

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 2020 г.: 0, 488

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

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

Сдано в набор 25.02.2022
Подписано к печати 01.03.2022
Опубликовано 15.03.2022

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

ISSN 0031-2991

Пат. физиол. и экспер. тер.
2022. Том 66. № 1. 1–134

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, 2022.

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 66 № 1 · 2022

Январь–Март

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 2020 was 0,488

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 25.02.2022
Signed for publication on 01.03.2022
Published on 15.03.2022

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

ISSN 0031-2991

Pat Fiziol Eksp Ter
2022. Volume 66. No 1 1-134.

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, 2022.

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. 66 № 1 · 2022

January–March

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*

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Кирова Ю.И., Терехина О.Л., Шакова Ф.М.** Морфофункциональные особенности астроцитов и микроглии в мозге стареющих крыс при курсовом применении этилметилгидроксипиридина сукцината 4
- Макарьева Л.М., Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Степанов С.С., Коржук М.С., Шоронова А.Ю.** Проявления гипер- и дегидратации нервной ткани полей СА1 и СА3 гиппокампа после непродолжительной окклюзии и пережатия общих сонных артерий 17
- Иванова Н.А., Бурденный А.М., Логинов В.И., Кураева Т.Л., Носиков В.В.** Роль полиморфных маркёров гена *IL6* в патогенезе сахарного диабета 1 типа 28
- Булатова И.А., Шевлюкова Т.П., Щёктова А.П., Кривцов А.В.** Генетический профиль больных хроническим гепатитом С 35
- Брус Т.В., Васильев А.Г., Трашков А.П.** Основные биохимические маркеры при неалкогольной жировой болезни печени различной степени тяжести (экспериментальное исследование) 44
- Астахов Д.А., Забозлаев Ф.Г., Галямова А.Р., Иванов Ю.В., Дикова Т.С., Сафонова В.М., Дыдыкин С.С., Нечунаев А.А., Злобин А.И., Панченков Д.Н.** Динамика морфологических изменений в ткани печени при необратимой электропорации в условиях возрастающей напряженности электрического поля 52
- Максимова М.Ю., Галанина А.С.** Автономная дисфункция у пациентов с постковидным синдромом 61
- Мухамадияров Р.А., Кутихин А.Г.** Полиморфизм эндотелиальных клеток на поверхности створок митрального клапана и сосудов микроциркуляторного русла при инфекционном эндокардите 68
- Баринов Э.Ф., Малинин Ю.Ю., Григорян Х.В.** Молекулярные механизмы, контролирующие выраженность геморрагии при ингибировании синтеза ТхА2 в тромбоцитах. 78
- Гильяно Н.Я., Дуботолова М.М., Носкин Л.А., Степанов С.И., Арутюнян А.В., Алчинова И.Б., Ибатуллин Ф.М.** D-глюкозамин индуцирует различные формы гибели опухолевых клеток. 85
- Терехина Н.А., Селин А.Д., Терехин Г.А.** Мочевая кислота – мишень для действия электромагнитного излучения 96
- Козлов В.А., Сапожников С.П., Карышев П.Б., Воронов Л.Н.** Локальный амилоидоз шишковидной железы. 104

ОБЗОРЫ

- Гарбузенко Д.В.** Молекулярные стимулы фиброгенной активации звёздчатых клеток печени 112
- Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б.** Шипики дендритов 120
- Щербаков В.И., Поздняков И.М., Ширинская А.В., Волков М.В.** Стерильное воспаление при преэклампсии и угрозе преждевременных родов 127

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Kirova Yu.I., Terekhina O.L., Shakova F.M.** Morpho-functional features of astrocytes and microglia in the brain of ageing rat during the course of ethylmethylhydroxypyridine succinate treatment 4
- Makarjeva L.M., Avdeev D.B., Akulinin V.A., Stepanov S.S., Korzhuk M.S., Shoronova A.Yu.** Manifestations of hyper- and dehydration of the nervous tissue in the fields CA1 and CA3 of the hippocampus after variable and permanent occlusions of the common carotid arteries 17
- Ivanova N.A., Burdennyi A.M., Loginov V.I., Kuraeva T.L., Nosikov V.V.** The pathogenic role of *IL6* gene polymorphisms in type 1 diabetes mellitus 28
- Bulatova I.A., Shevlyukova T.P., Shchekotova A.P., Krivtsov A.V.** Genetic profile of patients with chronic hepatitis C 35
- Brus T.V., Vasiliev A.G., Trashkov A.P.** The main biochemical markers of non-alcoholic fatty liver disease of various severity (experimental study) 44
- Astakhov D.A., Zabozaev F.G., Galyamova A.R., Ivanov Yu.V., Dikova T.S., Safonova V.M., Dydykin S.S., Nechunaev A.A., Zlobin A.I., Panchenkov D.N.** The dynamics of morphological changes in liver tissue during irreversible electroporation with electrical fields of increasing strength 52
- Maksimova M.Yu., Galanina A.S.** Autonomic dysfunction in patients with post-COVID syndrome 61
- Mukhamadiyarov R.A., Kutikhin A.G.** Polymorphism of endothelial cells on the surface of mitral valves and microcirculatory vessels in infectious endocarditis 68
- Barinov E.F., Malinin Yu.Yu., Grigoryan Kh.V.** Molecular mechanisms controlling the severity of hemorrhage after inhibition of TxA2 synthesis in platelets 78
- Giliano N.Ya., Dubotolova M.M., Noskin L.A., Stepanov S.I., Arutyunyan A.V., Alchinova I.B., Ibatullin F.M.** D-Glucosamine induces various forms of cancer cells death 85
- Terekhina N.A., Selin A.D., Terekhin G.A.** Uric acid as a target for the action of electromagnetic radiation 96
- Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P., Karyshev P.B., Voronov L.N.** Local amyloidosis of the pineal gland 104

REVEIWS

- Garbuzenko D.V.** Molecular stimuli of fibrogenic activation in hepatic stellate cells. 112
- Paltsyn A.A., Sviridkina N.B.** Spines of dendrites 120
- Shcherbakov V.I., Pozdnyakov I.M., Shirinskaya A.V., Volkov M.V.** Sterile inflammation in preeclampsia and inflammation in preeclampsia and preterm 127

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2022

УДК 547.461.4:616.831-002:612.013.1:599.323.4

Кирова Ю.И., Терехина О.Л., Шакова Ф.М.

Морфофункциональные особенности астроцитов и микроглии в мозге стареющих крыс при курсовом применении этилметилгидроксипиридина сукцината

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

В развитии возраст-ассоциированных нейродегенеративных заболеваний ключевая роль отводится устойчивой провоспалительной активации микроглии и опосредованным реактивной микроглией окислительному стрессу, нейровоспалению, астроглиальной дисфункции. Конститутивная экспрессия микроглиями сукцинатного рецептора SUCNR1/GPR91, формирование новых представлений о сукцинате как иммунометаболите (метабокин) и отсутствие исследований влияния сукцинатной сигнализации на морфофункциональное состояние резидентных иммунных клеток ЦНС предопределили проведение исследования. **Цель** работы – выявление морфофункциональных особенностей и количества астро- и микроглиями в стареющем мозге крыс при курсовом применении сукцинатсодержащего препарата мексидол (этилметилгидроксипиридина сукцинат).

Методика. Исследование выполнено на самцах беспородных белых крыс 3, 6 и 18 мес. Мексидол вводили в/б в дозе 100 мг/кг ежедневно, в течение 3, 7 и 14 сут. Методом вестерн-блот-анализа в лизате коры головного мозга (КГМ) определяли содержание высокоспецифичных маркеров микроглиальной (Iba1, ionized calcium binding adapter molecule 1) и астроглиальной (GFAP, glial fibrillary acidic protein) активации, а также уровень синаптофизина (SYN, маркер синаптогенеза). Методом иммуногистохимического окрашивания Iba1 и GFAP на парафиновых срезах префронтальной коры (ПФК) и гиппокампа оценивали морфологические особенности и осуществляли подсчет астро- и микроглиями у молодых и старых крыс.

Результаты. У старых животных уровень GFAP и Iba1 увеличился на 30% и 20% соответственно, а содержание SYN снижилось на 25% в сравнении с молодыми животными, что свидетельствует об активации воспалительного процесса и снижении синаптогенного потенциала у старых животных. Морфологические признаки провоспалительной поляризации (короткие, слабоветвленные, малочисленные отростки) были характерны для микро- и астроглии ПФК старых крыс. Курс мексидола вызывал в КГМ старых крыс снижение содержания GFAP и Iba1, увеличение экспрессии SYN до уровня молодых животных, увеличение количества, длины, разветвленности отростков у GFAP- и Iba1-положительных клеток, что свидетельствует о сукцинат/SUCNR1-зависимой противовоспалительной трансформации микро- и астроглии в стареющем мозге.

Заключение. Исследование впервые раскрывает новые аспекты активности мексидола и сукцинатной сигнализации в мозге, что проявляется в ограничении воспалительной реакции и усилении синаптической пластичности. Сукцинатсодержащий препарат мексидол может быть использован в комплексной терапии различных неврологических патологий, ассоциированных с нейровоспалением и когнитивным дефицитом.

Ключевые слова: этилметилгидроксипиридина сукцинат (мексидол); астроциты; микроглия; нейровоспаление; старение; крысы

Для цитирования: Кирова Ю.И., Терехина О.Л., Шакова Ф.М. Морфофункциональные особенности астроцитов и микроглии в мозге стареющих крыс при курсовом применении этилметилгидроксипиридина сукцината. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1): 4–16.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.4-16

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, написание текста – Кирова Ю.И.; сбор и обработка материала, подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка материала – Кирова Ю.И., Терехина О.Л., Шакова Ф.М. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Кирова Юлия Игоревна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: bioenerg@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.12.2021

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Kirova Yu.I., Terekhina O.L., Shakova F.M.

Morpho-functional features of astrocytes and microglia in the brain of ageing rat during the course of ethylmethylhydroxypyridine succinate treatmentInstitute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation

In the development of age-associated neurodegenerative diseases, a key role is played by sustained pro-inflammatory activation of microglia and reactive microglia-mediated oxidative stress, neuroinflammation, and astroglial dysfunction. The constitutive expression of the succinate receptor SUCNR1/GPR91 by microglia, formation of new ideas about succinate as an immunometabolite (metabokine) and the lack of studies of the effect of succinate signaling on the morpho-functional state of CNS resident immune cells stimulated this study. **The aim** of the study was to assess the morpho-functional features and the number of astro- and microglia in the aging brain of intact rats and during the application of the succinate-containing drug, mexidol (ethylmethylhydroxypyridine succinate).

Methods. Experiments were performed on outbred white rats aged 3, 6, and 18 months. Mexidol was administered intraperitoneally at 100 mg/kg/day for 3, 7, and 14 days. The content of highly specific markers of microglial activation (Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1) and astroglial activation (GFAP, glial fibrillary acidic protein), and the content of synaptophysin (SYP, a marker of synaptogenesis) were determined in cerebral cortex (CC) lysate by Western blot analysis. Immunohistochemical staining of Iba1 and GFAP in paraffin-embedded sections of the prefrontal cortex (PFC) and hippocampus was used to evaluate morphological features and to count astro- and microglia in young and aged rats.

Results. In aged rats, the contents of GFAP and Iba1 were increased by 30% and 20%, respectively, and the content of SYP was decreased by 25%, compared with that of young animals. These findings indicate activation of inflammation and a reduction of synaptogenic potential in aged animals. Morphological features of proinflammatory polarization, i.e., short, poorly branched, few processes, were observed for micro- and astroglia in PFC of aged rats. Mexidol caused a decrease of the GFAP and Iba1 content in CC of aged rats, an increase of SYP expression to its level in young animals, an increase in the number, length, branching of processes in GFAP- and Iba1-positive cells. These findings demonstrate succinate/SUCNR1-dependent anti-inflammatory transformation of micro- and astroglia in the aging brain.

Conclusion. The findings demonstrate, for the first time, new aspects of mexidol activity and succinate signaling in the brain that limit inflammatory responses and enhance synaptic plasticity. The succinate-containing drug mexidol can be used in the complex therapy of various neurological pathologies associated with neuroinflammation and cognitive deficit.

Keywords: ethylmethylhydroxypyridine succinate (Mexidol); astrocytes; microglia; neuroinflammation; aging; rats

For citation: Kirova Yu.I., Terekhina O.L., Shakova F.M. Morpho-functional features of astrocytes and microglia in the brain of ageing rat during the course of ethylmethylhydroxypyridine succinate treatment. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(1): 4–16. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.4-16

For correspondence: *Yuliya I. Kirova*, Doctor of Biological Sciences, Principal Researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: bioenerg@mail.ru

Financing. The study had no sponsorship.

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

Author's contribution: the concept and design of the study – Kirova Yu.I.; collection and processing of material, preparation of illustrative material, statistical processing of the material – Kirova Yu.I., Terekhina O.L., Shakova F.M.; writing the text – Kirova Yu.I. Approval of the final version of the article – all co-authors.

Information about the authors:Kirova Yu.I., <https://orcid.org/0000-0002-2436-3661>Terekhina O.L., <http://orcid.org/0000-0001-5128-1912>Shakova F.M., <https://orcid.org/0000-0002-0494-2500>

Received 20.12.2021.

Accepted 20.01.2022

Published 15.03.2022

В развитии возраст-ассоциированных нейродегенеративных заболеваний ключевая роль отводится устойчивой провоспалительной активации микроглии и опосредованным реактивной микроглией окислительному стрессу и нейровоспалению [1, 2]. Недавно

опубликованные исследования продемонстрировали дисфункцию астроцитов, снижение их синаптогенного и нейропротекторного потенциала, как ведущий фактор в формировании когнитивного дефицита при нормальном и патологическом старении [3, 4]. Согласно

новым данным, реактивная астроглия не только признак старения и заболеваний мозга, но и критически значимый патогенетический механизм, определяющий прогрессирование нейродегенеративных патологий [4].

Представления об астроцитах претерпели кардинальное переосмысление за минувшее десятилетие, в результате чего основополагающая механическая функция астроцитов как клеток, обеспечивающих структурную поддержку нейронов и формирование внеклеточного матрикса, была замещена функцией синаптической модуляции: отростки астроцитов составляют структурную часть синапса (трехчастный синапс), астроциты секретируют синаптогенные факторы и глиотрансмиттеры, осуществляют рециклинг нейромедиаторов, усиливают долговременную потенциацию [5–9]. Таким образом, астроциты являются центральными координаторами активности нейрональных сетей и, в конечном итоге, когнитивных функций [10]. Показано, что нейродегенеративные заболевания с прогрессирующим когнитивным дефицитом связаны с астроцитарной дисфункцией, а наиболее распространенная форма возраст-ассоциированной нейродегенерации Болезнь Альцгеймера получила новую трактовку как синаптическая патология [4].

Помимо модуляции синаптической передачи, структурной и метаболической поддержки нейронов, астроциты наряду с микроглией участвуют в развитии воспалительных и цитотоксических реакций в нервной системе [8]. Появляется все больше свидетельств, что астроциты и микроглия играют определяющую роль в потере нейронов при нормальном старении и нейродегенеративных патологиях, ассоциированных с пожилым возрастом [4]. Несмотря на детальную проработанность проблемы провоспалительной трансформации микроглии при старении, морфо-функциональные изменения стареющих астроцитов остаются практически неисследованными [11]. Наряду со свидетельствами провоспалительной поляризации астроцитов при старении [4, 10, 12] описаны дистрофические изменения астроцитов без существенных изменений в экспрессии провоспалительных генов [11, 13].

В настоящее время наиболее обсуждаемой является концепция, согласно которой реактивная стареющая микроглия, секретируя IL-1 α , TNF- α , C1q, вызывает провоспалительную трансформацию астроцитов (A1-нейротоксический фенотип) [14]. A1-астроциты демонстрируют снижение способности к формированию синапсов, стимуляции выживания и роста нейронов, а также цитотоксичность. Таким образом, активация астроцитов является микроглиально-зависимой и ее эффективная коррекция предполагает блокирование провоспалительной M1-активации микроглии [3].

В оценке про/противовоспалительного состояния астроцитов наиболее адекватным и надежным подходом является определение уровня экспрессии мРНК/белка GFAP (glial fibrillary acidic protein) и анализ морфологических особенностей иммуногистохимически окрашенных GFAP-положительных астроцитов [15, 16]. GFAP – белок промежуточных филаментов – широко признан высокоспецифичным маркером реактивной астроглии. Морфологически провоспалительный/цитотоксический фенотип астроцитов характеризуется короткими, широкими, малочисленными и слабо разветвленными отростками, увеличенным клеточным телом (астроцитарная гипертрофия). Гипертрофированные пролиферирующие астроциты наблюдают при травме, инфаркте, инфекции мозга (астроцитарный глиоз), а также при стрессе и старении. Тем не менее, есть немало исследований, выявляющих не гипертрофические, а дистрофические изменения астроцитов при старении (уменьшение количества астроцитов, уменьшение числа отростков и их длины, уменьшение размера клеточного тела) [17]. Таким образом, вопрос морфофункциональной поляризации астроглии при старении мозга остается нерешенным [8], также как подходы к ограничению воспалительной трансформации астроцитов и индукции нейропротективного фенотипа астроцитов (A2-фенотип).

Важно отметить, что применение неспецифической противовоспалительной терапии (нестероидные противовоспалительные препараты) снижает риск и облегчает течение нейродегенеративных процессов [18]. Одним из перспективных подходов к коррекции старческого церебрального воспаления может быть рецептор-опосредованная противовоспалительная трансформация микроглии. Известно, что главные типы иммунцитов (макрофаги, дендритные клетки, лимфоциты) и резидентные иммунные клетки ЦНС (микроглия) конститутивно экспрессируют сукцинатный рецептор SUCNR1/GPR91, а янтарная кислота (сукцинат) оказывает сигнальное иммуномодулирующее действие как иммунометаболит (метабокин) [19].

