser A., Vaux D.L. Viewing BCL2 and cell death control from an evolutionary perspective. *Cell Death Differ*. 2018; 25: 13–20. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.145>
- Mehrbod P., Ande S.R., Alizadeh J., Rahimizadeh S., Shariati A., Malek H., et al. The roles of apoptosis, autophagy and unfolded protein response in arbovirus, influenza virus, and HIV infections. *Virulence*. 2019; 10(1): 376–413. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1605803>
- Sochalska M., Tuzlak S., Egle A., et al. Lessons from gain- and loss-of-function models of pro-survival Bcl2 family proteins: implications for targeted therapy. *FEBS J*. 2015; 282: 834–49. <https://doi.org/10.1111/febs.13188>
- Wan J., Kalpage H. A., Vaishnav A., Liu J., Lee I., Mahapatra G., et al. Regulation of Respiration and Apoptosis by Cytochrome c Threonine 58 Phosphorylation. *Scientific reports*. 2019; 9(1): 15815. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105704>
- Hangen E., Féraud O., Lachkar S., Mou H., Doti N., Fimia G.M., et al. Interaction between AIF and CHCHD4 Regulates Respiratory Chain Biogenesis. *Mol. Cell*. 2015; 58: 1001–4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.020>

32. Bano D., Prehn J. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. *EBioMedicine*. 2018; 30: 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.03.016>
33. Berthier A., Johanns M., Zummo F.P., Lefebvre P., Staels B. PPARs in liver physiology. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2021; 1867(5): 166097. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166097>

**Сведения об авторах:**

**Франциянц Елена Михайловна**, доктор биол. наук, проф., заместитель генерального директора по науке ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: super.gormon@ya.ru, РИНЦ SPIN-код: 9427-9928;

**Нескубина Ирина Валерьевна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: neskubina.irina@mail.ru, РИНЦ SPIN-код: 3581-8531;

**Сурикова Екатерина Игоревна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: sunsur2000@mail.ru, РИНЦ SPIN-код: 2401-4115;

**Шихлярова Алла Ивановна**, доктор биол. наук, проф., ст. науч. сотр. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail shikhliarova.a@mail.ru, РИНЦ SPIN-код: 6271-0717;

**Бандовкина Валерия Ахтямовна**, ст. науч. сотр. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, канд. биол. наук, e-mail: valerryana@yandex.ru;

**Каплиева Ирина Викторовна**, доктор мед. наук, зав. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: kaplirina@yandex.ru, РИНЦ SPIN-код: 5047-1541;

**Немашкалова Людмила Анатольевна**, науч. сотр. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: tilde09@rambler.ru, РИНЦ SPIN-код: 1355-8652;

**Трепитаки Лидия Константиновна**, мл. науч. сотр. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: legolab69@yandex.ru, РИНЦ SPIN-код: 2052-1248;

**Шейко Елена Александровна**, канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: esheiko@inbox.ru;

**Качесова Полина Сергеевна**, научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: vnr.kachesova@gmail.com;

**Черярина Наталья Дмитриевна**, врач-лаборант лаб. изучения патогенеза злокачественных опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: scalolas.92@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616.348-002.44-085.243:615.356

Осиков М.В., Бойко М.С., Симонян Е.В.

## Выраженность ответа острой фазы при экспериментальном язвенном колите в условиях применения витамина D<sub>3</sub> в составе оригинальных ректальных суппозиториях

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России (ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава РФ), 454092, г. Челябинск, ул. Воровского, д. 64

**Цель** -- изучение влияния витамина D<sub>3</sub> в составе оригинальных ректальных суппозиториях на выраженность острофазового ответа при экспериментальном язвенном колите

**Методика.** Эксперимент выполнен на 49 половозрелых крысах-самцах Wistar. Язвенный колит (ЯК) моделировали двухэтапным (накожным, а затем ректальным) применением 3% спиртового раствора оксазолон. Оригинальные суппозитории на основе смеси полиэтиленгликолей массой 300 мг, содержащие 1500 МЕ витамина D<sub>3</sub>, вводили *per rectum* каждые 12 ч в течение 6 сут. Исследования проводили на 2-е, 4-е и 6-е сут заболевания. Клиническую картину оценивали по адаптированной для крыс шкале Disease activity index (DAI) с учетом массы тела, консистенции и наличия крови в каловых массах. Количество лейкоцитов и нейтрофилов определяли на гематологическом анализаторе. Функциональную активность нейтрофилов исследовали по поглощению частиц монодисперсного латекса в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте. Концентрацию в сыворотке крови С-реактивного белка (С-РБ), IL-6 и IL-8 определяли с помощью иммуноферментного анализа, экспрессию TNF-α в стенке толстой кишки -- иммуногистохимическим методом.

**Результаты.** При экспериментальном ЯК на 2-е, 4-е и 6-е сут наряду с прогрессирующим повышением DAI зафиксированы изменения показателей острофазового ответа (ОФФ): увеличивается экспрессия в толстой кишке TNF-α с максимальным уровнем на 4-е и 6-е сут, повышается концентрация в сыворотке крови IL-6 с максимальным уровнем на 4-е, IL-8 -- на 6-е сут; в сыворотке возрастает концентрация С-РБ максимально на 6-е сут, в крови увеличивается общее количество лейкоцитов, число палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов с максимальным уровнем на 2-е и 4-е сут. Возрастает поглотительная и НСТ-редуцирующая способность нейтрофилов крови с максимальными значениями на 4-е и 6-е сут эксперимента. Применение при экспериментальном ЯК ректальных суппозиториях с витамином D<sub>3</sub> приводит на 4-е и 6-е сут наблюдения к снижению DAI, экспрессии TNF-α в толстой кишке и количества нейтрофилов, на 2-е, 4-е и 6-е сут -- к уменьшению концентрации IL-6 и С-РБ в сыворотке, поглотительной и НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови, на 6-е сут -- к снижению концентрации IL-8 в сыворотке и общего количества лейкоцитов в крови.

**Заключение.** Применение при экспериментальном ЯК оригинальных ректальных суппозиториях с витамином D<sub>3</sub> приводит к снижению индекса активности болезни. Выраженность клинических проявлений ослабевает по мере снижения экспрессии в кишке TNF-α, снижения концентрации в сыворотке IL-6, количества в крови лейкоцитов и нейтрофилов, уменьшения НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов.

**Ключевые слова:** язвенный колит, витамин D<sub>3</sub>, ответ острой фазы, IL-8, IL-6, TNF-α, С-реактивный белок

**Для цитирования:** Осиков М.В., Бойко М.С., Симонян Е.В. Выраженность ответа острой фазы при экспериментальном язвенном колите в условиях применения витамина D<sub>3</sub> в составе оригинальных ректальных суппозиториях. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): - .

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**Для корреспонденции:** Осиков Михаил Владимирович, e-mail: prof.osikov@yandex.ru

**Участие авторов:** Осиков Михаил Владимирович -- концепция и дизайн исследования, анализ полученных данных, написание текста, редактирование рукописи; Бойко Маргарита Сергеевна -- набор экспериментального материала, статистическая обработка данных, анализ полученных данных, написание текста.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.01.2021

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021



Osikov M.V., Boyko M.S., **Simonyan E.V.****Severity of the acute phase response in experimental ulcerative colitis under conditions of the use of vitamin D3 in a novel rectal suppository**

South Ural Medical University,  
Vorovskogo Str. 64, Chelyabinsk 454092, Russian Federation

**Aim.** To study the effect of vitamin D3 in rectal suppositories on severity of the acute phase response (APR) in experimental ulcerative colitis (UC).

**Methods.** Experiments were performed on 49 mature male Wistar rats. UC was induced by cutaneous followed by rectal applications of a 3% oxazolone alcohol solution. Novel polyethylene glycol suppositories (300 mg) containing 1500 IU of vitamin D3 were injected *per rectum* every 12 hrs for 6 days. Data were collected on days 2, 4, and 6 of UC. The clinical picture was assessed according to the Disease Activity Index (DAI) scale adapted for rats, taking into account body weight, consistency of, and the presence of blood in the feces. The number of blood leukocytes and neutrophils was determined on a hematological analyzer and in blood smears. The functional activity of neutrophils isolated from the blood was evaluated by the absorption of monodisperse latex particles and with the spontaneous and induced NBT test. Serum concentrations of C-reactive protein (CRP), IL-6 and IL-8 were measured by enzyme immunoassay. TNF- $\alpha$  expression in the colon wall was measured by an immunohistochemical method.

**Results.** The following changes in APR variables along with a progressive increase in DAI were recorded on days 2, 4, and 6. Expression of colon TNF- $\alpha$  increased, with maximal values on days 4 and 6. Serum IL-6 increased and reached a maximal value on day 4; and serum IL-8 increased, with a maximum on day 6. Serum CRP increased, with a maximum on day 6. The total number of blood leukocytes and the number of stab and segmented neutrophils increased, with maximal values on days 2 and 4. The absorption and NBT-reducing ability of blood neutrophils increased, with maximal values on days 4 and 6. The use of rectal suppositories with vitamin D3 in experimental UC resulted in decreases in DAI, colon TNF- $\alpha$  expression, and the number of blood neutrophils on days 4 and 6; decreases in serum concentrations of IL-6 and CRP, and the absorption and NBT-reducing ability of blood neutrophils on days 2, 4, and 6; and decreases in the serum concentration of IL-8 and in the total number of blood leukocytes on day 6. Severity of clinical manifestations was alleviated with decreases in the expression of colon TNF- $\alpha$ , the serum concentration of IL-6, the number of blood leukocytes and neutrophils, and the NBT-reducing ability of neutrophils decreases.

**Conclusion.** Application of the original rectal suppositories with vitamin D3 every 12 hours in experimental UC leads to a decrease in the disease activity index. The severity of clinical manifestations weakens as TNF- $\alpha$  expression, serum IL-6 concentration, number of leukocytes and neutrophils in blood, and decrease of neutrophil NBT-reducing capacity decrease.

**Keywords:** ulcerative colitis; vitamin D3; acute phase response; IL-8; IL-6; TNF- $\alpha$ ; C-reactive protein

**For citation:** Osikov M.V., Boyko M.S., **Simonyan E.V.** The severity of the response of the acute phase in experimental ulcerative colitis in conditions of the use of vitamin D3 in the original rectal suppositories. *Pathological physiology and experimental therapy*. 2021; 65(4): -

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**For correspondence:** **Mikhail V. Osikov**, head. Department of Pathological Physiology, FSBEI HE SUSMU, Ministry of Health of Russia, e-mail: prof.osikov@yandex.ru

**Contribution:** Osikov M.V. — concept and design of the study, analysis of the data obtained, writing the text, editing the manuscript; Boyko M.S. — a set of experimental material, statistical data processing, analysis of the data obtained, writing a text.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Information about the authors:**

Osikov M.V., <https://orcid.org/0000-0001-6487-908>

Boyko M.S., <https://orcid.org/0000-0002-4046-2424>

Received 10.01.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

## Введение

Болезнь Крона и язвенный колит (ЯК) характеризуются хроническим воспалением в стенке желудочно-кишечного тракта в результате дисбаланса врожденного и адаптивного иммунного ответа на микробиом кишечника и триггеры окружающей среды в генетически предрасположенном организме [1-4]. Иници-

рующим этапом патогенеза ЯК является повреждение стенки толстой кишки, которое приводит к активации макрофагов, нейтрофилов, лимфоцитов, эндотелиоцитов и др. клеток, повышению синтеза и секреции IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  и др. провоспалительных цитокинов, запускающих острофазный ответ (ОФ) [5, 6]. Ключевыми проявлениями ОФ выступают

активация синтеза в печени и увеличение концентрации в крови С-реактивного белка (С-РБ) и др. белков ООФ, стимуляция миелоидного ростка костного мозга с увеличением количества и активности нейтрофилов в крови и др. признаки. Ряд показателей ООФ, в частности уровни С-РБ, IL-6 выступают в качестве диагностических и прогностических маркеров при ЯК [2].

Используемые в настоящее время консервативные терапевтические подходы при ЯК (производные 5-аминосалицилатов, глюкокортикоиды, иммуносупрессоры, биологические методы) вызывают тяжелые побочные эффекты, ограничивающие их применение у трети больных, кроме того они, с учетом пожизненного назначения, весьма затратны, что является предпосылкой для поиска альтернативных, патогенетически обоснованных методов лечения [7]. Витамин D<sub>3</sub>, продемонстрировал свои положительные эффекты при таких аутоиммунных заболеваниях, как сахарный диабет I типа, ревматоидный артрит, псориаз [8]. Рецептор витамина D<sub>3</sub> (VDR) широко представлен в эпителиоцитах толстой кишки [9]. Содержание витамина D<sub>3</sub> в сыворотке крови, а также экспрессия рецептора витамина D<sub>3</sub> в слизистой толстой кишки у больных ЯК ниже, чем у здоровых, оба показателя отрицательно коррелируют с активностью ЯК [10]. При экспериментальных колитах различной этиологии дефицит витамина D или нокаут гена VDR приводят к тяжелому течению заболевания, а пероральное применение витамина D<sub>3</sub> уменьшает тяжесть заболевания [11]. Концентрация в сыворотке крови при ЯК одного из ключевых маркеров ООФ – С-реактивного белка (С-РБ) имеет обратную корреляционную связь с концентрацией в сыворотке крови витамина D<sub>3</sub> [10]. В РФ отсутствуют лекарственные формы с витамином D<sub>3</sub>, локально воздействующие на участок поврежденной толстой кишки при ЯК, что явилось предпосылкой для разработки оригинальных ректальных суппозиториях [12]. Ранее нами продемонстрировано антиоксидантное действие витамина D<sub>3</sub> в составе ректальных суппозиториях при ЯК за счет снижения содержания в стенке толстой кишки продуктов перекисного окисления липидов и продуктов окислительной модификации белков [13, 14]. **Цель работы** – изучить влияние витамина D<sub>3</sub> в составе оригинальных ректальных суппозиториях на выраженность острофазового ответа при экспериментальном ЯК.

### Методика

Эксперимент выполнен на 49 крысах-самцах Wistar массой 215-245 г. Работа проводилась в соответствии с требованиями Европейской конвенции по содержа-

нию, уходу и выводу из эксперимента лабораторных животных [15]. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ (протокол №11 от 27.12.2017). Животные случайным образом были разделены на 3 группы: 1-я группа (n=7) – интактный контроль, 2-я (n=21) – животные с ЯК; 3-я (n=21) – животные с ЯК в условиях применения *per rectum* витамина D<sub>3</sub> каждые 12 ч до выведения крыс из эксперимента на 6-е сут. Анестезию проводили путем внутримышечного введения препарата «Золетил-100» (МНН: тилетамин гидрохлорид, «Virbac Sante Animale», Франция) в дозе 20 мг/кг. ЯК моделировали двухэтапным применением 150 мкл 3% спиртового раствора оксазолон («Sigma-aldrich», США): на первом этапе путем нанесения на кожу между лопаток, на втором -- введением *per rectum* на глубину 7-8 см [16]. Верификацию ЯК проводили клиническими и морфологическими методами исследования. Суппозитории изготавливали на основе 10% водного раствора витамина D<sub>3</sub> с использованием смеси полиэтиленгликолей различной молекулярной массы, эмульгатора Т-20, кремофора RH-40 и колифора Р 407. Размер и форма суппозитория соответствовали особенностям строения дистального отдела толстой кишки крыс, конечная масса каждого суппозитория составляла 300 мг, содержание витамина D<sub>3</sub> в каждом суппозитории 1500 МЕ [12]. Клинический статус оценивали, используя шкалу активности болезни (Disease activity index, DAI) адаптированную для крыс, показатели включают массу тела, консистенцию стула и наличие крови в каловых массах. Каждый критерий оценивали по шкале от 0 до 4, баллы суммировали, минимальное значение индекса – 0, максимальное – 12 [17]. Оценку в крови общего количества лейкоцитов выполняли с помощью автоматического гематологического анализатора для ветеринарии «BC-2800Vet» («Mindray», Китай), откалиброванного для крови крыс, лейкоцитарную формулу определяли путем подсчета клеток в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Нейтрофилы выделяли из цельной крови на градиенте плотности стерильных растворов фикола («Pharmacia», Швеция) и верографина («Spofa», Чехия). О функциональной активности нейтрофилов крови судили по поглощению частиц монодисперсного полистирольного латекса с оценкой активности фагоцитоза, фагоцитарного числа, по кислородзависимому метаболизму в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в спонтанном и индуцированном режимах с подсчетом активности и интенсивности НСТ-теста [18]. На автоматическом иммуноферментном анализаторе «Personal LAB» (Италия) с использованием специфических тест-систем

для крыс фирмы «Cloud-Clon Corp.» (Китай) в сыворотке крови определяли концентрацию интерлейкина-8 (IL-8), интерлейкина-6 (IL-6) и С-РБ, результат выражали в пг/мл. Иммуногистохимически оценивали экспрессию TNF- $\alpha$  в стенке толстой кишки с использованием наборов специфических для крыс антител «Cloud-Clon Corp.» (Китай) и высокоадгезивных стекол с положительно заряженной поверхностью (Super Frost Plus), результат выражали в ед/мм<sup>2</sup>.

Полученные данные обрабатывали, используя программу «IBM SPSS Statistics v.23» (США). Характеристика выборок представлена в формате «Me (Q1; Q3)», где Me – медиана, Q1 и Q3 – значения нижнего и верхнего квартиля соответственно. Для оценки значимости различий между двумя группами использовали непараметрические критерии Манна-Уитни, Вальда-Вольфовитца, Колмогорова-Смирнова при условии, что межгрупповые различия значимы по критерию Краскела-Уоллиса. Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Статистически значимыми считали отличия при  $p < 0,01$ .

### Результаты исследования

При экспериментальном ЯК у животных на 2-е сут наблюдения отмечалось снижение массы тела, увеличение числа дефекаций, консистенция кала становилась жидкой с присутствием крови, определяемой визуально и в бензидиновой пробе. На 4-е и 6-е сут клинические признаки усугублялись, кроме этого, у крыс снижалась двигательная активность, уменьшалось число подходов к пище и воде. Клиническая картина четко подтверждается статистически значимым увеличением индекса DAI на 2-е, 4-е и 6-е сут. DAI прогрессивно увеличивается от 2-х к 6-м сут наблюдения, значение DAI на 6-е сут статистически значимо ( $p < 0,01$ ) выше, чем на 2-е сут (табл. 1). При экспериментальном ЯК

на 2-е, 4-е и 6-е сут зафиксировано статистически значимое увеличение экспрессии TNF- $\alpha$  в толстой кишке. В динамике ЯК экспрессия TNF- $\alpha$  на 4-е сут значимо выше, чем на 2-е, а на 6-е не отличается от показателя 4-х сут. Как видно из табл. 2, максимальная экспрессия TNF- $\alpha$  в толстой кишке фиксируется на 4-е и 6-е сут. Исследование концентрации цитокинов в сыворотке крови выявило статистически значимое увеличение уровня IL-6 и IL-8 на 2-е, 4-е и 6-е сут экспериментального ЯК (табл. 2). Концентрация в сыворотке крови IL-6 на 4-е и 6-е сут значимо выше, чем на 2-е сут наблюдения, концентрация IL-8 остается стабильно высокой на всех сроках наблюдения.

Исследование С-РБ в сыворотке крови выявило статистически значимое его увеличение у крыс 2-й группы на всех сроках наблюдения. Уровень С-РБ прогрессивно возрастает с достижением максимальных значений к 6-м сут эксперимента. В динамике прогрессирования ЯК статистически значимо увеличивается общее количество лейкоцитов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов (табл. 3). Количество палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов постепенно снижается к 6-м сут эксперимента: на 4-е сут существенно не отличается от 2-х сут, на 6-е ниже, чем на 2-е и 4-е сут наблюдения. Исследование поглотительной способности нейтрофилов выявило значимое повышение активности фагоцитоза и фагоцитарного числа на 2-е, 4-е и 6-е сут ЯК. В динамике ЯК активность фагоцитоза на 4-е сут значимо не отличается от 2-х сут, на 6-е сут существенно не отличается от 4-х и 2-х сут, фагоцитарное число на 4-е сут значимо ниже, чем на 2-е сут, на 6 сут не отличается от 2 сут, но несколько выше, чем на 4-е сут. НСТ-редуцирующая активность нейтрофилов крови в спонтанном режиме увеличивается на 2-е, 4-е и 6-е сут ЯК по показателю активности НСТ-теста, на 4-е и 6-е сут – по показателю

Таблица 1/ Table 1

**Влияние витамина D<sub>3</sub> в составе ректальных суппозиториев на индекс активности болезни (DAI, у.е.) при экспериментальном ЯК (Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>))**

**The effect of vitamin D3 in the composition of rectal suppositories on the disease activity index (DAI, cu) in experimental UC (Me (Q1; Q3))**

Группа I Group I	Группа 2/Group II			Группа 3/Group III		
	2 сутки/2 day	4 сутки/4 day	6 сутки/6 day	2 сутки/2 day	4 сутки/4 day	6 сутки/6 day
0	7,00 (3,00;7,00) *	8,00 (6,00;10,00) *	11,00 (11,00;11,00) *	5,00 (5,00;5,00) *	4,00 (4,00;5,00) **, **	4,00 (4,00;4,00) **, **

**Примечание.** \*\* – значимые ( $p < 0,01$ ) различия с группой 1; \*\* – с группой 2.

**Note.** \* – statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) with group 1; \*\* - with group 2.

интенсивности НСТ-теста; в индуцированном режиме активность и интенсивность НСТ-теста значимо увеличиваются на 2-, 4- и 6-е сут исследования. В динамике наблюдения активность и интенсивность спонтанного НСТ-теста на 6-е сут значимо выше чем на 2-е и 4-е сут, активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста на 4-е сут значимо выше, чем на 2-е и 6-е сут.

Применение витамина D<sub>3</sub> в составе ректальных суппозиториях при экспериментальном ЯК приводило к изменению клинической картины у животных. Масса тела не снижалась, каловые массы были более оформленными, кровь в каловых массах определялась только в бензидиновой пробе. Указанные изменения нашли отражение в показателе DAI, который статистически значимо уменьшался на 4-е и 6-е сутки эксперимента, но отличался от значений в группе интактных животных, то есть восстанавливался частично (табл. 1). На фоне локального применения витамина D<sub>3</sub> при ЯК на 4-е и 6-е сут в толстой кишке значимо снижается экспрессия TNF-α (табл. 2). При анализе концентрации цитокинов в сыворотке получены следующие данные: концентрация IL-6 снижается на 2-е, 4-е

и 6-е сут эксперимента, концентрация IL-8 снижается только на 6-е сут (табл. 2). Отметим, что при применении витамина D<sub>3</sub> при ЯК экспрессия TNF-α в толстой кишке, концентрация в сыворотке IL-6 и IL-8 во все сроки наблюдения значимо отличаются от значений в группе интактных животных, то есть восстанавливаются частично.

При экспериментальном ЯК в условиях применения ректальных суппозиториях с витамином D<sub>3</sub> концентрация в сыворотке С-РБ снижается на 2-е, 4-е и 6-е сут наблюдения, но не достигает значений в группе интактных животных во все сроки наблюдения (табл. 2). При исследовании общего количества лейкоцитов в крови выявлено их значимое снижение только на 6-е сут наблюдения без достижения значений интактных животных (табл. 3). Количество палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов снижается на 4-е и 6-е сут наблюдения. Следует отметить, что количество палочкоядерных нейтрофилов значимо не отличается от значений интактных животных на 6-е сут, сегментоядерных нейтрофилов – на 4-е и 6-е сут эксперимента. Применение витамина D<sub>3</sub> в составе ректальных суппозиториях при ЯК значимо изменяет поглотительную

Таблица 2/ Table 2

**Влияние витамина D<sub>3</sub> в составе ректальных суппозиториях на содержание С-РБ в сыворотке, цитокинов в сыворотке и в стенке толстой кишки при экспериментальном ЯК (Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>))**

**Influence of vitamin D<sub>3</sub> in the composition of rectal suppositories on the content of CRP in serum, cytokines in serum and in the wall of the colon in experimental UC (Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>))**

Показатели Indicator	Группа I Group I	Группа 2/ Group II			Группа 3/ Group III		
		2 сутки/2 day	4 сутки/4 day	6 сутки/6 day	2 сутки/2 day	4 сутки/4 day	6 сутки/6 day
TNF-α, ед./мм <sup>2</sup> толстой кишки TNF-α, units/mm <sup>2</sup> of the colon	16,28 (7,66-26,81)	752,87 (703,06; 814,17)*	1302,68 (1264,36; 1321,83)*	1321,83 (919,54; 1475,09)*	766,28 (670,49; 957,85)*	727,96 (727,97; 766,28)*,**	210,72 (172,41; 229,88)*,**
IL-6, пг/мл сыворотки IL-6, pg/ml serum	16,57 (15,65; 18,41)	45,11 (44,18; 46,03)*	51,55 (50,63;52,47)*	52,47 (49,71; 54,31)*	38,66 (37,74; 39,58)*,**	34,98 (30,38; 36,82)*,**	24,85 (23,93; 25,77)*,**
IL-8, пг/мл сыворотки IL-8, pg/ml serum	90,61 (88,51;93,12)	273,47 (222,36;291,08)*	224,91 (217,68;233,41)*	245,74 (225,76; 296,36)*	227,46 (205,35; 243,62)*	214,71 (194,31; 243,19)*	216,41 (184,94; 226,19)*,**
С-РБ, пг/мл сыворотки CRP, pg/ml serum	44,97 (40,76; 47,51)	188,12 (184,68;189,26)*	263,82 (214,51;267,26)*	314,01 (309,71; 446,43)*	133,79 (127,89; 141,66)*,**	123,96 (118,91; 132,67)*,**	106,81 (106,53; 108,51)*,**

**Примечание.** \* – значимые (p < 0,01) различия с группой 1; \*\* – с группой 2.

**Note.** \* – statistically significant differences (p < 0.01) with group 1; \*\* – with group 2.

способность нейтрофилов крови: активность фагоцитоза и фагоцитарное число снижаются на 2-е, 4-е и 6-е сут наблюдения. При этом значений в группе интактных животных достигает только активность фагоцитоза на 6-е сут эксперимента. При исследовании НСТ-редуцирующей активности нейтрофилов крови выявлено, что в спонтанном режиме на 2-, 4- и 6-е сут эксперимента значимо снижается активность, а на 6-е сутки снижается интенсивность НСТ-теста. В индуцированном режиме на 2-, 4- и 6-е сут эксперимента значимо снижается активность, а на 2-е и 4-е сут – интенсив-

ность НСТ-теста. Отметим, что на 2-е сут эксперимента достигает значений интактных животных активность спонтанного НСТ-теста, а также активность и интенсивность индуцированного НСТ-теста, на 4-е сутки – активность спонтанного индуцированного НСТ-теста и интенсивность индуцированного НСТ-теста, на 6-е сут – только интенсивность спонтанного НСТ-теста.

### Обсуждение

Выявленные изменения показателей при экспериментальном ЯК обусловлены известными закономер-

Таблица 3/Table 3

**Влияние витамина D<sub>3</sub> в составе ректальных суппозиториев на количественный состав лейкоцитов, функциональную активность нейтрофилов крови при экспериментальном ЯК (Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>))**

**The effect of vitamin D<sub>3</sub> in the composition of rectal suppositories on the quantitative composition of leukocytes, the functional activity of blood neutrophils in experimental UC (Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>))**

Показатели Indicator	Группа 1 Group I	Группа 2/ Group II			Группа 3/ Group III		
		2 сутки/2 day	4 сутки/4 day	6 сутки/6 day	2 сутки/2 day	4 сутки/4 day	6 сутки/6 day
Лейкоциты, • 10 <sup>9</sup> /л WBC, • 10 <sup>9</sup> /l	4,40 (4,00;5,40)	10,45 (7,10;12,80)*	6,45 (6,00; 11,40)*	8,95 (6,10;14,20)*	11,05 (6,80;11,70)*	7,40 (5,40;9,30)*	6,73 (5,00; 9,80)*,**
ПЯН, • 10 <sup>9</sup> /л PNEU, • 10 <sup>9</sup> /l	0,04 (0;0,14)	0,37 (0,21;0,38)*	0,23 (0,15;0,41)*	0,12 (0,07;0,14)*	0,22 (0,13;0,23)*,**	0,17 (0,14;0,27)*,**	0,07 (0;0,19)**
СЯН, • 10 <sup>9</sup> /л SNEU, • 10 <sup>9</sup> /l	1,36 (1,33;1,56)	5,41 (2,41;6,14)*	2,43 (2,04;4,78)*	2,28 (1,74;3,13)*	5,03 (2,14;5,03)*	1,67 (1,13;2,88)**	1,99 (1,37;5,39)**
Активность фагоцитоза, % Phagocytosis activity, %	36,00 (32,00; 39,00)	78,50 (74,00;79,00)*	61,00 (61,00; 78,00)*	74,00 (69,00;75,00)*	49,00 (39,00;52,00)*,**	46,00 (41,00; 54,00)*,**	42,00 (34,00; 52,00)**
Фагоцитарное число, у. е. Phagocytic number, in units	1,88 (1,87;2,22)	15,65 (14,78;16,25)*	13,06 (10,28; 13,27)*	16,18 (13,69;19,29)*	11,96 (8,29;12,98)*,**	9,51 (8,17; 10,95)*,**	12,76 (11,01; 13,52)*,**
НСТ-тест спонтан- ный, активность, % NST test is sponta- neous, activity, %	4,00 (4,00;5,00)	10,50 (8,00;15,00)*	14,50 (11,00; 15,00)*	16,50 (14,00;19,00)*	5,00 (3,00;5,00)**	6,50 (4,00;8,00)**	7,00 (5,00; 9,00)*,**
НСТ-тест спонтанный, интенсивность, у. е. NST test is sponta- neous, intensity, in units	0,06 (0,05;0,07)	0,05 (0,05;0,11)	0,13 (0,05; 0,30)*	0,19 (0,11;0,27)*	0,06 (0,06;0,06)	0,08 (0,08;0,18)*	0,07 (0,06; 0,10)**
НСТ-тест индуциро- ванный активность, % NBT test induced activity, %	3,50 (3,00;4,00)	12,50 (10,00;14,00)*	30,00 (22,00; 37,00)*	22,50 (17,00;26,00)*	3,00 (3,00;4,00)**	7,00 (6,00;9,00)*,**	6,00 (4,00; 10,00)*,**
НСТ-тест индуциро- ванный интенсив- ность, у. е. NBT-test induced intensity, in units	0,06 (0,06;0,06)	0,19 (0,19;0,20)*	0,39 (0,34;0,39)*	0,19 (0,12;0,23)*	0,05 (0,03;0,09)**	0,11 (0,06;0,15)**	0,13 (0,10;0,13)*

**Примечание.** \* – значимые ( $p < 0,01$ ) различия с группой 1; \*\* – с группой 2. ПЯН – палоякоядерные нейтрофилы, СЯН – сегментоядерные нейтрофилы. НСТ (спонтанная и индуцированная интенсивность), фагоцитарное число – в условных единицах (у.е.).

**Note.** \* – statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) with group 1; \*\* – with group 2. PNEU - nuclear neutrophils, SNEU - segmented neutrophils. NBT(spontaneous and induced intensity), phagocytic number, — in units.

ностями формирования ООФ в ответ на первичное повреждение стенки толстой кишки спиртовым раствором оксазолон и вторичное повреждение факторами иммунной системы. Полагают, что оксазолон выступает в роли гаптена инициирует Th2-зависимый иммунный ответ с повышением продукции IL-4, IL-5, IL-13 T- и NK-T-клетками собственной пластинки и наиболее приближен к клиническим и морфологическим признакам ЯК у людей [4]. Ранее нами продемонстрирована ассоциация клинических признаков и содержания продуктов перекисидации липидов и окислительной модификации белков в стенке толстой кишки при экспериментальном ЯК [19]. В ответ на повреждение толстой кишки активируются нейтрофилы, моноциты/макрофаги, эндотелиоциты и др. клетки, участвующие в синтезе и секреции провоспалительных цитокинов,

в частности IL-6, IL-8, TNF-α, что было обнаружено, начиная со 2-х сут экспериментального ЯК с максимальной выраженностью на 4-е и 6-е сут. Увеличение концентрации С-РБ в сыворотке крови при экспериментальном ЯК связано со стимуляцией синтеза белков ООФ в печени под воздействием IL-6 и других провоспалительных цитокинов. TNF-α, IL-1β усиливают провоспалительные функции нейтрофилов и макрофагов, что сопровождается повышением концентрации IL-8 в крови [2, 4, 6]. IL-8, в свою очередь, являясь мощным хемоаттрактантом, увеличивает в очаге повреждения количество нейтрофилов, моноцитов/макрофагов и др. клеток. Увеличение в крови количества нейтрофилов, их поглотительной и НСТ-редуцирующей способности реализуется за счет демаргинации в сосудистом русле и выхода зрелых нейтрофилов

Таблица 4 Table 4

**Корреляция между индексом активности болезни (DAI, у.е.) и показателями острофазового ответа при ЯК в условиях применения ректальных суппозиториях с витамином D<sub>3</sub>**

**Correlation between the disease activity index (DAI, cu) and indicators of acute phase response in UC under conditions of using rectal suppositories with vitamin D<sub>3</sub>**

Показатели / Indicator	Группа 1/Group I	Группа 2/Group II	Группа 3/Group III
Лейкоциты, • 10 <sup>9</sup> /л WBC, • 10 <sup>9</sup> /l	<b>0,94</b>	0,28	0,57
ПЯН, • 10 <sup>9</sup> /л PNEU, • 10 <sup>9</sup> /l	0,05	<b>0,52</b>	<b>0,71</b>
СЯН, • 10 <sup>9</sup> /л SNEU, • 10 <sup>9</sup> /l	0,01	<b>0,61</b>	0,14
Активность фагоцитоза, % (Phagocytosis activity, %)	0,35	0,12	0,21
Фагоцитарное число, у. е. Phagocytic number, u. e.	0,16	0,18	0,41
НСТ-тест спонтанный, активность, % NST test is spontaneous, activity, %	<b>0,77</b>	0,23	0,05
НСТ-тест спонтанный, интенсивность, у. е. NST test is spontaneous, intensity, in units	<b>0,70</b>	0,24	0,05
НСТ-тест индуцированный, активность, % NBT test induced, activity, %	0,41	0,30	0,31
НСТ-тест индуцированный, интенсивность, у. е. NBT-test induced, intensity, in units	0,03	0,33	0,23
IL-8, пг/мл сыворотки (IL-8, pg/ml serum)	0,19	0,18	0,11
IL-6, пг/мл сыворотки (IL-6, pg/ml serum)	<b>0,57</b>	0,31	0,11
С-РБ, пг/мл сыворотки (CRP, pg/ml serum)	0,31	0,28	0,22
TNF-α, ед./мм <sup>2</sup> толстой кишки TNF-α, units/mm <sup>2</sup> of the colon	<b>0,73</b>	0,29	0,29

**Примечание.** Приведены значения коэффициента корреляции Спирмена (R). Полужирным шрифтом выделены статистически значимые (p<0,05) связи. НСТ(спонтанная и индуцированная интенсивность) , фагоцитарное число — в условных единицах (у.е.).