В собственных исследованиях по изучению влияния сукцинатной сигнализации на провоспалительно поляризованную микроглию стареющего мозга [20] было впервые показано, что курсовое применение сукцинатсодержащего препарата мексидол (этилметилгидроксипиридина (ЭМГП) сукцинат; 100 мг/кг, в/б, ежедневно, 14 дней) сопровождалось увеличением уровня экспрессии в КГМ старых крыс поверхностного маркера (CD206) противовоспалительного фенотипа микроглии, иммуносупрессорного цитокина TGF- β 1, нейротрофина BDNF, а также уменьшением содержа-

ния маркеров провоспалительного фенотипа микроглии (CD86, IL-1 β , TNF- α), что в целом свидетельствует об индукции противовоспалительной поляризации микроглии в стареющем мозге с явлениями умеренного хронического воспаления. Данные были получены методом иммуноблоттинга, так как иммуногистохимическая идентификация M1/M2 фенотипа микроглиальных клеток затруднительна в условиях *in vivo*, когда выявляются промежуточные/смешанные микроглиальные фенотипы [21]. В отношении астроцитов до настоящего времени отсутствуют множественные специфические маркеры (паттерны) их про-/противовоспалительной трансформации. Фактически единственным информативным подходом к идентификации фенотипа астроцитов является иммуногистохимическое окрашивание GFAP – маркера зрелых и провоспалительно поляризованных астроцитов и последующий анализ морфологии, количества и локализации GFAP-экспрессирующих астроцитов.

Поскольку астроциты, также как микроглиоциты, экспрессируют сукцинатный рецептор [22], а данные о влиянии сукцинат/SUCNR1 сигнализации на фенотип астроцитов в стареющем мозге с явлениями хронического воспаления отсутствуют в мировой литературе, была проведена представленная работа.

Цель исследования заключалась в оценке морфофункциональных особенностей и количества астро- и микроглиоцитов в стареющем мозге интактных крыс и при курсовом применении сукцинатсодержащего препарата мексидол (ЭМГП сукцинат).

Методика

Животные. Исследование было выполнено на самцах беспородных белых крыс в возрасте 3 (молодые), 6 (средневозрастные), 18 (старые) мес, выращенных в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» при естественном чередовании суточной освещенности, свободном доступе к пище и воде. Эксперименты проводили в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. Протоколы экспериментов были утверждены этическим комитетом ФГБНУ НИИОПП (протокол утверждения проекта № 1 от 20.02.2020; протокол окончательного утверждения № 5 от 16.12.2020).

Использованный препарат. Мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат) применяли в инъекционной форме (ООО «НПК «ФАРМАСО-

ФТ», 50 мг/мл) для внутрибрюшинного (в/б) введения в дозе 100 мг/кг, ежедневно, в течение 3-, 7-, 14-сут. Для каждого анализируемого периода курса (3-и, 7-е, 14-е сут) и для каждого возраста (3, 6, 18 мес) были сформированы группы контроля (курс ежедневных в/б инъекций изотонического раствора (NaCl 0,9%) в соответствии со схемой введения мексидола (9 групп, в каждой $n = 4$) и опытные группы (9 групп, в каждой $n = 6$). Забой животных осуществляли декапитацией под эфирным наркозом через 1 сут после заключительной инъекции.

Иммуноблоттинг использовали для выявления уровня экспрессии белков-маркеров активации микроглиоцитов (Iba1) и астроцитов (GFAP). Iba1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1) высокоспецифично продуцируется микроглией, локализован в цитоплазме, связан с актином, интенсивно экспрессируется при активации микроглии, необходим для миграционной активности [23]. GFAP (glial fibrillary acidic protein) является белком промежуточных филаментов, локализован в цитоплазме, служит маркером зрелых и активированных астроцитов, определяет морфологическую пластичность астроцитов, интенсивно экспрессируется при астроглиальной активации [16]. Синаптофизин определяли как маркер синаптогенеза и функциональной активности астроцитов – главных координаторов синаптической активности [11, 24].

Замороженные в жидком азоте образцы коры головного мозга (КГМ) растирали до порошкообразного состояния. Навески массой 100 мг лизировали на льду в течение 30 мин в охлажденном до 2 °C лизис-буфере (в соотношении 1V ткань: 6V буфер; 50 mM HEPES, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 1% тритон X-100, 10% глицерин, 1 mM дитиотреитол, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM AEBSF, 60 мкг/мл аprotинин, 10 мкг/мл леупептин, 1 мкг/мл пепстатин А) [25]. После центрифугирования (30 мин, 14 000 g, 4 °C) супернатант, содержащий искомые белки, смешивали с загрузочным буфером (4× Laemmli Sample Buffer), инкубировали 5 мин при 95 °C и хранили при –80°C. Концентрацию общего белка в пробах определяли спектрофотометрически по методу Бредфорда. Белки лизата КГМ [25] разделяли в 10% полиакриламидном геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану электроолюцией. Мембрану инкубировали с первичными моноклональными антителами (разведение 1:500; 14 ч; 4 °C; Santa Cruz Biotechnology, США) против Iba1 (sc-32725), GFAP (sc-71143), SYP (sc-136271); вторичными антителами (разведение 1:5000; 1 ч; 4 °C), конъюгированными с пероксидазой хрена (anti-mouse sc-516102). В качестве контроля использовали антитела к акти-

ну (sc-376421). Детектирование белков осуществляли в реакции с ECL-реагентами (Pierce Biotechnology, Inc., США) на пленку фирмы Kodak с последующей денситометрией в программе Adobe Photoshop. О содержании искомым белков судили по плотности окрашивания полосы связывания антител с белком. Результат выражали в относительных денситометрических единицах (ОДЕ).

Иммуногистохимия была использована для идентификации GFAP-положительных астроцитов и Iba1-положительных микроглиоцитов в серийных срезах префронтальной коры (ПФК) головного мозга и гиппокампа. Образцы мозга фиксировали в забуференном 4% параформальдегиде, обезвоживали, заливали в парафин по общепринятой методике, готовили серийные фронтальные срезы толщиной 7 мкм, которые выполняли в ПФК в интервале 4,2-4,7 от брегмы и на уровне гиппокампа в интервале от (-) 2,30 до (-) 2,8 мм от брегмы [26]. Срезы депарафинизировали в ксилоле, регидратировали в спиртах нисходящей концентрации, производили демаскировку антигена кипячением срезов на водяной бане в 0,01М цитратном буфере pH 6,0 в течение 30 мин. Неспецифическое связывание антител блокировали инкубацией в 4% растворе БСА в PBS, содержащем 0,1% тритон X-100, 0,1% NaN₃ в течение 1 ч при 4 °С. После блокирования, срезы инкубировали в течение 14 ч при 4 °С с первичными антителами к GFAP (1:200; Abcam, UK; ab7260), Iba1 (1:200; Abcam, UK; ab178846). После инкубации срезы отмывали в PBS, инкубировали со вторыми антителами (1:500; Abcam, UK; ab150077) 2 ч в темноте при 4 °С. Негативный контроль получали обработкой срезов PBS вместо первичных антител. После инкубации со вторичными антителами, выполняли окрашивание клеточных ядер 4',6-диамидино-2-фенилиндолом, после чего срезы высушивали и заключали под покровное стекло в флуоресцентную монтажную среду (Abcam, UK; ab104135). Для флуоресцентной микроскопии использовали микроскоп OLYMPUS BX51, фотодокументирование осуществляли с помощью камеры OLYMPUS XM10. Для количественного анализа иммуногистохимических препаратов использовали программу VideoTesT-Morphology 5.2 (LLC «VideoTesT», Россия).

Обзорное окрашивание срезов ПФК и гиппокампа гематоксилином и эозином выполняли по стандартной методике с целью оценить морфологическое состояние/количество нейронов и глиальных клеток.

Статистический анализ данных выполняли с помощью программных пакетов Statistica 10,0 (Stat soft Inc., США) с использованием непараметрического рангового U-критерия Уилкоксона (Уилкоксона-Манна-Уит-

ни). Различия между сравниваемыми группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Динамика экспрессии маркеров глиальной активации (GFAP, Iba1) и маркера синаптогенеза (SYP) в КГМ разновозрастных контрольных крыс и при курсовом применении ЭМГП сукцината. Определение уровня экспрессии цитоплазматических высокоспецифических маркеров активации астроцитов (GFAP) и микроглии (Iba1) в лизатах КГМ 3-, 6-, 18-месячных крыс показало, что их содержание возрастзависимо увеличивается (**рис. 1**). У средневозрастных (6-месячных) крыс уровень GFAP увеличивался на 15%, у старых (18-месячных) крыс – на 30% в сравнении с молодыми (3-месячными). Содержание Iba1 также увеличивалось у 6-месячных крыс на 10%, а у 18-месячных крыс – на 20% (**рис. 1 А, В**).

Возрастзависимое увеличение экспрессии маркеров глиальной активации (астроглиальной – GFAP, микроглиальной – Iba1) свидетельствует о прогрессирующей провоспалительной поляризации астро- и микроглиоцитов при старении мозга и согласуется с данными других исследователей [8, 10, 27, 28].

Введение крысам разных возрастов ЭМГП сукцината (100 мг/кг, в/б, 14 сут, ежедневно) сопровождалось снижением уровня GFAP на 20% через 7 сут курса, а Iba1 – на 20% через 14 сут у крыс всех возрастных групп в сравнении с контролем (**рис. 1 А, В**). В литературе широко обсуждается концепция определяющего влияния микроглии в формировании фенотипа астроцитов [14], однако полученные в эксперименте данные о более раннем (на 7-е сут) снижении содержания GFAP в сравнении с Iba1 (на 14-е сут курса) может свидетельствовать о независимой от микроглии сукцинат-опосредованной противовоспалительной трансформации астроглии, экспрессирующей сукцинатный рецептор SUCNR1.

Для оценки функционального состояния астроглии, координирующей образование и поддержание синаптических контактов, при продолжительной стимуляции сукцинат/SUCNR1 сигнализации в мозге проводили определение уровня экспрессии синаптофизина (маркер синаптогенеза) [24].

Было показано, что базовый уровень экспрессии синаптофизина снижался у старых крыс на 25% в сравнении с молодыми и средневозрастными крысами (**рис. 2**). 14-суточное введение ЭМГП сукцината сопровождалось увеличением содержания синаптофизина в КГМ старых крыс до его уровня у 3- и 6-месячных крыс (**рис. 2**). Таким образом, 14-суточный курс ЭМГП сукцината индуцировал транс-

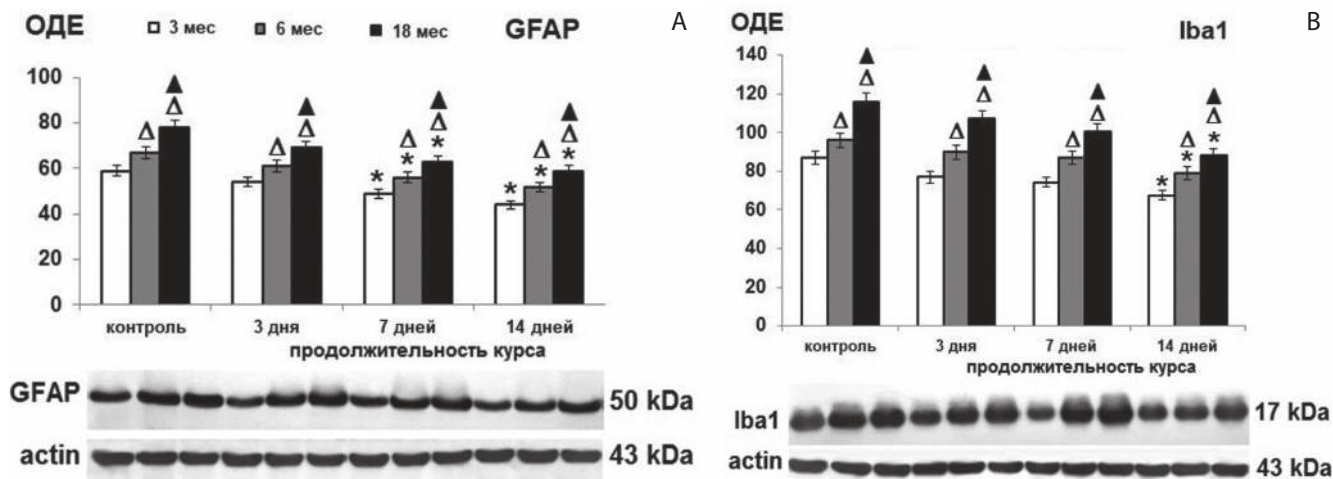


Рис. 1. Базовый уровень экспрессии GFAP (A) и Iba1 (B) и на протяжении курса мексидола (100 мг/кг, в/б, ежедневно) в коре головного мозга 3-, 6-, 18-месячных крыс. Показаны данные денситометрического анализа иммуноблотов. ОДЕ – относительные денситометрические единицы. GFAP – glial fibrillary acidic protein, Iba1 – ionized calcium-binding adapter molecule 1. ▲ – данные отличаются от группы молодых (3-месячных) крыс ($p < 0,01$) в соответствующем временном периоде; ▲ – данные отличаются от группы средневозрастных (6-месячных) крыс ($p < 0,01$) в соответствующем временном периоде; * – данные отличаются от контроля внутри возрастной группы ($p < 0,01$).

Fig. 1. GFAP (A) and Iba1 (B) expression at baseline and during the course of mexidol (100 mg/kg, i.p., daily) in the cerebral cortex of 3-, 6-, and 18-month-old rats. Data of densitometric analysis of immunoblots are shown. The bars show the mean relative densitometric values. GFAP, glial fibrillary acidic protein; Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1. ▲, data differ from the group of young (3-mo-old) rats ($p < 0.01$) in the corresponding time period; ▲, data differ from the group of middle-aged (6-mo-old) rats ($p < 0.01$) in the corresponding time period; *, data differ from controls within the age group ($p < 0.01$).

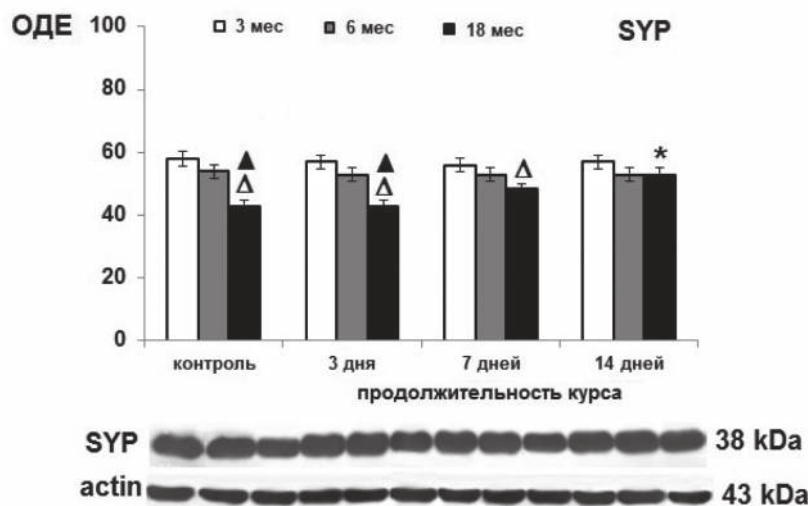


Рис. 2. Базовый уровень экспрессии синаптофизина (SYP) и на протяжении курса мексидола (100 мг/кг, в/б, ежедневно, 14 сут) в коре головного мозга 3-, 6-, 18-месячных крыс. Показаны данные денситометрического анализа иммуноблотов. ОДЕ – относительные денситометрические единицы. ▲ – данные отличаются от группы молодых (3-месячных) крыс ($p < 0,01$) в соответствующем временном периоде; ▲ – данные отличаются от группы средневозрастных (6-месячных) крыс ($p < 0,01$) в соответствующем временном периоде; * – данные отличаются от контроля внутри возрастной группы ($p < 0,01$).

Fig. 2. Synaptophysin (SYP) expression at baseline and during the course of mexidol (100 mg/kg, i.p., daily, 14 days) in the cerebral cortex of 3-, 6-, and 18-month-old rats. Data of densitometric analysis of immunoblots are shown. The bars show the mean relative densitometric values. ▲, data differ from the group of young (3-mo-old) rats ($p < 0.01$) in the corresponding time period; ▲, data differ from the group of middle-aged (6-mo-old) rats ($p < 0.01$) in the corresponding time period; *, data differ from controls within the age group ($p < 0.01$).

формацию стареющей астроглии от воспалительно-нейротоксического к регуляторному/нейропротекторному фенотипу.

Морфологические особенности астро- и микроглии в префронтальной коре головного мозга и гиппокампе разновозрастных контрольных крыс и при курсовом применении ЭМГП сукцината. ПФК и гиппокамп – области мозга наиболее восприимчивые к старению. Известно, что стареющая астро- и микроглия ПФК и гиппокампа приобретает выраженные черты реактивного фенотипа в отличие от других областей мозга [4]. Иммуногистохимическое окрашивание маркеров глиальной активации (астроглиальной – GFAP, микроглиальной – Iba1) на фронтальных срезах ПФК и гиппокампа позволило выявить морфологические отличия астроцитов и микроглии у молодых и старых крыс (рис. 3, 4).

В ПФК морфологические признаки провоспалительной активации микроглии и астроцитов выявлялись уже у 3-месячных крыс, но в еще большей степени отмечались у 18-месячных особей (рис. 3). Наиболее типичными морфологическими особенностями астро- и микроглиоцитов были малочисленные, короткие, расширенные, слаборазветвленные отростки (рис. 3, табл. 1). В целом эти морфологические чер-

ты указывают на провоспалительную поляризацию астро- и микроглиоцитов, описаны у стареющих грызунов, приматов и человека [10, 11, 29–32]. В ПФК количество астроцитов не отличалось у молодых и старых крыс, но численность микроглиоцитов была выше у старых особей (табл. 1). Другими авторами также было показано, что общее количество астроцитов в ЦНС у грызунов, приматов и человека существенно не меняется с возрастом [30].