**Note.** The values of the Spearman correlation coefficient (R). Statistically significant (p < 0.05) connections are highlighted in bold. NBT (spontaneous and induced intensity), phagocytic number, — in units.

из костного мозга на 2-е сут, а также активации пролиферации и дифференцировки клеток миелоидного ростка в костном мозге под действием провоспалительных медиаторов, в том числе IL-6 и IL-8, концентрация которых в сыворотке увеличивается.

Выявленное действие витамина D<sub>3</sub> на клинический статус и показатели острофазового ответа могут быть связаны с его способностью восстанавливать целостность эпителиального барьера толстой кишки за счет усиления синтеза винкулина, зонулина, окклюдина и др. белков через взаимодействие со специфическими рецепторами (VDR) и ограничивать очаг повреждения толстой кишки. Восстановление эпителиального барьера толстой кишки приводит к снижению синтеза провоспалительных цитокинов в очаге, что способствует ограничению площади вторичной альтерации и уменьшению выраженности ООФ [11, 20]. Еще один механизм протекторного действия витамина D<sub>3</sub> при ЯК может быть связан с благоприятным влиянием на состав кишечной микрофлоры в условиях дисбиоза при данной патологии [21]. Мишенями кальцитриола выступают активированные Т-клетки, НК-клетки, где через ингибирование активации STAT1 и STAT3 снижается синтез провоспалительных цитокинов [22]. В опухолевых клетках простаты витамин D<sub>3</sub> подавляет провоспалительный сигнальный путь, опосредованный p38 MAPK, и как следствие синтез TNF-α, IL-6. Противовоспалительный эффект витамина D<sub>3</sub> может быть опосредован ингибированием ЦОГ-2, снижением синтеза простагландинов и снижением экспрессии их рецепторов, что было показано при аденокарциноме толстой кишки и опухолях молочной железы [23]. С использованием корреляционного анализа установлены связи между показателем DAI и исследуемыми показателями ООФ в динамике экспериментального ЯК в условиях применения ректальных суппозиториях с витамином D<sub>3</sub> (табл. 4). На 2-е сут выявлены прямые сильные связи с общим количеством лейкоцитов в крови, экспрессией в кишке TNF-α, активностью и интенсивностью спонтанного НСТ-теста, прямая средней силы связь -- с концентрацией в сыворотке IL-6. На 4-е сут зафиксированы прямые средней силы связи с количеством в крови палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов. На 6-е сут выявлена прямая сильная связь с количеством палочкоядерных нейтрофилов.

### Заключение

Полученные результаты демонстрируют протекторный эффект оригинальных ректальных суппозиториях, содержащих 1500 МЕ витамина D<sub>3</sub> в отношении клинической активности экспериментального

ЯК и выраженности ООФ, что дополняет имеющиеся представления о плейотропных эффектах витамина D<sub>3</sub> в организме и является предпосылкой для проведения дальнейших исследований по уточнению на доклиническом этапе механизма локального действия витамина D<sub>3</sub> в толстой кишке и перспективности его применения в клинической практике.

### Литература

#### (п.п. 1-11; 16; 17; 20-23 см. References)

12. Патент РФ № 2019115328, 2019.05.20. Симонян Е.В., Осиков М.В., Бойко М.С., Бакеева А.Е. *Средство с витамином D<sub>3</sub> для лечения язвенного колита в форме ректальных суппозиториях*. Патент РФ № 2709209. 2019. Бюл. №35
13. Осиков М.В., Симонян Е.В., Бойко М.С., Огнева О.И., Ильиных М.А., Воргова Л.В. Влияние витамина D<sub>3</sub> в составе оригинальных ректальных суппозиториях на показатели окислительной модификации белков в толстом кишечнике при экспериментальном язвенном колите. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020; 170(11): 563–8. Doi:10.47056/0365-9615-2020-170-11-563-568
14. Осиков М.В., Симонян Е.А., Бойко М.С. Влияние витамина D<sub>3</sub> в составе ректальных суппозиториях оригинального состава на показатели свободнорадикального окисления в слизистой оболочке толстой кишки в динамике экспериментального язвенного колита. *Вестник уральской медицинской академической науки*. 2020; 17(1): 42–52. Doi:10.22138/2500-0918-2020-17-1-42-52
15. Директива 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Санкт-Петербург; 2012.
16. Фрейдлин И.С. *Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека: учебное пособие*. Л., 1986.
17. Осиков М.В., Давыдова Е.В., Бойко М.С., Бакеева А.Е., Кайгородцева Н.В., Галеева И.Р. и др. Особенности свободнорадикального окисления в толстом кишечнике при язвенном колите и болезни Крона. *Вестник РГМУ*. 2020; 3: 63–70. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.027

### References

1. Wedlake L., Slack N., Andreyev H.J., Whelan K. Fiber in the treatment and maintenance of inflammatory bowel disease: a systematic review of randomized controlled trials. *Inflamm Bowel Dis*. 2014; 20(3): 576–86. doi: 10.1097/01.MIB.0000437984.92565.31. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24445775/>
2. Takač B., Mihaljević S., Glavaš-Obrovac L., Kibel A., Suver-Steivić M., Canecki-Varžić S. et al. Interactions among interleukin-6, c-reactive protein and interleukin-6 (-174) g/c polymorphism in the pathogenesis of crohn's disease and ulcerative colitis. *Acta Clin Croat*. 2020; 59(1):67-80. doi: 10.20471/acc.2020.59.01.09. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32724277/>
3. Zhao J., Wang Y., Gu Q., Du Z., Chen W. The association between serum vitamin D and inflammatory bowel disease. *Medicine (Baltimore)*. 2019; 98(18):e15233. doi: 10.1097/MD.00000000000015233. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31045762/>
4. Iyer S.S., Gensollen T., Gandhi A., Oh S.F., Neves J.F., Collin F., et al. Dietary and Microbial Oxazoles Induce Intestinal Inflammation by Modulating Aryl Hydrocarbon Receptor Respons-

- es. *Cell*. 2018; 173(5): 1123-1134.e11. doi:10.1016/j.cell.2018.04.037. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29775592/>
5. Sayar S., Kurbuz K., Kahraman R., Caliskan Z., Atalay R., Ozturk O. et al. A practical marker to determining acute severe ulcerative colitis: CRP/albumin ratio. *North Clin Istanbul*. 2019; 7(1):49-55. doi: 10.14744/nci.2018.78800. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7103752/>
  6. Kaur A., Goggolidou P. Ulcerative colitis: understanding its cellular pathology could provide insights into novel therapies. *J Inflamm (Lond)*. 2020; 17:15. doi: 10.1186/s12950-020-00246-4. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32336953/>
  7. Wang Q., Mi S., Yu Z., Li Q., Lei J. Opening a Window on Attention: Adjuvant Therapies for Inflammatory Bowel Disease. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2020; 2020:7397523. doi:10.1155/2020/7397523. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7441453/>
  8. Murdaca G., Tonacci A., Negrini S., Greco M., Borro M., Puppo F. et al. Emerging role of vitamin D in autoimmune diseases: An update on evidence and therapeutic implications. *Autoimmunity Rev*. 2019; 18(9):102350. doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102350. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31323357>.
  9. Wang Y., Zhu J., DeLuca H.F. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys*. 2012; 523: 123–33. doi: 10.1016/j.abb.2012.04.001. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22503810/>
  10. Yang F., Sun M., Sun C. et. al. Associations of C-reactive Protein with 25-hydroxyvitamin D in 24 Specific Diseases: A Cross-sectional Study from NHANES. *Sci Rep*. 2020; 10(1):5883. doi:10.1038/s41598-020-62754-w. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32246038/>
  11. Zhao H., Zhang H., Wu H., Li H., Liu L., Guo J., et al. Protective role of 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> in the mucosal injury and epithelial barrier disruption in DSS-induced acute colitis in mice. *BMC gastroenterology*. 2012; 12: 57. doi:10.1186/1471-230X-12-57. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3464614/>
  12. RF patent No. 2019115328, 2019.05.20. Simonyan E.V., Osikov M.V., Boyko M.S., Bakeeva A.E. *Means with vitamin D3 for the treatment of ulcerative colitis in the form of rectal suppositories*. RF Patent No. 2709209.2019. Bul. No. 35 (In Russian)
  13. Osikov M.V., Simonyan E.V., Bojko M.S., Ogneva O.I., Il'inyh M.A., Vorgova L.V., Bogomolova A.M. The effect of vitamin D<sub>3</sub> in the composition of original rectal suppositories on the indicators of oxidative modification of proteins in the large intestine in experimental ulcerative colitis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020; 170(11): 563–8. (In Russian). Doi:10.47056/0365-9615-2020-170-11-563-568
  14. Osikov M.V., Simonyan E.A., Boyko M.S. The effect of vitamin D<sub>3</sub> in the composition of rectal suppositories of the original composition on the indices of free radical oxidation in the colon mucosa in the dynamics of experimental ulcerative colitis. *Bulletin of the Ural Medical Academic Science*. 2020; 17(1): 42-52. Doi:10.22138/2500-0918-2020-17-1-42-52 (In Russian)
  15. Directive 2010/63 / EU of the European Parliament and of the Council of the European Union of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Saint Petersburg 2012 (In Russian)
  16. Heller F., Fuss I.J., Nieuwenhuis E.E., Blumberg R.S., Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity*. 2002; 17(5): 629–38. doi: 10.1016/s1074-7613(02)00453-3. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12433369/>
  17. Wang X.W., Yang J.H., Cao Q., Tang J.M. Therapeutic efficacy and mechanism of water-soluble extracts of Banxiaixixin decoction on BALB/c mice with oxazolone-induced colitis. *Exp. Ther. Med*. 2014; 8(4): 1201–4. doi: 10.3892/etm.2014.1890. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25187824/>
  18. Freydlin I.S. *Methods of studying phagocytic cells in assessing the immune status of a person: tutorial*. [Metody izucheniya fagotsitiruyushchikh kletok pri oislenke immunnogo statusa cheloveka: uchebnoe posobie]. Leningrad, 1986. (In Russian)
  19. Osikov M.V., Davydova E.V., Boyko M.S., Bakeeva A.E., Kaigorodtseva N.V., Galeeva I.R. and other. Features of free radical oxidation in the large intestine in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Bulletin of the Russian State Medical University*. 2020; 3: 63-70. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.027 (In Russian)
  20. Wang H.Q., Zhang W.H., Wang Y.Q., Geng X.P., Wang M.W., Fan Y.Y., et al. Colonic vitamin D receptor expression is inversely associated with disease activity and jumonji domain-containing 3 in active ulcerative colitis. *World journal of gastroenterology*. 2020; 26(46): 7352–66. doi:10.3748/wjg.v26.i46.7352. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7739157/>
  21. Naderpoor N., Mousa A., Arango L.F.G., Barrett H.L., Dekker N.M., de Courten B. Effect of Vitamin D Supplementation on Faecal Microbiota: A Randomised Clinical Trial. *Nutrients*. 2019; 11(12): 2888. doi:10.3390/nu11122888. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31783602>
  22. Olson K.C., Kulling Larkin P.M., Signorelli R., Hamel C.E., Olson T.L., Conaway M.R., et al. Vitamin D pathway activation selectively deactivates signal transducer and activator of transcription (STAT) proteins and inflammatory cytokine production in natural killer leukemic large granular lymphocytes. *Cytokine*. 2018; 111: 551–62. doi: 10.1016/j.cyto.2018.09.016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6289695/>
  23. Jeon S.M., Shin E.A. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp Mol Med*. 2018; 50(4):20. doi:10.1038/s12276-018-0038-9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29657326/>

**Сведения об авторах:**

**Осиков Михаил Владимирович**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ, e-mail: prof.osikov@yandex.ru ;

**Бойко Маргарита Сергеевна**, ассистент кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ, e-mail: ri-tochka9@list.ru

**Симонян Елена Владимировна**, канд. фарм. наук, доцент, зав. каф. химии и фармации фармацевтического факультета ФГБОУ ВО ЮУГМУ.



© Коллектив авторов, 2021

УДК 616.613-003.7

Верлов Н.А.<sup>1-3</sup>, Гулина Л.С.<sup>2</sup>, Бендт И.В.<sup>2</sup>, Ланда С.Б.<sup>1</sup>, Трашков А.П.<sup>1</sup>, Эмануэль В.Л.<sup>4</sup>

## Динамика содержания олигомерных форм уромодулина в моче крыс при развитии мочекаменной болезни

<sup>1</sup>ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,

188300, Ленинградская обл., Россия, Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1;

<sup>2</sup>ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА,

197110, Санкт-Петербург, Россия, Пудожская ул., д. 7;

<sup>3</sup>ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)»,

197758, Санкт-Петербург, Россия, посёлок Песочный, Ленинградская ул., д. 68А, лит. А;

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России,

197022, Санкт-Петербург, Россия, ул. Льва Толстого, д. 6-8

**Введение.** Изучение роли олигомерных форм уромодулина в развитии уролитиаза является важной фундаментальной и прикладной задачей. Несмотря на разнообразие моделей уролитиаза на лабораторных животных в настоящее время отсутствует информация относительно динамики концентрации и фракционного состава олигомерных форм уромодулина в моче животных на различных этапах развития патологического процесса. **Цель** – исследование динамики содержания олигомерных форм уромодулина в моче животных на фоне развития гипероксалатного уролитиаза индуцированного экзогенным введением 1% раствора этиленгликоля в качестве безальтернативного источника питья.

**Методика.** Проводили общеклинический и биохимический анализ образцов крови и мочи на различных этапах развития патологического процесса. До начала моделирования патологии и на фоне экзогенного введения этиленгликоля был исследован осадок мочи. Оценка содержания олигомерных форм уромодулина в моче животных проводилась методом анализа треков наночастиц и динамического рассеяния света.

**Результаты.** Показано, что на фоне развития патологии наблюдается уменьшение концентрации олигомерных форм уромодулина в моче, на начальных этапах развития патологии за счёт увеличения фракции крупных частиц (более 200 нм, олигомерная форма 28 МДа). При дальнейшем развитии патологического процесса на завершающем этапе наблюдается радикальное уменьшение концентрации частиц в моче (более чем в 2 раза).

**Заключение.** Полученные данные показали относительно низкую корреляцию между длительностью моделирования патологии и тяжестью проявления уролитиаза ( $r$ -Пирсона = 0,49,  $p$ -value = 0,0003). Концентрация олигомеров уромодулина в моче животных уменьшается на фоне увеличения количества кристаллов в осадке мочи, что вероятно связано с включением уромодулина в структуру кристаллов осадка.

**Ключевые слова:** уролитиаз; уромодулин; олигомерные формы; биомоделирование

**Для цитирования:** Верлов Н.А., Гулина Л.С., Бендт И.В., Ланда С.Б., Трашков А.П., Эмануэль В.Л. Динамика содержания олигомерных форм уромодулина в моче крыс при развитии мочекаменной болезни. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2021; 65(4): -.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**Для корреспонденции:** Верлов Николай Александрович, e-mail: verlov\_na@pnpi.nrcki.ru

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Эмануэль В.Л., Верлов Н.А., Ланда С.Б.; сбор и обработка материала – Верлов Н.А., Ланда С.Б., Гулина Л.С.; подготовка иллюстративного материала – Верлов Н.А., Ланда С.Б., Бендт И.В.; написание текста – Эмануэль В.Л., Верлов Н.А., Ланда С.Б.; редактирование – Эмануэль В.Л., Верлов Н.А., Трашков А.П.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.06.2021

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021

Verlov N.A.<sup>1,3</sup>, Gulina L.S.<sup>2</sup>, Bendt I.V.<sup>2</sup>, Landa S.B.<sup>1</sup>, Trashkov A.P.<sup>1</sup>, Emanuel V.L.<sup>4</sup>

## Changes in the urinary content of uromodulin oligomeric forms in rats during development of urolithiasis

<sup>1</sup>B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute of the Kurchatov Institute National Research Center, Microdistrict Orlova Roshcha, Gatchina of the Leningradskaya Region 1188300, Russian Federation;

<sup>2</sup>State Research Institute of Especially Pure Biological Products of the Federal Medical and Biological Agency, Pudozhskaya St. 7, St. Petersburg 197110, Russian Federation;

<sup>3</sup>St. Petersburg Clinical Science and Practice Center for Specialized Types of Medical Care (Oncology), Leningradskaya St. 68A, Pesochny Settlement, St. Petersburg 197758, Russian Federation;

<sup>4</sup>Academician I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, L'va Tolstogo St. 6-8, Saint Petersburg 197022, Russian Federation

Studying uromodulin oligomeric forms in urolithiasis development is important fundamental and applied problem. Despite the variety of in vivo models of urolithiasis, there is currently no information about concentration dynamics and fractional composition of uromodulin oligomeric forms in urine for animals at various stages of pathological process development. The purpose We investigate dynamics uromodulin oligomeric forms in urine of animals against the background of development hyperoxalate urolithiasis induced by exogenous administration of 1% ethylene glycol solution as a non-alternative source of drinking.

**Methods.** For urine samples at various stages of pathogenesis, general clinical and biochemical analysis were carried out, for urine samples before the start of pathology modeling and against the background of exogenous administration of ethylene glycol, urine sediment was examined. The study of urine sediment and content uromodulin oligomeric forms was carried out on 0th, 7th, 14th, 21st and 28th days of pathology modeling. Evaluation of the content of uromodulin oligomeric forms in urine of animals was carried out by nanoparticles track analysing and dynamic light scattering.

**Results.** It is shown that against the background of the pathology development there is a decrease in the concentration of oligomeric forms of uromodulin in the urine, at the initial stages of pathology development due to an increase in the fraction of large particles (over 200 nm, oligomeric form 28 MDa). With further development of the pathological process at the final stage, there is a radical decrease in the concentration of particles in the urine (more than 2-fold).

**Conclusion.** The obtained data showed a relatively low correlation between the duration of pathology modeling and the severity of urolithiasis manifestation (Pearson's  $r = 0.49$ ,  $p$ -value = 0.0003). Concentration of uromodulin oligomers in animals urine decreases with an increase in the amount of crystals in urine sediment, which is probably associated with inclusion of uromodulin in structure of sediment crystals.

**Keywords:** urolithiasis; uromodulin; oligomeric forms; biomodelling

**For citation:** Verlov N.A., Gulina L.S., Bendt I.V., Landa S.B., Trashkov A.P., Emanuel V.L. Changes in the urinary content of uromodulin oligomeric forms in rats during development of urolithiasis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(4): -. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**For correspondence:** Verlov Nikolay Aleksandrovich, Candidate of Sciences. biol. nauk, head of the The resource center of the OMRB SIC «Kurchatov Institute» – PIAF, e-mail: verlov\_na@pnpi.nrcki.ru

**Contribution:** research concept and design – Emanuel V.L., Verlov N.A., Landa S.B.; collection and processing of material – Verlov N.A., Landa S.B., Gulina L.S.; preparation of illustrative material – Verlov N.A., Landa S.B., Bendt I.V.; text writing – Emanuel V.L., Verlov N.A., Landa S.B.; editing – Emanuel V.L., Verlov N.A., Trashkov A.P.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

### Information about the authors:

Verlov N.A, <https://orcid.org/0000-0002-3756-0701>

Gulina L.S., <https://orcid.org/0000-0002-1622-4311>

Landa S.B., <https://orcid.org/0000-0001-5546-250X>

Emanuel V.L., <https://orcid.org/0000-0002-2079-0439>

Received 14.06.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

## Введение

Уромодулин (белок Тамма-Хорсфалла, ТНР, БТХ) – мажорный белок массой 95 кДа, выделяемый с мочой в норме [1]. Биологические функции уромодулина мно-

гочисленны, что связано с разнообразием его олигомерных форм при широком диапазоне физико-химических условий, в которых он находится в моче в норме и при

патологии. Отмечено, что уромодулин, обладая способностью к гелеобразованию при высокой концентрации солей и низких величинах pH [2], играет существенную роль в регуляции водно-электролитного баланса в TAL. Продукция белка возрастает на фоне диеты с высоким содержанием соли и хроническом введении петлевого диуретика фуросемида, при этом уромодулин увеличивает экспрессию на мембране почечного наружного медуллярного калиевого канала (ROMK2) и активирует N-K-2Cl котранспортёр TAL [3]. Ввиду особого процессинга уромодулина в процессе его выхода в просвет нефрона, он практически сразу олигомеризуется, создавая разнообразие олигомерных форм, среди которых основное место занимают олигомерные формы 7МДа и 28МДа. Олигомерную форму 7МДа размером 100-120 нм принято считать условно «нормальной», поскольку она является доминантной олигомерной формой белка в моче здоровых людей. Выявлено, что при развитии уролитиаза отмечается существенный сдвиг фракционного состава олигомерных форм белка в моче в область крупных частиц: 200 нм и более, что связывают с переходом олигомерной формы 7 МДа в олигомерную форму 28 Мда. Олигомерную форму 7МДа размером 100-120 нм принято считать условно «нормальной», поскольку она является доминантной олигомерной формой белка в моче здоровых людей. Выявлено, что при развитии уролитиаза отмечается существенный сдвиг фракционного состава олигомерных форм белка в моче в область крупных частиц: 200 нм и более, что связывают с переходом олигомерной формы 7 МДа в олигомерную форму 28 Мда. Продолжаются исследования роли олигомерных форм уромодулина в процессе кристаллообразования.

Многочисленные модели гипероксалурии у крыс основаны на экзогенном введении литогенных материалов, таких как оксалат натрия [4] гликолевая кислота [5] или этиленгликоль [6]. Несмотря на структурные различия почек крысы и человека [7], сопоставимость соотношения коры и мозгового вещества (2:1) позволяют аппроксимировать результаты экспериментальных моделей на крысах для изучения патологического кристаллообразования при уролитиазе человека.

**Цель работы** – исследование динамики олигомерных форм уромодулина в моче крыс на различных этапах развития мочекаменной болезни, индуцированной экзогенным введением этиленгликоля.

### Методика

Моделирование нефролитиаза было проведено на 20 половозрелых самках беспородных крыс массой 300-400 г, полученных из одного питомника. На мо-

мент начала эксперимента все животные были клинически здоровы и осмотрены ветеринарным врачом. Животные содержались на стандартном рационе питания в обычных условиях вивария по 2 крысы в клетке с 12-часовым режимом день-ночь при температуре 22 °С. Рандомно были сформированы 2 группы: контрольная ( $n=10$ ) и опытная ( $n=10$ ). Контрольная группа получала в качестве питья чистую воду, опытная группа – 1% водный раствор этиленгликоля в качестве безальтернативного питья, что индуцировало развитие экспериментального нефролитиаза. Исследование проводилось в соответствии с правилами работы с лабораторными животными в соответствии с регламентом декларации ЕС от 2010 г. об использовании лабораторных животных.

Сбор мочи осуществляли в метаболических клетках с использованием водной нагрузки 5 мл на животное перорально. Взятие образцов мочи проводилось на этапе формирования групп и на 7-, 14-, 21- и 28-е сут моделирования патологии. Исследование мочи проводили на анализаторе мочи URIT-50 Vet (Китай) тест-полосками URIT 11Vet методом отражательной фотометрии по следующим параметрам:

- pH – по изменению цветовой гаммы индикаторов, дискретно с шагом 0,5 ед в диапазоне от 5 до 9 ед pH;
- величина глюкозурии по специфической ферментативной реакции, дискретно в диапазоне до 56 ммоль/л;
- наличие кетонурии (преимущественно по уровню ацетоуксусной кислоты), дискретно до 16 ммоль/л;
- наличие билирубинурии, дискретно до 50 ммоль/л;
- уробилиногена, дискретно до 210 ммоль/л;
- величины протеинурии по связыванию протеинов с бромфеноловым синим, от 0,1 до 10г/л, дискретно: 0,3-1-3 г/л;
- объёма лейкоцитурии по эндосилэстеразной активности нейтрофильных гранулоцитов и макрофагов (лейкоцитарная эластаза) с чувствительностью около 80–90% при наличии около  $20 \times 10^6$  WBC/L;
- величины эритроцитурии по положительному псевдопероксилазному эффекту гемоглобина с чувствительностью, эквивалентной наличию примерно 3–5 эритроцитов в 2 мкл мочи;
- относительной плотности – по величине ионной силы, дискретно с шагом 0,005 до 1,030г/мл.

Для обнаружения и подсчета кристаллов в моче проводилась стандартизованная микроскопия осадка при помощи цитосистемы фирмы Hettich (Германия) при предварительной обработке пробы мочи PLL (Poly-L-Lysine) с последующим центрифугированием образца на предметном стекле с 1100xg в течении 5 мин

и последующей микроскопией (световой микроскоп DMLB Leica Microsystems AG (Германия)).

Биохимическое исследование мочи выполнено на анализаторе Chem-7 Erba Mannheim (Германия) и включало определение следующих показателей: концентрацию креатинина кинетическим методом Яффе без депротеинизации; мочевины кинетическим (UV-тест) методом; хлоридов, калия и натрия ионселективным электрохимическим методом.

Макроскопическое исследование почки животных включало в себя внешний и внутренний осмотр почки. Исследовались параметры: форма, величина, цвет, состояние поверхности, наличие различных включений, определение границы между корковым и мозговым веществом, наличие кровоизлияний. Оценка массовых коэффициентов производилась после взвешивания органов при помощи лабораторных аналитических весов HR-100AZG AND, (Япония).

Для гистологического исследования почку фиксировали в 10% растворе формалина. Гистологическая проводка производилась согласно протоколу производителя компании «Блик». Из парафиновых блоков на санном микротоме Slide 2002 Compact (Германия) готовили срезы толщиной 5-6 мкм, полученные препараты окрашивали гематоксилином и эозином и изучали при помощи светового микроскопа DMLB Leica Microsystems AG (Германия). При микроскопическом исследовании препараты фотографировали в области сосочка и коркового вещества почки.

Метод анализа траекторий наночастиц (NTA) применяли для измерения размера и концентрации частиц в образцах разведенной мочи. Гидродинамический диаметр частиц измеряли методом анализа траекторий наночастиц, используя прибор (NTA; NanoSight® LM10, Malvern Instruments, Великобритания), оснащенный синим лазером (45 мВт при 488 нм) и камерой C11440-5B (Hamamatsu photonics К.К., Япония). Суспензию, приготовленную посредством разведения исходного образца в фильтрованном 0,22 мкм PBS в 100 раз, пропускали через проточную кювету NanoSight®. Для записи и анализа полученных результатов использовалось программное обеспечение NTA 2.3. При анализе записей длительностью 60 с оценивались следующие параметры: средний гидродинамический диаметр, мода распределения, стандартное отклонение и концентрация суспензии.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения R language в среде RStudio. Для оценки пропорциональной изменчивости выборки использовали коэффициент корреляции Пирсона ( $r$ -Пирсона). Для сравнения

выборок с нормальным распределением значений использовали тест Стьюдента, критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался как  $p$  менее 0,05.

### Результаты и обсуждение

Динамика кристаллообразования у животных при индуцированном уролитиазе оценивалась по количеству кристаллов в моче на 7-, 14-, 21-е и 28-е сут эксперимента. В контрольной группе в течение всего эксперимента кристаллы в осадке мочи либо не детектировались, либо их число не превышало 1-2. На 7-е сут после начала приема 1% раствора этиленгликоля у всех животных в экспериментальной группе при микроскопическом анализе мочи определялось более 5 кристаллов в поле зрения. В дальнейшем для оценки тяжести патологического процесса выделялись подгруппы: от 50 до 100 кристаллов в поле зрения, от 100 до 200, от 200 до 500, от 500 до 1000 и более 1000 кристаллов в поле зрения (ув. 10). Анализ зависимости количества кристаллов от продолжительности процесса моделирования патологии (**рис. 1**) свидетельствует о том, что количество кристаллов в моче пропорционально времени экспериментальной индукции уролитиаза ( $r$ -Пирсона = 0,49,  $p$ -value = 0,0003).

Масса животных в эксперименте определялась на момент формирования групп и каждые 7 сут с начала моделирования патологии. Масса животных в контрольной группе ( $303 \pm 24$  г,  $M \pm SE$ ) статистически значимо отличалась от массы животных в экспериментальной группе ( $313 \pm 17$  г,  $M \pm SE$ ,  $p$ -value 0,0018) на фоне обнаружения кристаллов в моче. На момент введения в эксперимент показатель массы животных в обеих группах не показывал значимых отличий.

Анализ образцов мочи в контрольной и экспериментальной группах животных (**табл. 1**) свидетельствует о наличии значимых отличий концентрации хлоридов, калия, креатинина и мочевины при развитии патологического процесса.

Данные общеклинического анализа мочи не выявили существенных отличий между контрольной и экспериментальной группами, кроме значения pH мочи. В контрольной группе величина pH составляла  $7,1 \pm 0,3$  ( $M \pm SE$ ), тогда как у животных в экспериментальной группе на фоне появления оксалатов в осадке мочи показатель pH снижался до  $6,6 \pm 0,2$  ( $M \pm SE$ ,  $p$ -value 0,003).

Через 28 сут из экспериментальной и контрольной групп для гистологического исследования были выведены по 2 крысы. У животных контрольной группы величина и форма почек не изменены и соответствуют нормальной картине. Поверхность гладкая,

капсула легко снимается. На разрезе органа корковое и мозговое вещество четко различимы. Кровоизлияния отсутствовали. У животных экспериментальной группы по сравнению с контролем почки были увеличены в размере, серого цвета. Капсула снимается легко. На разрезе органа граница между корковым и мозговым слоем четко не прослеживалась. Во всех образцах обнаружены кровоизлияния и отложения кристаллов различного диаметра. Аналогичная картина наблюдалась у оставшихся животных на 60-е сут эксперимента (момент окончания наблюдений и выведение всех животных из эксперимента).

Гистологическое исследование препаратов почки в контрольной группе не выявили каких-либо отклонений от нормы, в гистологическом препарате фильтрующая капсула нефрона четко очерчена, без изменений, в канале нефрона отсутствуют включения кристаллов.

У всех животных в экспериментальной группе наблюдались изменения в капсуле Боумана, в каналах нефрона обнаруживаются кристаллы, частично или полностью их перекрывающие (рис. 2).

Результаты измерений, проведенных методом анализа треков наночастиц, приведены в таблице 2 и рис 3 отмечается уменьшение концентрации почти в 2 раза в образцах мочи на фоне приема этиленгликоля, и наименьшая концентрация отмечена в образцах мочи при наличии более 1000 шт. кристаллов в поле зрения. При этом в моче животных экспериментальной группы при количестве кристаллов в моче до 1000 шт. наблюдался рост вклада фракции частиц размером больше 200-220 нм.

Данные микроскопии осадка мочи с подсчетом кристаллов и данные гистологии свидетельствуют о том, что у всех животных в экспериментальной группе сформиро-

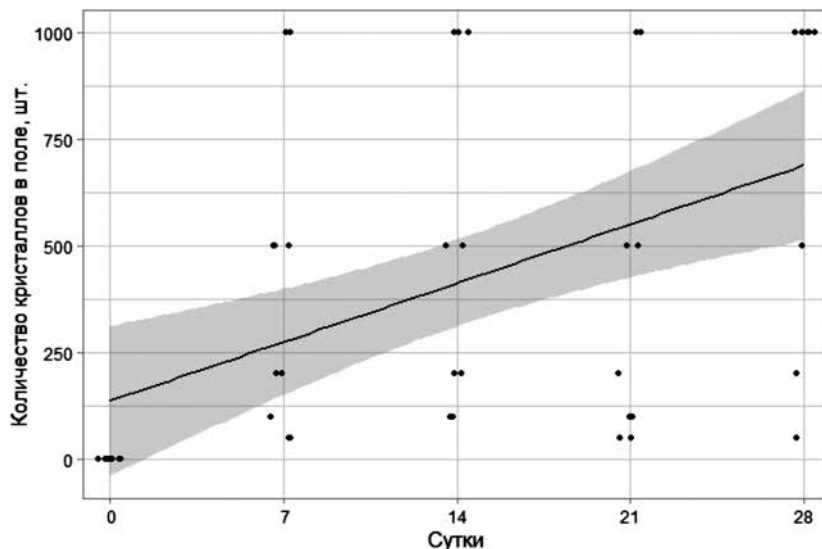


Рис. 1. Зависимость количества кристаллов в осадке мочи от продолжительности (сутки) моделирования патологии.

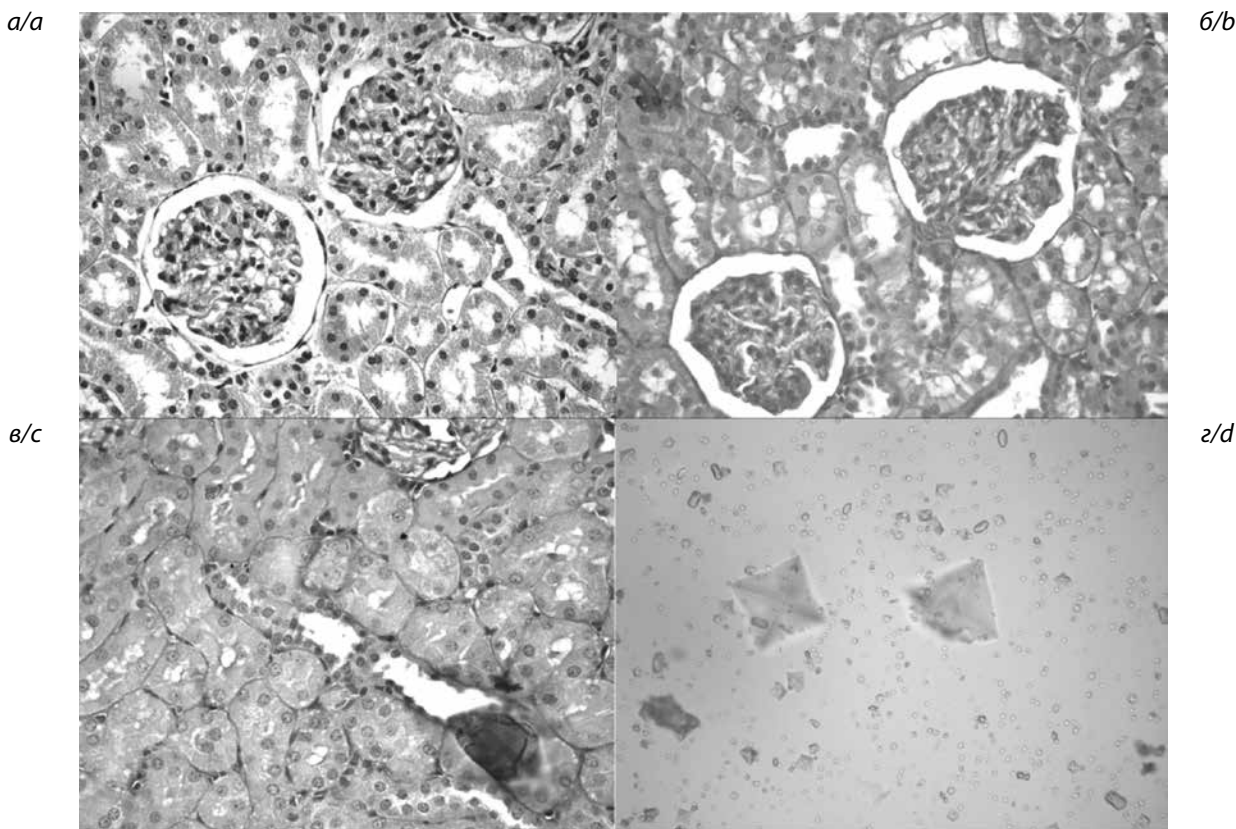
Fig 1. Dependence of the number of crystals in the urine sediment on the day of modeled pathology.

Таблица 1/ Table 1

Данные биохимического исследования мочи животных

Biochemical study of animal urine

	Контроль (M±SE)	Эксперимент (28 сутки) (M±SE)	p-value
Cl, ммоль/л	30,6±1,5	38,2±2,1	0,0088
K, ммоль/л	10,0±1,8	17,5±1,3	0,012
Na, ммоль/л	27,1±1,3	28,5±2,2	0,58
Билирубин, мкмоль/л	17,1±0,7	16,2±0,4	0,25
Креатинин, мкмоль/л	914±62	668±41	0,0016
Мочевина, мкмоль/л	4,6±0,2	6,3±0,4	0,0011



**Рис. 2.** Данные микроскопического исследования образцов.

а – гистологический препарат здоровой почки (контрольная группа), б, в – гистологический препарат почки животного экспериментальной группы, г – микроскопия осадка мочи животного из экспериментальной группы на 7-е сут моделирования патологии, (окраска гематоксилин-эозин, ув. 40).

**Fig. 2.** Microscopic funding in samples.

а – histology of a healthy kidney (control group), б, с – histology of a kidney with developing pathology (experimental group), д – microscopy of urine sediment of an animal from the experimental group on the 7th day of modeled pathological process.

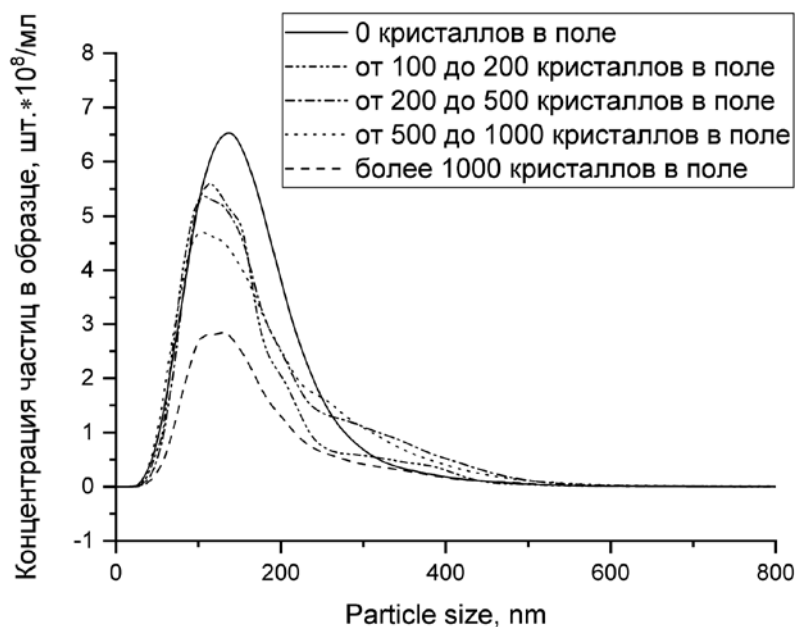
Таблица 2/ Table 2

**Результаты измерений концентраций частиц в образце мочи крыс, сгруппированные по количеству кристаллов в осадке мочи**  
**Results particle analysis for rat urine sample, grouped by amount of crystals in urine sediment**

Показатели	Среднее, нм (M±SE)	D10, нм (M±SE)	D50, нм (M±SE)	D90, нм (M±SE)	Концентрация шт.*Е10/мл
Контроль	169±3,8	90±1,9	153±3,1	267±9,8	9,6±0,87
От 100 до 200 кристаллов	161±4,5	83±2,3	138±3,6	273±11	7,46±0,37
От 200 до 500 кристаллов	180±5,2	88±1,6	154±4,6	313±10,8	8,45±0,41
От 500 до 1000 кристаллов	174±11,4	84±5,0	152±11,1	291±19,2	8,25±1,93
Более 1000 кристаллов	175±4,1	89±3,1	150±3,3	300±10,4	4,19±0,33

валась целевая патология – оксалатный уролитиаз. Однако динамика содержания кристаллов в осадке мочи, которую можно рассматривать как тяжесть патологического процесса, носила индивидуальный характер, при том, что максимальные значения отмечались на 7-е или 14-е

сут, а затем фиксировалось снижение уровня этого феномена. Следовательно, патологический кристаллогенез в протоках нефронов приводит к частичному, а затем полному перекрытию просвета протока кристаллами, что хорошо подтверждается гистологическими данными.



**Рис. 3.** Концентрация олигомерных форм уромодулина в моче крыс контрольной (0 кристаллов) и экспериментальной групп.

**Fig 3.** Concentration uromodulin oligomeric forms in rats urine for control (0 crystals) and experimental groups.

При этом потеря фильтрующей функции таким нефроном приводит к гиперфильтрации в оставшихся интактных нефронах, что, вероятно, снижает в них интенсивность кристаллообразования из-за увеличения объема ультрафильтрата. Снижение концентрации креатинина в моче подтверждает развитие патологии в системе мочеобразования и снижение экскреторной функции почек, при экзогенном введении этиленгликоля, о тяжести которой может свидетельствовать количество кристаллов в моче. Наблюдаемое уменьшение концентрации олигомерных форм уролитиаза статистически значимо ( $p$ -value =  $9.946e-05$  для групп 0 кристаллов и от 100 до 200 кристаллов). При этом в группе с количеством кристаллов в осадке мочи от 100 до 1000 наблюдается увеличение содержания крупных частиц (более 200 нм), что частично объясняет уменьшение общей концентрации частиц в объеме, поскольку трансформация 4 молекул олигомерной формы 7 МДа в одну молекулу 28 МДа уменьшает количество частиц в мл мочи. Однако падение концентрации уромодулина в моче при регистрации более 1000 кристаллов в поле зрения отмечается при отсутствии макромолекул (200 нм и более). Вероятно, сказывается снижение числа действующих нефронов, т.е. участвующих в синтезе уромодулина [8]. Кроме того, можно предположить, что концентрация уромодулина в моче снижается при его включении в кристаллические конкременты [8, 9].

## Заключение

Концентрация олигомерных форм уромодулина в моче уменьшается на фоне развития уролитиаза, индуцированного экзогенным введением этиленгликоля крысам. Помимо изменения концентрации происходит постепенное увеличение содержания в моче крупных фракций, соответствующих олигомерной форме 28 МДа, что соответствует данным наблюдаемым при уролитиазе у людей [10, 11]. В предельном состоянии манифестации патологии при количестве кристаллов в осадке мочи более 1000 в поле зрения наблюдается радикальное снижение концентрации олигомерных форм в моче, что связано как со снижением числа функционирующих нефронов, так и с включением макроформ уромодулина в структуру первичных центров кристаллогенеза.

## Литература

(п.п. 1-9; 11 см. References)

- Ланда С.Б. и др. Патохимические особенности олигомерных форм белка Тамма—Хорсфалла при уролитиазе. *Клин. лаб. диагн.* 2016; 61(6): 335–41. <https://doi.org/>

## References

- Nagaraj N., Mann M. Quantitative analysis of the intra- and inter-individual variability of the normal urinary proteome. *J Proteome Res.* 2011; 10(2): 637–45.

2. Wiggins R.C. Uromucoid (Tamm-Horsfall glycoprotein) forms different polymeric arrangements on a filter surface under different physicochemical conditions. *Clin. Chim. Acta.* 1987; 162(3): 329–40.
3. Renigunta A. et al. Tamm-Horsfall glycoprotein interacts with renal outer medullary potassium channel ROMK2 and regulates its function. *J Biol. Chem.* 2011; 286(3): 2224–35.
4. Khan S.R., Shevock P.N., Hackett R.L. Acute Hyperoxaluria, Renal Injury and Calcium Oxalate Urolithiasis. *J Urol.* 1992. Vol. 147(1): 226–30.
5. Bilbault H., Haymann J.-P. Experimental models of renal calcium stones in rodents. *World J Nephrol.* 2016; 5(2): 189.
6. Saha S., Verma R.J. Ethylene glycol induced renal toxicity in female Wistar rats. *Toxicol. Environ. Health Sci.* 2013; 5(4): 207–14.
7. Khan S.R. Animal Models of Calcium Oxalate Kidney Stone Formation. *Animal Models for the Study of Human Disease.* Elsevier, 2013; P. 483–498.
8. Wolf M.T.F., Zhang J., Nie M. Uromodulin in mineral metabolism. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2019; 28(5): 481–9. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000522>
9. Devuyst O., Olinger E., Rampoldi L. Uromodulin: from physiology to rare and complex kidney disorders. *Nat. Rev. Nephrol.* 2017; 13(9): 525–44.
10. Landa S.B. et al. Pathochemical features of oligomeric forms of Tamm-Horsfall protein in urolithiasis // CLINICAL LABORATOR DIAGNOSTICS. 2016. Vol. 61, № 6. P. 335-341.
11. Landa S.B. et al. Clinical informativity of postgenomic modification of uromodulin. *Lab. Sluz.* 2018; 7(1): 10.

**Сведения об авторах:**

**Верлов Николай Александрович**, канд. биол. наук, зав. Ресурсным центром ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, e-mail: verlov\_na@pnpi.nrcki.ru;

**Гулина Лидия Сергеевна**, биолог, ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России;

**Бендт Ирина Викторовна**, ст. биолог, ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России;

**Ланда Сергей Борисович**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ;

**Трашков Александр Петрович**, канд. мед. наук, зав. ЦДКИ ОМРБ НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ;

**Эмануэль Владимир Леонидович**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. клин. лаб. диагностики ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова.



## Обзоры

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092

Меркулов Ю.А.<sup>1</sup>, Гореликов А.Е.<sup>2</sup>, Пятков А.А.<sup>2</sup>, Меркулова Д.М.<sup>3</sup>

# Ритмическая трансспинальная магнитная стимуляция в терапии хронической боли в нижней части спины. Метаанализ (Часть II)

<sup>1</sup>ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии,  
125315, Москва, Балтийская ул., д. 6, Россия;

<sup>2</sup>ГАУЗ «МНПЦ медицинской реабилитации, восстановительной и спортивной медицины»,  
105120, Москва, Россия, Земляной вал, д. 53;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет),  
119991, Москва, Трубецкая ул., д. 8, Россия

Цель обзора – анализ результатов исследований эффективности ритмической транскраниальной и трансспинальной магнитной стимуляции (рТМС и рТсМС) в лечении боли в пояснице. Хроническая боль в нижней части спины (ХБНЧС) преобладает над другими видами боли и, выходя за нозологические рамки болезней опорно-двигательного аппарата, поражает около 80-84% населения в течение жизни. Нейропластичность, лежащая в основе патогенеза ХБНЧС, управляется стимулами, которые могут быть опосредованы процессами, происходящими как «сверху вниз», от вышележащих к ниже-расположенным иерархическим структурам нервной системы, так и «снизу вверх», – от периферических к центральным. Это находит отражение в повышенном интересе профессионального сообщества регенеративной медицины к применению высокотехнологических методов нейромодуляции ритмическими электромагнитными импульсами при ХБНЧС. Во второй части обзора представлен мета-анализ накопленных к моменту его публикации литературных данных. Он дополняет опубликованную ранее информацию о том, что и рТМС, и рТсМС относятся к перспективным патогенетическим терапевтическим методам для пациентов с ХБНЧС, основываясь на экспериментальных и клинических эффектах положительного влияния на искаженную сенсорную передачу, изменение проприоцепции, управление движением и психологическую модуляцию. Обе методики зарекомендовали себя в кратковременном облегчении хронической дорсалгии, в то время как долгосрочные последствия рТсМС (>1 месяца) должны быть исследованы далее. Различные факторы, связанные с унификацией пока еще разнородных протоколов стимуляции, включая форму подачи импульсов, частоту, место приложения, регулярность и продолжительность лечения, могут улучшить дальнейшую надлежащую трактовку ее результатов. Очевидная по мнению авторов настоящего обзора, но до настоящего времени не описанная в литературе комбинация рТМС и рТсМС при ХБНЧС, могла бы повлиять на процессы управления болью при изучаемой патологии в большей степени, чем каждая из них по отдельности.

**Ключевые слова:** хроническая боль в нижней части спины; ритмическая трансспинальная магнитная стимуляция; нейропластичность; метаанализ

**Для цитирования:** Меркулов Ю.А., Гореликов А.Е., Пятков А.А., Меркулова Д.М. Ритмическая трансспинальная магнитная стимуляция в терапии хронической боли в нижней части спины. Метаанализ (Часть II). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2021; 65(4): –.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**Для корреспонденции:** Меркулов Юрий Александрович, e-mail: 4181220@gmail.com

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Меркулов Ю.А.; сбор материала – Меркулов Ю.А., Гореликов А.Е., Пятков А.А.; анализ и интерпретация данных – Меркулов Ю.А., Меркулова Д.М.; статистическая обработка данных, подготовка иллюстративного материала, написание текста – Меркулов Ю.А., редактирование текста – Меркулова Д.М. Обсуждение окончательной версии статьи – все авторы.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 28.05.2021

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021

Merkulov Y.A.<sup>1</sup>, Gorelikov A.E.<sup>2</sup>, Pyatkov A.A.<sup>2</sup>, Merkulova D.M.<sup>3</sup>

## Repetitive transspinal magnetic stimulation in the treatment of chronic low back pain. A meta-analysis (Part II)

<sup>1</sup>Scientific Research Institute of General Pathology and Pathophysiology,  
8 Baltiyskaya Str., 125315 Moscow, Russian Federation;

<sup>2</sup>Moscow Centre for Medical Rehabilitation, Restorative and Sports Medicine,  
53 Zemlyanoy val, 105120 Moscow, Russian Federation;

<sup>3</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare  
of the Trubetskaya ul., 119991 Moscow, Russian Federation

The aim of this review was to analyze results of studies on the effectiveness of repetitive transcranial and transspinal magnetic stimulation (rTMS and rTsMS) in the treatment of low back pain. Chronic low back pain (CLBP) is prevalent over other types of pain and, beyond the nosological scope of musculoskeletal diseases, affects about 80-84% of the population in a lifetime. Neuroplasticity underlying the pathogenesis of CLBP is driven by stimuli, and stimuli can be mediated by processes from «top to bottom», i.e. from the overlying to the underlying hierarchical structures of the nervous system, and vice versa, i.e. from peripheral to the central. This is reflected in the increased interest of the professional community of regenerative medicine in implementing high-tech methods of neuromodulation by repetitive electromagnetic pulses in CLBP. In this *second part* of the review, we present a meta-analysis of the literature data accumulated by the time of its publication. It completes our previously published information stating that both rTMS and rTsMS are viable pathogenetic therapeutic modalities for patients with CLBP, based on experimental and clinical positive effects on impaired sensory transmission, changes in proprioception, motor control, and psychological modulation. Both methods have proven successful in providing short-term relief for chronic dorsalgia, while the long-term effects of rTsMS (>1 month) require further investigation. Various factors associated with the unification of the still heterogeneous stimulation protocols, including pulse delivery form, frequency, application location, periodicity and treatment duration, may further improve proper result interpretation. The combination of rTMS and rTsMS in CLBP, which is evident to the authors of this review but has not been described in the literature yet, could have more impact on the pain management processes of the investigated pathology than each of them separately.

**Keywords:** chronic lower back pain; repetitive transspinal magnetic stimulation; neuroplasticity; meta-analysis

**For citation:** Merkulov Y.A., Gorelikov A.E., Pyatkov A.A., Merkulova D.M. Repetitive transspinal magnetic stimulation in the treatment of chronic low back pain. A meta-analysis (Part II). *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(4): -. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**For correspondence:** Yuri A. Merkulov, Doctor of Medical Sciences, Principal researcher, Scientific Research Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8 Baltiyskaya Str., Moscow, 125315, Russian Federation, e-mail: 4181220@gmail.com

**Contribution:** research concept and design - Merkulov Y.A.; material collecting - Merkulov Y.A., Gorelikov A.E., Pyatkov A.A.; illustrative material, statistical data processing, data analysis and interpretation, text writing – Merkulov Y.A.; text editig -- Merkulova D.M.; Approval of the final version of the article – all co-authors.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

### Information about the authors:

Merkulov Y.A. <https://orcid.org/0000-0001-7684-9834>

Gorelikov A.E. <https://orcid.org/0000-0003-4276-0190>

Pyatkov A.A. <https://orcid.org/0000-0001-7464-5205>

Merkulova D.M. <https://orcid.org/0000-0003-0368-683X>

Received 28.05.2021

Accepted 2021

Published 2021....

## Введение

Боль в нижней части спины, острая или хроническая, преобладает над другими видами боли [1] и, выходя за нозологические рамки болезней опорно-двигательного аппарата (ОДА), поражает около 80-84% населения хотя бы раз в жизни [2-4]. По предварительной оценке примерно 25% людей после первоначального

эпизода дорсалгии периодически испытывают обострения, в то время как у 7-10% она переходит в хроническое состояние [5] и определяет развитие выраженных физических, психологических и социальных последствий, влияющих на их долговременную работоспособность и качество жизни [6]. Хроническая боль в пояснице составляет 22% от всех случаев хро-

нической боли и 35% от рефрактерных болевых синдромов [1]. Классификация болей в пояснице осложняется изменчивостью проявлений и сложностью патогенеза [4]. Наиболее распространенная диффузная боль без иррадиации за пределы ягодич классифицируется как неспецифическая боль в пояснице и проявляется у 60% всех страдающих хронической дорсалгией [7]. По данным H. Snekkevik и соавт. [8], 70% таких пациентов предъявляют жалобы на повышенную утомляемость и 18% дополнительно страдают от депрессии. По данным Alsaadi S.M. с соавт. [9], 59% пациентов с хронической болью в нижней части спины (ХБНЧС) испытывают трудности со сном. Результаты проведенных клинико-эпидемиологических исследований свидетельствуют, что нейропатический компонент в структуре ХБНЧС варьирует от 2,8% в китайской популяции [10], 15,8% в Великобритании [11], 35% в России [12] и до 49,5% и 54,7% – в Африке и Саудовской Аравии [13-14].

Базовое лечение неспецифических болей в пояснице является консервативным, и включает назначение неопиоидных анальгетиков, нестероидных противовоспалительных средств, физиотерапию, динамические укрепляющие упражнения, термотерапию и, при необходимости, короткий курс миорелаксантов [3]. Кроме того, консервативные методы включают в себя тракционную терапию, мануальную терапию и чрескожную электрическую нейростимуляцию (ЧЭНС) [4].

Распространенными назначениями при лечении хронической боли являются опиоиды. Использование этой группы препаратов противоречиво в связи с рисками сильной зависимости и злоупотреблениями [3, 15-16]. Считается, что хроническое употребление опиоидов наносит вред здоровью людей с ХБНЧС, потому что они могут обострить депрессию, что, в свою очередь, приводит к усилению боли [3]. Следовательно, использование опиоидных препаратов при хронической «нераковой» боли следует избегать [16].

Наряду с освещенным в первой части систематического обзора [17], положительным влиянием ритмической транскраниальной магнитной стимуляции (рТМС) на механизмы пластичности в центральной нервной системе (ЦНС) за счет непосредственного воздействия на мозговые структуры (центральная стимуляция, реализующаяся по нисходящим механизмам коркового торможения) [18], аналогичная неинвазивная и безболезненная нейромодуляция при ХБНЧС может достигаться опосредованно путем стимуляции области поясницы по принципу «снизу вверх». Данный путь активации восстановительных процессов пла-

стичности ЦНС должен способствовать уменьшению боли, улучшению сенсорной интеграции и нормализации сенсомоторного контроля осанки и движения, которые взаимосвязаны в управлении ХБНЧС [19]. Такие эффекты могут быть потенцированы посредством использования другой разновидности высокоинтенсивной импульсной магнитотерапии (ВИМТ): периферической, функциональной или (применительно к мишени стимуляции) транспинальной магнитной стимуляции (ТсМС – для наглядности различия с аббревиатурой ТМС). Патогенетическое обоснование применения ТсМС базируется на основополагающих физиотерапевтических принципах индуцирования электрических полей и токов значительной величины, обладающих полимодальным терапевтическим воздействием, в глубине подлежащих тканей (преимущественно в нервной и мышечной) без их повреждения [20]. Исследования на здоровых людях показали, что соматосенсорный входной сигнал от стимуляции периферических нервов и мышц приводит к функциональным изменениям возбудимости и корковых мотонейронов. В 2000 г. M. Ridding и соавт. [21] продемонстрировали, что длительная периферическая стимуляция может вызывать продолжительное увеличение возбудимости мотонейронов коры головного мозга, связанных со стимулируемыми участками тела. Значимость содружественной активации соматосенсорных афферентов и внутрикоровых моторных волокон была объективизирована с помощью низкочастотной стимуляции срединного нерва в паре с ТМС. Если воздействия таких стимулов синхронизируются на уровне моторной коры, это приводит к стойкому увеличению амплитуды моторных вызванных потенциалов (МВП) скелетных мышц [22]. Последующие экспериментальные и клинические исследования в нормальных условиях и условиях патологии подтвердили, что проприоцептивный поток сигналов, посылаемых ритмической ТсМС (рТсМС) вызывает эффект кондиционирования на различных уровнях сенсомоторной и когнитивной систем [23]. Кроме обезболивающего эффекта рТсМС за счет блокады передачи болевых импульсов в ЦНС, были описаны противоотечный, противовоспалительный, миостимулирующий и стимулирующий процессы регенерации эффекты [24]. Начало успешного применения ВИМТ при заболеваниях ОДА в отечественной восстановительной медицине было положено в классических работах И.М. Митбрейта и соавт., отмечавших, что применение магнитотерапии при остеохондрозе позвоночника, деформирующем артрозе суставов позволяет получить противоотечный, обезболивающий эффект, увеличение объема движений в суставах в бо-

лее ранние сроки обострения заболеваний и задержать дальнейшее развитие дегенеративно-дистрофического процесса [25].

Из вышеизложенного следует, что академический и практический интерес к проблемам боли, в том числе боли в спине и ее нейропатическому варианту в частности, равно как и ее немедикаментозной терапии посредством высокотехнологичных методов нейромодуляции ритмическими электромагнитными импульсами, поддерживается в профессиональном сообществе регенеративной медицины на высоком уровне. Это закономерно выражается в регулярной публикации обобщающих обзорных материалов по данным вопросам в медицинской печати. Один из недавних на момент набора этого текста отечественных критических анализов, посвященных магнитной стимуляции в лечении и реабилитации больных с заболеваниями нервной системы и позвоночника был опубликован в 2018 г. А.Е. Гореликовым и соавт. [26]. Обзор более специфической направленности по использованию ТМС в диагностике и терапии болевых синдромов у детей и взрослых – в 2019 г. В.Б. Войтенковым и соавт [27]. О накопленных к 2016 г. данных по применению рТсМС можно узнать из фундаментальной работы Блохиной В.Н. и соавт. [28]. Вместе с тем, насколько представлялось известным, отсутствовали работы, систематизирующие применение рТМС, рТсМС либо их комбинации у пациентов с ХБНЧС. Несмотря на то, что в зарубежной литературе в 2020 г. вышел систематический обзор S. Yang, M.C. Chang по оценке эффективности рТМС в управлении болью [29], ситуация с более специфической направленностью литературных данных в целом выглядела идентично.

Цель обзора – анализ результатов исследований, направленных на изучение эффективности рТМС и рТсМС в терапии ХБНЧС.

### Методика

Нами проведен поиск в базах данных MEDLINE (PubMed.gov) и РИНЦ (elibrary.ru) опубликованных до июня 2020 г статей, в которых авторы использовали метод ритмической магнитной стимуляции для лечения и реабилитации пациентов с хроническим болевым синдромом в спине. Ключевые фразы поиска для выявления потенциально релевантных статей в MEDLINE были: [(rtms OR rpms) OR (repetitive magnetic stimulation)] AND (low back pain); в базе РИНЦ: [(ртмс) OR (рпмс)) OR (ритмическая магнитная стимуляция)] AND (боль в спине). Кроме того, с учетом предварительного знакомства с одноименной статьей Р.В. Lee и соавт. [30], был проведен дополнительный поиск

в MEDLINE по фразам: ((pemt) OR (pulsed electromagnetic therapy)) AND (low back pain) и РИНЦ: (импульсная магнитотерапия) AND (боль в спине). Основанием для дополнительного расширения поискового запроса послужило описание метода импульсной магнитотерапии в работе Р.В. Lee и соавт. [30], где применялась ВИМТ с магнитной индукцией до 2,1 Тл, а использованный аппарат CR-3000 System (CR Technology Co., Kyungki-do, Korea) конструктивно не отличался от приборов для ритмической магнитной стимуляции, однако без специфической идентификации.

При выборе статей были применены следующие критерии включения: (1) пациенты с ХБНЧС, (2) методы ритмической магнитной стимуляции были применены для лечения и/или реабилитации этих пациентов, и (3) после воздействия ритмической магнитной стимуляцией были проведены контрольные исследования для оценки степени снижения боли. Следующие типы исследований были исключены: (1) обзоры, (2) исследования на животных, (3) диссертации и авторефераты диссертаций, а также (4) тезисы и/или доклады конференций.

Статистическую обработку полученных материалов проводили в программе Jamovi V 1.2.18.0 (jamovi.org) с помощью модуля MAJOR (Meta-Analysis for Jamovi) по исходам, основанным на непрерывных данных – оценке боли по визуально-аналоговой шкале (ВАШ) между основной группой, получавшей тот или иной вид ритмической магнитной стимуляции, и контрольной группой, получавшей имитационную магнитную стимуляцию (ИМС) – с использованием модели случайных эффектов, метода ограниченного максимального правдоподобия, стандартизованной разности средних и 95% доверительного интервала (ДИ). Оценка статистической неоднородности исследований проводилась по показателю  $I^2$  и Q-тесту.

### Результаты

По результатам поиска было выявлено 170 потенциально релевантных статей. Из них 64 и 77 публикаций отобраны по исходным ключевым фразам в базах MEDLINE и РИНЦ, соответственно. При помощи дополнительных фраз поиска найдено 25 публикаций в базе данных MEDLINE и 4 – в РИНЦ. Названия и аннотации всех отобранных работ были проверены на соответствие требованиям. Затем были получены полнотекстовые статьи для оценки приемлемости исследований, и в итоге в обзор было включено в общей сложности 14 публикаций [17]. Эти публикации состояли из нерандомизированных, наблюдательных и РКИ с параллельным или перекрестным дизайном.

Характеристики исследований, изучавших воздействие рТсМС, обобщены в **таблице**.

### Обсуждение

Параллельно с нейростимулирующим эффектом рТМС, дополнительный – миостимулирующий эффект ВИМТ при ХБНЧС может быть реализован посредством применения методики рТсМС. В его основе лежит способность индуцированных токов вызывать сокращение мышц (скелетных и гладких). При этом возбуждаются почти все волокна, расположенные как на поверхности, так и в глубине иннервирующих их нервов, в то время как при электрической стимуляции возбуждению подвергаются главным образом поверхностно расположенные толстые миелинизированные нервные волокна [20]. Исходя из механизмов формирования болевого синдрома, основным принципом его купирования, в том числе и магнитными полями, является подавление импульсной активности ноцицепторов, проводников и гиперактивных нейронов, образующих генератор патологически усиленного возбуждения на сегментарном и супрасегментарном уровнях ЦНС. На местном уровне обезболивающее действие магнитных полей связано со снижением чувствительности периферических болевых рецепторов и проводимости афферентов боли. В основе этих изменений, по-видимому, лежит влияние физического фактора на ионные каналы клеток, синаптическую передачу и потенциалы действия нейронов [31]. Включение того или иного механизма зависит от вида и дозиметрических параметров магнитного поля. Обезболивающий эффект магнитотерапии обуславливается прекращением или ослаблением нервной импульсации из болевого очага вследствие устранения гипоксии. Он может быть связан с упомянутым выше противовоспалительным и противоотечным действием рТсМС и является, по сути, вторичным, в особенности при травматических и воспалительных процессах [25]. В фундаментальных исследованиях S. Chokroverty и соавт. [32] было показано, что при ТсМС в области пояснично-крестцового отдела позвоночника, возбуждение нервных корешков происходит прежде, чем они выходят из межпозвоноковых отверстий, что позволяет использовать методику в диагностике и лечении пояснично-крестцовой радикулопатии.

Есть данные, что рТсМС, неинвазивным образом наносимая на мышцы спины и спинномозговые корешки, не активирует кожные ноцицептивные афференты, а генерирует массивные потоки чисто проприоцептивных сигналов в мозг без ноцицептивных компонентов [23]. Это отличается от электрической

стимуляции, которая широко задействует поверхностные кожные рецепторы и может посылать в мозг шумоподобную информацию, бессмысленную для сенсомоторного управления движением [33]. Проприоцептивные потоки, генерируемые рТсМС, могут влиять на возбудимость кортикоспинального тракта, лобно-теменных областей коры, а также интракорткальных тормозных и возбуждающих структур в первичной моторной коре (М1), что представляет собой определенный потенциал для лечения боли [34]. При этом в ряде публикаций, описавших диагностические возможности метода ТМС в оценке параметров МВП, коркового «периода молчания» и интракорткального ингибирования [35], было подтверждено, что рТсМС с частотой 20-25 Гц у здоровых испытуемых приводит к изменению кортикоспинальной и интракорткальной возбудимости, в то время как, частота 10 Гц – не оказывает влияния на возбудимость коры.

В подборку настоящего обзора вошли девять работ, изучавших эффективность рТсМС при ХБНЧС, пять из которых – рандомизированные клинические исследования (РКИ) с плацебо-контролем в виде имитационной магнитной стимуляции (ИМС) [30, 36-43]. Исследование Y.L. Lo и соавт. в 2011 г. показало, что единственный сеанс рТсМС, проведенной над поясничным отделом позвоночника у пациентов со спондилезом, может уменьшить боль более чем на 60%, а его эффект продолжался в течение как минимум 4 дней [36]. Н. Massé-Alarie и соавт. в 2013 также продемонстрировали, что комплексная терапия, сочетающая рТсМС с ЛФК, способна всего за один сеанс благотворно повлиять на возбудимость М1 и улучшить способность к произвольной активации глубоких мышц брюшной стенки, задействованных в нарушенной стабилизации поясницы у людей с ХБНЧС [37]. У обследованных пациентов было выявлено значимое снижение амплитуды МВП поперечной мышцы живота в сравнении с уровнем перед стимуляцией. При этом регресс болевого синдрома был статистически подтвержден только в группе рТсМС, в которой через 2 нед было дополнительно отмечено уменьшение функционального ограничения жизнедеятельности и кинезиофобии в отличие от группы, получавшей ИМС в комбинации с ЛФК. По мнению авторов, рТсМС могла привести к сокращению мышцы либо путем прямой стимуляции мышечных волокон, либо посредством преимущественной деполяризации терминалей аксонов альфа-мотонейронов в нерве. Непрямой (связанный с сокращением мышцы) путь передачи проприоцептивной информации в сенсомоторную кору, как они полагают, имеет большое значение для индук-

Таблица/Table

**Характеристики включенных исследований, использовавших rTсMS для терапевтического воздействия на ХБНЧС**

**Characteristics of included studies that used rTсMS for therapeutic management of CLBP**

№ п/п	Источник, год	Дизайн исследования	Кол-во пациентов	Частота (Гц)	Интенсивность (МП/ВМ, %)	Протокол стимуляции	Тип индуктора	Область стимуляции	Кол-во сеансов стимуляции	Оценка результатов
1	Lee P.V. et al. [30], 2006	ПарИ	17+19 (ИМС)	5/10	60-100/ВМ	Чередование частот стимуляции каждые 5 сек в теч. 15 мин	НД	Нижняя часть спины в 5 см от поверхности кожи	9	ЧРШ, ODI
2	Kim J.Y. et al. [40], 2010	ПарИ	13+10 (ЧЭНС)	20	С 20/ВМ до 85% предела переносимости	8571 импульс за сеанс из 10 мин с чередованием 5 сек стимуляции и 2 сек отдыха	НД	Участок наибольшей болезненности	10	ЧРШ, ODI, MPQ
3	Lo Y.L. et al. [36], 2011	ПарИ	10+10 (ИМС)	10	45-55/ВМ	1000 импульсов за сеанс: 200 пачек из 5 импульсов с 5 сек интервалами между пачками	8-об-разный	На уровне T12-L1 межпозвонокового промежутка	1	ВАШ
4	Massé-Alarie H. et al. [37], 2013	ПарИ	7 (КТ)+ 6 (ИМС)	50	33/МП (пальпаторное сокращение поперечной м-цы живота)	Чередование (2 сек «on» / 8 сек «off») в виде пачек из 3 импульсов, повторяющихся каждые 200 мс	8-об-разный	На 2 см медиальнее и ниже передней верхней подвздошной ости	1	ВАШ, TSK, QBPDS
5	Massé-Alarie H. et al. [38], 2017	ПарИ	9 (КТ)+ 9 (ИМС)	20	35-40/ВМ	6000 импульсов в теч. 20 мин: 30 мыш. сокращений в теч. 10 сек с 30 сек «off» между сокращениями	8-об-разный	На уровне L4-L5 позвонка над многораздельными мышцами спины	3	ВАШ, TSK, ODI, PSFS
6	Кончугова Т.В. с соавт. [41], 2017	ПарИ	32 (КТ)+ 33 (ЧЭНС)	НД	НД	Параметры, «реализованные в готовом протоколе»	Кольцевой	Между ребрами и тазом	10	ВАШ
7	Abdelhalim N.M. et al. [39], 2019	ПарИ	21+21 (ИМС)	5/10	НД	Чередование частот стимуляции каждые 5 сек	НД	Нижняя часть спины в 5 см от поверхности кожи	12	ЧРШ, ODI, SF-36
8	Копачка М.М. с соавт. [42], 2019	НИ	20	НД	НД	По 15-35 минут 1 раз в день; при выраженном моторном дефиците (7 пациентов) дополнительно 10 мин	Кольцевой	На уровне L4-S1 позвонка; при выраженном моторном дефиците (7 чел) дополнительно стимуляция дистального отрезка п. tibialis в проекции подколенной ямки	10-20	ВАШ

Продолжение табл. см. на стр. 103.