В гиппокампе астроциты и микроглиоциты имели принципиально другую морфологию (без признаков провоспалительной активации) в сравнении с ПФК: множественные, длинные, тонкие, разветвленные отростки, формирующие перекрывающиеся пространственные домены (рис. 4, табл. 2).

Курс мексидола не влиял на количество астроцитов в исследуемых областях мозга у молодых и старых крыс, но вызывал уменьшение количества микроглиоцитов в ПФК и CA1 поле гиппокампа старых крыс до их численности у молодых особей (табл. 1, 2). Снижение пролиферативной активности микроглии является свидетельством ограничения провоспалительной поляризации, что подтверждается полученными ранее данными по увеличению уровня экспрессии противовоспалитель-

Таблица 1/Table 1

Данные морфометрического анализа иммуногистохимически окрашенных GFAP-положительных астроцитов и Iba1-положительных микроглиоцитов на срезах префронтальной коры головного мозга контрольных крыс 3-месячного и 18-месячного возраста и после 14-дневного курса ЭМГП сукцината, (M±m)

Morphometric data of immunohistochemically stained GFAP-positive astrocytes and Iba1-positive microgliaocytes on sections of the prefrontal cerebral cortex of control rats aged 3 and 18 mos and after a 14-day course of EMHP succinate

| Показатели Indicators | | Астроциты ПФК PFC astrocytes | | | Микроглиоциты ПФК PFC microgliaocytes | | |
|--------------------------|--------------------------------------|--|---|---|--|---|---|
| | | кол-во/мм ² number/mm ² | количество отростков number of processes | длина отростков, мкм length of processes, μm | кол-во/мм ² number/mm ² | количество отростков number of processes | длина отростков, мкм length of processes, μm |
| 3 месяца 3 mos | контроль control | 119±9,5 | 3,5±0,31 | 14±1,9 | 72±5,6 | 4,3±0,42 | 11±0,81 |
| | 14-суточный курс 14-day course | 112±9,8 | 4,7±0,53* | 19±2,1* | 69±6,2 | 5,1±0,56* | 23±2,1* |
| 18 месяцев 18 mos | контроль control | 122±9,6 | 3,8±0,34 | 10±1,4 | 90±7,2 | 3,2±0,26 | 9±1,3 |
| | 14-суточный курс 14-day course | 116±10,1 | 5,2±0,62* | 15±1,9* | 72±5,8* | 4,9±0,45* | 19±2,1* |

Примечание. Измеряли длину отростков первого порядка с высокой GFAP- и Iba1-иммунореактивностью. *p<0,01 – отличия от контроля в соответствующей возрастной группе. ПФК – префронтальная кора.

Note. The length of primary processes with high GFAP and Iba1 immunoreactivity was measured. *, data differ from the control in the corresponding age group (p<0.01). PFC – prefrontal cortex.

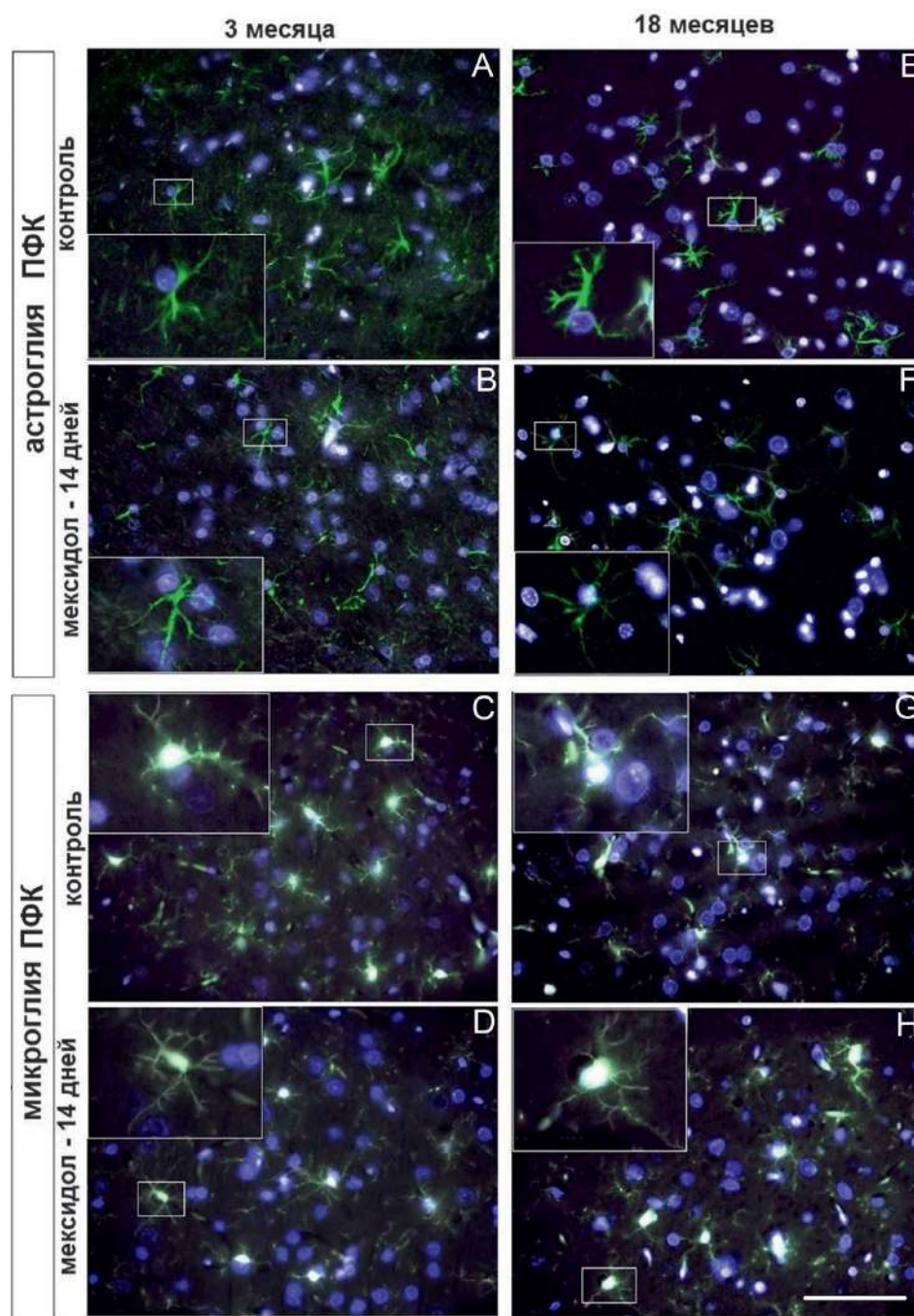


Рис. 3. Микрофотографии GFAP-экспрессирующих астроцитов (A, B, E, F) и Iba1-экспрессирующих микроглиоцитов (C, D, G, H) в ПФК молодых (A, B, C, D) и старых (E, F, G, H) крыс в контроле (A, C, E, G) и после 14-суточного курса ЭМГП сукцината (мексидол; 100 мг/кг, в/б, ежедневно) (B, D, F, H).

Изображения получены совмещением фотографий иммуногистохимически окрашенных GFAP- и Iba1-положительных клеток (астроциты и микроглиоциты, соответственно; зеленый цвет) и фотографий клеточных ядер, окрашенных диамидинофенилиндолом (синий цвет). Объектив $\times 40$. Масштаб 50 мкм.

Fig. 3. Micrographs of GFAP-expressing astrocytes (A, B, E, F) and Iba1-expressing microglia (C, D, G, H) in PFC of young (A, B, C, D) and old (E, F, G, H) control (A, C, E, G) rats and after a 14-day course of EMHP succinate (Mexidol, 100 mg/kg, ip, daily) (B, D, F, H).

The images were obtained by merging photographs of immunohistochemically stained GFAP- and Iba1-positive cells (astrocytes and microglia, respectively; green) and photographs of cell nuclei stained with diaminodiphenylindole (blue). Objective: $\times 40$. Scale bar: 50 μm .

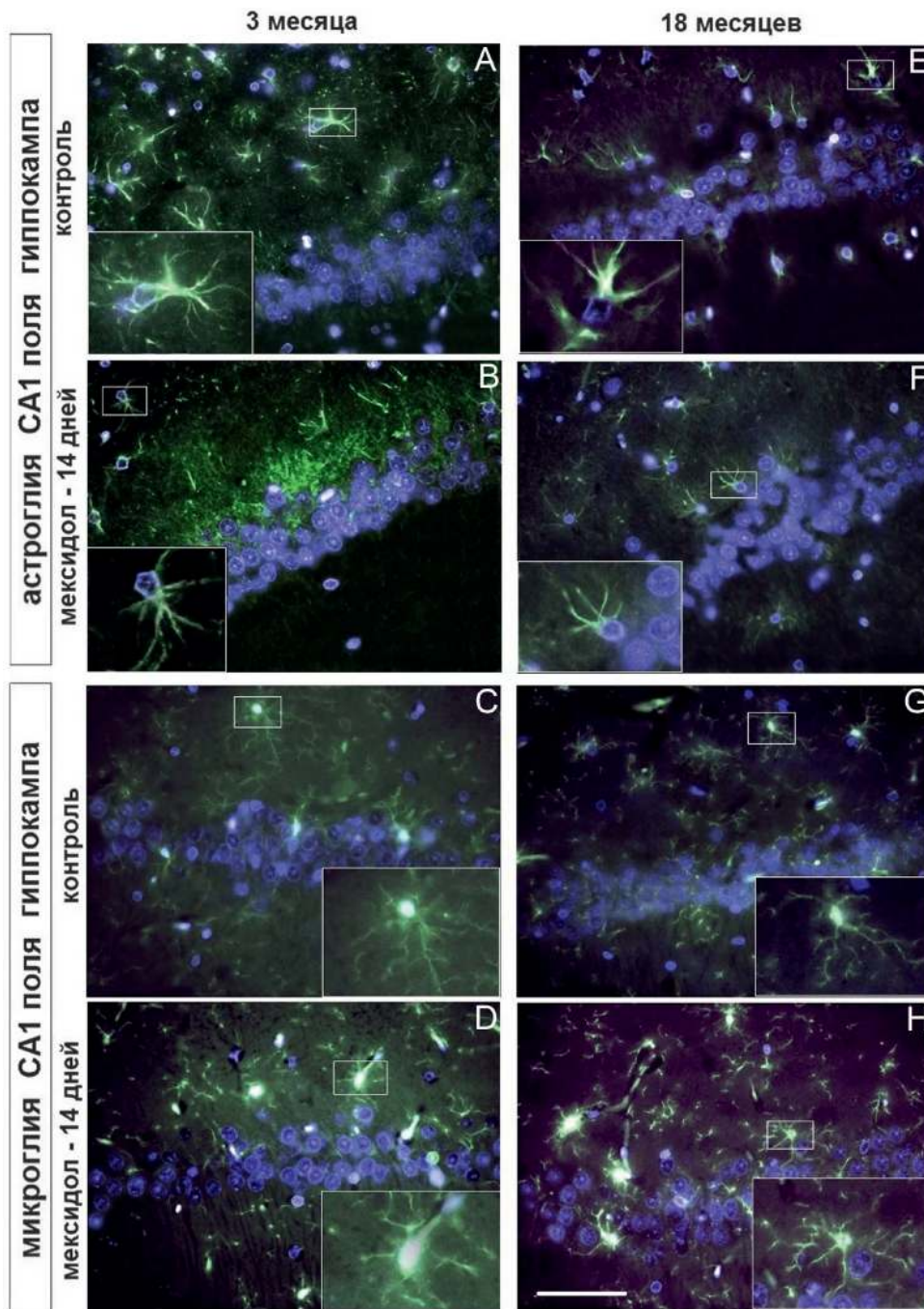


Рис. 4. Микрофотографии GFAP-экспрессирующих астроцитов (A, B, E, F) и Iba1-экспрессирующих микроглиоцитов (C, D, G, H) в гиппокампе (поле СА1) молодых (A, B, C, D) и старых (E, F, G, H) крыс в контроле (A, C, E, G) и после 14-суточного курса ЭМГП сукцината (мексидол; 100 мг/кг, в/б, ежедневно) (B, D, F, H). Изображения получены совмещением фотографий иммуногистохимически окрашенных GFAP- и Iba1-положительных клеток (астроциты и микроглиоциты, соответственно; зеленый цвет) и фотографий клеточных ядер, окрашенных диамидинофенилиндолом (синий цвет). Объектив $\times 40$. Масштаб 50 мкм.

Fig. 4. Micrographs of GFAP-expressing astrocytes (A, B, E, F) and Iba1-expressing microglia (C, D, G, H) in the hippocampus (field CA1) of young (A, B, C, D) and old (E, F, G, H) rats in control (A, C, E, G) and after a 14-day course of EMHP succinate (Mexidol; 100 mg/kg, ip, daily) (B, D, F, H).

The images were obtained by merging photographs of immunohistochemically stained GFAP- and Iba1-positive cells (astrocytes and microglia, respectively; green) and photographs of cell nuclei stained with diamidinophenylindole (blue). Objective: $\times 40$. Scale bar: 50 μm .

ных микроглиальных маркеров (CD206, TGF- β 1, BDNF) при курсовом применении ЭМГП сукцината [20].

Важно отметить, что в ПФК количество астроцитов превышало количество микроглиоцитов (отношение составило 1,7 у молодых и 1,4 у старых крыс), и, в еще большей степени, в СА1 поле гиппокампа (отношение составило 2,4 у молодых и 1,9 у старых крыс). По данным литературы снижение количества микроглиоцитов и полное истощение микроглии в мозге с помощью ингибитора рецептора колониестимулирующего фактора (CSFIR) улучшало морфологию астроцитов, синаптическую активность и когнитивные функции у старых животных [33]. Выявленное нами у молодых и старых крыс более высокое количество микроглиоцитов в ПФК в сравнении с гиппокампом может отчасти объяснить более выраженные морфологические черты провоспалительного фенотипа глиоцитов в ПФК.

Курс мексидола увеличил в ПФК и СА1 области гиппокампа количество и длину первичных отростков глиоцитов, а также их разветвленность (количество отростков второго и более высоких порядков) (рис. 3, 4; табл. 1, 2).

Выявленная индукция нейропротективного А2-фенотипа астроглии при продолжительной стимуляции сукцинат/SUCNR1 сигнализации (14-суточный курс мексидола, 100 мг/кг, в/б) позволяет предположить два

регуляторных механизма: опосредованный микроглией и независимый от микроглии.

По данным литературы микроглия оказывает определяющее влияние на морфофункциональное состояние астроцитов. Известно, что микроглиальные провоспалительные цитокины TNF- α , IL-1 β индуцируют нейротоксический А1-фенотип [4, 14, 34], а микроглиальная down-регуляция рецептора P2Y₁ астроцитов – нейропротективный А2-фенотип [35]. Поэтому, в качестве эффективного подхода в коррекции астроглиоза была предложена модуляция состояния микроглии [14, 36]. Собственные данные показали индукцию противовоспалительного М2-фенотипа микроглии в стареющем мозге при курсовом применении мексидола [20]. Таким образом, нейропротективная поляризация астроцитов при курсовом применении ЭМГП сукцината может быть опосредована микроглиальной регуляцией.

Астроциты экспрессируют сукцинатный рецептор, активация которого вызывает астроглиальные кальциевые колебания [37]. Известно, что кальциевая сигнализация связана с активацией протеинкиназы С, митоген-активируемой протеинкиназы (МАПК) и МАПК-зависимых процессов (клеточная миграция, пролиферация, спраутинг эндотелиальных клеток и аксонов). В настоящее время доказано стимулирующее влияние сукцинат/SUCNR1 сигнализации в цере-

Таблица 2/ Table 2

Данные морфометрического анализа иммуногистохимически окрашенных GFAP-положительных астроцитов и Iba1-положительных микроглиоцитов на срезах гиппокампа (поле СА1) контрольных крыс 3-месячного и 18-месячного возраста и после 14-дневного курса ЭМГП сукцината, ($M \pm m$)

Morphometric data of immunohistochemically stained GFAP-positive astrocytes and Iba1-positive microglia on sections of the hippocampus (field CA1) of control rats aged 3 and 18 mos and after a 14-day course of EMHP succinate

| Показатели Indicators | | Астроциты гиппокампа (СА1 поле) Hippocampal astrocytes (CA1 field) | | | Микроглиоциты гиппокампа (СА1) Hippocampal microglia (CA1 field) | | |
|-----------------------------|----------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| | | кол-во/мм ² number/mm ² | количество отростков number of processes | длина отростков, мкм length of processes, μ m | кол-во/мм ² number/mm ² | количество отростков number of processes | длина отростков, мкм length of processes, μ m |
| 3 месяца 3 mos | контроль control | 149 \pm 12 | 4,6 \pm 0,41 | 18 \pm 1,6 | 61 \pm 4,9 | 5,4 \pm 0,71 | 17 \pm 1,1 |
| | 14-суточн. курс 14-day course | 156 \pm 11 | 5,4\pm0,48* | 24\pm2,2* | 54 \pm 4,7 | 7,6\pm0,76* | 23\pm1,4* |
| 18 месяцев 18 mos | контроль control | 146 \pm 13 | 4,5 \pm 0,35 | 15 \pm 1,4 | 78 \pm 6,2 | 5,1 \pm 0,73 | 16 \pm 1,3 |
| | 14-суточн. курс 14-day course | 142 \pm 10 | 5,3\pm3,92* | 18\pm1,6* | 63\pm5,1* | 6,9\pm0,98* | 21\pm1,6* |

Примечание. Измеряли длину отростков первого порядка с высокой GFAP- и Iba1-иммунореактивностью. * – данные отличаются от контроля в соответствующей возрастной группе ($p < 0,01$).

Note. The length of primary processes with high GFAP and Iba1 immunoreactivity was measured. *, data differ from the control in the corresponding age group ($p < 0.01$).

бральном ангиогенезе и активации аксонального роста [19, 38]. Морфологическое сходство между процессами сукцинат/SUCNR1-зависимого роста аксонов, нейритов, отростков активированных эндотелиальных клеток может предполагать аналогичный механизм в основе разрастания отростков астро- и микроглиальных клеток в присутствии сукцината.

Данные обзорного окрашивания срезов префронтальной коры мозга и гиппокампа разновозрастных контрольных крыс и при курсовом применении ЭМГП сукцината. Обзорное окрашивание гематоксилин-эозином срезов ПФК и гиппокампа разновозрастных контрольных крыс и после 14-суточного курса мексидола позволило выполнить подсчет и морфологическую оценку состояния нейронов и глиальных клеток [39]. В ПФК и гиппокампе молодых и старых контрольных крыс и после 14-суточного курса мексидола были выявлены нормохромные нейроны. Явления нейрональной дегенерации (конденсированные ядра, эозинофильная цитоплазма) не были обнаружены. Количество нейронов снижалось в исследуемых областях мозга у старых особей ($272 \pm 21/\text{мм}^2$ ПФК, $396 \pm 35/1\text{мм}^2$ CA1) по сравнению с молодыми ($312 \pm 23/\text{мм}^2$ ПФК, $459 \pm 37/\text{мм}^2$ CA1), что широко описано в литературе и является типичной характеристикой стареющего мозга [40].

Признаки глиальной активации были выявлены в ПФК молодых и старых крыс в виде увеличения количества клеток с гиперхромным базофильным ядром и отчетливыми эозинофильными отростками.

Идентификация и подсчет клеток реактивной глиии были выполнены с помощью иммуногистохимического окрашивания (см. выше). Количество гиперхромных клеток реактивной глиии снижалось в ПФК после 14-суточного курса ЭМГП сукцината как у молодых, так и старых особей, что подтверждает формирование противовоспалительного/нейрорепаративного фенотипа астро- и микроглиоцитов.

Заключение

Исследование было направлено на изучение церебральных эффектов сукцинат/SUCNR1 сигнализации. Представления о сигнальной роли сукцината в мозге, сформированные после открытия сукцинатного рецептора SUCNR1 в 2004 г., ограничиваются данными о стимуляции ангиогенеза в условиях гипоксии/ишемии [22].

В наших более ранних исследованиях [41] было впервые показано, что продолжительная стимуляция сукцинатной сигнализации (8-, 14-, 20-дневные курсы этилметилгидроксипиридина сукцината, 100 мг/кг, в/б, ежедневно) вызывает увеличение экспрессии

сукцинатного рецептора SUCNR1 и маркеров биогенеза митохондрий (PGC-1 α , NRF1, TFAM, NDUFB2, SDHA, сyt b, COX2, ATP5A), активацию митохондриогенеза в коре головного мозга у молодых, средневозрастных и старых крыс. Выявленный эффект мог быть опосредован регуляторным фенотипом микроглии, конститутивно экспрессирующей сукцинатный рецептор SUCNR1 и, таким образом, представляющей в ЦНС первичную мишень сукцинатной сигнализации.

Последующие исследования [20], выполненные методом иммуноблоттинга, показали, что у 18-месячных старых крыс с явлениями хронического умеренного церебрального воспаления курсовое 14-суточное введение ЭМГП сукцината (100 мг/кг, в/б, ежедневно) вызывало увеличение уровня экспрессии противовоспалительных маркеров регенераторного M2-фенотипа микроглии (CD206, BDNF, TGF- β 1) до их уровня у 6-месячных крыс, что свидетельствует о вовлечении сукцинатной сигнализации в механизмы противовоспалительной поляризации микроглии, экспрессирующей сукцинатный рецептор.

В представленной работе методом иммуногистохимического окрашивания маркеров глиальной активации (астроглиальной – GFAP, микроглиальной – Iba1) было показано, что у старых крыс в префронтальной коре головного мозга микроглиоциты и астроциты характеризуются чертами провоспалительного фенотипа (малочисленные, короткие, слаборазветвленные отростки). Курсовое введение ЭМГП сукцината (100 мг/кг, в/б, ежедневно, 14 дней) вызывало исчезновение морфологических признаков провоспалительного фенотипа астроцитов и микроглиоцитов в ПФК, а также формирование морфологических черт регуляторного/нейропротекторного глиального фенотипа. Данные иммуногистохимии были подтверждены вестерн-блот-анализом, показавшим, что уровни экспрессии GFAP и Iba1 уменьшались в коре головного мозга старых крыс на протяжении курса мексидола.

Данные работы согласуются с исследованиями влияния мексидола на процессы обучения и памяти, нарушенные у старых мышей. Показано, что ЭМГП сукцинат, улучшает как обучение, так и хранение и воспроизведение информации, увеличивает продолжительность жизни животных [42].

Полученные данные впервые продемонстрировали, что церебральная сукцинат/SUCNR1 сигнализация вовлечена в механизмы противовоспалительной поляризации астроцитов и микроглиоцитов – главных клеточных типов, опосредующих воспаление, окислительный стресс и нейродегенерацию при нормальном и патологическом старении мозга.

Литература

(п.п. 1-17; 19; 21–40 см. References)

18. Литвиненко И.В., Красаков И.В., Бисага Г.Н., Скулябин Д.И., Полтавский И.Д. Современная концепция патогенеза нейродегенеративных заболеваний и стратегия терапии. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2017; 6(2): 3–10. DOI: 10.17116/jnevro2017117623-10
20. Кирова Ю.И., Шакова Ф.М., Воронина Т.А. Этилметилгидроксипиридина сукцинат индуцирует противовоспалительную поляризацию микроглии в мозге стареющих крыс. *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*. 2022; 39(1): 44–53.
41. Кирова Ю.И., Шакова Ф.М., Германова Э.Л., Романова Г.А., Воронина Т.А. Влияние Мексидола на церебральный митохондриогенез в молодом возрасте и при старении. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020; 120(1): 62–9. DOI: 10.17116/jnevro202012001162
42. Воронина Т.А. Геропротективные эффекты этилметилгидроксипиридина сукцината в экспериментальном исследовании. *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020; 120(4): 81–7. DOI: 10.17116/jnevro202012004181

References

1. Kigerl K.A., Gensel J.C., Ankeny D.P., Alexander J.K., Donnelly D.J., Popovich P.G. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci*. 2009; 29: 13435–44.
2. Amici S.A., Dong J., Guerau-de-Arellano M. Molecular mechanisms modulating the phenotype of macrophages and microglia. *Front. Immunol*. 2017; 8: 1520.
3. Arranz A.M., Strooper B.D. The role of astroglia in Alzheimer's disease: pathophysiology and clinical implications. *Lancet Neurol*. 2019; 18: 406–14.
4. Matias I., Morgado J., Gomes F.C.A. Astrocyte heterogeneity: impact to brain aging and disease. *Front. Aging Neurosci*. 2019; 11: 59.
5. Codeluppi S.A., Chatterjee D., Prevot T.D., Bansal Y., Misquitta K.A., Sibille E., Banasr M. Chronic stress alters astrocyte morphology in mouse prefrontal cortex. *Intern J Neuropsychopharm*. 2021; 24(10): 842–53.
6. Meldolesi J. Astrocytes: News about Brain Health and Diseases. *Bio-medicines*. 2020; 8: 394.
7. Peteri U.K., Niukkanen M., Castren M.L. Astrocytes in neuropathologies affecting the frontal cortex. *Front Cell Neurosci*. 2019; 13: 44.
8. Salas I.H., Burgado J., Allen N.J. Glia: victims or villains of the aging brain? *Neurobiology of Disease*. 2020; 143: 105008.
9. Siracusa R., Fusco R., Cuzzocrea S. Astrocytes: role and functions in brain pathologies. *Front Pharmacol*. 2019; 10: 1114.
10. Palmer A.L., Ousman S.S. Astrocytes and aging. *Front. Aging Neurosci*. 2018; 10: 337.
11. Pan J., Ma N., Yu B., Zhang W., Wan J. Transcriptomic profiling of microglia and astrocytes throughout aging. *J Neuroinflamm*. 2020; 17: 97.
12. Clarke L.E., Liddel S.A., Chakraborty C., Müncha A.E., Heiland M., Barres B.A. Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *PNAS*. 2018; 115(8): E1896–E1905.
13. Verkhatsky A., Rodrigues J.J., Pivoriunas A., Zorec R., Semyanov A. Astroglial atrophy in Alzheimer's disease. *Pflugers Archiv. Eur J Physiol*. 2019; 471(10): 1247–61.
14. Liddel S.A., Guttenplan K.A., Clarke L.E., Bennett F.C., Bohlen C.J., Schirmer L., et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017; 541: 481–87.
15. Gomes F.C.A., Paulin D., Neto V.M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res*. 1999; 32(5): 619–31.
16. Jurga A.M., Paleczna M., Kadluczka J., Kuter K.Z. Beyond the GFAP-astrocyte protein markers in the brain. *Biomolecules*. 2021; 11: 1361.
17. Messing A., Brenner M. GFAP at 50. *ASN Neuro*. 2020; 12: 1759091420949680.
18. Litvinenko I.V., Krasakov I.V., Bisaga G.N., Skulyabin D.I., Poltavsky I.D. Modern conception of the pathogenesis of neurodegenerative diseases and therapeutic strategy. *Zhurnal neurologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2017; 6(2): 3–10. (in Russian). DOI: 10.17116/jnevro2017117623-10
19. Krzak G., Willis C.M., Smith J.A., Pluchino S., Peruzzotti-Jametti L. Succinate receptor 1: An emerging regulator of myeloid cell function in inflammation. *Trends Immunol*. 2021; 42(1): 45–58.
20. Kirova Y.I., Shakova F.M., Voronina T.A. Ethylmethylhydroxypyridine succinate induces anti-inflammatory polarization of microglia in the brain of aging rat. *Biologicheskie membrany: Zhurnal membrannoy i kletchnoy biologii*. 2022; 39(1): 44–53. (in Russian)
21. Jurga A.M., Paleczna M., Kuter K.Z. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Front. Cell Neurosci*. 2020; 14: 198.
22. Hamel D., Sanchez M., Duhamel F., Roy O., Honore J.-C., Noueihed B., et al. G-Protein-Coupled Receptor 91 and succinate are key contributors in neonatal postcerebral hypoxia-ischemia recovery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34: 285–93.
23. Hovens I.B., Nyakas C., Schoemaker R.G. A novel method for evaluating microglial activation using ionized calcium-binding adaptor protein-1 staining: cell body to cell size ratio. *Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2014; 1(2): 82–8.
24. Shan L., Zhang T., Fan K., Cai W., Liu H. Astrocyte-neuron signaling in synaptogenesis. *Front. Cell Dev. Biol*. 2021; 9: 680301.
25. Baghirova S., Hughes B.G., Hendzel M.J., Schulz R. Sequential fractionation and isolation of subcellular proteins from tissue or cultured cells. *MethodsX*. 2015; 2: 440–5.
26. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego; Academic Press; 1998.
27. Brenner M., Messing A. Regulation of GFAP expression. *ASN Neuro*. 2021; 13: 1–32.
28. Jiang C.T., Wu W.F., Deng Y.H., Ge J.W. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke. *Molecular Medicine Reports*. 2020; 21: 2006–18.
29. Angelova D.M., Brown D.R. Microglia and the aging brain: are senescent microglia the key to neurodegeneration? *J. Neurochem*. 2019; 151: 676–88.
30. Popov A., Brazhe A., Denisov P., Sutyagina O., Li L., Lazareva N., et al. Astrocyte dystrophy in ageing brain parallels impaired synaptic plasticity. *Aging Cell*. 2021; 20: e13334.
31. Robillard K.N., Lee K.M., Chiu K.B., MacLean A.G. Glial cell morphological and density changes through the lifespan of rhesus macaques. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2016; 55: 60–9.
32. Valles S.L., Iradi A., Aldasoro M., Vila J.M., Aldasoro C., Torre J., et al. Function of glia in aging and the brain diseases international. *J Med Sci*. 2019; 16(11): 1473–79.

33. Elmore M.R.P., Najafi A.R., Koike M.A., Dagher N.N., Spangenberg E.E., Rice R.A., et al. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron*. 2014; 82: 380–97.
34. Rothhammer V., Borucki D.M., Tjon E.C., Takenaka M.C., Chao C.-C., Ardura-Fabregat A. Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature*. 2018; 557: 724–28.
35. Shinozaki Y., Shibata K., Yoshida K., Shigetomi E., Gachet C., Ikenaka K., et al. Transformation of astrocytes to a neuroprotective phenotype by microglia via P2Y1 receptor downregulation. *Cell Rep*. 2017; 19: 1151–64.
36. Song G.J., Suk K. Pharmacological modulation of functional phenotypes of microglia in neurodegenerative diseases. *Front. Aging Neurosci*. 2017; 9: 139.
37. Molnar T., Dobolyi A., Nyitrai G., Barabas P., Heja L., Emri Z., et al. Calcium signals in the nucleus accumbens: activation of astrocytes by ATP and succinate. *BMC Neuroscience*. 2011; 12: 96.
38. Cherif H., Duhamel F., Cecyre B., Boucard A., Quintal A., Chemtob S., et al. Receptors of intermediates of carbohydrate metabolism, GPR91 and GPR99, mediate axon growth. *PLoS Biol*. 2018; 16(5): e2003619.
39. Garman R.H. Histology of the central nervous system. *Toxicologic Pathology*. 2011; 39: 22-35.
40. Smith D.E., Roberts J., Gage F.H., Tuszynski M.H. Age-associated neuronal atrophy occurs in the primate brain and is reversible by growth factor gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 10893–8.
41. Kirova Y.I., Shakova F.M., Germanova E.L., Romanova G.A., Voronina T.A. The effect of mexidol on cerebral mitochondriogenesis at a young age and during aging. *Biologicheskie membrany: Zhurnal membrannoy i kletchnoy biologii*. 2020; 120(1): 62-9. (in Russian). DOI: 10.17116/jnevro202012001162
42. Voronina T.A. Geroprotective effects of ethylmethylhydroxypyridine succinate in an experimental study. *Zhurnal nevrologii i psikhatrii imeni S.S. Korsakova*. 2020; 120(4): 81-7. (in Russian). DOI: 10.17116/jnevro202012004181

Сведения об авторах:

Кирова Юлия Игоревна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы, e-mail: bioenerg@mail.ru;

Терехина Ольга Леонидовна, науч. сотр. лаб. регуляции репаративных процессов;

Шакова Фатима Мухамедовна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей патологии нервной системы.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-005.98+611.813+616-005.4-092.9

Макарьева Л.М.¹, Авдеев Д.Б.¹, Акулинин В.А.^{1,2}, Степанов С.С.¹, Коржук М.С.^{1,3}, Шоронова А.Ю.¹

Проявления гипер- и дегидратации нервной ткани полей CA1 и CA3 гиппокампа после непродолжительной окклюзии и пережатия общих сонных артерий

¹ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, 644099, Омск, Россия, ул. Ленина, д. 12;²ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет» им. П.А. Столыпина, 644008, Омск, Россия, Институтская площадь, д. 1;³Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, Россия, ул. Академика Лебедева, д. 6, литера «В»

Цель работы – изучение структурных изменений нейрон-глиальных взаимоотношений и морфометрическая характеристика процесса отёка-набухания структур полей CA₁ и CA₃ гиппокампа крыс после окклюзии и перевязки общих сонных артерий.

Методика. На белых крысах Wistar моделировали одностороннюю и двустороннюю окклюзию (ООСА) и перевязку (ПОСА) общих сонных артерий. У животных 1-й группы моделировали одностороннюю ООСА (30 мин, $n=30$), у животных 2-й и 3-й групп – двустороннюю ООСА, 20 и 40 мин соответственно ($n=30$ в каждой группе). В 4-й группе применяли ПОСА ($n=30$). Для морфологического исследования использовали гистологические (окраска гематоксилин-эозином и по Нисслю), иммуногистохимические (MAP-2, GFAP) и морфометрические методы исследования. На препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, с помощью плагина программы ImageJ 1.53 (Find Foci) оценивали различные параметров яркости и распределения пикселей изображения. Реакции на MAP-2 и GFAP использовали для верификации клеток. Проверку статистических гипотез проводили в программе Statistica 8.0 с помощью непараметрических критериев Shapiro-Wilk W-test, Mann-Whitney U-test, Wilcoxon Matched Pairs Test, ANOVA Kruskal-Wallis и ROC анализа.

Результаты. Установлено, что после ООСА и ПОСА в гиппокампе появлялось большое количество гетероморфных ярких зон отёка-набухания с высокой общей интенсивностью пикселей в пике. Максимальное их количество отмечено после ПОСА в течение всего периода наблюдения. После ООСА степень гидратации нейропиля статистически значимо изменялась (группа 2-я – $p=0,03$; группа 3-я – $p=0,0003$), уменьшаясь через 14 и 30 сут наблюдения. У животных 1-й группы преобладали умеренные обратимые проявления отёка-набухания, в группах 2-й, 3-й и 4-й на фоне нормохромных нейронов выявлены различные сочетания набухших, темных сморщенных и несморщенных отростков дендритов/перикарионов, проявления отёка периваскулярных и принейрональных отростков астроцитов. По мере увеличения степени тяжести ишемии выявлялись признаки гипергидратации астроцитарного компартмента и дегидратации нейронов. При этом в 1-й, 2-й и 3-й группах сохранялись функционально значимые возможности восстановления большей части темных нейронов и астроглии. После ПОСА происходил срыв механизмов оттока жидкости по астроцитам, формировались крупные полости со свободной жидкостью и разрушенным GFAP-позитивным цитоскелетом. Это сопровождалось дисфункцией астроцитов и, как следствие, необратимой дегидратацией и прижизненной дегенерацией темных нейронов CA₁ и CA₃ (пикноморфные с гомогенизацией).