№ п/п	Источник, год	Дизайн исследования	Кол-во пациентов	Частота (Гц)	Интенсивность (МП/ВМ, %)	Протокол стимуляции	Тип индуктора	Область стимуляции	Кол-во сеансов стимуляции	Оценка результатов
9	Блохина В.Н., Меликян Э.Г. [43], 2020	ПарИ	35 (КТ)+ 36 (ФТ)	1	НД	При наличии болевого синдрома и чувствительных расстройств: 100 стимулов в трейне, пауза 5 сек, всего 1500 стимулов, длительность сеанса 25 мин. Больным с двигательными нарушениями: протокол №1 – 100 стимулов в трейне, пауза 5 сек, всего 1500 стимулов, длительность сеанса 20 мин; протокол №2 – 100 стимулов в трейне, пауза 5 сек, всего 1200 стимулов, длительность сеанса 20 мин	Кольцевой	На уровне L3-L4 при радикулопатии L5; на уровне основания крестца со смещением на 3-4 см в сторону стимулируемой конечности при радикулопатии S1	10	ВАШ, ОТСХ

**Примечания.** рТсМС – ритмическая транспинальная магнитная стимуляция; ХБНЧС – хроническая боль в нижней части спины; ПарИ – параллельное исследование; НИ – наблюдательное исследование; ИМС – имитационная магнитная стимуляция; ЧЭНС – чрескожная электрическая нейростимуляция; КТ – комплексная терапия; ФТ – физиотерапия; НД – нет данных; МП – моторный порог; ВМ – выходная мощность; ЧРШ – числовая ранговая шкала; ODI – Oswestry Disability Index (Освестровский опросник нарушения жизнедеятельности при боли в спине); MPQ – McGill Pain Questionnaire (болевого опросник МакГилла); ВАШ – визуально-аналоговая шкала; TSK – Tampa Scale for Kinesiophobia (Тамповская шкала кинезиофобии); QBPDS – Quebec Back Pain Disability Scale (Квебекская шкала боли в спине); PSFS – Patient Specific Functional Scale (пациент-специфичная функциональная шкала); SF-36 – короткая форма одноименной шкалы оценки физического и психического аспектов качества жизни; ОТСХ – опросник тревожности Спилбергер-Ханина.

**Note.** рТсМС – repetitive transspinal magnetic stimulation; ХБНЧС – chronic low back pain; ПарИ – parallel study; НИ – observational study; ИМС – sham magnetic stimulation; ЧЭНС – percutaneous electrical neurostimulation; КТ – complex therapy; ФТ – physical therapy; НД – no data; МП – motor threshold; ВМ – stimulator output; ЧРШ – numerical rank scale; ODI – Oswestry Disability Index; MPQ – McGill Pain Questionnaire; ВАШ – visual analogue scale; TSK – Tampa Scale for Kinesiophobia; QBPDS – Quebec Back Pain Disability Scale; PSFS – Patient Specific Functional Scale; SF-36 – Short Form 36 Health Survey Questionnaire; ОТСХ – State-Trait Anxiety Inventory.

ции сенсорно-управляемой пластичности мозга. Следовательно, была продемонстрирована способность рТсМС генерировать сенсорно-управляемую активность в структурах М1, компенсируя связанные с болью нарушения интеграции сенсорных сигналов и реактивируя внутрикорковые тормозные механизмы. В дальнейшей своей работе [38] авторы подтвердили эти выводы на модели комбинированной терапии рТсМС+ЛФК многораздельной мышцы поясницы у 9 пациентов с ХБНЧС, у которых было объективизировано не только значительное уменьшение боли по ВАШ после проведения первого сеанса процедуры, но и поддержание этого эффекта наряду с улучшением функций по шкалам оценки нарушений жизнедеятельности в течение недели, что почти вдвое превышает вышеописанные результаты работы Y.L. Lo [36]. Долгосрочное воздействие такой комбинированной методики, а также ее влияние на различные маркеры кортикомоторного контроля боли, однако, еще предстоит определить.

Здесь необходимо отметить, что данные, опровергающие способность рТсМС изолированно вызывать обратное развитие ХБНЧС были опубликованы в исследовании 13 пациентов Kim J.Y. с соавт. в 2010 [40]. У 10 человек группы сравнения применялась ЧЭНС, которая определила статистически значимое улучшение динамики числовой ранговой шкалы (ЧРШ) боли, оцененное через 8 ч после проведения стимуляции ( $p=0,015$ ). При оценке через 2 нед противоболовое преимущество ЧЭНС перед рТсМС зафиксировалось на уровне  $p=0,005$ ; к нему добавилось значимое отличие в динамике результатов Освестровского опросника нарушения жизнедеятельности при боли в спине ( $p=0,016$ ). Авторы заключили, что ЧЭНС приводит к более значительному облегчению ХБНЧС, допустив возможные ограничения исследования, связанные с эффектом плацебо в отсутствие контрольной группы и рекомендовав дальнейшее изучение вопроса на большей выборке для сравнения эффектов различных методов лечения боли в пояснице. Как следует из таблицы,

такое исследование было опубликовано в 2017 г. Т.В. Кончуговой и соавт. [41], которые в целях повышения терапевтической эффективности и сокращения сроков лечения и реабилитации изучали результаты комплексного воздействия рТсМС и ударно-волновой терапии (УВТ) на ХБНЧС у 32 пациентов с дорсалгией в сравнении с применением ЧЭНС у 33 человек. Авторы сообщили, что в основной группе была выявлена достоверная позитивная динамика болевого синдрома по ВАШ. Его регресс более чем на 50% отмечен у 83% пациентов основной группы в отличие от группы сравнения, где значимый регресс после 10-дневного курса ЧЭНС зафиксирован только в половине случаев. Дальнейшие уточнения в работе не приведены. Сходное по детализации отечественное исследование последовало в 2019 г. В нем Копачка М.М. с соавт. [42] отметили, что после изучения мирового опыта ими было принято решение проводить ритмическую низкочастотную стимуляцию пояснично-крестцовой области в проекции нервных структур, поражение которых вызвало моторный дефицит и чувствительные нарушения у 20 пациентов с ХБНЧС. Для усиления эффекта при выраженном моторном дефиците у 7 пациентов была дополнительно добавлена 10-минутная стимуляция дистального отрезка n. tibialis в подколенной ямке. Субъективно снижение интенсивности болевого синдрома на фоне такой терапии отметили 15 из 20 пациентов. Примерно в 50% случаев анальгезирующий эффект продолжался более 1 месяца после окончания курса, что позволило авторам предположить необходимость проведения поддерживающих курсов рТсМС для закрепления полученных результатов.

В своей работе 2020 г. В.Н. Блохина и Э.Г. Меликян вернулись к оценке эффекта от дополнительного воздействия рТсМС в комплексе с традиционной реабилитационной терапией у пациентов с ХБНЧС после микродискэктомии и тревожностью [43]. Оценка проводилась на 7-й день (до начала реабилитационного лечения) и на 21-й день после операции. По данным исследования было отмечено значимое противоболевое действие как у 35 пациентов основной группы за счет комплексной терапии, так и у 36 лиц – группы сравнения, получавшей традиционную реабилитацию. При этом к 21-му дню не было выявлено межгруппового различия при оценке ВАШ боли в спине, однако отмечено статистически значимое ( $p=0,036$ ) различие между группами по показателю уровня боли в нижней конечности. Параллельный анализ зафиксированного снижения ситуационной и личностной тревожности (СТ и ЛТ) в обеих группах показал, что у пациентов, получавших в том числе рТсМС, значительно

уменьшилась частота проявлений высокого и умеренного уровня ЛТ, которая может выступать предиктором медленного восстановления. Авторы заключили, что рТсМС является эффективным терапевтическим инструментом у данной категории пациентов.

В 2 дополнительных отобранных для настоящего обзора работах описано применение рТсМС под видом высокоинтенсивной импульсной магнитотерапии. В статье Lee P.V. с соавт. в 2006 [30] показано, что подобная рТсМС приводит к статистически значимому снижению ХБНЧС по сравнению с имитацией при оценке через 3 нед применения 3 раза в неделю, а ее эффект сохраняется до 4-х нед, сопровождаясь столь же выраженным улучшением по шкале оценки нарушения жизнедеятельности. Отличительной особенностью дизайна РКИ Р.В. Lee явилось то, что все участники, в том числе обследующий и проводящий лечение доктора, а также осуществляющий ввод данных сотрудник, были «ослеплены» по отношению к его деталям. Вместе с тем, используемый прибор был ограничен по воздействию в частотном диапазоне до 10 Гц. Этот же прибор был использован и в работе N.M. Abdelhalim и соавт. 12 лет спустя [39] с аналогичным протоколом, режимами и периодичностью сеансов. Результаты показали, что по всем оцененным параметрам, включая ЧРШ боли, качество жизни и объем движений в поясничном отделе позвоночника, у пациентов экспериментальной группы были зафиксированы значимые улучшения через месяц использования рТсМС, в отличие от группы контроля, получавшей ИМС.

Проведен мета-анализ потенциально сопоставимых РКИ ( $k=5$ ) по исходам, основанным на оценке боли по ВАШ между основной и контрольной группами, получавшими рТсМС и ИМС при ХБНЧС. Среднее отличие между группами было  $g=-0,94$ , ( $p=0,001$ ; 95% ДИ [-1,51; -0,37]). Q-тест Кокрана был проведен для изучения того, могли ли колебания наблюдаемого эффекта быть связаны только с ошибкой выборки ( $Q\sim(df=4)\sim=8,83$ ;  $p=0,065$ ). Не было получено исчерпывающих доказательств, что истинная величина эффекта варьирует в разных исследованиях. Статистика  $I^2$  указывает на долю дисперсии наблюдаемого эффекта, обусловленную ошибкой выборки. В данном случае  $I^2=54,04\%$ . Несмотря на то, что эта статистика не является абсолютной мерой неоднородности, она часто интерпретируется как таковая. При интерпретации значений  $I^2$  не рекомендуется использовать эмпирические правила, такие как малые, средние или большие. Вместо этого информация, представляющая интервальный прогноз, более полезна для понимания неоднородности истинной величины эффекта в мета-а-



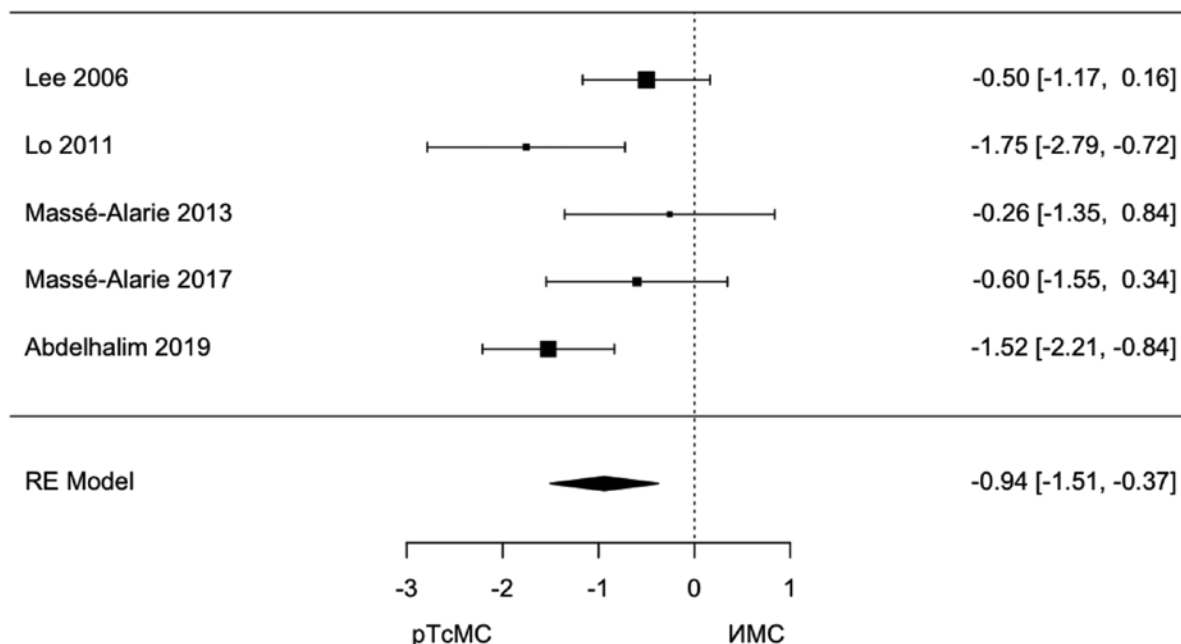
нализе. В данном случае 95% доверительный интервал составил -2,02; 0,14. То есть, по расчетам, 95% истинной величины эффекта находятся между  $g=-2,02$  и  $g=0,14$ . Графическое представление данных отражено на рисунке.

**Заключение**

Традиционно лечение хронических заболеваний ОДА (ХЗОДА), таких как ХБНЧС, закреплено в биомедицинской модели. Эта модель основана на структурно-патологической парадигме, где повреждение анатомических структур считается единственной причиной заболевания. За последние десятилетия появились доказательства нейрофизиологических изменений (нейропластичности) в ЦНС и ПНС, связанных с ХЗОДА. Исследования показывают, что ХЗОДА не просто являются результатом существующей структурной патологии периферических тканей, но включают в себя сложное взаимодействие между их повреждением, изменением афферентной информации, передаваемой от периферических рецепторов к спинному мозгу, стволу и областям коры головного мозга, изменениями в нейронной обработке болевых раздражителей и психосоциальных факторов [44]. Данные нейрофизиологические изменения согласуются с биопсихосоциальной моделью ХБНЧС,

подтверждающей на основании экспериментальных и клинических результатов искажение сенсорной передачи, изменения управления движением, изменения в проприоцепции, психологические и поведенческие отклонения, которые вовлечены как в клиническую манифестацию, так и в патофизиологию этого заболевания [45].

Общепринятые регенеративные технологии в значительной степени направлены на механизмы, связанные с запуском (т.е. периферические структурные повреждения, включающие воспаление, восстановление и ремоделирование тканей) и исходами ХЗОДА (такими, как мышечная сила, выносливость, управление движением и проприоцепция) [46]. Хотя эти методики способны оказать влияние на периферические структуры, они сами по себе могут быть недостаточными для восстановления свойств и функций коры и облегчения боли, особенно при хронических повреждениях. Ограниченные ресурсы в терапии ХЗОДА задействованы в решении проблем передачи, обработки и вспомогательной афферентной стимуляции двигательной активности [46]. Неспособность эффективно лечить такие состояния, как ХБНЧС, может быть связана с тем, что описанные центральные нейропластические изменения в различных областях в значительной степени игнорируются, что, вероятно, объяс-



**Рис.** Форест-диаграмма пяти РКИ по исходам, основанным на оценке боли по ВАШ между группами, получавшими рТсМС и ИМС при ХБНЧС.  
**Fig.** Forest plot of five RCTs on outcomes based on VAS pain scores between the groups receiving rTsMS and sham stimulation for CLBP.

няет, почему терапевтические эффекты невелики, независимо от типа вмешательства [45].

Нейропластичность управляется стимулами, и стимулы могут быть опосредованы процессами, направленными как сверху вниз, от вышележащих к ниже-расположенным иерархическим структурам нервной системы, так и снизу вверх, от периферических к центральным [47]. Поскольку ХЗОДА, и ХБНЧС, в частности, включают нейропластические изменения в определенных областях, логично предположить, что и лечение должно быть направлено через различные пораженные структуры в нервной системе, т.е. также снизу вверх и сверху вниз. В этой связи комбинация рассмотренных в 1-й и 2-й частях настоящего обзора [17] методик, по отдельности подтвердивших свое благотворное влияние на пластичность мозга, могла бы повлиять на процессы управления болью при изучаемой патологии в большей степени, чем каждая из них по отдельности. Эта гипотеза дополнительно основывается на результатах применения транскраниальной электрической стимуляции и периферической электрической стимуляции паравертебральных мышц [48-49], которые описывают терапевтический болеутоляющий эффект, в том числе длительный, от их комбинированного воздействия. Насколько известно авторам настоящего обзора, подобная экстраполяция на комбинацию методик рТМС и рТсМС, несмотря на очевидную патогенетическую обоснованность, до настоящего времени в литературе не встречается, что, таким образом, предполагается сделать предметом собственного исследования.

### Литература

(п.п. 1-11; 13-16; 18; 19; 21-23; 29-40; 44-49 см. References)

12. Яхно Н.Н., Кукушкин М.Л., Давыдов О.С., Данилов, А.Б., Амелин, А.В., Куликов, С.М. Результаты Российского эпидемиологического исследования распространенности невропатической боли, ее причин и характеристик в популяции амбулаторных больных, обратившихся к врачу—неврологу. *Боль*. 2018; 3(20): 24-32.
17. Меркулов Ю.А., Гореликов А.Е., Пятков А.А., Меркулова Д.М. Ритмическая транскраниальная магнитная стимуляция в терапии хронической боли в нижней части спины. Систематический обзор (Часть I). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2021; 65(3): 80-90. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2021.03.80-90>
20. Улащик В.С., Плетнев А.С., Войченко Н.В., Плетнев С.В. *Магнитотерапия: теоретические основы и практическое применение*. Под ред. В. С. Улащика. Минск: Беларуская навука, 2015. ISBN 978-985-08-1853-9
24. Живолупов С.А., Рашидов Н.А., Онищенко Л.С., Гайкова О.Н., Самарцев И.Н., Степанов А.Ю., Попов В.А. Особенности реперации мышц голени при лечении экспериментальной невропатии седалищного нерва с помощью трансспинальной импульсной магнитной стимуляции. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2010; 2(30): 140-4.
25. Митбрэйт И.М., Савченко А.Г., Волкова Л.П., Берлин Ю.В. «Бегущее» импульсное низкочастотное магнитное поле в лечении больных поясничным остеохондрозом. *Вопр. курорт, физиотер. и ЛФК*. 1989; 4: 43-6.
26. Гореликов А.Е., Мельникова Е.А., Рудь И.М. Магнитная стимуляция в лечении и реабилитации больных с заболеваниями нервной системы и позвоночника. *Медицинская реабилитация*. 2017; 11(140): 46-50.
27. Войтенков В.Б., Екушева Е.В., Скрипченко Н.В., Дамулин И.В. Транскраниальная магнитная стимуляция в диагностике и терапии болевых синдромов у детей и взрослых. *Журн неврол и психиатр*. 2019; 4: 93-9.
28. Блохина В.Н., Николаев С.Г., Кузнецов А.Н., Меликян Э.Г. Применение ритмической периферической магнитной стимуляции (РПМС). *Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова*. 2016; 11(3): 111-7.
41. Кончугова Т.В., Даминов В.Д., Уварова О.А., Кульчицкая Д.Б., Гушина Н.В., Каримов А.Н. Обоснование применения нового сочетанного метода ударно-волновой терапии и ритмической периферической магнитной стимуляции в клинической практике. *Физиотерапевт*. 2017; 6: 16-23.
42. Копачка М.М., Трошина Е.М., Челябинина М.В., Лаптева К.Н., Дзюбанова Н.А., Зеленков П.В. и др. Опыт применения низкочастотной периферической ритмической магнитной стимуляции у пациентов с болевым синдромом на поясничном уровне (пилотное исследование). *Российский журнал боли*. 2019; 17(S1): 138-9.
43. Блохина В.Н., Меликян Э.Г. Оценка тревожности и болевого синдрома у пациентов с пояснично-крестцовой радикулопатией в раннем реабилитационном периоде после микродискэктомии при применении различных реабилитационных программ. *Альманах клинической медицины*. 2020; 48(1): 13-21.

### References

1. Nakamura M., Nishiwaki Y., Sumitani M., Ushida T., Yamashita T., Konno S., Taguchi T., Toyama Y. Investigation of chronic musculoskeletal pain (third report): with special reference to the importance of neuropathic pain and psychogenic pain. *Journal of Orthopaedic Science*. 2014; 19(4): 667-75. <https://doi.org/10.1007/s00776-014-0567-6>
2. Frebarger J.K., Holmes G.M., Agans R.P., Jackman A.M., Darter J.D., Wallace A.S., Castel L.D., Kalsbeek W.D., Carey T.S. The rising prevalence of chronic low back pain. *Archives of Internal Medicine*. 2009; 169(3): 251-8. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2008.543>
3. National Inst. of Neurological Disorders and Stroke. Low back pain fact sheet. 2018-08-07. NIH Publication No. 15–5161.
4. Krath A., Klüter T., Stukenberg M., Zielhardt P., Gollwitzer H., Harrasser N., Hausdorf J., Ringeisen M., Gerdesmeyer L. Electromagnetic transduction therapy in non-specific low back pain: A prospective randomised controlled trial. *Journal of Orthopaedics*. 2017; 14(3): 410-5. <https://doi.org/10.1016/j.jor.2017.06.016>
5. Nayback-Beebe A.M., Yoder L.H., Goff B.J., Arzola S., Weidlich C. The effect of pulsed electromagnetic frequency therapy on health-related quality of life in military service members with chronic low

- back pain. *Nursing Outlook*. 2017; 65(5S): S26-S33. <https://doi.org/10.1016/j.outlook.2017.07.012>
6. Outcalt S.D., Kroenke K., Krebs E.E., Chumbler N.R., Wu J., Yu Z., Bair M.J. Chronic pain and comorbid mental health conditions: Independent associations of posttraumatic stress disorder and depression with pain, disability, and quality of life. *Journal of Behavioral Medicine*. 2015; 38(3): 535-43. <https://doi.org/10.1007/s10865-015-9628-3>
  7. Iizuka Y., Iizuka H., Mieda T., Tsunoda D., Sasaki T., Tajika T., et al. Prevalence of chronic nonspecific low back pain and its associated factors among middle-aged and elderly people: an analysis based on data from a musculo-skeletal examination in Japan. *Asian Spine Journal*. 2017; 11(6): 989-97. <https://doi.org/10.4184/asj.2017.11.6.989>
  8. Snekkvik H., Eriksen H.R., Tangen T., Chalder T., Reme S.E. Fatigue and depression in sick-listed chronic low back pain patients. *Pain Medicine*. 2014; 15(7): 1163-70. <https://doi.org/10.1111/pme.12435>
  9. Alsaadi S.M., McAuley J.H., Hush J.M., Maher C.G. Prevalence of sleep disturbance in patients with low back pain. *European Spine Journal*. 2011; 20(5): 737-43. <https://doi.org/10.1007/s00586-010-1661-x>
  10. Li J., He J., Li H., Fan B.F., Liu B.T., Mao P., et al. Proportion of neuropathic pain in the back region in chronic low back pain patients -a multicenter investigation. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 16537. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33832-x>
  11. Torrance N., Smith B.H., Bennett M.I., Lee A.J. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *J. Pain*. 2006; 7(4): 281-9.
  12. Yakhno N.N., Kukushkin M.L., Davydov O.S., Danilov A.B., Amelin A.V., Kulikov S.M. Results of the Russian epidemiological study of the prevalence of neuropathic pain, its causes and characteristics in the population of outpatients who consulted a neurologist. *Bol'*. 2018; 3(20): 24-32. (in Russian)
  13. Ouedraogo D.D., Nonguierma V., Tiéno H., Guira O., Drabo J.Y. Prevalence of neuropathic pain among Black African patients suffering from common low back pain. *Rheumatol Int*. 2012; 32: 2149-53.
  14. Kaki A.M., El-Yaski A.Z., Youseif E. Identifying neuropathic pain among patients with chronic low-back pain: use of the Leeds Assessment of Neuropathic Symptoms and Signs pain scale. *Reg Anesth Pain Med*. 2005; 30: 422-8.
  15. Dworkin R.H., O'Connor A.B., Backonja M., Farrar J.T., Finnerup N.B., Jensen T.S., Kalso E.A., Loeser J.D., Miaskowski C., Nurmikko T.J., Portenoy R.K., Rice A.S., Stacey B.R., Treede R.D., Turk D.C., Wallace M.S. Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. *Pain*. 2007; 132(3): 237-51. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.08.033>
  16. Steele A. Opioid use and depression in chronic pelvic pain. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 2014; 41(3): 491-501. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2014.04.005>
  17. Merkulov Y.A., Gorelikov A.E., Pyatkov A.A., Merkulova D.M. Repetitive transcranial magnetic stimulation in the treatment of chronic low back pain. A systematic review (Part I). *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2021; 65(3): 80-90 (in Russian). <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2021.03.80-90>
  18. Lefaucheur J.P., Drouot X., Menard-Lefaucheur I., Keravel Y., Nguyen J.P. Motor cortex rTMS restores defective intracortical inhibition in chronic neuropathic pain. *Neurology*. 2006; 67: 1568-74. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000242731.10074.3c>
  19. Massé-Alarie H., Schneider C. Revisiting the Corticomotor Plasticity in Low Back Pain: Challenges and Perspectives. *Healthcare*. 2016; 4(3): 67. <https://doi.org/10.3390/healthcare4030067>
  20. Ulashchik V.S., Pletnev A.S., Voychenko N.V., Pletnev S.V. *Magneto-therapy: theoretical foundations and practical application. [Magnitoterapiya: teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primeneniye]*. Ed. V.S. Ulashchik. Minsk: Belaruskaya navuka; 2015. ISBN 978-985-08-1853-9. (in Russian)
  21. Ridding M., Brouwer B., Miles T., Pitcher J., Thompson P. Changes in muscle responses to stimulation of the motor cortex induced by peripheral nerve stimulation in human subjects. *Exp. Brain Res*. 2000; 131(1): 135-43.
  22. Stefan K., Ans L.G., Cohen E.K., Benecke R., Classen J. Induction of plasticity in the human motor cortex by paired associative stimulation. *Brain*. 2000; 123(3): 572-84.
  23. Struppler A., Angerer B., Havel P. Modulation of sensorimotor performances and cognition abilities induced by RPMS: clinical and experimental investigations. *Suppl. Clin. Neurophysiol*. 2003; 56(C): 358-67.
  24. Zhivolupov S.A., Rashidov N.A., Onischenko L.S., Gaykova O.N., Samartsev I.N., Stepanov A.Ju., Popov V.A. Regeneration of the shin muscles during transspinal impulse magnetic stimulation of experimental sciatic nerve neuropathy. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii*. 2010; 2(30): 140-4. (in Russian)
  25. Mitbreit I.M., Savchenko A.G., Volkova L.P., Berlin Y.V. "Running" pulsed low-frequency magnetic field in the treatment of patients with lumbar osteochondrosis. *Vopr. kurort., physioter. i LFK*. 1989; 4: C 43-6. (in Russian)
  26. Gorelikov A.E., Melnikova E.A., Rud I.M. Magnetic stimulation in the treatment and rehabilitation of patients with diseases of the nervous system and spine. *Meditsinskaya Reabilitatsiya*. 2017; 11(140): 46-50. (in Russian)
  27. Voytenkov V.B., Ekusheva E.V., Skripchenko N.V., Damulin I.V. Transcranial magnetic stimulation in the diagnosis and therapy of pain syndromes in children and adults. *Jurn Nevrol i Psichiatr*. 2019; 4: 93-9. (in Russian)
  28. Blokhina V.N., Nikolaev S.G., Kuznetsov A.N., Melikyan E.G. Application of repetitive peripheral magnetic stimulation (RPMS). *Vestnik Natsional'nogo mediciko-khirurgicheskogo Centra im N.I. Pirogova*. 2016; 11(3): 111-7. (in Russian)
  29. Yang S., Chang M.C. Effect of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation on Pain Management: A Systematic Narrative Review. *Front. Neurol*. 2020; 11: 114. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00114>
  30. Lee P.B., Kim Y.C., Lim Y.J., Lee C.J., Choi S.S., Park S.H., et al. Efficacy of pulsed electromagnetic therapy for chronic lower back pain: A randomized, double-blind, placebo-controlled study *J Int. Med. Res*. 2006; 34(2): 160-7. <https://doi.org/10.1177/147323000603400205>
  31. Rosen A.D. Effect of a 125 mT static magnetic field on the kinetics of voltage activated Na<sup>+</sup> channels in GH3 cells. *Bioelectromagnetics*. 2003; 24(7): 517-23.
  32. Chokroverty S., Flynn D., Picone M.A., Chokroverty M., Belsh, J. Magnetic coil stimulation of the human lumbosacral vertebral column: site of stimulation and clinical application. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology/Evoked Potentials Section*. 1993; 89(1): 54-60. [https://doi.org/10.1016/0168-5597\(93\)90085-4](https://doi.org/10.1016/0168-5597(93)90085-4)
  33. Zhu Y., Starr A. Magnetic stimulation of muscle evokes cerebral potentials. *Muscle Nerve*. 1991; 14: 721-32.
  34. Krause P., Straube A. Peripheral repetitive magnetic stimulation induces intracortical inhibition in healthy subjects. *Neurol. Res*. 2008; 30: 690-4.

35. Gallasch E., Christova M., Kunz A., Rafolt D., Golaszewski S. Modulation of sensorimotor cortex by repetitive peripheral magnetic stimulation. *Front Hum Neurosci.* 2015; 14(9): 407. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2015.00407>
36. Lo Y.L., Fook-Chong S., Huerto A.P., George J.M. A randomized, placebo-controlled trial of repetitive spinal magnetic stimulation in lumbosacral spondylotic pain. *Pain Med.* 2011; 12: 1041-5. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2011.01143.x>
37. Massé-Alarie H., Flamand V.H., Moffet H., Schneider C. Peripheral neurostimulation and specific motor training of deep abdominal muscles improve posturo-motor control in chronic low back pain. *Clin J Pain.* 2013; 29(9): 814-823. <https://doi.org/10.1097/AJP.0b013e318276a058>
38. Massé-Alarie H., Beaulieu L.D., Preuss R., Schneider C. Repetitive peripheral magnetic neurostimulation of multifidus muscles combined with motor training influences spine motor control and chronic low back pain. *Clin Neurophysiol.* 2017; 128(3): 442-53. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2016.12.020>
39. Abdelhalim N.M., Samhan A.F., Abdelbasset W.K. Short-Term impacts of pulsed electromagnetic field therapy in middle-aged university's employees with non-specific low back pain: A pilot study. *Pak J Med Sci.* 2019; 35(4): 987-91. <https://doi.org/10.12669/pjms.35.4.49>
40. Kim J.Y., Yoon S.H., Rah U.W., Cho K.H., Hong J.Y. Effect of Repetitive Magnetic Stimulation and Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation in Chronic Low Back Pain: A Pilot Study. *Ann Rehabil Med.* 2010; 34(6): 725-9.
41. Konchugova T.V., Daminov V.D., Uvarova O.A., Kulchitskaya D.B., Gushchina N.V., Karimov A.N. Rationale for application of a new combined method of shockwave therapy and repetitive peripheral magnetic stimulation in clinical practice. *Physioterapevt.* 2017; 6: 16-23. (in Russian)
42. Kopachka M.M., Troshina E.M., Chelyapina M.V., Lapteva K.N., Dzyubanov N.A., Zelenkov P.V., et al. Experience of low-frequency peripheral repetitive magnetic stimulation in patients with lumbar pain syndrome (a pilot study). *Russkiy Jurnal Boli.* 2019; 17(S1): 138-9. (in Russian)
43. Blokhina V.N., Melikyan E.G. Assessment of anxiety and pain syndrome in patients with lumbosacral radiculopathy in the early rehabilitation period after microdiscectomy using different rehabilitation programs. *Almanakh Klinicheskoy Meditsiny.* 2020; 48(1): 13-21. (in Russian)
44. Pelletier R., Higgins J., Bourbonnais D. Is neuroplasticity in the central nervous system the missing link to our understanding of chronic musculoskeletal disorders? *BMC Musculoskeletal Disorders.* 2015; 16(1): 25.
45. Pelletier R., Higgins J., Bourbonnais D. Addressing Neuroplastic Changes in Distributed Areas of the Nervous System Associated with Chronic Musculoskeletal Disorders. *Phys Ther.* 2015; 95(11): 1582-91. <https://doi.org/10.2522/ptj.20140575>
46. Nijs J., Meeus M., Cagnie B. et al. A modern neuroscience approach to chronic spinal pain: combining pain neuroscience education with cognition-targeted motor control training. *Phys Ther.* 2014; 94(5): 730-8. <https://doi.org/10.2522/ptj.20130258>
47. Schabrun S.M., Jones E., Elgueta Cancino E.L., Hodges P.W. Targeting chronic recurrent low back pain from the top-down and the bottom-up: a combined transcranial direct current stimulation and peripheral electrical stimulation intervention. *Brain Stimul.* 2014; 7(3): 451-9. <https://doi.org/10.1016/j.brs.2014.01.058>
48. Luz-Santos C., Ribeiro Camatti J., Barbosa Paixão A., Nunes Sá K., Montoya P., Lee M., Fontes Baptista A. Additive effect of tDCS combined with Peripheral Electrical Stimulation to an exercise program in pain control in knee osteoarthritis: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2017; 18(1): 609. <https://doi.org/10.1186/s13063-017-2332-6>
49. Hazime F.A., Baptista A.F., de Freitas D.G., Monteiro R.L., Maretto R.L., Hasue R.H., João S.M.A. Treating low back pain with combined cerebral and peripheral electrical stimulation: A randomized, double-blind, factorial clinical trial. *Eur J Pain.* 2017; 21(7): 1132-43. <https://doi.org/10.1002/ejp.1037>

**Сведения об авторах:**

**Меркулов Юрий Александрович**, доктор мед. наук, гл. науч. сотр., e-mail: 4181220@gmail.com;

**Гореликов Андрей Евгеньевич**, зав. отд-нием медицинской реабилитации, e-mail: winstonone@bk.ru;

**Пятков Артем Александрович**, канд. мед. наук, врач-невролог, e-mail: contradolor@mail.ru;

**Меркулова Дина Мироновна**, доктор мед. наук, проф. каф. нервных болезней, руководитель неврологического центра, e-mail: dinamerk@mail.ru

Коллектив авторов, 2021

УДК 616-009

Тадтаева З.Г.<sup>1</sup>, Яковлева Е.Е.<sup>1,2</sup>, Амелин А.В.<sup>3</sup>

## Полиморфизм гена фолатного обмена метилентетрагидрофолат-редуктазы (*MTHFR*) и гипергомоцистеинемия при мигрени

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», МЗ РФ,

194100, Санкт-Петербург, Россия, ул. Литовская, 2;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,

197376, Санкт-Петербург, Россия, ул. Акад. Павлова, 12.