Заключение. После ООСА и ПОСА структурно-функциональная реорганизация нейронов полей CA₁ и CA₃ гиппокампа происходила на фоне гипергидратации нейропиля, перинейрональных и периваскулярных пространств (ножки астроцитов). Крайняя степень вариации этих проявлений отмечалась после ПОСА, что свидетельствовало о дисфункции и гибели большого количества астроцитов в результате чрезмерного отёка их отростков вблизи пикноморфных нейронов. При ООСА длительное сохранение признаков отёка-набухания не сопровождалось выраженной необратимой гибелью темных нейронов, большая часть этих нейронов восстанавливалась параллельно с восстановлением астроцитов. Поэтому в этих группах сохранение признаков отёка-набухания целесообразно рассматривать как условие для реализации механизмов саногенеза нервной ткани – её детоксикации.

Ключевые слова: ишемия; CA₁ и CA₃ гиппокампа; тёмные нейроны; отёк-набухание; морфометрия; иммуногистохимия; крысы Wistar

Для цитирования: Макарьева Л.М., Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Степанов С.С., Коржук М.С., Шоронова А.Ю., Проявления гипер- и дегидратации нервной ткани полей CA₁ и CA₃ гиппокампа после непродолжительной окклюзии и пережатия общих сонных артерий. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1): 17–27.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.17-27

Участие авторов: разработка концепции эксперимента — Коржук М.С.; эксперимент, уход за животными, забор материала, приготовление препаратов — Макарьева Л.М.; эксперимент, фотографирование препаратов, создание базы данных — Авдеев Д.Б.; эксперимент, забор материала, написание текста — Акулинин В.А.; морфометрический и информационно-математический анализ, написание текста, иллюстративный материал — Степанова С.С.; эксперимент, уход за животными, забор материала — Шоронова А.Ю. Обсуждение результатов исследования — все соавторы.

Для корреспонденции: Авдеев Дмитрий Борисович, e-mail: avdeev86@inbox.ru

Финансирование. Данная работа выполнена при поддержке Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК» №14 от 15.12.2017 г. и внутреннего гранта ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» № 574.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.10.2020

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Makarjeva L.M.¹, Avdeev D.B.¹, Akulinin V.A.^{1,2}, Stepanov S.S.¹, Korzhuk M.S.^{1,3}, Shoronova A.Yu.¹

Manifestations of hyper- and dehydration of the nervous tissue of the fields CA1 and CA3 of the hippocampus after variable and permanent occlusions of the common carotid arteries

¹Omsk State Medical University,

Lenina St. 12, Omsk 644099, Russian Federation;

²P.A. Stolypin Omsk State Agrarian University,

Institutskaya Ploshchad 1, Omsk 644008, Russian Federation;

³S.M. Kirov Military Medical Academy,

Academika Lebedeva St. 6, 194044, St. Petersburg, Russian Federation

Aim. To study structural changes in neuron-glial relationships and to provide a morphometric description of swelling of structures in the CA1 and CA3 fields of the rat hippocampus 1, 3, 7, 14, and 30 days after variable (VOCA) and permanent occlusions (POCA) of the common carotid arteries.

Methods. Four groups of sexually mature Wistar rats were studied: group I (30-min unilateral VOCA, $n=30$), group II (20-min bilateral VOCA, $n=30$), group III (40-min bilateral VOCA, $n=30$), Group IV (POCA, $n=30$). Histological (hematoxylin-eosin and Nissl staining), immunohistochemical (MAP-2, GFAP), and morphometric methods were used. On preparations stained with hematoxylin-eosin, using plug-ins of the ImageJ 1.53 (Find Foci) software, various parameters of brightness and distribution of image pixels were evaluated. Reactions for MAP-2 and GFAP were used for cell verification. Statistical hypotheses were tested with Statistica 8.0 software using nonparametric Shapiro-Wilk W test, Mann-Whitney U test, Wilcoxon Matched Pairs test, Kruskal-Wallis ANOVA, and ROC analysis.

Results. After VOCA and POCA, a large number of heteromorphic bright zones of edema swelling appeared in the hippocampus with a high overall pixel intensity at the peak. The maximum number of these zones was noted after POCA during the entire observation period. After VOCA, the degree of neuropil hydration significantly changed (group II, $p=0.03$; group III, $p=0.0003$), decreasing after 14 and 30 days of observation. In group I, moderate reversible swelling prevailed, and in groups II, III, and IV, against the background of normochromic neurons, various combinations of swollen, dark, non-wrinkled, and wrinkled processes of dendrites/perikaryons, and edema of the perivascular and near-neuronal processes of astrocytes were evident. As the severity of ischemia increased, signs of hyperhydration of the astrocytic compartment and dehydration of neurons became evident. In groups I, II, and III, functionally significant possibilities for restoration of most of the dark neurons and astroglia remained. After POCA, the mechanisms of fluid outflow through astrocytes were disrupted. Large cavities with free fluid and a destroyed GFAP-positive cytoskeleton were formed. This was accompanied by dysfunction of astrocytes and, as a result, by irreversible dehydration and intravital degeneration of CA1 and CA3 dark neurons (pycnomorphic with homogenization).

Conclusion. After VOCA and POCA, the structural and functional reorganization of neurons in the CA1 and CA3 fields of the hippocampus was associated with hyperhydration of the neuropil and the perineuronal and perivascular spaces (peduncles of astrocytes). The extreme degree of variation of these manifestations was noted after POCA, which indicated dysfunction and death of a large number of astrocytes as a result of excessive swelling of their processes near pycnomorphic neurons. In the VOCA groups, prolonged swelling was not accompanied by pronounced, irreversible death of dark neurons. Most of these neurons recovered in parallel with the restoration of astrocytes. Therefore, in the VOCA groups, the persistence of swelling should be considered primarily as a condition for engaging the sanogenesis mechanisms in the nervous tissue, i.e., its detoxification.

Keywords: ischemia; CA1 and CA3 of the hippocampus; dark neurons; edema swelling; morphometry; immunohistochemistry; Wistar rats

For citation: Makarjeva L.M., Avdeev D.B., Akulinin V.A., Stepanov S.S., Korzhuk M.S., Shoronova A.Yu. Manifestations of hyper- and dehydration of the nervous tissue of the fields CA1 and CA3 of the hippocampus after variable and permanent occlusions of the common carotid arteries. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(1): 17–27. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.17-27

Author's contribution: development of the concept of the experiment – Korzhuk M.S.; experiments, animal care, collection of material, making preparations – Makarieva L.M.; experiments, illustrative material, photographing preparations, database creation, discussions – Avdeev D.B.; experiments, material collection, text writing – Akulinin V.A.; morphometric and information and mathematical analysis, text writing – Stepanov S.S.; experiments, animal care, material collection – Shoranova A.Yu. Discussion of research results – all authors.

For correspondence: **Dmitry B. Avdeev**, candidate of veterinary science, senior lecturer of the department of histology, cytology and embryology, «Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Omsk State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation», e-mail: avdeev86@inbox.ru

Financing. This work was supported by the Innovation Promotion Fund under the program “UMNIK” No. 14 dated December 15, 2017 and an internal grant of The Omsk state medical University № 574.

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

Information about the authors:

Makarieva L.M., <https://orcid.org/0000-0002-1133-6541>

Avdeev D.B., <https://orcid.org/0000-0003-4976-7539>

Akulinin V.A., <https://orcid.org/0000-0001-6097-7970>

Stepanov S.S., <https://orcid.org/0000-0003-0741-3337>

Received 12.10.2020

Accepted 20.01.2022

Published 15.03.2022

Введение

Гиппокамп является основной частью архикортекса головного мозга млекопитающих, хорошо изучен и продолжает изучаться в силу особой роли для социальной коммуникации. Важность изучения именно гиппокампа обусловлена его участием в таких ключевых функциях головного мозга как когнитивные, память, эмоции, ориентация в пространстве [1, 2]. Совместно с зубчатой извилиной, субикулумом, пресубикулумом, парасубикулумом и энторинальной корой, (которые представляют парагиппокамповую область) формируется гиппокампальная формация (ГФ) [3–5]. Зубчатая извилина обеспечивает основной вход сенсорной информации от энторинальной коры в гиппокампальную формацию, осуществляя первый этап обработки, и передаёт результат в поле CA_3 , а затем – CA_1 гиппокампа [3].

Отёк-набухание является стандартным ответом нервной ткани головного мозга практически на любое патогенное воздействие, сопровождающееся гипоксией, интоксикацией и нарушением микроциркуляции. Механизмы развития гидропической дистрофии хорошо изучены и продолжают изучаться на молекулярном уровне. Основной причиной нарушения распределения воды в повреждённой нервной ткани являются: энергетический дефицит, дисфункция механизмов ионного гомеостаза, нарушение функции астроцитов и микрососудов [6–10].

Структурные проявления отёка-набухания описаны у экспериментальных животных и человека во всех отделах головного мозга, включая и гиппокамп [11]. При ишемии превалирует цитотоксический отёк-набухание головного мозга [12]. Набухание нейронов со-

провождается увеличением их размеров, растворением нуклеопротеиновых комплексов (хроматофильное вещество Ниссля), гиперхромией и смещением ядра нейрона. Развитие отёка проявляется просветлением цитоплазмы, появлением светлых пространств и вакуолей. При необратимой гидропической дистрофии сохраняются ядра, но полностью разрушаются цитоплазматические органеллы [13].

Однако неизвестно, как на развитие отёка-набухания в гиппокампе влияет продолжительность периода неполной ишемии и при каких гидропических изменениях начинаются нейродегенеративные процессы – патогенетический компонент, а при каких происходит преимущественно защита нервной ткани – саногенетический компонент. Необходимо сравнительное гистологическое и морфометрическое исследование проявлений отёка-набухания половозрелых белых крыс в норме, после окклюзии разной продолжительности (20-, 30-, 40 мин) и перевязки общих сонных артерий. Эти модели неполной ишемии в совокупности позволяют изучать роль градаций её воздействия на ГФ [14]. В настоящем исследовании акцент будет сделан на изучение проявлений отёка-набухания на уровне CA_1 и CA_3 .

Методика

Экспериментальная работа выполнена в ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», одобрена этическим комитетом вуза (протоколы № 83 от 14.10.2016; № 107 от 02.10.2018; № 112 от 26.09.2019; № 123 от 09.10.2020). Для изучения гиппокампа использовали аутобредных половозре-

лых крыс Wistar (самцы масса 250–350 г), которых до и после эксперимента содержали в соответствии со стандартами лабораторных условий. Моделирование острой ишемии осуществляли руководствуясь «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.77 № 755) и рекомендациями Международного комитета по науке о лабораторных животных, поддержанных ВОЗ, директивой Европейского Парламента № 2010/63/EU от 22.09.10 «О защите животных, используемых для научных целей».

Выбор моделей был основан на подборе неравноценных по продолжительности и тяжести процесса неполной ишемии головного мозга. Использовали одно-, двустороннюю окклюзию (ООСА) и перевязку (ПОСА) общих сонных артерий. ООСА проводили в течение 30 мин (группа I, $n=30$, односторонняя), 20 мин (группа II, $n=30$, двусторонняя) и 40 мин (группа III, $n=30$, двусторонняя). Группу IV составили животные после ПОСА ($n=30$, двусторонняя). Таким образом, все животные распределились по мере возрастания тяжести ишемии, что позволило провести оценку влияния роли продолжительности неполной ишемии на ее исход. Контролем служили интактные животные без манипуляций на общих сонных артериях ($n=6$). Для анестезии использовали препарат Zoletil 100 (10 мг/кг), содержащий в качестве действующих веществ тилетамин гидрохлорид и золазепам гидрохлорид. Забор материала проводили также под наркозом. Через 1, 3, 7, 14 и 30 сут после окклюзии и перевязки артерий. Головной мозг крыс ($n=6$, на срок в каждой группе) фиксировали путём последовательной перфузии (100–125 мл раствора 0,9% NaCl + 5000 единиц фрагмина) и 30 мл 4% раствора параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,2–7,4). Черепную коробку вскрывали через 1,5–2 ч, извлекали головной мозг и переносили его в аналогичный охлажденный фиксатор (холодильник, +4 °С). С помощью автомата «STP 120» полученный материал заключали в гомогенизированный парафин (HISTOMIX®). Серийные фронтальные срезы (толщина 4 мкм) готовили на микротоме HM 450 (Thermo), на уровне от (-) 2,40 до (-) 3,36 мм от Bregma (расположение основных структур гиппокампа) [15].

Изучали поля CA₁ и CA₃ гиппокампа. На препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, по Нисслию, при иммуногистохимическом выявлении специфических белков MAP-2 и GFAP проводили идентификацию нейронов и астроцитов. Общую оценку пирамидных нейронов, а также их тинкториальные изменения

проводили на препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином и Нисслию, цитоскелета – в реакции на MAP-2 и GFAP.

MAP-2 (ab32454) – кроличьи поликлональные антитела, разведение 1 мкг/мл (Abcam, США); GFAP (PA0026) – мышинные моноклональные антитела, клон GA5 (Bond Ready-to-Use Primary Antibody; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). После реакции с первичными антителами срезы инкубировали с вторичными антителами, для их визуализации использовали мультимерный набор Novolink™ (хромоген DAB – 3,3'-диаминобензидин; Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания).

Препараты фотографировали на микроскопе Leica DM 1000 (масляная иммерсия, объектив ×100), цифровые изображения – на камере GXCAM-DM800 Unique Wrap-Around 8MP AUTOFOCUS USB, pixel size 1,4×1,4 μm), изображение сохраняли в файлах с расширением tiff (2592×1944 пикселей). Далее использовали стандартные настройки (баланса белого, яркости, контраста при разрешении 600 пикс/дюйм). Для оценки степени гидратации нервной ткани гиппокампа изучали срезы, окрашенные гематоксилин-эозином. На каждый срок отбирали по 30 случайно выбранных полей зрения. На этих полях зрения выделяли области интереса (ROI) – участки нейропиля размером (20×20 мкм), формировали стеки (100 ROI), рассчитывали среднее значение для каждого животного и срока. Далее сравнивали вариационные ряды ($n=20–30$ значений на срок). Дальнейшее морфометрическое исследование осуществляли с использованием программы ImageJ 1.53c. На гистограммах черно-белых изображений (32 бит; 600 пикселей/дюйм) оценивали распределение пикселей по степени их яркости. Выявляли яркие зоны нейропиля, соответствующие максимальной гидратации. Применяли плагин «Morphological Filters» из пакета «MorphoLibJ» и плагин «Find Foci» (набор программ *GDSC ImageJ* для анализа микроскопических изображений) [<https://imagej.nih.gov/ij/>]. Плагин «Find Foci» позволил разделить каждую ROI на пики, отличающиеся по размерам и степени яркости, дать им количественную оценку. Для этого использовали интегральный показатель «общая интенсивность пикселей в пике» – произведение размера пика в пикселях на среднюю яркость пикселей в пике [16].

Проверку статистических гипотез осуществляли непараметрическими критериями (Shapiro-Wilk W-test, Mann-Whitney U-test, Wilcoxon Matched Pairs Test, ANOVA Kraskel-Wallis) и ROC-анализа с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft). Количественные данные в исследовании представлены как медиана

(Me – 50% квартиль, Q2) и интерквартильный разброс (Q1-Q3 – 25–75% квартили), процентная доля (%) самых ярких пиков (зоны отёка-набухания). Учитывались выбросы и экстремальные значения (Min-Max). Проблема множественного сравнения решалась путём использования ANOVA Kraskel-Wallis [17].

Результаты и обсуждение

В полях CA₁ и CA₃ гиппокампа животных контрольной и экспериментальных групп выявили сложную структурную композицию взаимосвязанных пирамидных нейронов и астроцитов (рис. 1). Наиболее тесный физический контакт отмечался между отростками нейронов и астроцитов в нейропиле молекулярного и полиморфного слоёв гиппокампа (рис. 1, а, б). Цитоархитектоника CA₁ и CA₃ имеет свои особенности, обусловленные размерами и плотностью укомплектования перикарионов, организацией дендритных деревьев. При реакции на MAP-2 в молекулярном слое поля CA₃ отчётливо верифицировался *stratum lucidum* (рис. 1, б; 4 б), образованный апикальными дендритами пирамидных нейронов и гигантскими терминалями мшистых волокон из зубчатой извилины. Для поля CA₁ характерен выраженный *stratum radiatum*, представленный прямыми дендритами пирамидных нейронов. Менее всего между CA₁ и CA₃ различался *stratum lacunosum moleculare* и полиморфный слой (рис. 1, а). Отростки астроцитов этих полей располагались между отростками нейронов в нейропиле, вокруг перикарионов пирамидных нейронов и микрососудов (рис. 1, в, г).

Таким образом, отмечена изначальная структурная гетероморфность полей CA₁ и CA₃. Наиболее схожими были *stratum lacunosum moleculare* и полиморфный слой. Качественная оценка состояния нервной ткани гиппокампа показала появление после ООСА и ПОСА типичных ишемических изменений всех типов клеток, которые хорошо описаны в литературе [14, 17]. На срезах гиппокампа у контрольных животных встречались единичные тёмные сморщенные клетки (в 2–3 полях зрения из 30), немногочисленные проявления перичеселлюлярного (ПЦО) и периваскулярного (ПВО) отёка. Подобная морфологическая картина была характерна также для группы I и II. Однако, даже после односторонней ООСА ишемические изменения затрагивали существенно больше полей зрения (6–15 полей зрения из 30), чем в контроле, появлялись явные признаки диффузно-очаговой де- и гипергидратации, а также реакции нейроглиальных клеток. При этом, как и в контроле, в общей массе преобладали нормохромные и несморщенные тёмные нейроны (рис. 2, а, б).

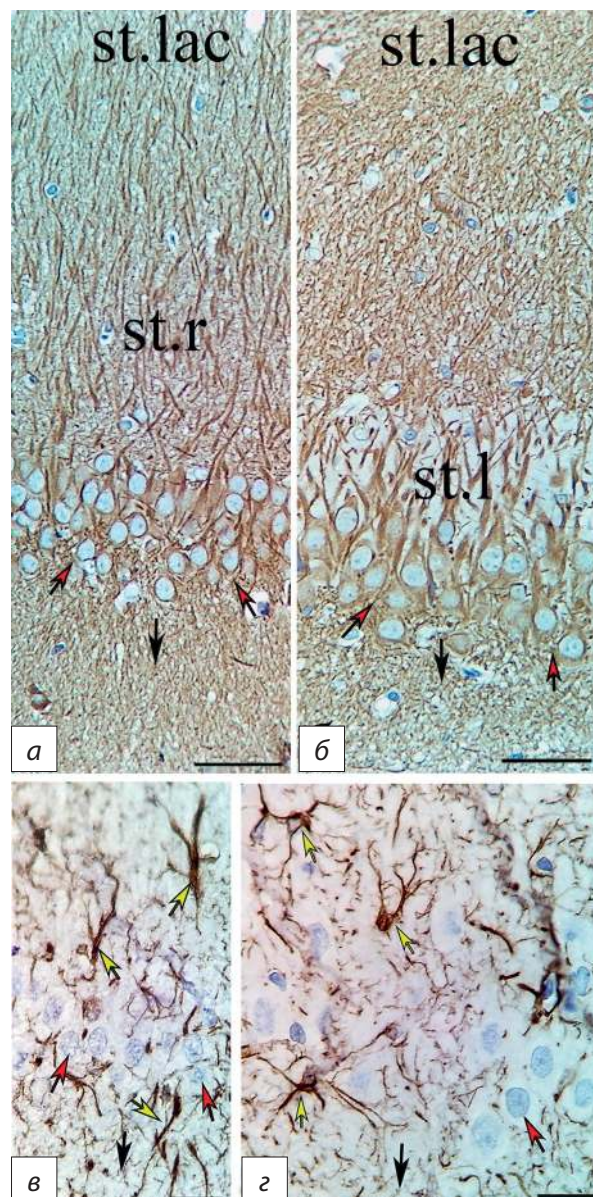


Рис. 1. Фрагменты полей CA₁ (а, в) и CA₃ (б, г) гиппокампа животных контрольной группы: нормохромные пирамидные нейроны (красные стрелки) с равномерным плотным заполнением перикариона и дендритов MAP-2, астроциты (жёлтые стрелки) верифицируются как GFAP-позитивные клетки с отростками (в виде доменов). Черные стрелки – указывают расположение полиморфного слоя, st.r – *stratum radiatum* CA₁, st.l – *stratum lucidum* CA₃, st.lac – *stratum lacunosum moleculare*. Иммуногистохимическая реакция на MAP-2 (а, б) и GFAP (в, г), дополнительная окраска гематоксилином. Объектив: ×40 (а, б) и ×100 (в, г), шкала: 50 мкм (а, б) и 20 мкм (в, г).

Fig. 1. Fragments of fields CA₁ (a, в) and CA₃ (б, г) of the hippocampus of rats of the control group. Normochromic pyramidal neurons (red arrows) with uniform dense filling of the perikaryon and MAP-2 dendrites. Astrocytes (yellow arrows) verified as GFAP-positive cells with processes in the form of domains; black arrows, location of the polymorphic layer; st.r – *stratum radiatum* CA₁; st.l – *stratum lucidum* CA₃; st.lac – *stratum lacunosum moleculare*. Immunohistochemical reaction for MAP-2 (a, б) and GFAP (в, г), additional staining with hematoxylin. Objective: ×40 (a, б) and ×100 (в, г). Scale: 50 μm (a, б) and 20 μm (в, г).

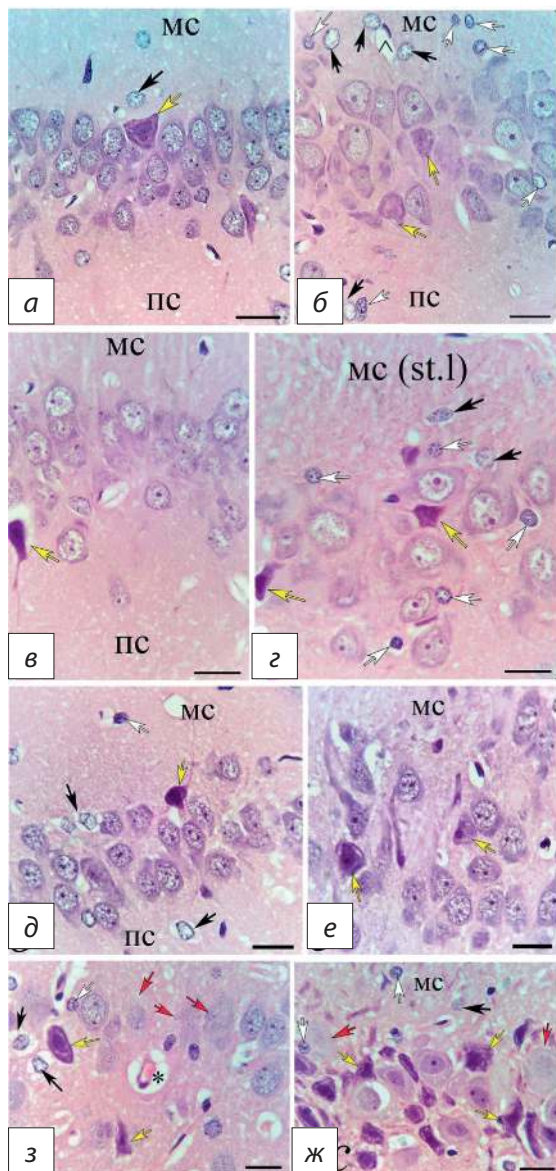


Рис. 2. Фрагменты полей CA₁ (а, в, д, з) и CA₃ (б, г, е, ж) гиппокампа животных группы 1-й (а, б), 2-й (в, г), 3-й (д, е) и 4-й (з, ж) через 1 сут после ООСА (а-е) и ПОСА (з-ж): в группах I-III преобладание нормохромных нейронов, единичные тёмные нейроны, незначительные проявления отёка-набухания; в группе IV (ж) много тёмных нейронов (жёлтые стрелки), появляются гипохромные нейроны (красные стрелки) с признаками гомогенизации, выраженные проявления отёка-набухания перикариона и перичеселлюлярного отёка, чёрные стрелки – астроциты, белые стрелки – олигодендроциты с признаками отёка-набухания. Окраска гематоксилин-эозином. Объектив: ×100, шкала: 20 мкм.

Fig. 2. Fragments of fields CA₁ (a, в, д, з) and CA₃ (б, г, е, ж) of the hippocampus of animals of groups I (a, б), II (в, г), III (д, е), and IV (з, ж) 1 day after OSA (a-e) and POCA (з-ж): in groups I-III, the predominance of normochromic neurons, single dark neurons, slight manifestations of edema-swelling; in group IV there are many dark neurons (yellow arrows), hypochromic neurons (red arrows) appear with signs of homogenization, pronounced manifestations of edema-swelling of the perikaryon and pericellular edema, black arrows are astrocytes, white arrows are oligodendrocytes with signs of edema-swelling. Hematoxylin-eosin staining. Objective: ×100, scale: 20 micron.

При моделировании более тяжёлой ишемии (группы III и IV) уже через 1 сут реактивные и дегенеративные изменения затрагивали половину полей зрения (15–20 из 30). Особенно это было характерно для животных группы IV. Через 1 сут после ПОСА в полях CA₁ и CA₃ кроме скоплений различных тёмных нейронов выявляли гипохромные нейроны с признаками гомогенизации, выраженные проявления отёка-набухания перикариона и перичеселлюлярного отёка (рис. 2, з, ж). Вероятно, это свидетельствовало о необратимых некротических изменениях нейронов [13].

В группе IV (более тяжёлая ишемия) даже через 30 сут сохранялись гипохромные нейроны с признаками гомогенизации, выраженные проявления отёка-набухания перикариона и перичеселлюлярного отёка (рис. 3, в, г).

Через 3 сут в группах II, III и IV отмечено преобладание дегенеративно изменённых нейронов, много тёмных нейронов отмечалось через 7 и 14 сут на фоне высокой сохранности систем межнейронной коммуникации и цитоскелета соседних нейронов (рис. 4).

С помощью плагина Find Foci установлено, что в постишемическом периоде процессы де- и гипергидратации нервной ткани отражались на гистограммах изображений сдвигом среднего значения яркости пикселей в двух противоположных направлениях: для фона – уменьшением значений (потемнение – дегидратация), для зон отёка-набухания – увеличением яркости (просветление – гипергидратация – отёк-набухание) (рис. 5).

По данным ROC анализа, на основании определения AUC (93% ДИ: 0,87–0,96; $p=0,001$) и порога отсечения (яркость 220 и 226), легко верифицировать структуры нейропиля 1) без признаков набухания, 2) с признаками набухания и 3) отёка-набухания. При этом чувствительность метода составила 83,2–90,0 (95% ДИ). Установлено, что в нейропиле CA₁ и CA₃ гиппокампа пики изображения (32-бит) с максимумом яркости <200 соответствовали фону, 200–210 не имели признаков набухания, 211–225 – соответствовали проявлениям набухания (просветление дендритов, терминалей синапсов, мелких отростков астроцитов), >226 – проявлениям отёка (периваскулярные, перичеселлюлярные, крупные отростки и тела отёчных астроцитов).

Морфометрический анализ нейропиля гиппокампа с помощью плагина Find Foci показал, что через 1 сут после ООСА и ПОСА происходило перераспределение пиков изображения нейропиля по интегральному показателю – общей интенсивности пикселей (рис. 6). На рисунке показаны первые 4 наиболее ярких пика (яркость 1 – 2 – 3 – 4 по убыванию) из 20 исследованных в каждой группе. Максимально яркие пики (яр-

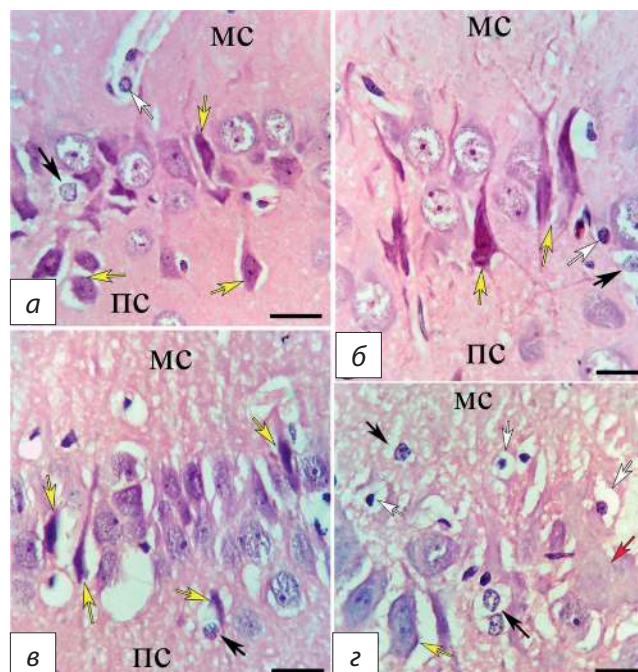


Рис. 3. Фрагменты полей CA_1 (а, в) и CA_3 (б, з) гиппокампа животных группы II (а, б) и IV (в, з) через 3 (а, б) и 30 (в, з) сут после ООСА (а-б) и ПОСА (в-з): преобладание дегенеративно изменённых нейронов, много тёмных нейронов (жёлтые стрелки), сохраняются гипохромные нейроны с признаками гомогенизации (красные стрелки), выраженные проявления отёка-набухания перикариона и перичеселлярного отёка, черные стрелки – астроциты, белые стрелки – олигодендроциты с признаками отёка-набухания. Окраска гематоксилин-эозином. Объектив: $\times 100$, шкала: 20 мкм.

Fig. 3. Fragments of fields CA_1 (a, b) and CA_3 (b, z) of the hippocampus of animals of groups II (a, b) and IV (v, z) 3 (a, b) and 30 (v, z) days after OSA (a-b) and POCA (v, z): the predominance of degeneratively altered neurons, many dark neurons (yellow arrows), hypochromic neurons with signs of homogenization persist (red arrows), pronounced manifestations of edema-swelling of the perikaryon and pericellular edema, black arrows – astrocytes, white arrows – oligodendrocytes with signs of edema-swelling. Hematoxylin-eosin staining. Objective: $\times 100$, scale: 20 micron.

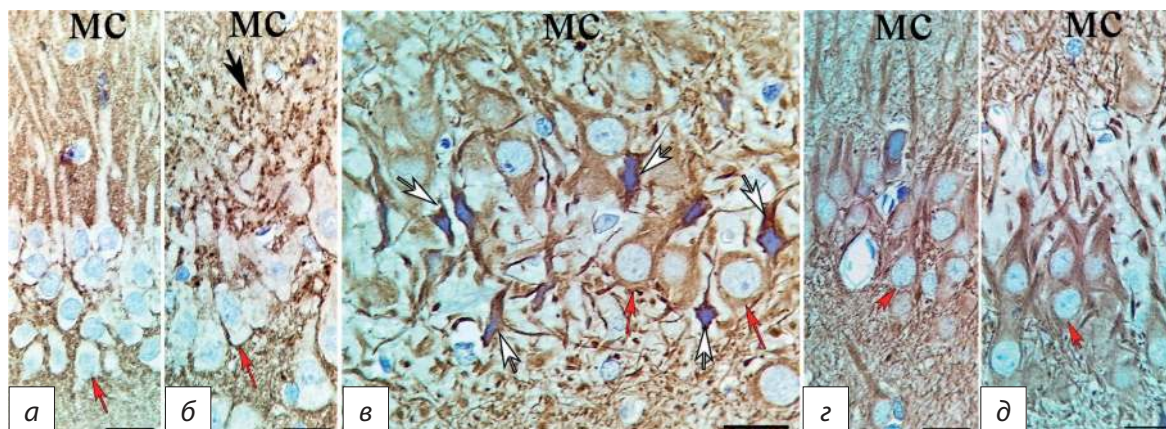


Рис. 4. Фрагменты полей CA_1 (а, з) и CA_3 (б, в, д) гиппокампа животных группы II через 7 сут после ООСА: высокая плотность меток (синаптофизин) синаптических терминалей в *stratum lucidum* CA_3 (б, чёрная стрелка), очаг сморщенных тёмных нейронов с дегидратированной цитоплазмой (белые стрелки) и периваскулярным отёком. МС – молекулярный слой, красные стрелки – тела пирамидных нейронов. Иммуногистохимическая реакция на синаптофизин (а, б) и MAP-2 (в, з, д), дополнительная окраска гематоксилином. Объектив: $\times 100$, шкала: 20 мкм.

Fig. 4. Fragments of fields CA_1 (a, z) and CA_3 (b, v, d) of the hippocampus of animals of group II 7 days after OSA: high density of marks (synaptophysin) of synaptic terminals in the *stratum lucidum* CA_3 (b, black arrow), focus of shriveled dark neurons with dehydrated cytoplasm (white arrows) and perivascular edema. MS, molecular layer; red arrows, bodies of pyramidal neurons. Immunohistochemical reaction for synaptophysin (a, b) and MAP-2 (v, z, d), additional staining with hematoxylin. Objective: $\times 100$, scale: 20 micron.

кость 1 и 2) отмечены в группе IV. Для этой группы характерно наличие значительного разброса показателя для всех степеней яркости. В группе I со слабой ишемией очень ярких пиков, соответствующих отеку-набуханию не выявлено.

Таким образом, через 1 сут после односторонней ОО-СА мы не выявили признаков отёка-набухания, однако статистически значимое снижение общей интенсивности пикселей для менее ярких пиков свидетельствовало о начальных признаках перераспределения связанной жидкости в дендритах. Дегидратация нейронов и их отростков, вероятно, приводила к появлению темных нейронов без сморщивания. То есть, после лёгкой ишемии, даже, если и перераспределение жидкости происходило, его трудно было зарегистрировать с помощью использованного метода анализа гистограмм изображения нейропиля. Во всех других группах содержание ярких пикселей (порог отсека более 211) статистически значимо увеличивалось (рис. 6). Мы полагаем, что это было связано

с выраженным набуханием (яркость 211–225) и даже отёком нейропиля (> 226). При этом появлялись пики, в которых максимальные значения яркости отдельных пикселей достигали 240–255. Тем не менее, показатель общей интенсивности пикселей в пиках в большей степени зависел от размера пика и в меньшей степени – от средней яркости пикселей. Между размером пиков и средней яркостью его пикселей выявлены слабые положительные связи ($r=0,35-0,45$; корреляционный анализ по Спирмену). То есть, проявления отёка-набухания после ОО-СА и ПОСА зависели в основном не от степени гидратации, а от объёма связанных с ним структур нейропиля (дендриты, синапсы, астроциты).