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад.И.П. Павлова», МЗ РФ,

197022, Санкт-Петербург, Россия, ул. Льва Толстого, 6-8

В обзоре обсуждается роль полиморфизма гена фолатного обмена метилентетрагидрофолат-редуктазы (*MTHFR*), ответственного за развитие гипергомоцистеинемии в патогенезе мигрени. Изложены общие данные о полиморфизме C677 гена фолатного цикла и метаболизме гомоцистеина. Представлен патогенетический механизм развития мигрени, связанный с провоспалительными, прокоагулянтными свойствами гомоцистеина, активацией процессов окислительного стресса, эндотелиальной дисфункцией и нейрогенным воспалением при повышении концентрации этой аминокислоты. Отражены перспективы и социальная значимость имплементации данных генетических исследований в клиническую практику, их роль в прогнозировании течения мигрени и оценке риска развития осложнений, а также коррекции фармакотерапевтических подходов.

**Методика.** Для поиска данных в базах MEDLINE, SCOPUS и Web of Science использованы поисковые запросы: *MTHFR*, мигрень, патофизиология, гипергомоцистеинемия, таргетная терапия.

**Ключевые слова:** метилентетрагидрофолатредуктаза, ген *MTHFR*, мигрень, патофизиология, гипергомоцистеинемия, таргетная терапия

**Для цитирования:** Тадтаева З.Г., Яковлева Е.Е., Амелин А.В. Полиморфизм гена фолатного обмена метилентетрагидрофолат-редуктазы (*MTHFR*) и гипергомоцистеинемия при мигрени. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): – .

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования –Тадтаева З.Г., Яковлева Е.Е., Амелин А.В.; сбор и обработка материала

– Тадтаева З.Г., Яковлева Е.Е., Амелин А.В.; подготовка иллюстративного материала – Тадтаева З.Г., Яковлева Е.Е., Амелин А.В.;

написание текста – Тадтаева З.Г., Яковлева Е.Е., Амелин А.В.; редактирование – Тадтаева З.Г., Яковлева Е.Е., Амелин А.В.

**Для корреспонденции:** Яковлева Екатерина Евгеньевна, канд. мед. наук, клинический фармаколог, ассистент каф.

фармакологии с курсом клинической фармакологии и фармакоэкономики Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, научный сотрудник отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова Института экспериментальной медицины, e-mail:eeiakovleva@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 26.03.2021

Принята к печати 2021

Опубликована 2021

Tadtaeva Z.G.<sup>1</sup>, Yakovleva E.E.<sup>1,2</sup>, Amelin A.V.<sup>3</sup>

## Polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) folate metabolism gene and hyperhomocysteinemia in migraine

<sup>1</sup>Saint Petersburg State Pediatric Medical University,

Litovskaya St. 2, Saint Petersburg 194100, Russia

<sup>2</sup>Institute of Experimental Medicine,

Akad. Pavlova St. 12, Saint Petersburg 197376, Russia

<sup>3</sup>Academician I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,

L'va Tolstogo St. 6-8, Saint Petersburg 197022, Russia

The review discusses the role of polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) folate metabolism gene responsible for hyperhomocysteinemia in the pathogenesis of migraine. Data on the polymorphism of the folate cycle gene C677 and

homocysteine metabolism are presented. The pathogenetic mechanism of migraine associated with proinflammatory, procoagulant properties of homocysteine and with the activation of oxidative stress, endothelial dysfunction, and neurogenic inflammation related with increased concentrations of homocysteine is described. Prospects and social significance of implementing data of genetic research into clinical practice are discussed. Included is the role of genetic research in predicting the course and complications of migraine, in assessment of risk for complications, and in pharmacotherapeutic approaches to migraine treatment.

**Methods.** MEDLINE, SCOPUS and Web of Science databases were used to search for data: MTHFR, migraine, pathophysiology, hyperhomocysteinemia, targeted therapy

**Key words:** methylenetetrahydrofolate reductase, *MTHFR*, migraine, folate cycle genes, homocysteine, hyperhomocysteinemia, targeted therapy.

**For citation:** Tadtavaeva Z.G., Yakovleva E.E., Amelin A.V. Polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) folate metabolism gene and hyperhomocysteinemia in migraine *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(4): -. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**Authors' contribution:** concept and design of the study -Tadtavaeva Z.G., Yakovleva E.E., Amelin A.V.; collection and processing of material - Tadtavaeva Z.G., Yakovleva E.E., Amelin A.V.; preparation of illustrative material - Tadtavaeva Z.G., Yakovleva E.E., Amelin A.V.; writing of the text - Tadtavaeva Z.G., Yakovleva E.E., Amelin A.V.; editing - Tadtavaeva Z.G., Yakovleva E.E., Amelin A.V.

**For correspondence:** Ekaterina Yakovleva, PhD, clinical pharmacologist, assistant of the Department of Pharmacology with the course of Clinical Pharmacology and Pharmacoeconomics of the St.Petersburg State Pediatric Medical University, researcher of the Department of Neuropharmacology S.V. Anichkov of the Institute of Experimental Medicine (St.Petersburg, Russia), e-mail: eeiakovleva@mail.ru

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Financing.** The study had no sponsorship.

**Information about the authors:**

Yakovleva E.E., <https://orcid.org/0000-0002-0270-0217>

Received 26.03.2021

Accepted 2021

Published 2021

## Введение

Изучение наследственности при многих заболеваниях и фармакогенетическое тестирование в настоящее время становятся основой персонализированной медицины и активно внедряется в клиническую практику, помогая повысить эффективность и безопасность лечения и точнее прогнозировать его результат.

Одним из заболеваний, в развитии которого важная роль принадлежит наследственности, является мигрень – хроническое пароксизмальное заболевание мозга с характерными повторяющимися приступами сильной головной боли [1,2]. Распространённость мигрени в различных странах мира в среднем составляет 12-15% среди взрослого населения. Женщины страдают мигренью чаще, чем мужчины примерно в 3 раза. Согласно данным исследования «Глобальное Бремя Болезней» (Global Burden of Disease Study (GBD), 2015), эта неврологическая патология занимает 4-е место среди причин нетрудоспособности у лиц обоих полов и всех возрастов [3].

Патогенез мигрени сложен и предполагает тесную взаимосвязь между нейрофизиологическими и нейрохимическими процессами, развивающимися в центральной и периферической нервной системе в результате взаимодействия внешних и генетических фак-

торов. У детей и подростков мигрень является одной из наиболее частых причин головной боли и может дебютировать в возрасте до 3 лет в виде, так называемых, периодических эквивалентов мигрени, проявляющихся не головной болью, а приступами головокружения, кишечными коликами, которые в более позднем детском и подростковом возрасте могут трансформироваться в типичные приступы мигрени [4,5]. Эпидемиологические исследования среди детей младшего возраста до 7 лет свидетельствуют, что более 2,5% из них (чаще мальчики) страдают от периодических приступов мигренозной головной боли. При переходе в пубертатный период встречаемость мигрени значительно возрастает у девочек, достигая 15% распространенности к 15-летнему возрасту. Показано, что у большинства детей с мигренью, как минимум, один из родителей страдает данным заболеванием [6, 7].

Эпидемиологические данные у детей и семейная представленность болезни косвенным образом свидетельствуют о генетической предрасположенности мигрени. В восемнадцатом веке одним из первых важную роль семейной наследственности в развитии мигрени отметил Tissot (1790). За последние два столетия проведено множество исследований, доказывающих повышенный риск развития мигрени у родственников

пробанда [8]. Наиболее важным доказательством роли генетических факторов в патогенезе мигрени являются результаты молекулярно-генетических исследований по идентификации ряда генов-кандидатов и изучению их ассоциаций с риском развития мигрени [8, 9]. Основные исследования в этой области знаний связаны с изучением генов, регулирующих нейрональную и сосудистую функции. Наиболее изученным является полиморфизм 677СТ в гене, кодирующем фермент 5,10-метилтен-тетрагидрофлатредуктазу (МТНFR). Установлено, что мутации в гене МТНFR приводят к развитию гипергомоцистеинемии (ГГЦ) и регулируют широкий спектр биохимических реакций в фолатном и метиониновом обмене, обеспечивающих превращение гомоцистеина (ГЦ) в метионин.

**Гомоцистеин в организме.** Уровень ГЦ определяется процессами реметилирования и транссульфирования, для правильного функционирования которых необходима достаточная концентрация витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub> и фолиевой кислоты, являющихся коферментами этих процессов. Избыток ГЦ подвергается катаболизму при помощи фолиевой кислоты и цианкобаламина [10--13].

Процесс реметилирования ГЦ с образованием метионина осуществляется с помощью фермента метионинсинтазы, кофактором которого является витамин В<sub>12</sub>. Фермент метилентетрагидрофлатредуктаза катализирует образование 5-метилентетра-гидрофла-

та (активной формы фолиевой кислоты) из 5,10-метилентетрагидрофлата, необходимого для инициирования цикла метионина. Из метионина при участии АТФ и метионин-аденозилтрансферазы образуется S-аденозилметионин (SAM), который является универсальным донором метильной группы в организме. Оба цикла имеют важное значение в биосинтезе липидов, нуклеотидов и белков [14]. Кроме того, SAM играет важную роль в метилировании ДНК. Затем SAM деметилируется до S-аденозилгомоцистеина (SAH), который преобразуется обратно в гомоцистеин и вновь вступает в цикл передачи метильной группы (**рис 1**).

В процессе транссульфирования ГЦ связывается с серином с образованием цистатиона, катализируемого цистатион-β-синтазой. Далее цистатион гидролизруется до цистеина, из которого образуются таурин, глутатион и неорганические кислоты. Учитывая, что в метаболизме ГЦ обязательным является участие фолиевой кислоты, пиридоксина и цианкобаламина, недостаток этих витаминов может приводить к гипергомоцистеинемии [15].

Клиническое изучение нарушений обмена гомоцистеина началось в середине прошлого столетия, когда в 1962 году был описан синдром гомоцистеинурии, связанный с дефицитом фермента цистатионинсинтазы. В клинической картине наблюдались умственная отсталость, деформации костей, смещение хрусталика,

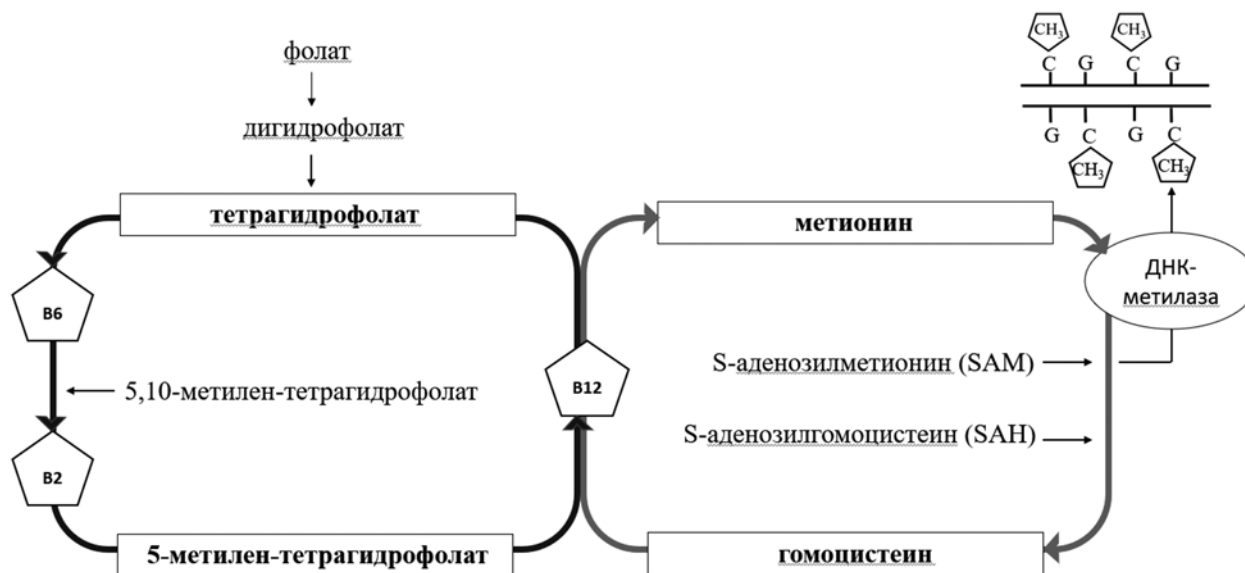


Рис. 1. Метаболизм гомоцистеина.

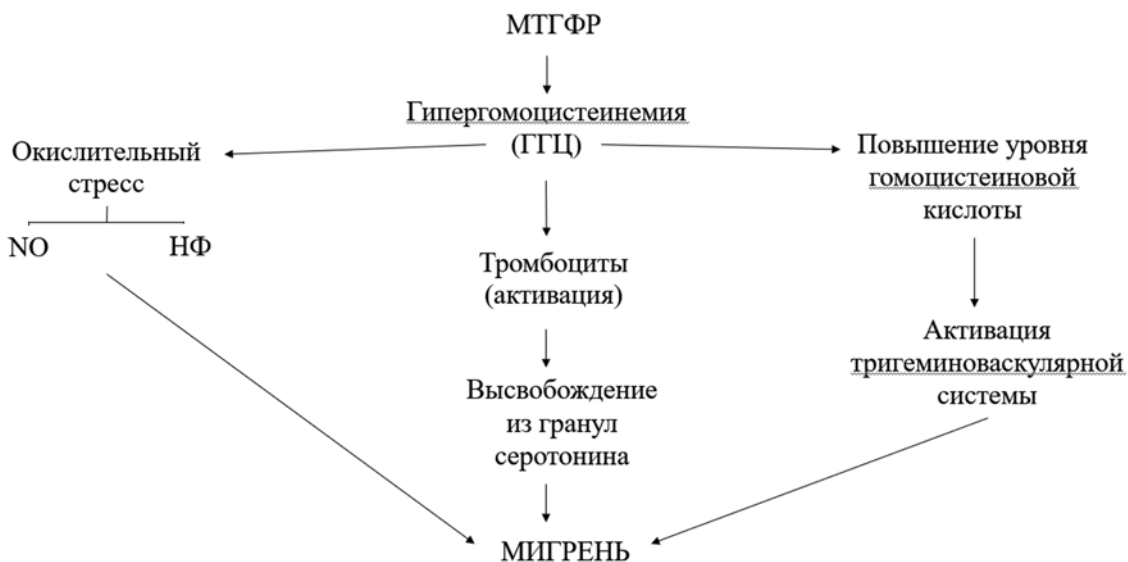
Fig. 1. Homocysteine metabolism.

прогрессирующие нарушения функции сердечно-сосудистой системы и высокая частота тромбоэмболий. В 1969 г. К. McCully, наблюдая детей с высоким уровнем гомоцистеина крови, впервые отметил, что у них рано возникают тяжелые формы атеросклеротического и тромбогенного поражения сосудов и было впервые высказано предположение о том, что высокий уровень гомоцистеинемии является фактором риска развития сердечно-сосудистых осложнений [16, 17].

**Роль гипергомоцистеинемии при мигрени.** Генетически обусловленная гипергомоцистеинемия может являться ключевым многокомпонентным звеном патогенеза мигрени, включающим дисфункцию эндотелия сосудов, изменение коагуляционных свойств крови и спонтанное возбуждение клеток тройничного нерва. Доказательством наличия дисфункции эндотелия при мигрени является обнаружение в крови маркеров повреждения эндотелия: повышенной активности фактора Виллебранда, эндотелина-1, повышение внутрисосудистой активности тромбоцитов, снижение концентрации естественных антикоагулятов, включая антитромбин III, протеины C и S. Полагают, что биохимической основой гипергомоцистеинемии является окислительный стресс – окислительное повреждение эндотелия в результате снижения синтеза монооксида азота (NO), являющегося одним из главных дилататоров и антиагрегантов [18]. Оксид азота принимает участие в физиологических процессах, имеющих

ключевое значение при многих заболеваниях, включая мигрень. NO активирует матриксные металлопротеиназы, влияющие на развитие распространяющейся корковой депрессии и нарушение гематоэнцефалического барьера. Увеличение маркеров окислительного стресса (продуктов перекисного окисления липидов и нитрат/нитрита в моче) обнаружены у . Активация тригемино-васкулярного комплекса приводит к нейрогенному воспалению, расширению кровеносных сосудов и формированию ноцицептивного потока [19]. Повышение уровня ГЦ может повреждать нейроны, вызывая изменения в ДНК, активировать проапоптотические факторы, а также влиять на активацию клеток тройничного нерва – один из основных нейрогенных факторов в патогенезе мигрени [20]. В эксперименте показано значительное увеличение активности нейронов тройничного нерва, отвечающих за болевое восприятие при введении D,L-гомоцистеиновой кислоты – вещества сходного по действию с гомоцистеином [21].

ГЦ и его метаболиты могут выступать в роли агонистов NMDA-глутаматных рецепторов, которые, как полагают, участвуют в формировании феномена кортикальной распространяющейся депрессии, являющейся нейрофизиологическим паттерном мигренозной ауры [20,22]. На **рис. 2** представлена схема гипотетического участия гена *MTHFR* и гипергомоцистеинемии в развитии мигрени.



**Рис. 2.** Роль генетически обусловленной гипергомоцистеинемии в развитии мигрени[23]. МТГФР – метилентетрагидрофолат-редуктаза; NO – монооксид азота; NF – нуклеарный фактор

**Fig. 2.** Role of genetically determined hyperhomocysteinemia in the development of migraine[23]. MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; NO, nitric monoxide; NF, nuclease factor.



**Полиморфизм 677ст гена *MTHFR* при мигрени.** *MTHFR* является ключевым ферментом фолатного цикла, который участвует в превращении фолиевой кислоты в ее активную форму 5-метилтетрагидрофолат. Ген *MTHFR* у человека расположен на коротком плече первой хромосомы (1p36.22), состоит из 11 экзонов, кодирует белок из 656 аминокислотных остатков. В настоящее время известно несколько десятков мутаций *MTHFR*. Наиболее изучена точечная мутация (миссенс-мутация) 677С-Т, которая ведет к замене валина на аланин в данном ферменте и снижению его термолабильности на 35% при гетерозиготном генотипе СТ и на 70% – при гомозиготном ТТ варианте. Наличие этой мутации приводит к повышению уровня гомоцистеина в крови и снижению уровня фолиевой кислоты.

В 2000 году, в Японии, Kowa и соавторы впервые изучили распространенность генетического варианта *MTHFR* С677 при мигрени [24]. Исследователи установили, что частота гомозиготного генотипа ТТ у пациентов с мигренью была достоверно выше (20,3% и 9,6% соответственно), а при мигрени с аурой значительно выше (40,9%), по сравнению с контрольной группой. Дальнейшие молекулярно-генетические исследования показали ассоциацию гомозиготного ТТ-генотипа *MTHFR* как при обеих формах мигрени (с аурой и без ауры), так и только при мигрени с аурой. Однако в ряде других исследований данная ассоциация подтверждена не была [25-29].

В ряде мета-анализов масштабных генетических исследований с участием 9 тысяч пациентов с мигренью и 27 тысяч пациентов контрольной группы подтверждена достоверная ассоциация Т-аллельного варианта *MTHFR* С677Т для мигрени с аурой [30-32]. Установлена ассоциация гомозиготного гена *MTHFR* с клиническими характеристиками мигрени: односторонней локализацией боли и усилением головной боли при физической нагрузке [33]. Кроме того, выявлено влияние полиморфизма С677Т гена *MTHFR* на некоторые электрофизиологические показатели. Так, у пациентов с гомозиготным ТТ-генотипом отмечались достоверно более высокая средняя амплитуда зрительного потенциала и более низкая габикуация контингентного отклонения, по сравнению с носителями аллелей С677Т и С677С [27]. Выявленные электрофизиологические изменения связывают с повышением корковой возбудимости, обусловленной ГГЦ. Исследования отечественных авторов также демонстрируют ассоциацию определенных аллельных вариантов гена *MTHFR* с мигренью и указывают на значимую роль биохимического цикла фолатов и метаболизма гомоцистеина при

мигрени. В работе Тадтаевой З.Г. и соавторов (2007) изучена распространенность полиморфизма С677Т гена *MTHFR* в общей группе мигрени и при мигрени с аурой, по сравнению со здоровой популяцией детей северо-запада России. При этом установлено увеличение частоты гомозиготного носительства аллеля 677Т более, чем в 2 раза, по сравнению с контрольной группой. Проанализировано влияние генотипа фермента *MTHFR* на уровень гомоцистеина при мигрени у детей. Выявлен наследственный дефект гена *MTHFR* в 53,3% изученных случаев. Гомозиготный ТТ генотип, являющийся важной детерминантой повышения уровня гомоцистеина плазмы, определялся у 16,6% детей, страдающих мигренью с аурой, а значения гомоцистеина плазмы при мигрени с аурой достоверно превышали таковые показатели в группе сравнения ( $p < 0,05$ ) [23]. В исследовании Азимовой Ю.Э. и соавторов (2020) проанализированы все гены, кодирующие ферменты фолатного цикла, и установлено, что 4 из них (*MTHFD1*, *MTHFR*, *MTRR*, *MTR*) можно рассматривать как значимые ассоциированные маркеры мигрени [34].

Существуют обоснованные предположения, что полиморфизм гена *MTHFR* может объяснять коморбидность мигрени и цереброваскулярных заболеваний [35-37]. В ряде исследований доказано, что повышение уровня ГЦ плазмы ассоциируется с увеличением риска ишемического инсульта [38-40]. В настоящее время не получено доказательств влияния Т-аллеля гена *MTHFR* на риск развития субклинических очагов в белом веществе головного мозга, нередко наблюдаемых у пациентов с мигренью, однако риски поражения головного мозга при гипергомоцистеинемии у пациентов с мигренью, по мнению некоторых исследователей, остаются высокими. Это обусловлено провоспалительными, прокоагулянтными свойствами гомоцистеина, активацией процессов окислительного стресса, эндотелиальной дисфункцией и нейрогенным воспалением при повышении концентрации данной аминокислоты [41].

### Заключение

Таким образом, имеющиеся литературные данные значительно расширяют представление о патогенезе мигрени. На основе оценки генетической гетерогенности и нейробиохимических показателей у конкретного больного можно спрогнозировать особенность течения мигрени, риск развития церебро-васкулярных осложнений, а также сформировать эффективные и безопасные фармакотерапевтические подходы к лечению мигрени.

**Литература**

(п.п. 3-5; 8-11; 13-16; 19-21; 26-33; 35; 39-41

см. References)

1. Амелин А.В., Игнатов Ю.Д., Скоромец А.А. *Мигрень (патогенез, клиника, лечение)*. СПб.; 2001.
2. Табеева Г.Р., Яхно Н.Н. *Мигрень*. М.; 2011.
6. Рачин А.П., Юдельсон Я.Б., Сергеев А.В. Эпидемиология хронической ежедневной головной боли у детей и подростков. *Боль*. 2004; 2(3): 27-30.
7. Сергеев А.В., Екушева Е.В. Мигрень у детей. Особенности диагностики и современные возможности терапии. *Русский медицинский журнал*. 2018; 2: 26-32.
12. Пизова Н.В., Пизов Н. А. Гипергомоцистеинемия и ишемический инсульт. *Медицинский совет*. 2017; 10: 12-6.
17. Тадтаева З.Г. Гипергомоцистеинемия (ГГц) при мигрени у детей (обзор). *Здоровье—основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения*. 2012; 7(2): 721-9.
18. Петришев Н.Н. *Дисфункция эндотелия. Патогенетическое значение и методы коррекции*. СПбИИЦВМА; 2007.
22. Носкова Т.Ю., Шведков В.В., Красников А.В., Шабалина А.А., Костырева М.В., Абаимов Д.А. и др. Гипергомоцистеинемия и поражение белого вещества головного мозга у больных эпилепсией: анализ двух случаев. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2018; S3: 97-9. <https://doi.org/10.17816/bm-ma13223>
23. Тадтаева З.Г., Кацадзе Ю.Л. Полиморфизм гена метилентетрагидрофолатредуктазы, гипергомоцистеинемия и возможности ее медикаментозной коррекции при мигрени у детей. *Казанский медицинский журнал*. 2007; 88(1): 16-20.
25. Тадтаева З.Г. Генетика мигрени. Обзор литературы. *Вестник Санкт-Петербургского университета*. 2013; 11(1):7 0-80.
34. Азимова Ю.Э., Климов Е.А., Наумова Е.А., Кокаева З.Г., Зайцева А.И., Кондратьева Н.С. и др. Сочетанные генотипы генов, кодирующих белки холинергической системы и ферменты фолатного цикла в значительной степени связаны с мигренью. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64: 5-1.
37. Азимова Ю.Э., Табеева Г.Р., Климов Е.А. Генетика мигрени. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2008; 2(1): 41-6.
38. Пизова Н.В., Пизов Н.А. Гипергомоцистеинемия и ишемический инсульт. *Медицинский совет*. 2017; 10: 12-6.

**References**

1. Amelin A.V., Ignatov Yu.D., Skoromets A.A. *Migraine (pathogenesis, clinical picture, treatment [Migren' (patogenez, klinika, lechenie)]*. SPb.; Sankt Peterburgskoemeditsinskoeizdatel'stvo; 2001. (In Russian)
2. Tabeeva G.R., Yakhno N.N. *Migraine*. Moscow; Geotar-Media; 2011. (In Russian)
3. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 Neurological Disorders Collaborator Group. *Lancet Neurol*. 2017;16: 877- 897. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30299-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30299-5)
4. Victor T.W., Hu X., Campbell J.C., Buse D.C, Lipton R.B. Migraine prevalence by age and sex in the United States: a life-

- span study. *Cephalalgia*. 2010;30(9):1065-1072. <https://doi.org/10.1177/0333102409355601>
5. Elser J.M., Woody R.C. Migraine headache in the infant and young child. *Headache*. 1990; 30(6):366-368. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.1990.hed30063.x>
6. Rachin A.P., Yudel'sonYa.B., SergeevA.V. Epidemiology of chronic daily headache in children and adolescents. *Bol'*. 2004; 2(3): 27-30. (In Russian)
7. Sergeev A.V., Ekusheva E.V. Migraine in children. Features of diagnostics and modern possibilities of therapy. *Russkiymeditsinskiy zhurnal. Meditsinskoeobozrenie*. 2018; 2: 26-32
8. De Vries B., Frants R., Ferrari M. Molecular genetics of migraine. *Hum. Genet*. 2009; 126: 115-132. <https://doi.org/10.1007/s.00439-009-0684-z>
9. Joutel A., Bousser M.G., Bioussé V., Labauge P., Chabriat H., Nibbio A. et al. A gene for familial hemiplegic migraine maps to chromosome 19. *Nat. Genet*. 1993; 5:40-45. <https://doi.org/10.104/j.1468-2982.1996.1603135-3.x>
10. Champe P., Harvey R. *Biochemistry. Lippincott's Illustrated Reviews*. 4th edit. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2008; 261-276.
11. McCully K.S. Chemical Pathology of Homocysteine. Excitotoxicity, Oxidative Stress, Endothelial Dysfunction, and Inflammation. *Ann-Clin. Lab. Sci*. 2009; 39(3):219-232.
12. Pizova N. V., Pizov N. A. Hyperhomocysteinemia and ischemic stroke. *Meditsinskiysovet*. 2017; 10: 12-16
13. Dietrich-Muszalska A., Malinowska J., Olas B., Glowacki R., Bald E., Wachowicz B. et al. The oxidative stress may be induced by the elevated homocysteine in schizophrenic patients. *Neurochem. Res*. 2012; 37(5):1057-1062. <https://doi.org/10.1007/s.11064-012-0707-3>.
14. Froese D.S., Kopec J, Rembeza E, Bezerra G.A., Oberholzer A.E., Suormala T. et al. Structural basis for the regulation of human 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation and S-adenosylmethionine inhibition. *Nat. Commun*. 2018; 9(1): 2261. <https://doi.org/10.1038/s.41467-018-04735-2>
15. Tufkova S., Paskaleva D., Sandeva M. Acute exogenous intoxications and homocysteine *Folia Medica*. 2020; 62: 519-524. <https://doi.org/10.3897/folmed.62.e49220>
16. Mudd S., Finkelstein J., Irreverre F., Laster L. Homocystinuria: An enzymatic defect. *Science*. 1964; 143: 1443-1445. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.143.3613.1443>
17. Tadtaeva Z.G. Hyperhomocysteinemia (HHc) in migraine in children (review). *Zdorov'e—osnovachlovecheskogopotentsiala: problemy-putiikhresheniya*. 2012; 7(2): 721-729. (In Russian)
18. Petrishchev N.N. *Endothelial dysfunction. Pathogenetic significance and methods of correction*. SPbИИЦВМА. 2007. (In Russian)
19. Van de Ven R.C.G., Kaja S., Plomp J. Genetic Models of migraine. *Arch. Neurol*. 2007; 64: 643-646. <https://doi.org/10.1001/archneur.64.5.643>
20. Abushik P.A., Niittykoski M., Giniatullina R., Shakirzyanova A., Bart G., Fayuk D. et al. The role of NMDA and mGluR5 receptors in calcium mobilization and neurotoxicity of homocysteine in trigeminal and cortical neurons and glial cells. *J. Neurochem*. 2014; 129: 264–274. <https://doi.org/DOI:10.1111/jnc.12615>
21. Lea R.A., Ovcarić M., Sundholm J., MacMillan J., Griffiths L.R. The methylenetetrahydrofolate reductase gene variant C677T influences susceptibility to migraine with aura. *BMC Medicine*. 2004; 2: 3. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-2-3>

22. Noskova T.Yu., Shvedkov V.V., Krasnikov A.V., Shabalina A.A., Kostyreva M.V., Abaimov D.A. i dr. Hyperhomocysteinemia and brain white matter lesion in patients with epilepsy: an analysis of two cases. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii*. 2018; S3: 97-99. <https://doi.org/10.17816/bmma13223>. (In Russian)
23. Tadtavaeva Z.G., Katsadze Yu.L. Polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene, hyperhomocysteinemia, and the possibility of its drug correction in migraine in children. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2007; 88 (1): 16-20. (In Russian)
24. Kowa H., Yasui K., Takeshima T. The homozygous C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for migraine. *Am. J. Med. Genet.* 2000; 96: 762-764. [https://doi.org/10.1002/1096-8628\(20001\)96:6<762::aid-ajmg12>3.0.co;2-x](https://doi.org/10.1002/1096-8628(20001)96:6<762::aid-ajmg12>3.0.co;2-x)
25. Tadtavaeva Z.G. Genetics of migraine. Literature review. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta*. 2013; 11(1): 70-80. (In Russian)
26. Kaunisto M.A., Kattela M., Hämäläinen E. Testing of variants of the MTHFR and EDR1 genes in 1798 Finnish individuals fails to conform to the association with migraine with aura. *Cephalalgia*. 2006; 26:1462-1472. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2006.1228.x>
27. Lea R.A., Ovcarić M., Sundholm J., MacMillan J., Griffiths L.R. The methylenetetrahydrofolate reductase gene variant C677T influences susceptibility to migraine with aura. *BMC Medicine*. 2004; 2: 3. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-2-3>.
28. Ligthart L., de Vries B., Smith A.V., Ikram M.A., Amin N., Hottenga J.-J. Meta-analysis of genome-wide association for migraine in six population-based European cohorts. *Eur J Hum Genet.* 2011; 19(8):901-907. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.48>
29. Milutinovic S., D'Alessio A.C., Detich N. Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis*. 2007; 28:560-571. <https://doi.org/10.1093/carcin/bg1167>
30. Rubino E., Ferrero M., Rainero I. Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with migraine: a meta-analysis. *Cephalalgia*. 2009; 29: 818-825. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2982.2007.01400.x>
31. Samaan Z., Gaysina D., Cohen-Woods S., Craddock N., Jones L., Korszun A. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene variant (MTHFR C677T) and migraine: a case control study and meta-analysis. *BMC Neurol.* 2011; 11: 66. <https://doi.org/10.1177/0333102416638520>
32. Schürks M., Rist P.M., Kurth T. MTHFR 677C/T and D/I polymorphisms in migraine: a systematic review and meta-analysis. *Headache*. 2009; 50: 588-599. <https://doi.org/10.1111/head.12798>
33. Liu A., Menon S., Colson N.J., Quinlan S., Cox H., Peterson M. et al. Analysis of the MTHFR C677T variant with migraine phenotypes. *BMC Res Notes*. 2010; 3:213. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-213>.
34. Azimova Yu.E., Klimov E.A., Naumova E.A., Kokaeva Z.G., Zaytseva A.I., Kondrat'eva N.S., i dr. Combined genotypes of genes encoding proteins of the cholecystokinergic system and folate cycle enzymes are largely associated with migraine. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2020; 64: 5-14. (In Russian)
35. Hademenos G., Alberts M., Award I., Mayberg M., Shephard T., Jagoda A., et al. Advances in the genetics of cerebrovascular disease and stroke. *Neurology*. 2001; 56 (8): 125 <https://doi.org/10.1212/WNL.56.8.997>
36. Moschiano F., D'Amico D., Ciusani E., Erba N., Rigamonti A., Schieroni F. et al. Coagulation abnormalities in migraine and ischaemic cerebrovascular disease: a link between migraine and ischaemic stroke. *Neurol. Sci.* 2004; 25 (suppl.3):126-128. <https://doi.org/10.1001/s10072-004-0269-5>
37. Azimova Yu.E., Tabeeva G.R., Klimov E.A. Genetics of migraine. *Annaly klinicheskoy i eksperimental'noy neurologii*. 2008; 2(1): 41-46. (In Russian)
38. Pizova N.V., Pizov N.A. Hyperhomocysteinemia and ischemic stroke. *Meditsinskiy sovet*. 2017; 10: 12-16. (In Russian)
39. Zhong C., Xu T., Peng Y., Wang A., Wang J., Peng H. et al. Plasma Homocysteine and Prognosis of Acute Ischemic Stroke: a Gender-Specific Analysis From CATIS Randomized Clinical Trial. *Mol Neurobiol.* 2017; 54(3): 2022-2030. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9799-0>;
40. Han L., Wu Q., Wang C., Hao Y., Zhao J., Zhang J.L. et al. Homocysteine, Ischemic Stroke, and Coronary Heart Disease in Hypertensive Patients: A Population-Based, Prospective Cohort Study. *Stroke*. 2015; 46: 1777-1786. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.02.056>
41. De Tommaso M., Difruscolo O., Sardaro M., Libro G., Pecoraro C., Serpino C. et al. Influence of MTHFR genotype on contingent negative variation and MRI abnormalities in migraine. *Headache*. 2007; 47: 253-265. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2006.00690.x>

**Сведения об авторах:**

**Тадтаева Зара Григорьевна**, доктор мед. наук, профессор кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии и фармакоэкономики, невролог многопрофильного центра Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, e-mail: tadtavaeva2003@mail.ru

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-5809-1457>

**Яковлева Екатерина Евгеньевна**, канд. мед. наук, клинический фармаколог, ассистент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии и фармакоэкономики Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета; научный сотрудник лаборатории химии и фармакологии лекарственных средств отдела нейрфармакологии им. С.В.Аничкова Института экспериментальной медицины, e-mail: eeiakovleva@mail.ru

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-0270-0217>

**Амелин Александр Витальевич**, доктор мед. наук, профессор кафедры неврологии, Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова, e-mail: avamelin@mail.ru.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-6437-232X>

© Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б., 2021

УДК 616-092

Пальцын А.А.<sup>1,2</sup>, Свиридкина Н.Б.<sup>1</sup>

## Интервальное голодание

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

125315, Москва, Россия, Балтийская ул., д. 8;

<sup>2</sup>ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного последипломного образования»,

123995, Москва, Россия, Баррикадная ул., д. 2/1

Интервальное голодание (intermittent fasting) – метод профилактики и лечения людей с самой распространенной сегодня патологией: избыточной массой тела и ожирением. Особую актуальность проблеме создает тот факт, что некрасивое и осложняющее жизнь ожирение – маркер расстройства метаболизма, предрасполагающего к развитию многих неинфекционных пандемий современного человечества. Интервальное голодание осуществляется ежесуточным полным отказом от еды на срок не менее 12 часов, – соотношении периодов голодания и приема пищи 12 ч : 12 ч. Увеличение периода голодания, например, 18 ч : 6 ч повышает профилактическую и лечебную эффективность интервального голодания.