Оценка общей интенсивности пикселей в наиболее ярких пиках (1 – 2 – 3 – 4) показала, что для морфометрической характеристики проявлений отёка-набухания достаточно данных о динамике самых ярких пиков (1). Ниже на графиках представлен сравнительный анализ изменения общей интенсивности пикселей имен-

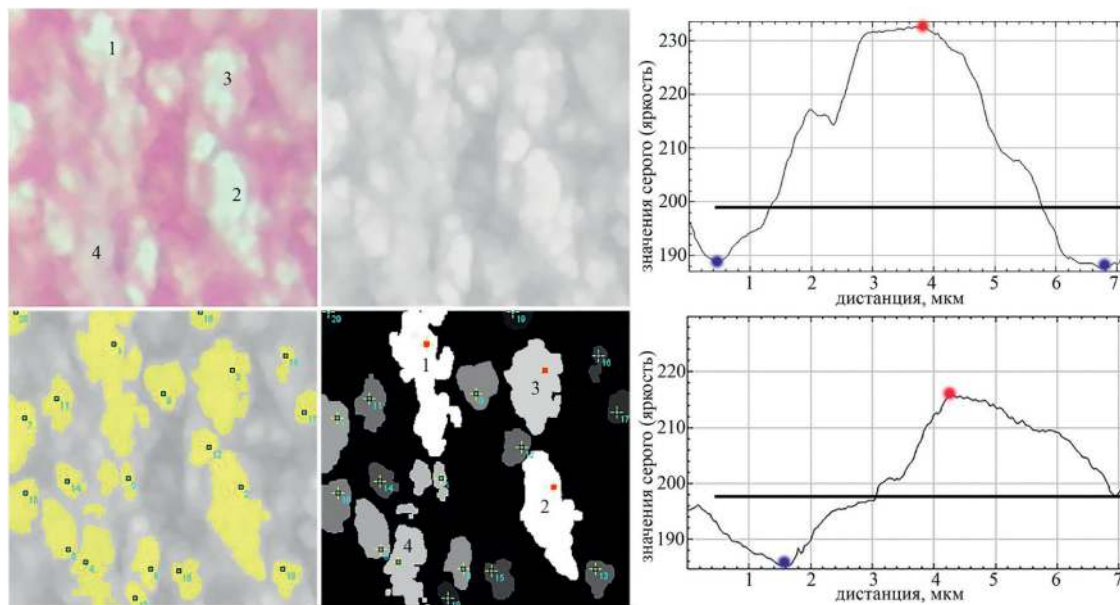


Рис. 5. Последовательные этапы анализа изображения ROI (90000 пикс; 20x20 мкм) нейропиля (исходное, 32-бит, все пики, пики по оттенкам серого), содержащего участок молекулярного слоя поля CA₁ крысы из группы IV (рис. 2, в), через 30 сут. Красные квадраты – максимально яркие пиксели 3- из 20 пиков с наибольшей общей интенсивностью. Гистограммы отражают распределение пикселей пика «1» (яркого) и «4» (бледного: линии (яркость около 200) отсекают пиксели фона (ниже) и зон просветления (выше) нейропиля. Красные точки – максимально яркие (235) пиксели зон отёка набухания, синие – минимальные значения (180) яркости пикселей фона. Окраска гематоксилин-эозином, объектив ×100. Трансформирование и анализ пиков ROI с помощью плагина Find Foci.

Fig. 5. Sequential stages of analysis of the ROI image (90 000 pixels; 20x20 micron) of a neuropil (initial, 32-bit, all peaks, peaks in grayscale), containing a section of the molecular layer of the CA₁ field of a rat from group IV (Fig. 2, c), through 30 days. Red squares are the brightest pixels of 3 out of 20 peaks with the highest overall intensity. Histograms reflect the distribution of pixels of peak “1” (bright) and “4” (pale): lines (brightness of about 200) cut off the background pixels (below) and areas of enlightenment (above) of the neuropil. Red dots are the brightest (235) pixels of swelling edema zones, blue – minimum brightness values (180) of background pixels. Hematoxylin-eosin staining, ×100 lens. Transformation and analysis of ROI peaks using the Find Foci plug-in.

но таких пиков (рис. 7). Установлено, что после ООСА и ПОСА распределение статистически значимо скошено вправо в сторону образования крупных ярких пиков. Максимальное их количество отмечено после ПОСА. При этом ПОСА приводила к стабильно высокому проявлению гипергидратации ($H=7,4; p=0,1$) в течение всего периода наблюдения, а после ООСА степень гидратации нейропиля статистически значимо изменялась (группа II – $p=0,03$; группа III – $p=0,0003$) (рис. 7).

У животных группы I преобладали умеренные обратимые проявления отёка-набухания, а в группах II, III и IV после острой ишемии на фоне нормохромных нейронов выявлены различные комбинации сочетания набухших, темных несморщенных и сморщенных (штопорообразных) отростков дендритов/перикарионов, проявления отёка периваскулярных и принейрональных отростков астроцитов (рис. 8).

Проведённые сравнения, анализ и синтез полученного материала позволили сделать некоторые обобщения,

касающиеся закономерностей де- и гипергидратации гиппокампа после непродолжительной ООСА и ПОСА. Показанные на рисунке 8 переходы от незначительных изменений нейронов по типу набухания (через 1 сут после односторонней ООСА) до выраженных проявлений отёка-набухания (через 30 сут после ПОСА) можно трактовать как последовательный, до определённого момента сбалансированный, процесс обмена жидкости между основными её компартаментами. После односторонней ООСА отмечалась в основном гипергидратация нейронального компартамента (рис. 8, а). По мере увеличения степени тяжести ишемии выявлялись признаки гипергидратации астроцитарного компартамента и дегидратации нейронов (рис. 8, б, в). При этом в группах I, II и III, вероятно, сохранялись потенциальные возможности структурно-функционального восстановления большей части темных нейронов и астроглии. После ПОСА происходил срыв механизмов оттока жидкости по астроцитам,

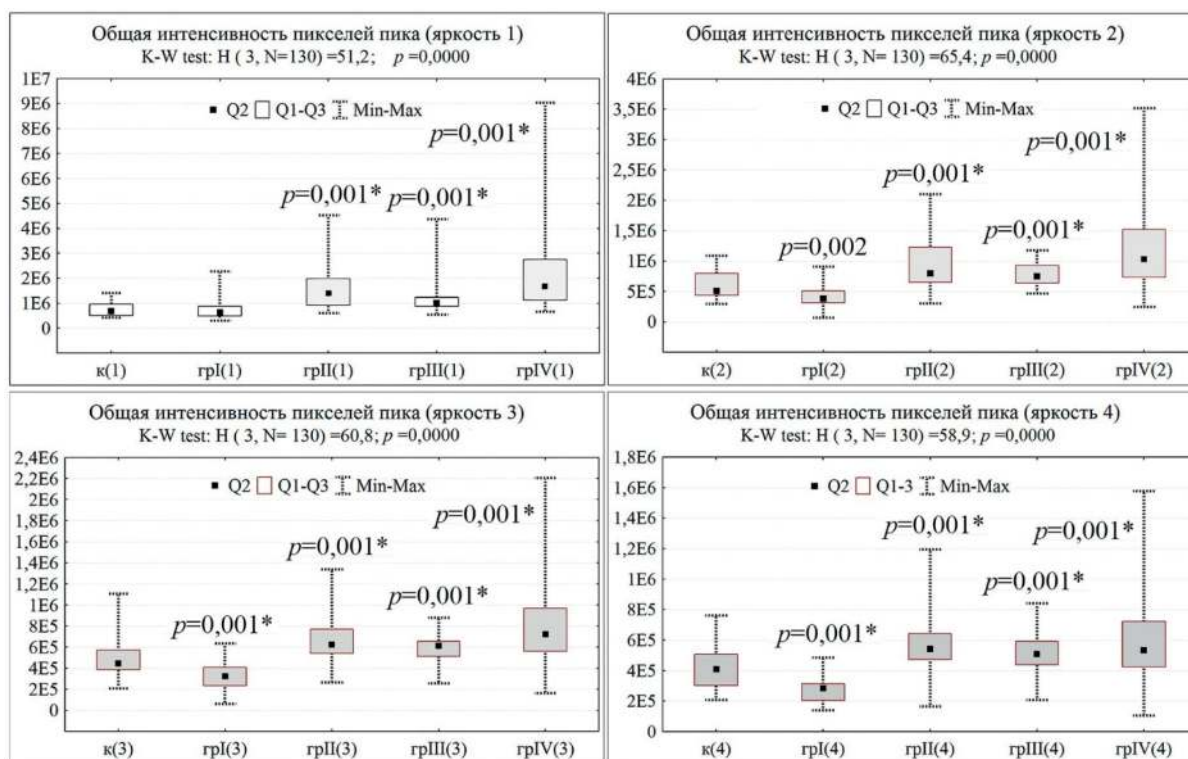


Рис. 6. Общая интенсивность пикселей (ось ординат) в наиболее ярких пиках (1 – 2 – 3 – 4) полей зрения (ROI=90 000 пикселей, $n=30$) *stratum lacunosum* молекулярного слоя полей CA_1 и CA_3 у животных групп I, II, III и IV через 1 сут после ООСА и ПОСА. Данные представлены как Q2 (Q1-Q3), диапазон без выбросов (усы).

Fig. 6. Total intensity of pixels (ordinate axis) in the brightest peaks (1-2-3-4) of the visual fields (ROI=90 000 pixels, $n=30$) of the *stratum lacunosum* of the molecular layer of the CA_1 and CA_3 fields in animals of groups I, II, III and IV 1 day after OSA and POCA. Data are presented as Q2 (Q1-Q3), range without outliers (whiskers).

формировались крупные полости со свободной жидкостью. Это сопровождалось дисфункцией астроцитов, как следствие, необратимой дегидратацией и сморщиванием темных нейронов (пикноморфные с гомогенизацией).

Известно, что острая ишемия приводит к повреждению и отрыву отростков астроцита с образованием замкнутых полостей, прогрессированию отёка-набухания и неизбежной гибели нейронов.

Заключение

Таким образом, после перевязки общей сонной артерии необратимо повреждается система естественной защиты и восстановления ишемически изменённых пирамидных нейронов полей CA₁ и CA₃ гиппокампа – микродренажная функция астроцитов. Дегенерация цитоскелета астроцитарных отростков, их длительный отёк вокруг нейронов и микрососудов вызывают необратимое повреждение и гибель нейронов по механизмам вторичной ишемии – сдавливание капилляров, энергетический дефицит, нарушение глутамат-глутаминового цикла и ионного гомеостаза, активация некроза и апоптоза [13]. Поэтому мы полагаем, что проявления де- и гипергидратации гиппокампа по-

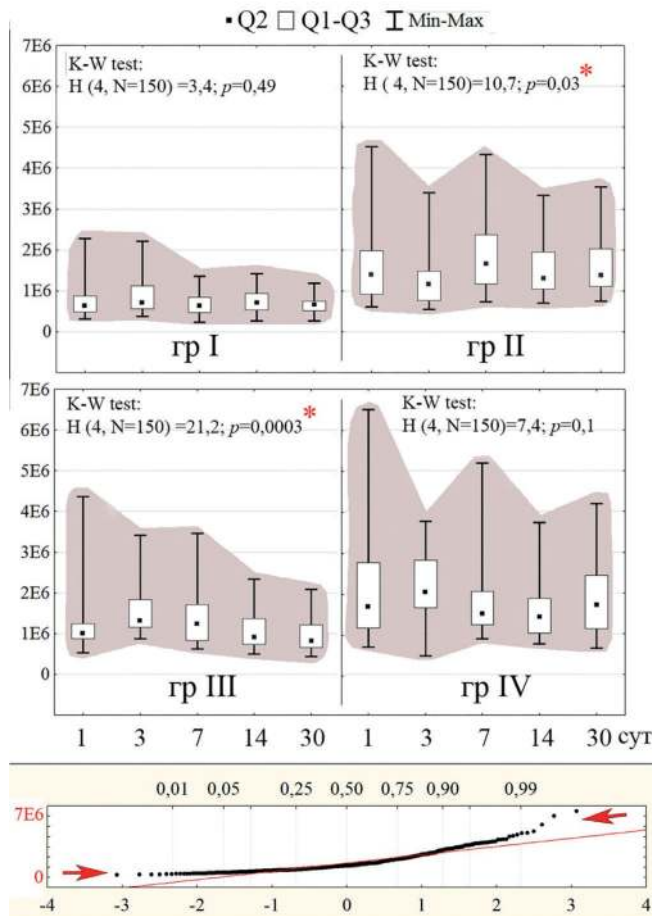


Рис. 7. Общая интенсивность пикселей (ось ординат) в самых ярких пиках (1) полей зрения (ROI=90000 пикселей, n=30) *stratum lacunosum* молекулярного слоя полей CA₁ и CA₃ у животных групп I, II, III и IV в динамике после ООСА и ПОСА. Данные представлены как Q2 (Q1-Q3), диапазон без выбросов (усы). Наглядно показано, что площадь распределения значений в каноническом пространстве в сравниваемых группах отличалась. Относительно группы I – соответственно - 1 : 2,1 : 1,8 : 2,7. Оба конца квантильного графика находятся выше прямой главного тренда (стрелки) – распределение скошено вправо в сторону крупных ярких пиков.

Fig. 7. Total pixel intensity (y-axis) in the brightest peaks (1) of the visual fields (ROI=90000 pixels, n=30) of the *stratum lacunosum* of the molecular layer of the CA1 and CA3 fields in animals of groups I, II, III and IV in dynamics after OSA and POSA. Data are presented as Q2 (Q1-Q3), range without outliers (whiskers). It is clearly shown that the area of distribution of values in the canonical space in the compared groups differed. Relative to group I - respectively - 1 : 2.1 : 1.8 : 2.7. Both ends of the quantile plot are above the main trend line (arrows) – the distribution is skewed to the right towards large bright peaks.

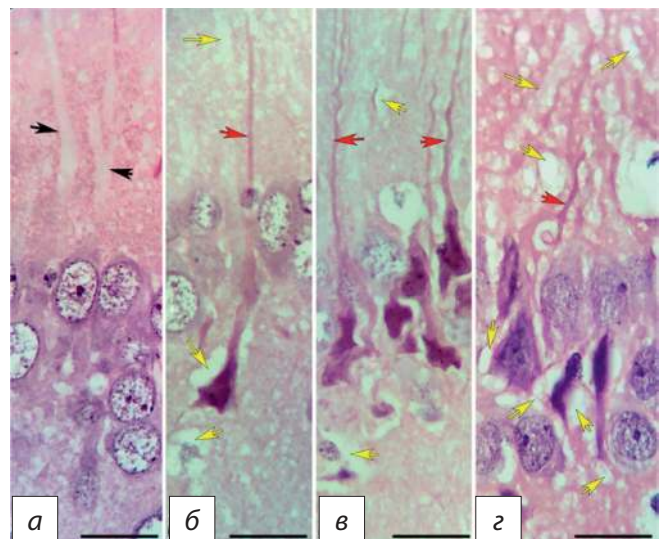


Рис. 8. Фрагменты поля CA₁ гиппокампа животных группы I (а), II (б, в) и IV (z) через 1 (а), 3 (б, в) и 30 (z) сут после ООСА (а-в) и ПОСА (z): преобладание набухания (а; черные стрелки), много темных нейронов с изменёнными дендритами (красные стрелки) без сморщивания (б) и со сморщиванием (в), гипохромные нейроны с признаками гомогенизации, выраженные проявления отёка-набухания перикариона и перичеселлюлярного отёка (б-з; жёлтые стрелки). Окраска гематоксилин-эозином. Объектив: ×100, шкала: 20 мкм.

Fig. 8. Fragments of field CA1 of the hippocampus of animals of groups I (a), II (b, v), and IV (r) 1 (a), 3 (b, v) and 30 (z) days after OSA (a-v) and PCA (z): predominance of swelling (a; black arrows), many dark neurons with altered dendrites (red arrows) without wrinkling (b) and with wrinkling (v), hypochromic neurons with signs of homogenization, pronounced manifestations of edema-swelling of the perikaryon and pericellular edema (b-z; yellow arrows). Hematoxylin-eosin staining. Objective: ×100, scale: 20 micron.

сле окклюзии общей сонной артерии, не сопровождающиеся разрушением отростков астроцитов, можно рассматривать как преимущественно обратимые защитные в рамках реактивного астроглиоза, а в отдалённом периоде после перевязки общей сонной артерии — как признак прижизненных дегенеративных изменений нейронов и астроцитов [18, 19].