**Ключевые слова:** ожирение; лечебное голодание; кетоновые тела; кишечная микробиота

**Для цитирования:** Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б. Интервальное голодание. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): -.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04

**Для корреспонденции:** Пальцын Александр Александрович, e-mail: lrrp@mail.ru

**Участие авторов:** концепция и дизайн обзора, написание текста – Пальцын А.А.; сбор и обработка материала, редактирование и обсуждение окончательной версии обзора – Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б.

**Финансирование.** Исследование не имело финансовой поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.05.2021

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021

Paltsyn A.A.<sup>1,2</sup>, Sviridkina N.B.<sup>1</sup>

## Intermittent fasting

<sup>1</sup>Scientific Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8 Baltiyskaya Str., Moscow, 125315, Russian Federation;<sup>2</sup>Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow 125315, Russian Federation

Intermittent fasting is a method for prevention and treatment of the currently most common pathology, overweight and obesity. Of particular relevance is the fact that ugly and life-complicating obesity is a marker of metabolic disorders that predispose people to many noninfectious pandemics. The interval fasting is performed by daily complete refraining from food for at least 12 hours with a 12h:12h ratio of fasting and food consumption periods. Increasing the fasting period, for example to 18h:6h, enhances the preventive and therapeutic efficacy of intermittent fasting.

**Keywords:** obesity; therapeutic fasting; ketone bodies; intestinal microbiota

**For citation:** Paltsyn A.A., Sviridkina N.B. Intermittent fasting. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2021; 65(3): -. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**For correspondens:** Aleksandr A. Paltsyn, Doctor of Biological Sciences, prof. of the Department of General Pathology and Pathophysiology, 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russian Federation; Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: lrrp@mail.ru

**Contribution:** review concept and design, text writing – Paltsyn A.A.; material collection and processing, editing, discussion of the review final version – Paltsyn A.A., Sviridkina N.B.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 14.05.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

Избыток жира в теле - самая распространенная болезнь современного человечества. Так сегодня среди населения США, превышающем 100 миллионов, каждый третий - ожиревший с индексом массы тела (ИМТ) больше 30 кг/м<sup>2</sup> [1]. Ожирение – болезнь неприятная, некрасивая, осложняющая сама по себе физически и эмоционально жизнь, она страшна ещё и тем, что деформируется не только фигура, но образ жизни и гомеостаз. Последнее существенно повышает вероятность развития осложнений, выражающихся такими состояниями и болезнями как метаболический синдром, диабет 2 типа, гипертоническая болезнь, синдром апноэ во сне, остеоартрит, стеатоз печени, тромбофлебит, инсулинорезистентность, рак, сердечно-сосудистые болезни, импотенция, инсульт, депрессия, падения, травмы. В последнее время на мир обрушилась беда резко увеличивающая распространенность главной причины ожирения – гиподинамии, внедряющая гиподинамию даже в такой динамичный слой населения, как школьники. Эта беда - пандемия COVID-19 [2];

Есть первостепенной важности психологический момент, отличающий ожирение от большинства других болезней человека. Факт развития-неразвития болезни в большом числе случаев не просто, но вполне реально, управляется волей пациента.

Для противодействия самой распространенной болезни медицина изобрела и предлагает много методов профилактики и лечения. Генеральное направление профилактики и лечения очевидно: сокращение массы съеданной пищи, коррекция её состава, стимуляция энерготрат. Не тратя время читателя и пространство статьи на описание всех предлагаемых стратегий, описываем, как нам кажется, оптимальную по соотношению сложности выполнения – результат: интервальное голодание (ИГ) (intermittent fasting, intermittent energy restriction). На наш взгляд, во вполне возможном для выполнения и результативном варианте. Он заключается в ежедневном полном воздержании от приема пищи на срок, превышающий половину суток – 12 ч. Причину выбора именно этого срока объясняют тем, что к 12 ч после еды такой источник энергии как гликоген печени оказывается существенно истраченным и дальнейшее поддержание активности тела осуществляется, главным образом, окислением жирных кислот и производством кетонов [3]. Иными словами: 12 ч после приема пищи очень важный сложившийся в эволюции временной параметр нашего метаболизма. Момент, когда для сохранения функции и массы мышц и, конечно, работы мозга, при растратенных к этому времени запасах глюкозы, метаболизм переключается с синтеза липидов/холестерина и накопления жира

на *трату жира* окислением жирных кислот с образованием кетонов. В дальнейших событиях метаболизма кетоны участвуют в цикле трикарбоновых кислот и образовании АТФ. Удачным техническим обстоятельством в сказанном оказывается возможность по концентрации кетонов в крови (легко определяемой даже в домашних условиях) контролировать эффективность лечебно-профилактического процесса. При голодании и физических нагрузках кетоны предпочтительное «топливо» для тела и мозга [4]. Кетогенная диета при миллимолярных (до 3,0 ммоль/л) концентрациях – оптимальный источник энергии при онкологических, нервных, сердечно-сосудистых болезнях, атеросклерозе, метаболическом синдроме, диабете, его микро- и макро васкулярных осложнениях и, конечно, при ожирении [5].

Понятно, что указанные выше 12 ч голодания для переключения обмена с синтеза липидов на их трату – цифра очень неточная, непостоянная даже для отдельного человека, а, тем более, для людей вообще. Переключение метаболизма на мобилизацию триацилглицеридов из адипоцитов и поступление в кровоток свободных жирных кислот происходит между 12 и 36 ч после еды, в зависимости от содержания гликогена в печени и интенсивности энерготрат в этот период. Поэтому к сроку 12 ч в нашей теме следует относиться как к малоэффективному минимуму, рекомендуемому самым слабевольным пациентам. Но в литературе можно увидеть и смешную цифру – 8 ч голодания [3]. Приводим клиническую иллюстрацию [6] значения продолжительности периода голодания. У участников с ожирением, (ИМТ ≥ 30 кг/м<sup>2</sup>) завершивших 8 нед графика ИГ в двух вариантах- 12:12 и 14:10 ч, наблюдались статистически значимые потеря веса и улучшение показателей глюкозы натощак только в группе с продленным голоданием – 14:10 часов.

В 12-недельном рандомизированном клиническом анализе 116 мужчин и женщин с избыточной массой тела и ожирением (ИМТ 27-43 кг/м<sup>2</sup>) в возрасте от 18 до 64 лет определили, что еда *ad libitum* от 0 до 8 ч и голодание в остальные 16 ч статистически значимо снижает вес в среднем на 1,7 кг сравнительно с контролем, питавшимся евшим 3 раза в сутки и не похуdivшем в ходе исследования [7]. Давний, настойчивый исследователь и энтузиаст ИГ- Mattson рекомендует стиль питания 18:6 [8].

Опубликованы интересные суммарные данные 18 наблюдательных клинических исследований американцев с избыточной массой тела без диабета [9]. Автор анализировал особенности снижения веса при постоянном (ежедневно на 15-60%) и периодическом (один день –

еда *adlibitum*, следующий день – полное или частичное голодание) ограничении питания. Для нашей статьи отобранные сроки наблюдения 8-12 нед. Общая потеря веса в сравниваемых группах была практически одинаковой. При постоянном ограничении: 5-8%; при периодическом: 4-8%. Однако, при постоянном ограничении лишь 75% сокращения веса было за счет жира, а при периодическом – 90% потерянного веса составлял жир. Следовательно, полнее сохранялись мышцы.

Выше представленные результаты – это информационно интересные, но по медицинскому (здравоохранительному буквально) значению лишь предварительные данные для создания долговременных, а ещё лучше, пожизненных программ оздоровления питанием. Современные преคลินิกские и клинические данные убеждают в том, что такие программы должны основываться на использовании знаний о прямых и обратных связях в системе мозг-кишечник-микробиом кишечника. Патофизиология ожирения должна разумно представить метаболизм в его эндокринных, нервных и иммунных взаимодействиях.

Пример связи: пища – кишечник – микробиота – иммунная система – почки опубликован большой группой (22 автора) исследователей из Австралии [10]. Продолжительное кормление мышей подвергнутой тепловой обработке пищей нарушало кишечный барьер, повышало выработку проинфламаторных молекул компонента C5a, приводило к развитию нефрита. Введение в корм грубых не обработанных волокон восстанавливало кишечный барьер, снижало концентрацию C5a, избавляло от нефрита

В исследованиях механизмов ИГ следует учитывать действие циркадных ритмов, влияющих на метаболизм, энергетику, многие (если не все) физиологические функции, в том числе, секрецию гормонов, режим сна, координацию движений. Многие в поведении млекопитающего организовано «с учетом» и под влиянием циркадных ритмов, включая активность (перистальтику и секрецию) пищеварительной системы.

Во всех сферах жизни действуют разнообразные механизмы молекулярных часов, которые синхронизируют физиологические процессы с суточными колебаниями состояния окружающей среды. Однако неизвестны механизмы перекрестной регуляции циркадных ритмов прокариот и эукариот в экосистемах со множеством царств, в частности в экосистеме – организм млекопитающего. Кишечная микробиота, как у мышей, так и у людей, демонстрирует суточные колебания уровня активности, определяемые не только сменами дня и ночи, но и, в значительной мере, ритмами и компонентами еды [11]

Она (микробиота) меняется по составу и функции уже в течение суток (для бактерий это может быть сменой нескольких поколений). Изменение часовых поясов, как и ритмов приема еды приводит к аберрантным суточным колебаниям состояния микробиоты и дисбактериозу. Известно, что дисбактериоз, вызванный сменой часовых поясов, как у мышей, так и у людей, способствует непереносимости глюкозы и ожирению. «Шестеренками» механизма такого дисбиоза являются бактерии – дисбиоз передается стерильным мышам трансплантацией фекалий. В совокупности эти результаты свидетельствуют о скоординированной суточной ритмичности метаорганизмов и убеждают в существовании микробиом-зависимого механизма общих метаболических нарушений у людей с аберрантными циркадными ритмами, например у тех, которые работают в непостоянных по времени суток сменах, у часто использующих авиаперелеты пассажирах и, тем более, у членов самолетных экипажей [12].

В современной цивилизованной жизни есть много факторов нарушающих или способствующих нарушению циркадных ритмов: вездесущая легкая доступность пищи в любое время суток, дальние авиаперелеты с пересечением часовых поясов, сменный график работы, превращение большинства населения планеты в городское, для которого характерна большая чем для деревенского «размытость» границ дня и ночи. Эти факторы привели к серьезным нарушениям циркадной ритмичности в отношении приема пищи, способствующим увеличению числа тучных людей. Сама микробиота кишечника претерпевает суточные колебания в составе и функциях, регуляция которых определяется в значительной мере ритмами приемов пищи хозяином. Изменения кишечной микробиоты мышей по составу и функции в зависимости от времени суток и ритма кормления, описаны С.А. Thaiss и соавт. [12]. Они показали, что кишечная микробиота играет важную модулирующую роль в энергетическом гомеостазе. Она существенно влияет на время и величину потребления и расхода энергии. В этих экспериментах было установлено, что микробные функции, связанные с энергетическим метаболизмом, репарацией ДНК и ростом клеток выполняются преимущественно во время темной фазы суток, тогда как в светлой фазе больше выражены детоксикация, подвижность, реакция на изменения окружающей среды. Следовательно, трудно, скорее невозможно, создать программу ИГ, идеально сочетающую «интересы» хозяина и микробиома и не осложненную нарушением циркадных ритмов. Так создание эффективной программы ИГ превращается в выбор меньшего из зол. Это грустное

замечание, по-видимому, справедливо для большинства медицинских программ.

Хотя некоторые из стратегий ИГ показали краткосрочную (до 12 мес) эффективность в снижении массы тела и исправлении метаболических дисфункций, большинство вмешательств оказались в значительной степени неэффективными в долгосрочной перспективе. Многие из изученных диет приводили к существенным краткосрочным снижениям уровня факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, особенно артериального давления, и умеренному снижению веса через 6 мес, но к 12-месячному сроку эффекты в значительной степени исчезали для большинства популярных диетических программ [13]. В тоже время есть сообщения, что если не все, то большинство случаев неэффективности продолжительных программ ИГ и физических нагрузок обусловлены недостатком воли, терпения у участников [14]. Иными словами, людям не удалось добиться четкого результата действия программы вследствие ее неаккуратного выполнения. Решая вопрос использования — неиспользования ИГ следует оценить терапевтический потенциал ИГ и имеющихся альтернатив. Например — кетогенная диета: хороша, но часто неэффективна. Однако, во множестве случаев её недостаточности проблема может быть решена комплексом кетогенной диеты с ИГ. Альтернативой к ИГ или пособием, облегчающим перенесение? терпение многочасовых перерывов в еде представляются, на первый взгляд, препараты, снижающие аппетит. Однако их очевидное несоответствие физиологии питания, обязывает тщательно изучить вопрос перед клиническим применением. Вполне вероятно, что изучение *снимет* вопрос о клиническом применении. Благотворный эффект при избыточной массе тела фекальных трансплантаций от худых доноров проявляется увеличением содержания бутират-продуцирующих бактерий и повышением инсулин-чувствительности [14]. Однако эффект не превышает срока 18 нед [15]. Столь непродолжительный результат можно было уверенно предсказать до эксперимента. Все мы — продукты среды. «Хороших» бактерий пересадили в плохую среду тучных. Они временно улучшили состояние реципиентов, но при сохранении других параметров жизни тучных (например, малоподвижности, **жирсжигающей** диете), бактерии изменились соответственно плохой среде. Для продолжительного, тем более пожизненного, действия полезной микробиоты нужен учет её «интересов», благоприятные для неё вмешательства в диету и образ жизни реципиентов.

Поскольку мы пока не всё знаем о структуре и функциях организма, при назначении программы

снижения веса следует учитывать не только наш и другие медицинские тексты, но и удобство, желание и легкость выполнения программы для исполнителя. Например, согласиться с его выбором между ИГ и периодическим голоданием просто потому, что человеку что-то нравится больше. В этом «нравится» может быть не просто каприз, а глубокий, но неизвестный пока ни больному, ни врачу смысл.

В сложившейся ситуации противоречивого медицинского отношения к ИГ мы сочли честным и разумным заключить статью изложением результатов недавно опубликованного и, на наш взгляд, убедительного, метаанализа [16]. Он проведен по результатам 19 исследований ИГ с достаточно строгим отбором: исключено из анализа по разным причинам 1569 описаний. Исследуемые (общее число 475, мужчин — 219) старше 20 лет с продолжительностью голодания от 12 до 20 ч в сут, сроком наблюдения — 12 нед. Результаты с 95% доверительным интервалом: снижение веса тела, массы жира, кровяного давления, концентрации глюкозы натощак, триглицеридов крови. Важная деталь: вес тела снизился за счет жира, а не мышц.

Предыдущим сообщением мы заканчиваем описание материала, относящегося к лечебному действию ИГ. А в заключении скажем кратко об исследовании, в котором оригинальным приемом выявили актуальность пропаганды знаний об ИГ уже не столько с лечебной, сколько с профилактической целью, как популяризацию культуры пищевого поведения, которое, как все мы знаем, часто со словом «культура» не гармонирует [17]. С помощью программы, установленной в смартфоны исследуемых, авторы получали сведения о времени приема, количестве и составе еды и напитков на всём протяжении суток. Это был просто анализ их привычного поведения без каких-либо медицинских рекомендаций. Мы, по-видимому, не очень удивим читателей сообщив, что большинство наблюдаемых ели часто и беспорядочно в течение всего времени бодрствования. Практически «голодали» только во сне. Для половины выборки продолжительность суточного приема пищи превышала 14,75 ч. Отчетливо проявлялась тенденция усиленного питания во второй половине суток. По авторским оценкам меньше 25% калорий потреблялось до полудня и больше 35% после 18:00. Соответственно современным гедоническим тенденциям общественного питания (главная и даже единственная ценность пищи для производителя: спрос, продаваемость) еда часто была излишне жирной и сладкой. Маловероятно, что больше половины исследуемых именно по выходным дням летали на самолетах со сменой часовых поясов, но имен-

но такова была частота резких изменений пищевого поведения в конце недели («Metabolic jetlag» — назовем его эффектом выходного дня). По завершении анализа из числа наблюдаемых была создана выборка людей с избыточным весом, сменивших на срок 16 нед, прием пищи на протяжении >14 ч, на прием пищи в течение 10-11 ч. В этой выборке через год после эксперимента регистрировали снижение веса, улучшение сна, общего самочувствия.

Непредвзятое рассмотрение источников литературы заставляет заключить, что для того большинства **обладателей носителей?** избыточного веса, и связанных с ним расстройств здоровья, которые не имеют специальных медицинских противопоказаний к сокращению времени приема пищи до 10 и менее часов в сутки, ИГ — путь к улучшению здоровья и фигуры. И поскольку желательная и планируемая продолжительность жизни людей часто измеряется годами, для исполнения желания следует применять ИГ не курсом лечения, а всю жизнь.

### Литература

(п.п. 1; 3-10; 12-18 см. References)

2. Панкова Н.Б. Сезонная вариабельность показателей сердечно-сосудистой системы у учащихся начальной школы с разным индексом массы тела. *Патогенез*. 2021; 19(1): 60-70.
11. Яковлева М.В., Червинец В.М., Червинец Ю.В., Смирнова Л.Е. Микробиота кишечника и полости рта у больных артериальной гипертензией с метаболическим синдромом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(4): 101-5.

### References

1. Frank J., Gupta A., Osadchiv V., Mayer E.A. Brain-Gut-Microbiome Interactions and Intermittent Fasting in Obesity. *Nutrients*. 2021; Feb 10; 13(2): 584.
2. Pankova N.B. Seasonal variability of cardiovascular parameters in elementary schoolchildren with various body mass indexes. *Patogenez*. 2021; 19(1): 60-70. (in Russian)
3. Anton S.D., Moehl K., Donahoo W.T., Marosi K., Lee S.A., et al. Flipping the Metabolic Switch: Understanding and Applying the Health Benefits of Fasting. *Obesity (Silver Spring)*. 2018; Feb; 26(2): 254-68.
4. Puchalska P., Crawford P.A. Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metab*. 2017; 25(2): 262-84.

5. Nasser S., Vialichka V., Biesiekierska M., Balcerczyk A., Pirola L. Effects of ketogenic diet and ketone bodies on the cardiovascular system: Concentration matters. *World J Diabetes*. 2020; Dec 15; 11(12): 584-95.
6. Pamela M. Peeke 1, Frank L. Greenway, Sonja K. Billes, Dachuan Zhang, Ken Fujioka. Effect of time restricted eating on body weight and fasting glucose in participants with obesity: results of a randomized, controlled, virtual clinical trial. *Nutr Diabetes*. 2021; Jan 15; 11(1): 6.
7. Dylan A. Lowe, Nancy Wu, Linnea Rohdin-Bibby, A Holliston Moore, Nisa Kelly, Yong En Liu. Effects of time-restricted eating on weight loss and other metabolic parameters in women and men with overweight and obesity: The TREAT Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*. 2020; Nov 1; 180(11): 1491-9.
8. de Cabo, Rafael; Mattson, Mark P. Effects of intermittent fasting on health, aging, and disease. *New England Journal of Medicine*. 2019; 381(26): 2541-51.
9. Varady K.A. Intermittent versus daily calorie restriction: which diet regimen is more effective for weight loss? *Obes Rev*. 2011; Jul; 12(7): e593-601.
10. Matthew Snelson, Sih Min Tan, Rachel E. Clarke, Cassandra de Pasquale, Vicki Thallas-Bonke, Tuong-Vi Nguyen, et al. Processed foods drive intestinal barrier permeability and microvascular diseases. *Sci Adv*. 2021; Mar 31; 7(14): e4841.
11. Yakovleva M.V., Chervinets V.M., Chervinets Yu.V., Smirnova L.E. Gut and oral cavity microbiota in patients with arterial hypertension with metabolic syndrome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2020; 64(4) 101-5. (in Russian)
12. Thaiss C.A., Zeevi D., Levy M., Zilberman-Schapira G., Suez J., Tengeler A.C., et al. Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell*. 2014; 159: 514-29.
14. Ge L., Sadeghirad B., Ball G.D.C., da Costa B.R., Hitchcock C.L., Svendrovski A., et al. Comparison of dietary macronutrient patterns of 14 popular named dietary programmes for weight and cardiovascular risk factor reduction in adults: Systematic review and network meta-analysis of randomised trials. *BMJ*. 2020; 369: m696.
15. Frank J., Gupta A., Osadchiv V., Mayer E.A. Brain-Gut-Microbiome Interactions and Intermittent Fasting in Obesity. *Nutrients*. 2021; Feb 10; 13(2): 584.
16. Kootte R.S., Levin E., Salojarvi J., Smits L.P., Hartstra A.V., Udayappan S.D., et al. Improvement of Insulin Sensitivity after Lean Donor Feces in Metabolic Syndrome Is Driven by Baseline Intestinal Microbiota Composition. *Cell Metab*. 2017; 26: 611-9.
17. Moon S., Kang J., Kim S.H., Chung H.S., Kim Y.J., Yu J.M., et al. Beneficial Effects of Time-Restricted Eating on Metabolic Diseases: A Systemic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2020; 12: 1267.
18. Gill S., Panda S. Smartphone App Reveals Erratic Diurnal Eating Patterns in Humans that Can Be Modulated for Health Benefits. *Cell Metab*. 2015; 22: 789-98.

### Сведения об авторах:

**Пальцын Александр Александрович**, доктор биол. наук, проф., лауреат Государственной премии СССР, глав. науч. сотр. НИИОПП, проф. каф. общей патологии и патофизиологии РМАНПО, e-mail: lrrp@mail.ru;  
**Свиридкина Надежда Борисовна**, канд. наук, вед. науч. сотр. НИИОПП, e-mail: mag115@list.ru



## МЕТОДИКА

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092.18, 616-092.4, 575.155.

Сазонова М.А.<sup>1,2</sup>, Синёв В.В.<sup>1,2</sup>, Рыжкова А.И.<sup>1</sup>, Сазонова М.Д.<sup>1</sup>, Дорошук Н.А.<sup>2</sup>, Кириченко Т.В.<sup>4</sup>, Орехов А.Н.<sup>1,3,4</sup>, Собенин И.А.<sup>1,2</sup>

# Создание цибридных культур, содержащих мутацию митохондриального генома m.1555A>G (ген MT-RNR1), имеющую протективный эффект при атеросклерозе

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, 121552, Москва, Россия, ул. 3-я Черепковская ул., д.15а;

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, 121609, Московская обл., Сколково, Россия, ул. Новая, д.100;

<sup>4</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», 117418, Москва, Россия, ул. Цюрупы, д. 3

**Введение.** В настоящее время все больший интерес ученых мира вызывают цибридные клеточные модели, которые являются одним из лучших объектов для изучения патологических процессов в организме человека. Например, сотрудниками нашей лаборатории были впервые созданы подобные модели для изучения протективного эффекта некоторых мутаций митохондриального генома, защищающих организм человека от дисфункции митохондрий и атеросклеротических поражений. **Цель:** исследования – создание цибридных культур с высоким уровнем гетероплазии по мутации митохондриального генома m.1555A>G, локализованной в кодирующем регионе митохондриального генома человека в гене MT-RNR1. В наших предварительных исследованиях было установлено, что пороговый уровень гетероплазии мутации m.1555A>G имеет при атеросклерозе протективный эффект.

**Методика.** Цибридные культуры были созданы путем слияния rho0(безмитохондриальных)-клеток и митохондрий из тромбоцитов с высоким уровнем гетероплазии исследуемых мутаций. Для получения безмитохондриальных клеток была использована культура моноцитарного происхождения ТНР-1.

**Результаты.** Получены 4 цибридные клеточные линии, содержащие мутацию m.1555A>G с уровнем гетероплазии выше порогового значения.

**Заключение.** В данной работе были созданы 4 цибридные культуры с высоким уровнем гетероплазии по мутации мтДНК m.1555A>G, имеющей при атеросклерозе протективный эффект. Полученные цибридные клеточные линии могут служить моделями для отработки методов генотерапии у пациентов с атеросклерозом. Кроме того, с помощью данных цибридных клеточных моделей можно будет изучать молекулярно-клеточные механизмы, защищающие клетки от митохондриальной дисфункции.

**Ключевые слова:** цитоплазматические гибриды; митохондриальный геном; цибриды; мутация; m.1555A>G; ген MT-RNR1; мтДНК; цибридная клеточная модель

**Для цитирования:** Сазонова М.А., Синёв В.В., Рыжкова А.И., Сазонова М.Д., Дорошук Н.А., Кириченко Т.В., Орехов А.Н., Собенин И.А. Создание цибридных культур, содержащих мутацию митохондриального генома m.1555A>G (ген MT-RNR1), имеющую протективный эффект при атеросклерозе. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): -. DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**Для корреспонденции:** Сазонова Маргарита Александровна, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Сазонова М.А.; методология – Сазонова М.А.; сбор и обработка материала – Сазонова М.А., Синёв В.В., Рыжкова А.И., Сазонова М.Д., Дорошук Н.А, Кириченко Т.В.; написание текста – Сазонова М.А.; редактирование – Орехов А.Н., Собенин И.А.

**Финансирование.** Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (грант №19-015-00479).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 08.04.2021

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021

Sazonova M.A.<sup>1,2</sup>, Sinyov V.V.<sup>1,2</sup>, Ryzhkova A.I.<sup>1</sup>, Sazonova M.D.<sup>1</sup>, Doroschuk N.A.<sup>2</sup>, Kirichenko T.V.<sup>1,4</sup>, Orekhov A.N.<sup>1,3,4</sup>, Sobenin I.A.<sup>1,2</sup>**Creation of cybrid cultures containing the mitochondrial genome mutation m.1555A>G (MT-RNR1 gene), which has a protective effect in atherosclerosis**<sup>1</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation<sup>2</sup>National Medical Research Center of Cardiology, 3rd Cherepkovskaya St. 15a, Moscow 121552, Russian Federation;<sup>3</sup>Research Institute for Atherosclerosis, Skolkovo Innovative Centre, Novaya St., Moscow Region, Moscow 121609, Russian Federation<sup>4</sup>Institute of Human Morphology, Tsurupa St. 3, Moscow 117418, Russian Federation

**Introduction.** Cybrid cell models are one of the best objects for studying pathological processes in the human body, and they are of increasing interest to scientists worldwide. Our laboratory was the first to create such models for studying the protective effect of mutations in the mitochondrial genome that protect the human body from mitochondrial dysfunction and atherosclerotic lesions. **Aim:** To create cybrid cultures with a high heteroplasmy level for the mitochondrial genome mutation m.1555A>G localized within the coding region of the human mitochondrial genome in the MT-RNR1 gene. Preliminary studies showed that the threshold heteroplasmy level for the m.1555A>G mutation has a protective effect in atherosclerosis.

**Methods.** Cybrid cultures were created by fusion of rho0 (mtDNA-depleted) cells and mitochondria from platelets with a high heteroplasmy level for the studied mutations. To obtain mtDNA-free cells, a culture of monocytic origin, THP-1, was used.

**Results.** We obtained four cybrid cell lines containing the m.1555A>G mutation with a heteroplasmy level above the threshold value.

**Conclusion.** Four cybrid cultures with a high heteroplasmy level for the mtDNA mutation m.1555A>G were created. These cybrid cell lines can serve as models for developing methods of gene therapy for patients with atherosclerosis. In addition, using these cybrid cell models, it will be possible to study molecular and cellular mechanisms that protect cells from mitochondrial dysfunction.

**Keywords:** cytoplasmic hybrids; mitochondrial genome; cybrids; mutation; m.1555A>G; gene MT-RNR1; mtDNA; cybrid cell model

**For citation:** Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Sazonova M.D., Doroschuk N.A., Kirichenko T.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Creation of cybrid cultures containing the mitochondrial genome mutation m.1555A>G (MT-RNR1 gene), which has a protective effect in atherosclerosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(4): -. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**For correspondence:** Sazonova Margarita Alexandrovna, Ph.D., Lead Researcher, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; e-mail: margaritaazonova@gmail.com

**Contribution:** research concept and design — Sazonova M.A.; methodology — Sazonova M.A.; collection and processing of material — Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Sazonova M.D., Doroschuk N.A., Kirichenko T.V.; writing the text — Sazonova M.A.; editing — Orekhov A.N., Sobenin I.A.

**Funding.** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant № 19-015-00479).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Information about authors:**Sazonova M.A., <https://orcid.org/0000-0002-8610-4593>Sinyov V.V., <https://orcid.org/0000-0001-5105-5763>Ryzhkova A.I., <https://orcid.org/0000-0002-8838-7750>Doroschuk N.A., <https://orcid.org/0000-0003-2258-6463>Orekhov A.N., <https://orcid.org/0000-0002-6495-1628>Sobenin I.A., <https://orcid.org/0000-0003-0978-6444>

Received 08.04.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

**Список сокращений:**

мтДНК — митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота

MT-RNR1 — митохондриальный ген рибосомальной рибонуклеиновой кислоты малой субъединицы рибосомы (12S)

ДМСО — диметилсульфоксид

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

## Введение

В настоящее время все больший интерес ученых мира вызывают цибридные клеточные модели, которые являются одним из лучших объектов для изучения патологических процессов в организме человека [1-5]. Однако особенно актуальным представляется создание цибридов с мутациями, имеющими протективный (защитный эффект), т.к. данные клеточные модели могут быть весьма перспективными для отработки методов генотерапии при различных заболеваниях человека.

Например, авторами данной статьи были впервые созданы цибридные клеточные модели для изучения протективного эффекта некоторых мутаций митохондриального генома, защищающих организм человека от дисфункции митохондрий и атеросклеротических поражений. Атеросклероз является тяжелым заболеванием 21 века [6-10]. По сравнению с другими заболеваниями человека для атеросклероза характерен один из самых высоких процентов смертельных исходов [11-15]. Митохондриальная дисфункция может быть одной из причин атеросклеротических поражений человека [16-20]. Она может быть причиной митофагии [21-23], укорочения теломер [13, 24-26], повреждения митохондриальной мембраны [27-29]. Эти процессы могут быть причиной дисфункции митохондрий, ведущей к окислительному стрессу, следствием которого может быть возникновение и развитие атеросклеротических поражений сосудов [30-34].

**Цель работы** — создание цибридных культур с высоким уровнем гетероплазмии по мутации митохондриального генома *m.1555A>G*, локализованной в кодирующем регионе митохондриального генома человека в гене *MT-RNR1*. Результатом данной мутации может быть дисфункция малой субъединицы рибосомы (12S). Это приводит к уменьшению нормально функционирующих рибосом в митохондриях и снижению уровня синтеза белков на митохондриальной рибосоме.

В наших предварительных исследованиях было установлено, что пороговый уровень гетероплазмии мутации *m.1555A>G* имеет при атеросклерозе протективный эффект [35-39]. В результате проведенной работы авторами статьи были созданы четыре цибридные культуры с высоким уровнем гетероплазмии по мутации митохондриального генома *m.1555A>G*.

## Методика

### *Создание безмитохондриальных (rho0) культур*

Для создания rho0-клеток была применена методика, разработанная авторами статьи на базе метода М. Кинга и Г. Аттарди в [40]. Алгоритм создания rho0-кле-

ток был следующим: Клетки нативной культуры ТНР-1 помещали в ростовую среду с добавлением уридина и этидиум бромид. При этом происходило блокирование ДНК клетки этидиум бромидом. В результате ДНК переставала нормально функционировать и возникла митохондриальная дисфункция. После этого данная клеточная линия помещалась в среду, содержащую только уридин (этидиум бромид в ней отсутствовал). В процессе культивирования на этой среде клетки при каждом пересевании постепенно теряли все функционирующие митохондрии. Они становились безмитохондриальными (rho0). После этого анализировалось количество копий митохондриального генома в rho0-культуре. Если количество копий мтДНК в rho0-культуре было значительно меньше, чем в нативной культуре ТНР-1, или они вообще отсутствовали, то устанавливалось, что rho0-культура создана.

В процессе создания безмитохондриальных клеток и цибридов использовались для приготовления ростовой среды такие реактивы: RPMI-1640; пируват натрия (110 мкг/л); эмбриональная бычья сыворотка (10% от общего объема); 100-кратный пенициллин-стрептомицин (пенициллин — 50 ед/мл, стрептомицин — 50 мкг/мл); бета-меркаптоэтанол ( $2 \times 10^{-5}$  М); d-глюкоза (2500 мг/л); L-глутамин (300 мг/л). Для приготовления 10-кратного цитрата натрия были использованы: полиэтиленгликоль 1500 (42% от общего объема); ПЭГ раствор; физиологический раствор (0,15M NaCl); диметилсульфоксид (ДМСО) (2 мл); цитрат натрия ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) тринатриевой соли, дигидрат); DMEM [-Ca<sup>2+</sup>] (9,5 мл). Кроме того, использовались готовые среды и растворы: фиколл-урографин (плотность 1,077); ДМСО, уридин (раствор 50 мг/мл); физиологический раствор DMEM [-Ca<sup>2+</sup>] (0,15M NaCl); бромистый этидий (1% раствор). Комплект реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I использовался для того, чтобы установить количество копий митохондриального генома в нативной, цибридной и rho0 культурах клеток.

**Выделение тромбоцитов из цельной крови.** Настоящее исследование было выполнено в соответствии с Хельсинской декларацией. Все участники исследования дали письменное информированное согласие на участие в данном исследовании.

С помощью слияния безмитохондриальных клеток с тромбоцитами, выступающими в качестве клеток-доноров митохондрий, были получены цибридные клетки. Тромбоциты участников исследования были выделены из цельной крови. Для этого применялся метод центрифугирования в градиенте плотности фиколла-урографина.

**Метод создания цибридных культур клеток.** Основное условие проникновения митохондрий в  $\rho\text{ho}0$ -клетки — образование пор в цитоплазматических мембранах. Поры могут возникнуть при воздействии на  $\rho\text{ho}0$ -клетки определенных физических или химических факторов. Следует отметить, что в литературе отсутствуют сведения о создании цибридных клеточных культур на основе клеточной культуры моноцитарного происхождения ТНР-1. Поэтому авторами статьи данные цибридные культуры были созданы впервые. Нами была использована методика «ПЭГ-слияния». Эта методика позволяет создавать цибриды с помощью слияния  $\rho\text{ho}0$ -клеток с тромбоцитами, использующихся в качестве клеток-доноров митохондрий. В тромбоцитах отсутствует ядерный геном. Они содержат только митохондриальную ДНК. Поэтому использование тромбоцитов в качестве доноров митохондрий (в том числе, митохондриального генома) значительно упрощает протокол получения цибридных линий.

Суспензию с тромбоцитами центрифугировали в течение 15 мин при 1500g при температуре 15 °С. Из пробирки был отобран супернатант.

Суспензию безмитохондриальных клеток центрифугировали в течение 5 мин при 180g при температуре 25 °С. Безмитохондриальные клетки ресуспендировали в среде ДМЕМ [-Ca<sup>2+</sup>] в концентрации 5x10<sup>5</sup> клеток/мл.

Затем  $\rho\text{ho}0$ -клетки добавляли к осадку тромбоцитов. Центрифугировали в течение 10 мин при 180 g при температуре 25 °С. Затем отбирали супернатант. После этого к осадку тромбоцитов с безмитохондриальными клетками было добавлено 100 мкл 42% ПЭГ. Было проведено ресуспендирование. По истечении 1 мин, было проведено повторное ресуспендирование в течение 30 с. После этого было проведено культивирование полученной суспензии клеток в ростовой среде в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С.

#### **Количественный анализ копий митохондриального генома в $\rho\text{ho}0$ -клеточных культурах и цибридах**

В созданных безмитохондриальных и цибридных клеточных культурах был проведен количественный анализ копий митохондриального генома. Согласно результатам данного анализа было подтверждено либо отсутствие митохондрий ( $\rho\text{ho}0$ -клетки), либо их наличие (цибриды). Количество копий мтДНК детектировалось с помощью реал-тайм ПЦР в присутствии красителя SYBR Green I. Контролем служила нативная культура клеток моноцитарного происхождения ТНР-1.

Определение количества копий митохондриального генома проводилось с использованием контрольных синтетических матриц на основе участка митохондри-

альной ДНК в концентрациях 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> и 10<sup>6</sup>. Была построена калибровочная кривая на основе данных Ст-величины матриц. Ее использовали для определения количества копий мтДНК в исследуемых образцах безмитохондриальной, цибридной и нативной культур клеток. Если количество копий митохондриального генома в исследуемой культуре было очень маленьким или мтДНК вообще отсутствовала, в отличие от нативной ТНР-1, то принято было считать, что митохондрии в данной культуре отсутствуют или вскоре, после нескольких пассажей, исчезнут из клеток, вследствие утраты погибшими (из-за этидиум бромид) митохондриями способности к делению. Поэтому полученная культура считалась безмитохондриальной ( $\rho\text{ho}0$ ).

Уровень гетероплазмии мутации *m.1555A>G* в безмитохондриальных клетках оказался чрезвычайно низким. Это было связано с тем, что количество копий митохондриального генома в клетках  $\rho\text{ho}0$  было очень мало по сравнению с данным параметром в нативной культуре ТНР-1. Например, в исследуемом образце общей ДНК (30 нг/мкл) из культуры  $\rho\text{ho}0$  было приблизительно 10<sup>3</sup> копии мтДНК. В то же время образец из нативной культуры ТНР-1 содержал более 10<sup>6</sup> копий митохондриального генома. После получения цибридных культур, содержащих мутацию *m.1555A>G* уровень гетероплазмии этой однонуклеотидной замены в цибридных клетках оказался примерно таким же, как в тромбоцитах доноров-носителей исследуемой мутации.

**Определение уровня гетероплазмии мутации митохондриального генома *m.1555A>G*.** С помощью безмитохондриальных клеточных линий были созданы цибридные клеточные культуры, содержащие высокий уровень гетероплазмии мутации митохондриального генома. Уровень гетероплазмии мутации *m.1555A>G* был определен с помощью оригинального метода количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, разработанного авторами статьи на основе технологии пиросеквенирования [34-36, 41, 42].

Амплификаты ДНК доноров тромбоцитов, содержащие область исследованных мутаций, были пиросеквенированы. Затем в них был определен уровень гетероплазмии мутации *m.1555A>G* на основании формулы, разработанной авторами статьи [34-36, 41, 42].

Использовались следующие праймеры для полимеразной цепной реакции (ПЦР) [34-36, 41, 42]:

R: bio-GTAAGGTGGAGTGGGTTTG  
GG(1704-1684);

F: TAGGTC AAGGTGTAGCCCATGAGGTGGC  
AA(1326-1355).

Для проведения ПЦР использовался стандартный буфер с сульфатом аммония. Концентрация хлорида маг-

ния в буфере была 2,5 мМ. Размер амплификата составлял 379 п.н. [34-36, 41, 42].

В качестве праймера для пиросеквенирования был использован [34-36, 41, 42]: ACGCATTTATATAGAGGA (1537-1554).

### Результаты и обсуждение

Посредством ПЭГ-слияния безмитохондриальных клеток и митохондрий из тромбоцитов пациентов была получена цибридная клеточная культура, содержащая мутацию митохондриального генома m.1555A>G. Пороговый уровень гетероплазмы мутации мтДНК m.1555A>G использовался в качестве критерия для отбора доноров тромбоцитов [34]. Согласно результатам предварительных исследований авторов статьи, мутация митохондриального генома m.1555A>G имеет протективный эффект при атеросклерозе человека. [34-36, 41-45].

Было проведено сравнение количества копий митохондриального генома в полученных цибридных культурах и rho0-культуре ТНР-1. Количество копий мтДНК в цибридной культуре клеток оказалось значительно большим, чем в безмитохондриальной культуре (10<sup>6</sup> копий митохондриального генома, по сравнению с 10<sup>3</sup> копиями мтДНК, соответственно). На основе проведенного анализа был сделан вывод о том, что цибридные культуры, содержащие мутацию мтДНК m.1555A>G, созданы.

Таким образом, в настоящей работе были получены 4 цибридные клеточные культуры, в которых уровень гетероплазмы мутации митохондриального генома m.1555A>G превышал пороговое значение в атеросклеротических бляшках (17,5%) и утолщенном интимо-медиальном слое сонных артерий (19,5%) [34]. В первой цибридной линии уровень гетероплазмы мутации m.1555A>G составил 11%, во второй – 27%, в третьей – 14%, а в четвертой – 23%.

Следует отметить, что одна из цибридных клеточных линий, несущая мутацию митохондриального генома m.1555A>G, была создана с помощью тромбоцитов, полученных от пациента с атеросклеротической бляшкой в сонных артериях, а другая – от участника исследования, не имевшего атеросклеротических бляшек в сонных артериях. При этом, третья цибридная культура была создана с помощью тромбоцитов, полученных от пациента с утолщенным интимо-медиальным слоем сонных артерий, а четвертая – от участника исследования с нормальной интимой меди.

Мутация митохондриального генома m.1555A>G локализована в кодирующем регионе митохондриального генома человека в гене MT-RNR1. В наших пред-

варительных исследованиях было установлено, что пороговый уровень гетероплазмы мутации m.1555A>G имеет при атеросклерозе протективный эффект [35-39].

Полученные цибридные клеточные модели могут быть полезны для отработки методов генотерапии атеросклероза. Кроме того, при сравнении цибридных клеточных линий, имеющих высокий уровень гетероплазмы по одной и той же мутации, можно будет выявить молекулярно-клеточные механизмы митохондриальной дисфункции при атеросклеротических поражениях человека.

### Заключение

Созданы четыре цибридные культуры с высоким уровнем гетероплазмы по мутации митохондриального генома m.1555A>G. Полученные цибридные клеточные модели могут быть полезны для отработки методов генотерапии атеросклероза. Кроме того, при сравнении цибридных клеточных линий, имеющих высокий уровень гетероплазмы по одной и той же мутации, можно будет выявить молекулярно-клеточные механизмы митохондриальной дисфункции при атеросклеротических поражениях человека.

### Литература

(п.п. 1-22; 24-40; 43-45 см. References)

23. Сазонова М.А., Синёв В.В., Карагодин В.П., Рыжкова А.И., Галицына Е.В., Баринаева В.А. и др. Влияние аутофагии на возникновение и развитие атеросклероза и его факторов риска. *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2017; 23(4): 20-2.
41. Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А. Новый метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома. *Пат. физиол. и Экспер. тер.* 2011; (4): 81-4.
42. Сазонова М.А. Ассоциация мутаций митохондриального генома с липофиброзными бляшками интимы аорты человека. *Пат. физиол. и Экспер. тер.* 2015; (1): 17-32.

### References

1. Miranda S., Correia M., Dias A.G., Pestana A., Soares P., Nunes J., et al. Evaluation of the role of mitochondria in the non-targeted effects of ionizing radiation using cybrid cellular models. *Sci Rep*. 2020; Apr 9; 10(1): 6131. doi: 10.1038/s41598-020-63011-w
2. Hu S.Y., Zhuang Q.Q., Qiu Y., Zhu X.F., Yan Q.F. Cell models and drug discovery for mitochondrial diseases. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2019; May; 20(5): 449-56. doi: 10.1631/jzus.B1900196
3. Aryaman J., Johnston I.G., Jones N.S. Mitochondrial DNA density homeostasis accounts for a threshold effect in a cybrid model of a human mitochondrial disease. *Biochem J*. 2017; Nov 24; 474(23): 4019-34. doi: 10.1042/BCJ20170651
4. Dolinko A.H., Chwa M., Atilano S.R., Kenney M.C. African and Asian Mitochondrial DNA Haplogroups Confer Resistance Against Diabetic Stresses on Retinal Pigment Epithelial Cybrid Cells In Vitro. *Mol Neurobiol*. 2020; Mar; 57(3): 1636-55. doi: 10.1007/s12035-019-01834-z

5. Wilkins H.M., Carl S.M., Swerdlow R.H. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondrialopathies. *Redox Biol.* 2014; 2: 619-31. doi: 10.1016/j.redox.2014.03.006. Review
6. Zhu Y., Xian X., Wang Z., Bi Y., Chen Q., Han X., et al. Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. *Biomolecules.* 2018; Aug 23; 8(3): 80. doi: 10.3390/biom8030080
7. Poznyak A., Grechko A.V., Poggio P., Myasoedova V.A., Alfieri V., Orekhov A.N. The Diabetes Mellitus-Atherosclerosis Connection: The Role of Lipid and Glucose Metabolism and Chronic Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2020; Mar 6; 21(5): 1835. doi: 10.3390/ijms21051835.
8. van Capelleveen J.C., Bochem A.E., Boekholdt S.M., Mora S., Hoogeveen R.C., Ballantyne C.M., et al. Association of High-Density Lipoprotein-Cholesterol Versus Apolipoprotein A-I With Risk of Coronary Heart Disease: The European Prospective Investigation Into Cancer-Norfolk Prospective Population Study, the Atherosclerosis Risk in Communities Study, and the Women's Health Study. *J Am Heart Assoc.* 2017; Aug. 3; 6(8), pii: e006636. doi: 10.1161/JAHA.117.006636
9. Pedro-Botet J., Climent E., Benaiges D. Atherosclerosis and inflammation. New therapeutic approaches. *Med Clin (Barc).* 2020; Sep 25; 155(6): 256-62. doi: 10.1016/j.medcli.2020.04.024
10. Halcox J.P., Banegas J.R., Roy C., Dallongeville J., De Backer G., Guallar E., et al. Prevalence and treatment of atherogenic dyslipidemia in the primary prevention of cardiovascular disease in Europe: EURIKA, a cross-sectional observational study. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2017; Jun. 17; 17(1), p.160. doi: 10.1186/s12872-017-0591-5
11. Sazonova M.A.; Sinyov V.V.; Ryzhkova A.I.; Sazonova, M.D.; Kirichenko T.V.; Khotina V.A.; et al. Some Molecular and Cellular Stress Mechanisms Associated with Neurodegenerative Diseases and Atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* 2021; 22, 699. <https://doi.org/10.3390/ijms2202069>
12. Kubota Y., Heiss G., MacLehose R.F., Roetker N.S., Folsom A.R. Association of Educational Attainment With Lifetime Risk of Cardiovascular Disease: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *JAMA Intern. Med.* 2017; Aug. 1; 177(8): 1165-72. doi: 10.1001/jamainternmed.2017.1877
13. Natalya A. Doroschuk, Anton Yu Postnov, Alexander D. Doroschuk, Anastasia I. Ryzhkova, Vasily V. Sinyov, et al. An original biomarker for the risk of developing cardiovascular diseases and their complications: Telomere length. *Toxicology Reports* 8. 2021; 499–504.
14. Kalbaugh C.A., Kucharska-Newton A., Wruck L., Lund J.L., Selvin E., Matsushita K., et al. Peripheral Artery Disease Prevalence and Incidence Estimated From Both Outpatient and Inpatient Settings Among Medicare Fee-for-Service Beneficiaries in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *J Am Heart Assoc.* 2017; May 3;6(5), pii: e003796. doi: 10.1161/JAHA.116.003796
15. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova, A.I., Galitsyna, E.V., Khasanova Z.B., Postnov A.Yu., et al. Role of Mitochondrial Genome Mutations in Pathogenesis of Carotid Atherosclerosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017; 2017: 6934394, 7 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/6934394>
16. Sorrentino V., Menzies K.J., Auwerx J. Repairing Mitochondrial Dysfunction in Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2018; Jan 6; 58: 353-89. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104908
17. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Sazonova M.D., Khasanova Z.B., Sobenin I.A. MtDNA mutations linked with left ventricular hypertrophy. *Vessel Plus.* 2019; 3:5 doi: 10.20517/2574-1209.2018.56
18. West A.P. Mitochondrial dysfunction as a trigger of innate immune responses and inflammation. *Toxicology.* 2017; Nov 1; 391: 54-63. doi: 10.1016/j.tox.2017.07.016
19. Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Sinyov V.V., Sazonova M.D., Nikitina N.A., Shkurat T.P., . Mitochondrial mutations associated with cardiac angina. *Vessel Plus.* 2019; 3: 8. doi: 10.20517/2574-1209.2019.01
20. Wang L., Wu Q., Fan Z., Xie R., Wang Z., Lu Y. Platelet mitochondrial dysfunction and the correlation with human diseases. *Biochem Soc Trans.* 2017; Dec 15; 45(6): 1213-23. doi: 10.1042/BST20170291
21. Malpartida A.B., Williamson M., Narendra D.P., Wade-Martins R., Ryan B.J. Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy in Parkinson's Disease: From Mechanism to Therapy. *Trends Biochem Sci.* 2021; Apr; 46(4): 329-43. doi: 10.1016/j.tibs.2020.11.007
22. Chistiakov D.A., Shkurat T.P., Melnichenko A.A., Grechko A.V., Orekhov A.N. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review. *Ann Med.* 2018; Mar; 50(2): 121-7. doi: 10.1080/07853890.2017.1417631
23. Sazonova M.A., Sinev V.V., Karagodin V.P., Ryzhkova A.I., Galitsyna E.V., Barinova V.A., et al. Influence of autophagy on the genesis and development of atherosclerosis and its risk factors. *Angiol. Sosud. Khir.* 2017; 23(4): 20-8. English, Russian.
24. Wu N.N., Zhang Y., Ren J. Mitophagy, Mitochondrial Dynamics, and Homeostasis in Cardiovascular Aging. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; Nov 4;2019:9825061. doi: 10.1155/2019/9825061
25. Shin W.H., Chung K.C. Human telomerase reverse transcriptase positively regulates mitophagy by inhibiting the processing and cytoplasmic release of mitochondrial PINK1. *Cell Death Dis.* 2020; Jun 8; 11(6): 425. doi: 10.1038/s41419-020-2641-7
26. Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Sinyov V.V., Sazonova M.D., Kirichenko T.V., Doroschuk N.A., et al. Mutations of mtDNA in some vascular and metabolic diseases. *Curr Pharm Des.* 2020; Aug 20. 26:1-10. doi: 10.2174/1381612826999200820162154
27. Tagaya M., Arasaki K. Regulation of Mitochondrial Dynamics and Autophagy by the Mitochondria-Associated Membrane. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 997: 33-47. doi: 10.1007/978-981-10-4567-7\_3
28. Wei Y., Chiang W.C., Sumpter R. Jr., Mishra P., Levine B. Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. *Cell.* 2017; Jan 12; 168(1-2): 224-38.e10. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.042
29. Kirichenko T.V., Ryzhkova A.I., Sinyov V.V., Sazonova M.D., Orekhova V.A., Karagodin V.P., et al. Impact of mitochondrial DNA mutations of carotid intima-media thickness in the Novosibirsk region. *Life (Basel).* 2020; 10(9): 160. doi: 10.3390/life10090160
30. Peng W., Cai G., Xia Y., Chen J., Wu P., Wang Z., et al. Mitochondrial Dysfunction in Atherosclerosis. *DNA Cell Biol.* 2019 Jul; 38(7): 597-606. doi: 10.1089/dna.2018.4552
31. McCully K.S. Environmental Pollution, Oxidative Stress and Thioretinaco Ozonide: Effects of Glyphosate, Fluoride and Electromagnetic Fields on Mitochondrial Dysfunction in Carcinogenesis, Atherogenesis and Aging. *Ann Clin Lab Sci.* 2020; May; 50(3): 408-11.
32. Dubois-Deruy E., Peugnet V., Turkieh A., Pinet F. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants (Basel).* 2020; Sep 14; 9(9): 864. doi: 10.3390/antiox9090864
33. Kirichenko T.V., Ragino Y.I., Voevoda M.I., Urazalina S.J., Khasanova Z.B., Orekhova V.A., Sinyov V.V., Sazonova M.A., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Data on association of mitochondrial heteroplasmy with carotid intima-media thickness in subjects from Russian and Kazakh populations. *Data Brief.* 2020; Jan 14; 29: 105136. doi: 10.1016/j.dib.2020.105136. eCollection 2020 Apr

34. Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Sinyov V.V., Galitsyna E.V., Orekhova V.A., Melnichenko A.A., et al. New markers of atherosclerosis: a threshold level of heteroplasmy in mtDNA mutations. *Vessel Plus*. 2017; 1:182-91. doi: 10.20517/2574-1209.2017.16
35. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Barinova V.A., Ryzhkova A.I., Zhelankin A.V., Postnov A.Y., et al. Mosaicism of Mitochondrial Genetic Variation in Atherosclerotic Lesions of the Human Aorta. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:825468. doi:10.1155/2015/825468
36. Sazonova M., Budnikov E., Khasanova Z., Sobenin I., Postnov A., Orekhov A. Studies of the human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome. *Atherosclerosis*. 2009; 204(1): 184-90. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.001
37. Sazonova M.A., Sobenin I.A., Orekhov A.N., Budnikov Ye.Yu., Khasanova Z.B., Postnov A.Yu. Corrigendum to “studies of the human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome” [atherosclerosis 204 (2009) 184-190] (doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.001) *Atherosclerosis*. 2010. 209(1):306.
38. Postnov A.Y., Sazonova M.A., Budnikov Y.Y., Khasanova Z.B., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Association of somatic mitochondrial mutations with atherosclerosis. *Atherosclerosis Suppl*. 2007; 8(1):46. doi: [https://doi.org/10.1016/S1567-5688\(07\)71126-1](https://doi.org/10.1016/S1567-5688(07)71126-1).
39. Sazonova M., Andrianova I., Khasanova Z., Sobenin I., Postnov A. Quantitative mitochondrial genome mutation investigation and possible role of the somatic mutations in development of atherosclerotic lesion of human aorta. *Atherosclerosis Suppl*. 2008; 9(1): 113. doi: [https://doi.org/10.1016/S1567-5688\(08\)70454-9](https://doi.org/10.1016/S1567-5688(08)70454-9)
40. King M.P., Attardi G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol*. 1996; 264, 304–13. doi:10.1016/S0076-6879(96)64029-4
41. Sazonova M.A., Postnov A.Iu., Orekhov A.N., Sobenin I.A. A new method of quantitative estimation of mutant allele in mitochondrial genome. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2011; (4): 81-4. (in Russian). PMID: 22359940
42. Sazonova M.A. Association of mitochondrial genome mutations with lipofibrous plaques in human aortic intima. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2015; 59(1): 17-28. PMID: 26226685
43. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I.; Sazonova M.D., Kirichenko T.V., Khotina V.A., et al. Some Molecular and Cellular Stress Mechanisms Associated with Neurodegenerative Diseases and Atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2021; 22, 699. <https://doi.org/10.3390/ijms2202069>
44. Poznyak A.V., Bharadwaj D., Prasad G., Grechko A.V., Sazonova M.A., Orekhov A.N. Anti-Inflammatory Therapy for Atherosclerosis: Focusing on Cytokines. *Int J Mol Sci*. 2021; Jun 30; 22(13): 7061. doi: 10.3390/ijms22137061
45. Poznyak A.V., Bharadwaj D., Prasad G., Grechko A.V., Sazonova M.A., Orekhov A.N. Renin-Angiotensin System in Pathogenesis of Atherosclerosis and Treatment of CVD. *Int J Mol Sci*. 2021; Jun 22; 22(13): 6702. doi: 10.3390/ijms22136702

#### Сведения об авторах:

**Сазонова Маргарита Александровна**, канд. биол. наук вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, ст. науч. сотр. лаб. медицинской генетики ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com;

**Синёв Василий Владимирович**, мл. науч. сотр. лаб. медицинской генетики ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; ст. лаборант с в/о лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП;

**Рыжкова Анастасия Игоревна**, мл. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП;

**Сазонова Марина Дмитриевна**, ст. лаборант с в/о лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП;

**Дорожук Наталья Александровна**, науч. сотр. лаб. медицинской генетики ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; мл. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, канд. мед. наук;

**Кириченко Татьяна Валерьевна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы сотр. ФГБНУ «НИИ морфологии человека»;

**Орехов Александр Николаевич**, доктор биол. наук, зав. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП; вед. науч. сотр. лаб. клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы ФГБНУ «НИИ морфологии человека», директор «НИИ атеросклероза» Инновационного центра Сколково;

**Собенин Игорь Александрович**, доктор мед. наук, зав. лаб. медицинской генетики ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России и вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП.

© Коллектив авторов, 2021

УДК 618.1:612.661:57.08

Чеботарева Ю.Ю.<sup>1</sup>, Овсянников В.Г.<sup>1</sup>, Родина М.А.<sup>2</sup>, Подгорный И.В.<sup>1</sup>, Хутиева М.Я.<sup>3</sup>

## Современные аспекты биологического моделирования нарушений полового развития

<sup>1</sup>ФГБУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, 344022, Ростов-на-Дону, Россия, пер. Нахичеванский, д. 29;

<sup>2</sup>МБУЗ КДЦ «Здоровье», 344011, Ростов-на-Дону, Россия, пер. Доломановский, д. 70/3;

<sup>3</sup>ФГБУ ВО «Ингушский государственный университет», 366700, Республика Ингушетия, Магас, Россия, просп. И.Б. Зязикова, д. 7

**Введение.** Изучение механизмов развития репродуктивных нарушений в условиях эксперимента на крысах является одним из важных направлений современной патофизиологии. Крыса имеет функционирующий эстральный цикл, трехнедельную гестацию и гемохориальный тип плацентации. На циклических изменениях в яичниках и эпителии влагалища крысы базируется биологическое моделирование эндокринной гинекологической патологии. В настоящее время интерес представляет разработка экспериментальной модели нарушения полового созревания в периоде детства. Нарушение полового созревания может приводить к различным патологическим изменениям в сфере репродуктивного здоровья в будущем, актуальность данной проблемы очевидна. **Цель** работы – изучение современных аспектов моделирования преждевременного полового созревания у девочек.

**Методика.** Анализ современных отечественных и зарубежных работ, касающихся механизмов преждевременного полового созревания и экспериментальных исследований в области моделирования данной патологии в экспериментах на крысах.

**Результаты.** Преждевременное половое созревание у девочек – нарушение, проявляющееся развитием одного или комплекса признаков половой зрелости до 7 летнего возраста. Детерминация полового развития связана с особенностью генетических и эпигенетических факторов. К последним традиционно относят характер питания, стресс как адаптационную реакцию, интегрированную с активацией гормонотипа. Фактор питания связан с функционированием гормонов жировой ткани, включая лептин, грелин, эффектами инсулиноподобного фактора роста. В ряде экспериментальных исследований, связанных с воздействием факторов питания, стресса и световой дезадаптации на репродуктивную систему животного, доказано значимое влияние последней на нейромедиаторные системы мозга. Наименее изученными в механизме преждевременного полового созревания остаются вопросы нейроэндокринной регуляции гонадной оси системой *KISS/KISS1R*. Продолжение изучения ассоциации изменения профиля нейромедиаторов моноаминового ряда и динамики кислоспептина в эксперименте на крысах способно расширить представление о механизмах половой дифференцировки мозга и транслировать полученные данные в клиническую практику, связанную с обследованием девочек с преждевременным половым созреванием.

**Заключение.** В связи с малой распространенностью и ограниченностью представлений о патогенезе преждевременного полового созревания, данная проблема требует детального изучения. Необходимо дальнейшее изучение патогенетических основ данной патологии в условиях биологического моделирования на самках крыс раннего возраста.

**Ключевые слова:** преждевременное половое созревание; девочки; экспериментальная модель; крысы

**Для цитирования:** Чеботарева Ю.Ю., Овсянников В.Г., Родина М.А., Подгорный И.В., Хутиева М.Я. Современные аспекты биологического моделирования нарушений полового развития. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): –.

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**Для корреспонденции:** Чеботарева Юлия Юрьевна, e-mail: chebotarevajulia@inbox.ru

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Чеботарева Ю.Ю., Овсянников В.Г.; сбор и обработка материала – Подгорный И.В., Родина М.А., Хутиева М.Я.; написание текста – Чеботарева Ю.Ю., Родина М.А., Хутиева М.Я.; редактирование – Овсянников В.Г.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта

Поступила 11.12.2020

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021



Chebotaryova Yu.Yu.<sup>1</sup>, Ovsyannikov V.G.<sup>1</sup>, Rodina M.A.<sup>2</sup>, Podgorny I.V.<sup>1</sup>, Hutieva M.Ya.<sup>3</sup>**Modern aspects of biological modeling of sexual development disorders**

Rostov State Medical University, Pereulok Nakhichevskiy 29, Rostov-on-Don 344022, Russian Federation;  
Clinical and Diagnostic Center «Health», Pereulok Dolomanovskiy 70/3, Rostov-on-Don 344011, Russian Federation;  
Ingush State University, 7 Prospekt I.B. Zyazikova 7, Magas 366700, Republic of Ingushetia, Russian Federation

**Introduction.** Studying pathogenetic mechanisms responsible for development of reproductive disorders in rat models is an important direction of modern pathophysiology. The rat has a functioning estrous cycle, a three-week gestation, and a hemocho-rial placentation. Biological modeling of endocrine gynecological pathology is based on cyclic changes in the ovaries and in the epithelium of the rat vagina. Currently, the development of an experimental model of puberty disorders in childhood is of interest. Premature puberty can lead to various pathological changes in future reproductive health. The relevance of this problem is obvious. **The aim** of this work was to study modern aspects of modeling premature puberty in girls.

**Method.** Modern domestic and foreign reviews on the mechanism of premature puberty and experimental studies of modeling this pathology in experiments on rats were analyzed.

**Results.** Premature puberty in girls is a disorder manifested by the development of one or all signs of puberty as early as before the age of 7 yrs. Sexual development is associated with characteristic roles of genetic and epigenetic factors. The latter traditionally include nutrition and stress as an adaptive reaction integrated with the activation of hormone synthesis. The nutrition factor is related with the functioning of adipose tissue hormones, including leptin, ghrelin, and the effects of insulin-like growth factor. A number of experimental studies on rats addressing effects of nutrition, stress, and light maladaptation on the reproductive system have demonstrated its significant effect on brain neurotransmitter systems. Regarding the mechanism of premature puberty, the least studied issue is the neuroendocrine regulation of the gonadal axis by the *KISS/KISS1R* system. Continuing study of the association between changes in the profile of monoamine neurotransmitters and the dynamics of kisspeptin in experiments on rats can expand understanding of sexual differentiation mechanisms in the brain. The obtained data can be translated into clinical practice for the management of premature puberty in girls.

**Conclusion.** Due to the rare prevalence of premature puberty and insufficient data on its pathogenesis, this problem requires detailed study. It is necessary to further study the mechanism of this pathology by biological modeling on female rats at an early age.

**Keywords:** premature puberty; girls; experimental model; rats

**For citation:** Chebotaryova Yu.Yu., Ovsyannikov V.G., Rodina M.A., Podgorny I.V., Hutieva M.Ya. Modern aspects of biological modeling of sexual development disorders. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(4): -. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.

**For correspondence:** *Yulia Yu. Chebotaryova*, MD, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Obstetrics and Gynecology No. 2, Head of the problematic scientific laboratory «Comprehensive Study of reproductive Disorders in girls and adolescent girls» Rostov State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 344058, Rostov-on-Don, 116, Plekhanova, e-mail: chebotarevajulia@inbox.ru

**Contribution:** concept and design of the study – Chebotaryova Yu.Yu., Ovsyannikov V.G.; collection and processing of the material – Podgorny I.V., Rodina M.A., Hutieva M.Ya.; writing of the text – Chebotaryova Yu.Yu., Rodina M.A., Hutieva M.Ya.; editing – Ovsyannikov V.G.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 20.11.2020

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

## Введение

Изучение механизмов развития репродуктивных нарушений в условиях эксперимента на крысах является одним из важных направлений современной патофизиологии [1]. На циклических изменениях в яичниках и эпителии влагалища крысы базируется биологическое моделирование эндокринной гинекологической патологии. В настоящее время интерес представляет разработка экспериментальной модели нарушения полового созревания в периоде детства. Нарушение по-

лового созревания может приводить к различным патологическим изменениям в сфере репродуктивного здоровья в будущем, актуальность данной проблемы очевидна.

**Цель работы** – изучение современных аспектов моделирования преждевременного полового созревания у девочек.

## Методика

Анализ современных отечественных и зарубежных обзоров по теме механизма преждевременного поло-

вого созревания и экспериментальных исследований в области моделирования данной патологии в экспериментах на крысах.

### Результаты исследования

Крыса, по аналогии с женской репродуктивной системой, имеет эстральный цикл, трехнедельную гестацию и гемохориальный тип плацентации [2], что дает возможность моделировать репродуктивные и гестационные заболевания в динамике ультракороткого времени экспериментального наблюдения и экстраполировать полученные данные в область изучения механизмов различных репродуктивных нарушений у человека [3-5].

Персонализированный подход в экспериментах на самках крыс учитывает этапы онтогенеза, включая периоды новорожденности, ювенильный, репродуктивный (половозрелый) — старше 5 мес и, предстарческий — более 19 мес [6]. Все это позволяет изучать механизмы формирования различных репродуктивных заболеваний с учетом возрастных особенностей. Однако для изучения ранних репродуктивных нарушений, включая преждевременное половое развитие, необходимо четко знать референсные границы периода детства у при моделировании на крысах. С учетом данных О.А. Гелашвили, возраст крысы 10 сут соответствует возрасту ребенка 17 мес (1 год и 5 мес), а 60 сут — 104 мес (7–8 лет) [7].

Следует отметить, что половозрелой считают крысу потенциально способную принести потомство. Такая крыса имеет пятидневный эстральный цикл, состоящий из 4 фаз, включая диэструс, метэструс, проэструс, эструс. Наличие эстрального цикла крысы подтверждает характерная цитологическая картина влагилищного мазка, связанная с гормонопозом в яичниках. Преовуляторные фолликулы, окруженные множественными слоями гранулезного (фолликулярного) эпителия отчетливо видны у нерожавшей крысы, достигшей половой зрелости [1, 8]. Крыса в возрасте свыше 18 нед и массой более 250 г имеет не связанный с сезонными колебаниями и копуляцией регулярный половой цикл с множественной беременностью [1, 9]. У половозрелой крысы, в независимости от копуляции, отмечается спонтанная овуляция, после которой в яичниках развиваются желтые тела разного размера и возраста [9]. На циклических изменениях в яичниках и, соответственно, во влагилищном эпителии крысы базируется биологическое моделирование эндокринной гинекологической патологии. Нами разработаны биологические модели таких репродуктивных заболеваний как синдром поликистозных яичников, синдром хронической

ановуляции, которые объясняли патогенез различных вариантов олигоменореи у подростков [10, 11]. В настоящее время интерес представляет разработка экспериментальной модели ранних репродуктивных нарушений, включая преждевременное половое развитие.

Половое развитие — совокупность физиологических процессов в организме ребенка, приводящих к полной соматической, психологической и половой зрелости. Критериями вступления в стадию полового созревания у девочек являются рост молочных желез (телархе), вторичное оволосение (адренархе) и появление менархе. При этом телархе и менархе являются результатом стероидогенеза в яичниках, в то время как вторичное оволосение обусловлено андрогенной активностью надпочечников. Динамику изменений вторичных половых признаков общепринято оценивать по градациям Tanner J. (1962 г), при этом допустимым значениям соответствует стадия I, которая характеризуется отсутствием вторичных половых признаков, II–III стадии — непосредственно период полового созревания и IV–V стадии расцениваются как зрелое состояние [12].

Преждевременное половое созревание (ППС) у девочек — нарушение развития девочки, проявляющееся одним или всеми признаками половой зрелости в возрасте до 7 лет: ускорение линейного роста (150–155 см в 8–10 лет), опережение костного возраста более чем на 2 года [13]. Авторы выделяют гонадотропин-зависимую (истинную или центральную) форму ППС, обусловленную активацией гипоталамо-гипофизарной системы и гонадотропин-независимую (ложную или периферическую) форму, связанную с избыточной секрецией половых гормонов яичниками или надпочечниками [13–16,]. ППС центрального генеза это орфанное заболевание, выявляется с частотой 1 случай на 5–10 тыс детей и возникает в результате преждевременной активизации гонадотропной оси [13, 14]. Отмечено, что заболевание чаще является идиопатическим и может иметь последствия для роста и психосоциального развития [14]. Однако встречаются «ложные» формы ППС, при которых имеются новообразования в яичниках или надпочечниках [15]. Выделяют также неполное ППС, которое проявляется изолированными признаками вторичного оволосения (преждевременное пубархе), увеличения молочных желез (преждевременное телархе) и преждевременного менархе [16]. Изолированное телархе относят к распространенным нарушениям у девочек дошкольного возраста [17, 18]. Установлены 2 патогенетически различные формы преждевременного телархе: I вариант проявляется до 3 лет на фоне эстрогенного влияния, II вари-

ант — в возрасте от 4 до 6 лет на фоне повышенной секреции кортизола и пролактина [18].

Известно, что запуск полового развития является мультифакторным процессом с определенной ролью генетических и эпигенетических факторов [19]. К последним традиционно относят характер питания, стресс как адаптационную реакцию, интегрированную с активацией гомонопеэза. Метилонное профилирование девочек с ППС выявило гиперметилование ДНК, что указывает на то, что пубертатный процесс связан со специфическими изменениями в эпигенетически обусловленном регуляторном контроле [20]. Авторы считают, что изменения в метилировании нескольких генов *ZNF*, представляют собой отчетливую эпигенетическую модификацию, лежащую в основе инициации полового созревания человека.

А. Gradone и соавт. изучили мутации белка MKRN3 при случаях семейного ППС [21]. Уровни MKRN3 были ниже у пациентов с ППС по сравнению с препубертатным возрастом и сопоставимы с таковыми для пубертатной стадии. Авторы выявили, что девочки с центральным ППС имели более низкие периферические уровни MKRN3, которые отрицательно коррелировали с гонадотропинами, эстрогенами и индексом массы тела (ИМТ) [21]. Полученные результаты подтверждают участие MKRN3 в центральном ППС и отсутствие вредных мутаций. Кроме того, эти данные указывают на роль MKRN3 в сложном механизме, контролирующем начало полового созревания, и его взаимодействие с другими факторами, влияющими на половое созревание, такими как питание.

Фактор питания связан с функционированием гормонов жировой ткани, таких как лептин, грелин, эффектами инсулиноподобного фактора роста (ИПФР1). J. Tencer и соавт. провели сравнение концентрации сывороточного ингибина В, антимюллерова гормона (АМГ) и лептина у девочек с идиопатическим центральным ППС и оценили способность каждого из этих гормонов прогнозировать возраст менархе [22]. Исследователи установили, что концентрация ингибина В положительно коррелировала с возрастом дебюта полового созревания, концентрация АМГ положительно коррелировала с сывороточным эстрадиолом и отрицательно — с базальной концентрацией ФСГ. Концентрация лептина показала значительную положительную корреляцию с менархе, ИМТ и отрицательную корреляцию с пиком ФСГ. Авторы разработали формулы, основанные на концентрациях сывороточного ингибина В и соотношении пиков ЛГ/ФСГ, отдельно или в комбинации, для прогнозирования возраста менархе и определении показаний к ле-

чению при ППС [22]. При недостаточности массы тела запуск пубертата не происходит. Менархе связано с достижением массы тела  $45,5 \pm 1,6$  кг [13, 23]. Однако, лептин воздействует на гипоталамус опосредованно через нейропептид кисспептин, который является положительным модулятором кисспептиновой системы [23].

Полагают, что половые стероиды активируют секрецию гонадотропин-релизинг гормонов гипоталамуса (ГнРГ) путем прямого и косвенного воздействия [24]. Посредниками в данных процессах являются нейромедиаторы, такие как адреналин, норадреналин, дофамин, кисспептин и другие. Лиганд-рецепторная система кисспептина включает ген *KISS1*, локализованный на 1q32, его продукты — кисспептины и рецептор GPR54 [23]. Установлено, что взаимодействие кисспептина с рецептором сопровождается активацией G-протеинов и увеличением уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$  с последующей внутриядерной активацией синтеза ГнРГ и ингибированием пролиферации клеток [23]. Идиопатическое центральное ППС связывают с мутацией и полиморфизмом *GPR54* и *KISS1*, что приводит к устойчивой стимуляции секреции ГнРГ прямым влиянием на ГнРГ-содержащие нейроны, большинство из которых экспрессирует рецептор KISS1R. Нейроны, которые экспрессируют *KISS1* mRNA, находятся в AVPV и ARC ядрах гипоталамуса. KISS1-нейроны в ARC участвуют в негативной обратной связи, а в AVPV — в положительной обратной связи регуляции ГнРГ/ЛГ половыми стероидами. Кисспептины выполняют роль транмиттеров в передаче сигналов от половых стероидов (эстрогенов, андрогенов), а также осуществляют посреднические функции между лептином и ГнРГ-секретирующими центрами гипоталамуса, таким образом осуществляя процессы «прямой/обратной связи» в пределах гонадной оси и сигнализируя об энергетическом балансе в названные центры [25].

В аркуатном ядре гипоталамуса также богато представлена и вторая группа посредников ГнРГ-сети. Речь идет о нейронах с проопиомеланокортином (proopiomelanocortin — POMC), которые в зависимости от обстоятельств могут распадаться до бета-эндорфина, адренкортикотропного гормона или меланоцитстимулирующего гормона (альфа-МСГ). Если KISS1-нейроны смыкают вокруг ГнРГ-сети сигналы пищеварения и гонад, то POMC-клетки работают с ней на стыке питания и стресса. Эндорфины (эндогенные опиаты) смягчают боль, улучшают настроение, но при этом подавляют ГнРГ. Адренкортикотропный гормон управляет надпочечниками, предрасполагая к подъему уровня кортизола, альфа-МСГ, напротив,

прямо стимулирует работу ГнРГ [25]. Чувствительные к лептину, инсулину и нейропептиду Y POMC-нейроны — хорошие кандидаты для передачи пищевых сигналов ГнРГ-нейронам. И действительно, подобно KISS1-нейронам, POMC-нейроны распространяют свои окончания к ГнРГ, образуя с ней синаптические контакты. Возможность POMC-нейронов расщепляться на 3 разнонаправленных продукта является ярким примером гибкой контекстуальной регуляции ГнРГ-сети, а через нее и всей половой системы [25].

Популяция KISS1ергических нейронов воспринимает сигналы всех типов и является, по-видимому, основным стимулятором ГнРГ-сети. Огромную роль играют сигналы голода и насыщения, передаваемые ради гибкости управления несколькими аналитическими узлами гипоталамуса [26].

Гонадотропин-зависимое ППС в подавляющем числе случаев является идиопатическим, вызванным мутацией в генах, включающих *GNRH1*, *GNRHR*, *GNR54*, *FGFR1*, *FGF8*, *PROKR2*, *PROK2*, *TAC3*, *TACR3*, *KAL1*, *CHD7*, *LEP*, *LEPR*, *PC1*, *DAX1*, *SF-1*, *HESX-1*, *LHX3*, *PROP-1*, *KISS1*, *SISSIR*, *MKNR3* и *DLK1*. Доказано, что секреция ГнРГ регулируется кисспептином посредством пермиссивных или подавляющих сигналов, исходящих от нейрокинина В и диноρφина. В современной литературе есть данные о разделении центральной формы ППП на центральную форму ППП 1 и 2 типа (СРРВ1, СРРВ2) в зависимости от участия в механизме развития *KISSIR1* (СРРВ1) или *MKNR3* (СРРВ2) [25, 26]. В тоже время эпигенетические модификации играют также важную роль в начале пубертата [27].

Опухоли надпочечников у детей являются редкими, но значительными причинами вирилизации и периферического преждевременного полового созревания (ППС) [15]. Аденома надпочечников может проявляться как изосексуальным ППС, так и вирилизацией у девочек. У этих пациентов следует тщательно оценивать яичники. Длительное воздействие андрогена и эстрогена может приводить к мультикистозному изменению структуры яичников, что приведет к сохранению высокого уровня эстрогена и инициации ППС. Распространенность внутрочерепных поражений среди девочек с диагнозом ППС, была ниже, чем сообщалось ранее, ни одно из выявленных поражений не требовало лечения [28]. Результаты исследований подтверждают, что польза от плановых МРТ у девочек с ППС старше 6 лет без каких-либо неврологических проблем не является четкой [29]. Авторами было обнаружено, что при диагностике ППС следует учитывать уровни сывороточного лютеинизирующего гормона, ФСГ и инсулиноподобного фактора роста I [30].

Низкий прогнозируемый рост и психосоциальная неадекватность при ППС диктуют необходимость терапевтической коррекции у девочек с преждевременным половым созреванием [31, 32]. Основой лечения с целью сохранения нормального роста являются аналогии ГнРГ [33].

L. Soriano-Guillén, J. Argente считают, что повреждения ЦНС чаще встречаются у мальчиков, а идиопатическая этиология ППС — у девочек [34]. Однако в последнее десятилетие количество идиопатических случаев уменьшилось благодаря открытию мутаций в разных генах, включая *KISS1*, *KISSIR*, *MKNR3* и *DLK1*, которые вызывают ППС. Генетическое тестирование должно быть включено в диагностику ППС, особенно в семейных случаях. Установлено, что раннее половое созревание оказывает отрицательное влияние на конечный рост [34].

### Обсуждение

Таким образом, управление половой системой включает минимум 3 физиологических аспекта: стресс, энергетический баланс и активность гонад. Мы проанализировали эксперименты, связанные с воздействием на репродуктивную систему крысы факторов питания, стресса и световой дезадаптации. Последний фактор связан с секрецией мелатонина, обладающего антиоксидантными, противовоспалительными и седативными эффектами [35, 36].

В экспериментах Жуковой О.В. и соавт. показана возрастная динамика эстральной функции самок крыс, находящихся с рождения в условиях стандартного освещения и получающих с 5-месячного возраста ежедневно 5 дней в неделю вместе с питьевой водой в ночное время блокатор мелатониновых рецепторов — лузиндол (N-Acetyl-2-benzyl-tryptamine) в концентрации 10 мг/л [37-39]. Авторы показали уменьшение количества коротких и увеличение количества длинных эстральных циклов через 1 мес применения лузиндола. Установлено, что блокада мелатониновых рецепторов вызывала появление преждевременных возрастных изменений эстральной функции у самок крыс: достоверное уменьшение количества регулярных циклов и появление иррегулярных эстральных циклов (с 6-месячного возраста); более раннее увеличение продолжительности овуляторного цикла (с 9-месячного возраста). Авторы считают, что блокада мелатониновых рецепторов могла привести к усилению секреции гонадолиберина и гонадотропина, в результате чего активация роста и развития фолликулов в яичниках способствовала более длительному выделению эстрогенов и изменению фаз овуляторного цикла. Несмо-

тря на различные механизмы развития недостаточности мелатонинергической системы – снижение выработки мелатонина (при воздействии постоянного освещения) или блокада мелатониновых рецепторов (при применении лузиндола) – эффекты действия на овуляторную функцию аналогичны [37-39]. Е.С. Обуховой и соавт. показано, что в режиме световой депривации возрастные изменения овуляторного цикла наступают позднее по сравнению с подобными изменениями у контрольных самок в условиях стандартного освещения. При блокаде мелатониновых рецепторов лузиндолом динамика старения репродуктивной системы соответствовала таковой в контрольной группе при стандартном освещении [40].

Мелатонинергическая система, выделенная в 2006 г. Р. Pevet в отдельную структуру характеризуется циркадианной и циркануальной ритмичностью, светочувствительностью и возрастным прогрессирующим ослаблением активности [41]. Особый интерес к мелатонинергической системе связан с генетическим механизмом старения и механизмами контроля циркадианного ритма. На крысах Вистар показано, что угнетение функции эпифиза при пребывании в различных модельных условиях десинхроноза, включая использование лузиндола (антагонист мелатониновых рецепторов) способствует преждевременному старению, развитию новообразований и сокращению продолжительности жизни лабораторных животных, в то время как отсутствие освещения угнетает канцерогенез и увеличивает продолжительность жизни.

Световое загрязнение является частью современного образа жизни и рассматривается как один из ведущих экологических факторов преждевременного старения организма [42-44]. Длительное избыточное освещение в ночные часы способствует угнетению мелатонинобразующей функции эпифиза и ускорению процессов старения этого органа, приводя к нарушению эндогенного суточного ритма мелатонина и снижению его концентрации в крови. Воздействие постоянного освещения на исследуемые параметры изучено в разные возрастные периоды – антенатальный, ранний и поздний постнатальный. Полученные данные свидетельствуют о том, что световое загрязнение и нарушение фотопериода приводит к возникновению десинхроноза, что, в свою очередь, ведет к развитию преждевременного старения. Однако авторы отмечают, что возможно и преждевременная активация репродуктивной системы [42-44].

Значительная часть репродуктивных нарушений связана со стрессом [45]. Стресс не тождественен просто нервному напряжению, это неспецифическая ре-

акция на изменения условий, которые требуют адаптации. Стрессорные факторы стратифицируют на физические, метаболические и психологические. Важную роль играют расстройства биологических ритмов организма, психологические особенности. В целом стресс при репродуктивных нарушениях, включая ППС часто реализуется через транзиторную гиперпролактинемия или активацию глюкокортикоидной функции надпочечников [17, 18, 24].

Важная роль в механизмах полового созревания отводится взаимодействию нейромедиаторных систем мозга. И.Л. Никитина и соавт. отмечают их роль наряду с межнейронным сигналингом в формировании половой дифференцировки мозга и полового поведения [46]. Наименее изученными остаются вопросы нейроэндокринной регуляции гонадной оси системой kiss/kiss1R. Авторы изучили профиль моноаминовых медиаторов в ЦНС в ассоциации с уровнем кисспептинов в крови у потомства женского пола гиперандрогенизированных на разных сроках гестации самок крыс. Модель пренатальной гиперандрогенизации создана на самках крыс линии Wistar (50 крыс) путем внутрибрюшинного введения тестостерона беременным самкам на 11-е и 18-е сут гестации. В ядрах гипоталамуса потомства этих животных выявлено статистически значимое повышение концентрации норэпинефрина в 3-м триместре соответственно. Уровень кисспептина статистически значимо возрастал у животных обеих опытных групп при гиперандрогенизации на более поздних сроках гестации. Избыток тестостерона на ранних сроках гестации оказывает тератогенное действие на потомство. Разнонаправленные изменения нейромедиаторного сигналинга, возникшие на фоне пренатальной гиперандрогенизации на поздних сроках гестации, опосредованно могут приводить к инверсиям половой дифференцировки и полового поведения. Пренатальная гиперандрогенизация ассоциирована с повышением уровня кисспептина крови, что позволяет предположить опосредованное влияние гиперандрогенизации на поздних сроках гестации на активацию кисспептинового сигналинга и ассоциированную с этим активацию гонадной оси. Продолжение изучения ассоциации изменения профиля нейромедиаторов моноаминового ряда и динамики кисспептина способно расширить понимание механизмов половой дифференцировки мозга и транслировать полученные данные в клиническую практику [47].

### Заключение

В связи с редкой распространенностью, недостаточных данных о патогенезе ППС, данная проблема

требует детального изучения. Нарушение полового созревания может приводить к различным патологическим изменениям в сфере репродуктивного здоровья девочки в будущем. Актуальность данной проблемы очевидна и требует особого внимания в плане дальнейшего изучения данной патологии в условиях биологического моделирования на самках крыс раннего возраста.

**Литература**

**(п.п. 13; 15; 16; 20-22; 26-34; 36 см. References)**

1. Овсянников В.Г., Чеботарева Ю.Ю., Подгорный И.В. Моделирование гестационных осложнений в условиях эксперимента на крысах. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2019; 1: 114–23. <https://doi.org/10.21626/vestnik/2019-1/13>
2. Чеботарева Ю.Ю., Подгорный И.В., Овсянников В.Г., Петров Ю.А. Особенности гормонального профиля в динамике беременности у крыс линии SHR и Wistar-Kyoto. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2018; 8(4): 42-7.
3. Чеботарева Ю.Ю., Овсянников В.Г., Хутиева М.Я., Подгорный И.В. Роль глюкокортикоидной дисрегуляции в развитии гестационного пиелонефрита, плацентарной недостаточности в эксперименте. *Нефрология*. 2017; 21(5): 76-9. <https://doi.org/10.24884/1561-6274-2017-21-5-76-79>
4. Чеботарева Ю.Ю., Овсянников В.Г., Хутиева М.Я., Подгорный И.В., Петров Ю.А. Моделирование преэклампсии в эксперименте у крыс. *Владикавказский медико-биологический вестник*. 2013; 17(26): 50-3.
5. Чеботарева Ю.Ю., Овсянников В.Г., Елесина И.Г., Алексеева Н.А. Способ экспериментального моделирования хронической ановуляции у крыс. *Владикавказский медико-биологический вестник*. 2013; 17(26): 54-8.
6. Кривенцов М.А. Изменение абсолютной и относительной массы тимуса крыс при парентеральном введении спинномозговой жидкости в онтогенетическом аспекте. *Украинский морфологический альманах*. 2013; 11(2): 55-7.
7. Гелашвили О.А. Вариант периодизации биологически сходных стадий онтогенеза человека и крысы. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2008; 4(4): 125-6.
8. Чеботарева Ю.Ю., Овсянников В.Г. Морфологические особенности формирования поликистоза яичников в зависимости от методов биологического моделирования. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2008; 105(6): 95-8.
9. Чеботарева Ю.Ю., Овсянников В.Г. Моделирование поликистоза яичников. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2009; 3: 29-31.
10. Михельсон А.Ф., Чеботарева Ю.Ю., Евдокимова Е.П. История ростовской школы акушерства и гинекологии (к празднованию 90-летия Ростовского государственного медицинского университета). *Медицинский вестник Юга России*. 2021; 12(1): 98-104. <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2021-12-1-98-104>
11. Чеботарева Ю.Ю., Овсянников В.Г., Елесина И.Г. Механизмы репродуктивных нарушений при первичной олигоменорее у девушек-подростков. *Проблемы женского здоровья*. 2015; 10(3): 31-7.
12. Савельева Г.М., Сухих Г.Т., Серов В.Н., Радзинский В.Е., И.Б. Манухин. Патология репродуктивной системы в детском и под-

- ростковом возрасте. *Гинекология. Национальное руководство*. М.; 2019.
14. Фархутдинова Л.М. Преждевременное половое созревание центрального происхождения. *Архив внутренней медицины*. 2017; 4: 245-51.
17. Чеботарева Ю.Ю., Хашагульгова Х.У. Некоторые особенности неспецифической резистентности и варианты коррекции при преждевременном телархе. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2009; 110(5): 135-6.
18. Юровская В.П., Сависько А.А., Чеботарева Ю.Ю., Хашагульгова Х.У. Патогенетические особенности преждевременного телархе. *Репродуктивное здоровье детей и подростков*. 2011; 2: 75-84.
19. Родина М.А., Чеботарева Ю.Ю., Приходько Е.Д., Летифов Г.М., Логинова Э.И. Клинические особенности изosexуальной формы преждевременного полового развития. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2019; 64(4): 298.
23. Чернуха Г.Е., Табеева Г.И., Гусев Д.В., Шмаков Р.Г. Киспептин и репродуктивная система. *Гинекология. Эндокринология*. 2017; 132 (3): 73-8.
24. Никитина И.Л., Байрамов А.А., Ходулева Ю.Н., Шабанов П.Д. Киспептины в физиологии и патологии полового развития — новые диагностические и терапевтические возможности. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2014; 12(4): 3-12.
25. Горельшнев А.С., Кузнецова И.В. Менструальный цикл и энергетическая «политика» гипоталамуса. *Акушерство и гинекология. Спецвыпуск «Актуальные вопросы эндокринной гинекологии»*. Эффективная фармакотерапия. 2015; 5: 4-15.
35. Бурчаков Д.И., Успенская Ю.Б. Антиоксидантный, противовоспалительный и седативный эффекты мелатонина: результаты клинических исследований. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2017; 117(4-2): 67-73.
37. Жукова О.В., Обухова Е.С., Хижкин Е.А., Гындык М.Л., Виноградова И.А. Овуляторная функция крыс в условиях блокады мелатониновых рецепторов. *Ученые записки Петрозаводского государственного университета*. 2015; 153(8): 98-104.
38. Жукова О.В., Виноградова И.А., Обухова Е.С., Илюха В.А., Хижкин Е.А. Влияние фармакологической блокады мелатониновых рецепторов на овуляторную функцию самок крыс в условиях световой депривации. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2018; 81: 84.
39. Жукова О.В., Обухова Е.С., Хижкин Е.А., Илюха В.А., Виноградова И.А. Лузиндол ускоряет старение эстральной функции у самок крыс. *Успехи геронтологии*. 2016; 29(2): 279-85.
40. Обухова Е.С., Жукова О.В., Хижкин Е.А., Виноградова И.А., Илюха В.А. Влияние световой депривации и лузиндола на овуляторную функцию у крыс. *Успехи геронтологии*. 2017; 30(4): 529-33.
41. Виноградова И.А., Горанский А.И., Жукова О.В., Матвеева Ю.П., Юнаш В.Д. Участие мелатонинергической системы в профилактике рака и старения при световом десинхронозе. В кн.: *Белые ночи 2019. Материалы V Петербургского международного онкологического форума: тезисы*. Автономная некоммерческая научно-медицинская организация «Вопросы онкологии». Санкт-Петербург. 2019: 85-86.
42. Обухова Е.С., Жукова О.В., Хижкин Е.А., Виноградова И.А., Илюха В.А. Влияние световой депривации и лузиндола на овуляторную функцию у крыс. *Успехи геронтологии*. 2018; 8(1): 22-5.

43. Жукова О.В., Виноградова И.А., Обухова Е.С., Илюха В.А., Хижкин Е.А. Влияние фармакологической блокады мелатониновых рецепторов на овulatoryную функцию самок крыс в условиях световой депривации. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2018; 81(S): 84.
44. Виноградова И.А., Илюха В.А., Юнаш В.Д., Хижкин Е.А., Лотош Т.А., Матвеева Ю.П. и др. Световой десинхронизм как фактор риска преждевременного старения. *Acta Naturae (русская версия)*. 2016; 8(S1): 125-6.
45. Кузнецова И.В., Бурчакова М.Н., Бурчаков Д.И., Хаджиева Н.Х., Филиппова Г.Г. Психогенные стресс-зависимые нарушения менструального цикла: роль негормональной коррекции. *Здоровье женщины*. 2018; 10(136): 68.
46. Никитина И.Л., Кудряшова Е.К., Масель А.С., Байрамов А.А., Шабанов П.Д. Изменения уровня моноаминовых нейромедиаторов в ЦНС и кисспептина в крови у потомства гиперандрогенизированных самок крыс в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(1): 4-12.
47. Никитина И.Л., Юхлина Ю.Н., Васильева Е.Ю., Нагорная И.И. Кисспептиновые механизмы регуляции полового развития мальчиков: потенциал диагностики и терапии при задержке старта пубертата и гипогонадотропном гипогонадизме. *Проблемы эндокринологии*. 2018; 64(5): 280-5.
9. Chebotareva Yu.Yu., Ovsyannikov V.G. Modeling of the polycystic ovary syndrome. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2009; 3: 29-31. (in Russian)
10. Mikhelson A.F., Chebotareva Yu.Yu., Evdokimova E.P. History of the Rostov School of Obstetrics and Gynecology (to celebrate the 90th anniversary of the Rostov State Medical University). *Meditinskiiy vestnik Yuga Rossii*. 2021; 12(1): 98-104. (in Russian) <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2021-12-1-98-104>
11. Chebotareva Yu.Yu., Ovsyannikov V.G., Elesina I.G. Mechanisms of reproductive disorders in primary oligomenorrhea in adolescent girls. *Problemy zhenskogo zdorov'ya*. 2015; 10(3): 31-7.
12. Savelieva G.M., Sukhikh G.T., Serov V.N. Pathology of the reproductive system in childhood and adolescence. [*Gynecology. National guide. Ginekologiya. Natsional'noe rukovodstvo*]. Moscow; 2019: 911-16. (in Russian)
13. Cantas-Orsdermir S., Eugster E.A. Update in central precocious puberty: from etiologies to outcomes. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2019; 1-8. <https://doi.org/10.1080/17446651.2019.1575726>
14. Farkhutdinova L.M. Central precocious puberty. *Archive of internal medicine*. 2017; 7(4): 245-51. (in Russian). <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2017-7-4-245-251>
15. Ersoy B., Kizilay D., Cayirli H. Central Precocious Puberty Secondary to Adrenocortical Adenoma in a Female Child: Case Report and Review of the Literature. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2017; 30(5): 591-4.
16. Herrero-Morín J.D., González N.F., Crus L. Hipertricotosis cubital en una paciente con pubarquia precoz. Caso clínico. *Arch Argent Pediatr*. 2018; 116(6): e765-e768.
17. Chebotareva, Yu.Yu., Hashagulova H.U. Some particularities of the non-specific resistance and the variants of correction of premature thelarche. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik*. 2009; 5(110): 135-1. (in Russian)
18. Yurovskaya V.P., Savisko A.A., Chebotaryova Yu.Yu. Pathogenetic peculiarities of premature thelarche. *Reproduktivnoe zdorov'e detey i podrostkov*. 2011; 2: 75-9. (in Russian)
19. Rodina M.A., Chebotaryova Yu.Yu., Prikhodko E.D. Clinical features of the isosexual form of premature sexual development. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2019; 64(4): 298. (in Russian)
20. Bessa D.S., Maschietto M. Methylome profiling of healthy and central precocious puberty girls. *Clinical Epigenetics*. 2018; 10: 146
21. Gradone A., Cirilo G., Sasso M. MKRN3 levels in girls with central precocious puberty and correlation with sexual hormone levels: a pilot study. *Endocrine*. 2018; 59(1): 203-5
22. Tencer J., Lemaire P., Brailly-Tabard S. Serum Inhibin B concentration as a predictor of age at first menstruation in girls with idiopathic central precocious puberty. *PLoS ONE*. 2018; 13(12): e0205810
23. Chernukha G.Ye., Tabeeva G.I., Gusev D.V. Kisspeptin and Reproductive System. *Gynecology Endocrinology*. 2017; 3(132): 73-5. (in Russian)
24. Nikitina I.L., Bairamov A.A., Khoduleva Yu.N., Shabanov P.D. Kisspeptins in physiology and pathology of sex development — new diagnostic and therapeutic approaches. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*. 2014; 12(4): 3-12. (in Russian)
25. Gorelyshev A.S., Kuznetsova I.V. Menstrual Cycle and Energy 'Policy' of the Hypothalamus. *Effective Pharmacotherapy Issue 5. Akusherstvo i ginekologiya. Spetsvypusk «Aktual'nye voprosy endokrinnoy ginekologii»*. *Effektivnaya farmakoterapiya*. 2015; 5: 4-15. (in Russian)

## References

1. Ovsyannikov V.G., Chebotareva Yu.Yu., Podgorniy I.V. Modeling of hypertension during pregnancy in experimental studies on rats. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik «Chelovek i ego zdorov'e»*. 2019; 1: 114-9. (in Russian). <https://doi.org/10.21626/vestnik/2019-1/13>
2. Chebotareva Yu.Yu., Podgorniy I.V., Ovsyannikov V.G.. The features of hormonal profile in rats of the SHR and Wistar-Kyoto. *Krymskiy zhurnal eksperimental'noy i klinicheskoy meditsiny*. 2018; 8(4): 42-5. (in Russian)
3. Chebotareva Yu.Yu., Ovsyannikov V.G., Khutiyeva M.Ya., Podgorniy I.V. The role of glucocorticoid dysregulation in the development of gestational pyelonephritis, placental insufficiency in the experiment. *Nefrologiya*. 2017; 21(5): 76-3. (in Russian)
4. Chebotareva Yu.Yu., Ovsyannikov V.G., Hutieva M.Ja. The experimental modeling of the preeclampsia in the experiment in the Wistar rats. *Vladikavkazskiy medikobiologicheskiy vestnik*. 2013; 17(26): 50-3. (in Russian)
5. Chebotareva Yu.Yu., Ovsyannikov V.G., Yelesina I.G., Alekseeva N.A. Method of experimental modeling of chronic anovulation in rats. *Vladikavkazskiy mediko-biologicheskiy vestnik*. 2013; 17(26): 54-8. (in Russian)
6. Kriventsov M.A. Ontogenetic changes of the absolute and relative weight of the rats' thymus after parenteral administration of xenogeneic cerebrospinal fluid. *Ukrainskiy morfologicheskii al'manakh*. 2013; 11(2): 55-2. (in Russian)
7. Gelashvili O.A. Variant of periodization of biologically similar stages of human and rat ontogenesis. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2008; 4(4): 125-6. (in Russian)
8. Chebotareva Yu.Yu., Ovsyannikov V.G. Morphological features of the formation of polycystic ovaries depending on the methods of biological modeling. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik*. 2008; 105(6): 95-8. (in Russian)

26. Leka-Emiri S., Chrousos G.P., Kanaka-Gantenbein C. The mystery of puberty initiation: genetics and epigenetics of idiopathic central precocious puberty (ICPP). *J Endocrinol Invest.* 2017; 40(8): 789-802.
27. Schneider Aguirre R., Eugster E.A. Central precocious puberty: From genetics to treatment. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & metabolism.* 2018; 32(4): 343-54.
28. Hwang. Prevalence of Pathological Drain Lesions in Girls with Central Precocious Puberty: Possible Overestimation? *J Korean Med Sci.* 2018; 33(51): e329
29. Liyan Pan, Guangjian Liu, Xiaojian Mao. Development of Prediction Models Using Machine Learning Algorithms for Girls with Suspected Central Precocious Puberty: Retrospective Study. *JMIR Med Inform.* 2019; 7 iss.I:e11728. - p1-13 DOI:10.2196/11728
30. Lopes M.C., Ramos C.O.. Applicability of a novel mathematical model for the prediction of adult height and age at menarche in girls with idiopathic central precocious puberty. *Clinics.* 2018; 73: 480.
31. Schneider Aguirre R., Eugster E.A. Central precocious puberty: From genetics to treatment. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & metabolism.* 2018; 32(4): 343-54.
32. Soriano-Guillén L., Argente J. Central precocious puberty, functional and tumor-related. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2019; 10(19): 1521-6903.
33. Sultan C., Gaspari L., Maimoun L., Kalfa N., Paris F. Disorders of puberty. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018; 48: 62-89.
34. Limony Y., Koziel S., Friger M. Association between the onset age of puberty and parent height. *PLoS ONE.* 2018; 14(1): e0211334. PMID: 26020145. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.104>
35. Burchakov D.I., Uspenskaya Y.B. The antioxidant, anti-inflammatory, and sedative effects of melatonin: results of clinical trials. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova.* 2019; 49(1): 54-9. (in Russian)
36. Burchakov D.I., Uspenskaya Y.B. The antioxidant, anti-inflammatory and sedative effects of melatonin: results of clinical trials. *Neuroscience and Behavioral Physiology.* 2019; 49(1): 54-9.
37. Zhukova O.V., Obukhova E.S., Khizhkin E.A. Rats' ovulatory function under melatonin receptors' blockade. *Uchenye zapiski Peterzavodskogo gosudarstvennogo universiteta.* 2015; 8(153): 98-104. (in Russian)
38. Zhukova O.V., Vinogradova I.A., Obukhova E.S. Pharmacological blockade of the receptors of melatonin effect on ovulatory function in female rats under conditions of light deprivation. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2018; 81 (S): 84. (in Russian)
39. Zhukova O.V., Obukhova E.S., Hizhkin E.A. Luzindole accelerates the aging of estrous function of female rats O.B. Жукова, *Uspekhi gerontologii.* 2016; 29 (2): 279-6. (in Russian)
40. Obukhova E.S., Zhukova O.V., Hizhkin E.A. The effect of light deprivation and luzindole on the ovulatory function in rats. *Uspekhi gerontologii.* 2017; 30(4): 529-4. (in Russian)
41. Vinogradova I.A., Goransky A.I., Zhukova O.V. Participation of the melatonergic system in the prevention of cancer and aging in light desynchronization. In: White nights 2019. *Materials of the V St. Petersburg International Oncological Forum: abstracts. Autonomous non-profit scientific and medical organization "Oncology Issues". [Belye nochi 2019. Materialy V Peterburgskogo mezhduarodnogo onkologicheskogo foruma: tezisy. Avtonomnaya nekommercheskaya nauchno-meditsinskaya organizatsiya «Voprosy onkologii»].* St. Petersburg. 2019: 85-6. (in Russian)
42. Obukhova E.S., Zhukova O.V., Khizhkin E.A. The effect of light deprivation and luzindole on the ovulatory function in rats. *Uspekhi gerontologii.* 2018; 8(1): 22-5. (in Russian)
43. Zhukova O.V., Vinogradova I.A., Obukhova E.S. A. Effect of pharmacological blockade of melatonin receptors on ovulatory function of female rats under conditions of light deprivation. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2018; 81(S): 84. (in Russian)
44. Vinogradova I.A., Ilyukha V.A., Yunash V.D. Light desynchronization as a risk factor of premature aging. *Acta Naturae.* 2016; 8(S1): 125-1.
45. Kuznetsova I.V., Burchakova M.N., Burchakov D.I. Psychogenic stress-dependent disorders of menstrual cycle: role of non-hormonal correction. *Zdorov'e zhenshchiny.* 2018; 10(136): 68. (in Russian)
46. Nikitina I.L., Kudryashova E.K., Masel A. Level of monoamine neurotransmitters in the central nervous system and kisspeptin in blood in the offspring of experimentally induced model hyperandrogenisation in female rats. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2017; 61(1): 4-12. (in Russian)
47. Nikitina I.L., Yuchlina Yu.N., Vasileva E.Y. Kisspeptin regulation of male sex development: possibilities of diagnosis and treatment of delayed puberty and hypogonadotropic hypogonadism. *Problemy endokrinologii.* 2018; 64 (5): 280-5. (in Russian)

**Сведения об авторах:**

**Чеботарева Юлия Юрьевна**, доктор мед. наук, доцент, каф. акушерства и гинекологии № 2, руководитель проблемной научной лаборатории «Комплексного изучения репродуктивных нарушений у девочек и девушек-подростков» ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: chebotarevajulia@inbox.ru;

**Овсянников Виктор Григорьевич**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: ovsyannikov\_vg@mail.ru; Родина Марина Александровна, врач акушер-гинеколог МБУЗ КДЦ «Здоровье», e-mail: rodina\_marisha@mail.ru; Подгорный Игорь Владимирович, канд. мед. наук, ассистент каф. акушерства и гинекологии № 2 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России;

**Хутиева Мадина Яхьяевна**, канд. мед. наук, ст. преподаватель каф. акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Ингушский государственный университет», e-mail: madina.hutieva@mail.ru.