Литература

(п.п. 1-13; 15; 16; 19 References)

14. Бонь Е.И., Максимович Н.Е. Сравнительный анализ морфологических нарушений нейронов теменной коры и гиппокампа крыс при различных видах экспериментальной ишемии головного мозга. *Оренбургский медицинский вестник*. 2021; 9 (2(34)): 29-37.
17. Боровиков В. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере*. 2-е изд. Изд-во: СПб: Питер, 2003. ISBN: 5-272-00078-1.
18. Авдеев Д.Б., Степанов С.С., Горбунова А.В., Шоронова А.Ю., Макарьева Л.М., Акулинин В.А. и др. Темные нейроны сенсорной коры белых крыс после острой неполной ишемии в аспекте артефактов фиксации и нейроглиальных взаимоотношений. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2021; 10(2): 9-22. DOI: 10.18499/2225-7357-2021-10-2-9-22

References

1. Salmond C.H., Chatfield D.A., Menon D.K., Pickard J.D., Sahakian B.J. Cognitive sequelae of head injury: involvement of basal forebrain and associated structures. *Brain*. 2005; 128(1): 189-200. DOI: 10.1093/brain/awh352
2. Spitz G., Bigler E.D., Abildskov T., Maller J.J., O'Sullivan R., Ponsford J.L. Regional cortical volume and cognitive functioning following traumatic brain injury. *Brain Cogn*. 2013; 83(1): 34-44. DOI: 10.1016/j.bandc.2013.06.007
3. Amaral D.G., Scharfman H.E., Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res*. 2007; 163: 3-22. DOI: 10.1016/S0079-6123(07)63001-5
4. Ramachandran V.S. *Encyclopedia of Human Behavior*. 2nd Edition. San Diego: Elsevier Academic Press; 2012.
5. Schultz C., Engelhardt M. Anatomy of the hippocampal formation. *Front Neurol Neurosci*. 2014; 34: 6-17. DOI: 10.1159/000360925
6. Adeva M.M., Souto G., Donapetry C., Portals M., Rodriguez A., Lamas D. Brain edema in diseases of different etiology. *Neurochem Int*. 2012; 61(2): 166-74. DOI: 10.1016/j.neuint.2012.05.007

Сведения об авторах:

Макарьева Любовь Михайловна, очный аспирант каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО ОмГМУ, e-mail: lyuba.mamontova.07@gmail.com;

Авдеев Дмитрий Борисович, канд. вет. наук, ст. преподаватель каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ОмГМУ, e-mail: avdeev86@inbox.ru;

Акулинин Виктор Александрович, доктор мед. наук, проф. зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, 1. ФГБОУ ВО ОмГМУ; 2. ФГБОУ ВО ОмГАУ им. П.А. Столыпина, e-mail: akulinin@omsk-osma.ru;

Степанов Сергей Степанович, доктор мед. наук, ст. науч. сотр. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО ОмГМУ, e-mail: serg_stepanov@mail.ru;

Коржук Михаил Сергеевич, доктор мед. наук, проф., каф. военно-морской хирургии, ВМА им. С.М. Кирова, e-mail: gensurg@mail.ru;

Шоронова Анастасия Юрьевна, очный аспирант каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ОмГМУ, e-mail: nastasya1994@mail.ru

7. Bai J., Lyden P.D. Revisiting cerebral postischemic reperfusion injury: new insights in understanding reperfusion failure, hemorrhage, and edema. *Int J Stroke*. 2015; 10(2): 143-52. DOI: 10.1111/ijss.12434
8. Belov Kirdajova D., Kriska J., Tureckova J., Anderova M. Ischemia-triggered glutamate excitotoxicity from the perspective of glial cells. *Front Cell Neurosci*. 2020; 14:51. DOI: 10.3389/fncel.2020.00051
9. Dreier J.P., Lemale C.L., Kola V., Friedman A., Schoknecht K. Spreading depolarization is not an epiphenomenon but the principal mechanism of the cytotoxic edema in various gray matter structures of the brain during stroke. *Neuropharmacol*. 2018; 134: 189-207. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2017.09.027
10. Ferrer I., Vidal N. Neuropathology of cerebrovascular diseases. *Handb Clin Neurol*. 2017; 145: 79-114. DOI: 10.1016/B978-0-12-802395-2.00007-9
11. Von Kummer R., Dzialowski I. Imaging of cerebral ischemic edema and neuronal death. *Neuroradiol*. 2017; 59(6): 545-53. DOI: 10.1007/s00234-017-1847-6
12. Wang Y.F., Parpura V. Astroglial modulation of hydromineral balance and cerebral edema. *Front Mol Neurosci*. 2018; 11: 204. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00204
13. Ito U., Hakamata Y., Kawakami E., Oyanagi K. Degeneration of astrocytic processes and their mitochondria in cerebral cortical regions peripheral to the cortical infarction. *Stroke*. 2009; 40(6): 2173-81. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.534990
14. Bon' E.I., Maksimovich N.E. Comparative analysis of morphological disturbances of the neurons of the rats parietal cortex and hippocampus in different types of experimental brain ischemia. *Orenburgskiy meditsinskiy vestnik*. 2021; 9 (2(34)): 29-37. (in Russian)
15. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
16. Herbert A.D., Carr A.M., Hoffmann E. FinDGoci: A focus detection algorithm with automated parameter training that closely matches human assignments, reduces human inconsistencies and increases speed of analysis. *PLoS ONE*. 2014; 9(12): e114749. DOI: 10.1371/journal.pone.0114749
17. Borovikov V. *Statistica. The art of analyzing data on a computer*. 2nd ed. [Искусство анализа данных на компьютере]. Izdatel'stvo Piter; 2003. ISBN: 5-272-00078-1. (in Russian)
18. Avdeev D.B., Stepanov S.S., Gorbunova A.V., Shoronova A.Yu., Makar'eva L.M., Akulinin V.A., et al. Dark neurons of the sensorimotor cortex of white rats after acute incomplete ischemia in terms of artifacts fixation and neuroglial relationships. *Zhurnal anatomii i gistopatologii*. 2021; 10(2): 9-22. (in Russian). DOI: 10.18499/2225-7357-2021-10-2-9-22
19. Ahmadvpour S., Behrad A., Fernandez-Vega I. Dark Neurons: A protective mechanism or a mode of death. *Journal of Medical Histology*. 2019; 3(2): 125-31. DOI: 10.21608/JMH.2020.40221.1081

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Иванова Н.А.¹, Бурденный А.М.^{1,2}, Логинов В.И.¹, Кураева Т.Л.³, Носиков В.В.²

Роль полиморфных маркеров гена *IL6* в патогенезе сахарного диабета 1 типа

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,
125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

²ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН,
119334, Москва, Россия, ул. Косыгина, д. 4

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России,
115478, Москва, Россия, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11

Актуальность. Сахарный диабет типа 1 (ранее называемый ювенильным или инсулинозависимым) характеризуется тем, что продукция инсулина отсутствует вследствие аутоиммунной деструкции клеток поджелудочной железы, вероятно, вызванной действием факторов внешней среды на фоне генетической предрасположенности, которая проявляется в наличии функциональных однонуклеотидных замен (SNP) в генах цитокинов, ответственных за воспаление. Считается, что при длительном хроническом воспалении происходит необратимое разрушение β -клеток поджелудочной железы, и при наличии функциональных полиморфных маркеров в генах воспаления, таких как ген интерлейкин β (*IL6*), возможна манифестация болезни с последующей прогрессией и развитием осложнений. **Цель** исследования – изучение частоты распределения аллелей и генотипов ряда полиморфных маркеров гена *IL6* при СД типа 1 у жителей Москвы и Московской области.

Методика. В настоящую работу включено 366 больных СД типа 1 и 526 здоровых индивидов. Группу больных составили пациенты с наличием сахарного диабета типа 1 различной манифестации с общей медианой возраста 41 ± 5 лет. Обе группы выравнены по полу и возрасту. Определение генотипов полиморфных маркеров *rs1800795*, *rs1800796*, *rs1800797* и *rs1554606* гена *IL6* проводилось с помощью ПЦР «в реальном времени» на амплификаторе «Real-time CFX96 Touch» (Bio-Rad, США) с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS (Евроген, Россия) и уникальных праймеров и зондов.

Результаты. В результате исследования выявлена статистически значимая ассоциация полиморфного маркера *rs1800795* гена *IL6* с повышенным риском развития СД1 ($\chi^2=9,48$, $OR=1,35$, $CI_{95\%}=1,11-1,64$, $p=0,0088$).

Заключение. Полученные результаты дополняют информацию о механизмах возникновения и патогенезе СД типа 1. Внедрение в практику анализа полиморфных вариантов гена *IL6*, позволит выявить вероятность развития этой болезни и/или её прогрессирование у пациентов с аутоиммунными заболеваниями или у лиц, находящихся в группе риска.

Ключевые слова: сахарный диабет типа 1; цитокины; полиморфные маркеры гена *IL6*

Для цитирования: Иванова Н.А., Бурденный А.М., Логинов В.И., Кураева Т.Л., Носиков В.В. Роль полиморфных маркеров гена *IL6* в патогенезе сахарного диабета 1 типа. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1) 28–34.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.28-34

Участие авторов: обработка материала, проведение исследования – Иванова Н.А.; концепция и дизайн исследования, статистическая обработка результата, написание текста – Бурденный А.М.; подготовка иллюстративного материала, редактирование статьи – Логинов В.И.; сбор и описание материала – Кураева Т.Л.; концепция и дизайн исследования, финальное редактирование статьи. – Носиков В.В.

Для корреспонденции: Бурденный Алексей Михайлович, burdennyu@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 07.12.2021

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Ivanova N.A.¹, Burdenny A.M.^{1,2}, Loginov V.I., Kuraeva T.L.³, Nosikov V.V.²

The pathogenic role of *IL6* gene polymorphisms in type 1 diabetes mellitus

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation;²N.M. Emanuel Institute for Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Kosygin St. 4, Moscow 119334, Russian Federation;³National Medical Research Center for Endocrinology, Dmitriya Ulyanova St. 11, Moscow 115478, Russian Federation

Background. Type 1 diabetes mellitus (T1DM), previously called juvenile or insulin-dependent diabetes, is characterized by lack of insulin production due to autoimmune destruction of pancreatic cells. This destruction may be caused by environmental factors. These factors contribute to inflammation in the presence of genetic predisposition due functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the cytokine genes. It is supposed that during prolonged chronic inflammation, irreversible destruction of all pancreatic b-cells occurs. In the presence of functional, polymorphic markers in inflammatory genes, such as the interleukin 6 (*IL6*) gene, the manifestation and progression of T1DM is possible, followed by complications. **Aim.** The aim of the present study was to define the frequency distribution of allelic variants and genotypes in a number of polymorphic markers of the *IL6* gene in patients with T1DM residing in Moscow and the Moscow Region.

Methods. The present study included 366 patients with T1DM and 526 healthy individuals. The T1DM group consisted of native Russian patients with T1DM of various manifestations and with a median age of 41 ± 5 yrs. The groups were gender- and age- matched. Genotypes of polymorphic markers *rs1800795*, *rs1800796*, *rs1800797*, and *rs1554606* of the *IL6* gene were determined using real-time PCR on a Real-time CFX96 Touch amplifier (Bio-Rad, USA) using qPCRmix-HS ready-mixed PCR kits (Eurogen, Russia) and unique primers and probes.

Results. Our study revealed a statistically significant association of the polymorphic marker *rs1800795* of the *IL6* gene with an increased risk of developing T1DM ($\chi^2=9.48$, $OR=1.35$, $CI_{95\%}=1.11-1.64$, $p=0.0088$).

Conclusion. Our results complement present information on the origin, mechanisms, and pathogenesis of T1DM. By implementing the analysis of polymorphic variants of *IL6* gene in clinical practice, it will be possible to identify the probability of developing T1DM and/or its progression in patients with autoimmune diseases or in people at risk.

Keywords: Type 1 diabetes mellitus; cytokines; *IL6* gene polymorphisms

For citation: Ivanova N.A., Burdenny A.M., Loginov V.I., Kuraeva T.L., Nosikov V.V. The pathogenic role of *IL6* gene polymorphisms in type 1 diabetes mellitus. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(1): 28–34. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.28-34

Author's contribution: material handling and research performing – Ivanova N.A.; research concept and design, statistical analysis, writing – Burdenny A.M.; preparation of illustrative material and article edition – Loginov V.I.; material collection and description – Kuraeva T.L.; research concept and design, article final edition – Nosikov V.V.

For correspondence: Alexey M. Burdenny, ph.d. I.s.s. of Pathogenomics and Transcriptomics lab. of FSBSI IGPP, e-mail: burdenny@gmail.com

Financing. The present work has no financial help.

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

Information about authors:

Burdenny A.M., <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>Loginov V.I., <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>

Received 07.12.2021

Accepted 20.01.2022

Published 15.03.2022

Введение

На сахарный диабет типа 1 (СД1) во всем мире приходится около 11–22 млн человек [1]. Заболеваемость СД1 за последние годы заметно увеличилась, что связывают с частым рождением детей у пациентов с СД1 и изменениями в окружающей среде [2–4]. СД1 – это аутоиммунное заболевание, которое возникает в результате разрушения/гибели β -клеток поджелудочной железы [5, 6]. Однако патогенез этого аутоиммунного заболевания остается до конца неизвестным.

В зависимости от патогенетических особенностей СД1 подразделяется на два подтипа: 1а и 1б. Считается, что подтип 1а определяется дефектом противовирусного иммунитета, поэтому предполагают, что патогенетическим фактором является неустановленная вирусная инфекция, вызывающая деструкцию бета-клеток островков поджелудочной железы. При возникновении этого варианта СД типа 1 в крови обнаруживаются циркулирующие аутоантитела к островковой ткани.

Как правило, через 1-3 года количество антител значительно снижается.

Сахарный диабет подтипа 1б составляет 1-2% по отношению ко всем больным, страдающим диабетом. Этот подтип рассматривают как проявление аутоиммунного заболевания, что подтверждается частым сочетанием СД подтипа 1б с другими аутоиммунными заболеваниями. Кроме того, циркулирующие в островковой ткани аутоантитела обнаруживаются до выявления клинического диабета и присутствуют в крови больных в течение почти всего периода болезни. Патогенез СД подтипа 1б связывают с частичным генетически обусловленным дефектом системы иммунологического надзора, т.е. с неполноценностью Т-лимфоцитов-супрессоров, которые в норме препятствуют развитию форбидных клонов Т-лимфоцитов, направленных против тканевых белков собственного организма [7, 8]. За последние 10 лет все больше исследований продемонстрировали, что воспалительные цитокины, такие как интерлейкин-6 (IL6), связаны с развитием СД1 [7, 9].

Интерлейкин 6 (ген *IL6* 7p15-21-q21) – представитель цитокинового семейства, который обладает провоспалительными свойствами. Человеческий IL-6 состоит из 212 аминокислот, включая сигнальный пептид из 28 аминокислот. Цитокин вырабатывается, прежде всего, клетками иммунной системы: моноцитами, лимфоцитами, макрофагами, эндотелиоцитами, микроглией, а также производится целым рядом клеток неиммунной природы. IL6 активирует эндотелиальные клетки и обеспечивает сбор лейкоцитов около стенок сосудов. Предполагается, что такая активность IL6 может приводить к постепенному разрушению β-клеток поджелудочной железы [10]. IL-6 передает сигналы через комплекс рецепторов цитокинов 1-го типа на клеточной мембране, состоящей из лиганд-связывающей цепи IL-6Rα (CD126) и компонента, передающего сигналы gp130 (также называемый CD130) [11, 12]. Возможно, что IL-6 обладает и противовоспалительным действием, которые, скорее всего, обусловлены его классической передачей сигналов (через аналогичные белки, связанные с мембраной). Патологические эффекты данного цитокина чаще всего связаны с фосфорилированием генов STAT3 пути. Это оказывает существенное влияние на аутоиммунитет, поскольку передача сигналов по этому пути важна для дифференцировки T17 клеток (Th17) с одновременным ингибированием развития клеток Treg [13]. Данные об ассоциации полиморфных вариантов гена *IL6* с уровнем продукции цитокина в сыворотке крови в литературе крайне противоречивы. Однако,

в ряде работ было показано, что полиморфный маркер *rs1800796*, расположенный в промоторной области гена *IL6* влияет на транскрипцию гена и соответственно на экспрессию этого цитокина, что в итоге контролирует уровень циркулирующего в крови интерлейкина 6 [14]. В отношении, другого полиморфного маркера *rs1800795* (G-174C), разными авторами было показано, что у пациентов с генотипом CC наблюдался высокий уровень IL-6 [15–17].

На данный момент роль цитокина в патогенезе СД1 не ясна, однако есть убедительные доказательства роли функциональных полиморфных маркеров в патогенезе других многофакторных заболеваний. Так, в одном крупном исследовании показана ассоциация двух полиморфных маркеров (*rs1800795*, *rs1800796*) с увеличением риска развития артериальной гипертензии [18]. В другом исследовании авторы свидетельствуют об ассоциации полиморфного маркера *rs1800795* гена *IL6*, на риск развития СД 2 типа [19]. Кроме того, обращает на себя внимание более раннее исследование, в котором проводился поиск ассоциации двух полиморфных маркеров *rs1800795* и *rs1800797* гена *IL6* [20]. По результатам исследования выявлена не только ассоциация полиморфного маркера *rs1800795* с повышенным риском развития СД2, но и сочетанного генотипа *rs1800795* и *rs1800797*.

Целью настоящего исследования было изучение частоты аллельных вариантов полиморфных маркеров *rs1800795*, *rs1800796*, *rs1800797*, *rs1554606* гена *IL6* при СД типа 1 у жителей Москвы и Московской области.

Методика

Настоящее исследование было проведено с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93 № 2288). В работе использованы образцы крови жителей Москвы и Московской области.

Исследование включало материал, разделенный на две, выравненные по полу и возрасту, группы индивидов. Группа больных состояла из 366 человек с наличием сахарного диабета типа 1 различной манифестации с общей медианой 41±5 лет. В группе контроля собрано 526 здоровых образцов от индивидов, представленных сотрудниками ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России. Выборки были этнически однородны и составлены из русских (на основании паспортных данных), не являющихся родственниками.

Для исследования ассоциации полиморфных маркеров гена *IL6* использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов венозной крови стандартным методом с ис-

пользованием фенол-хлороформной очистки. Определение генотипов полиморфных маркёров гена *IL6* проводилось с помощью ПЦР «в реальном времени» на амплификаторе «Real-time CFX96 Touch» (Bio-Rad, США) в 25 мкл реакционной смеси с использованием готовой смеси для ПЦР qPCRmix-HS (Евроген, Россия) и уникальных праймеров и зондов (табл. 1). Обозначения полиморфных маркёров даны в соответствии с базой данных dbSNP [21].

В зондах использовали флуоресцентные красители FAM (карбоксихлорофлуоресцеин) и HEX(VIC) (гексахлорофлуоресцеин), а в качестве гасителя флуоресценции ВНQ-1.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием закона генетического равновесия Харди-Вайнберга для аутомных признаков. Вся статистическая обработка результатов проводилась с помощью калькулятора для расчёта статистики, написанного в программе excel, в соответствии с формулами, предлагаемыми для расчета статистики согласно выбранному критерию. При сравнении частот встречаемости генотипов применяли критерий Пирсона. Комплексную оценку взаимосвязей между исследуемыми генотипами и риском заболевания проводили с помощью логистической регрессии, определяя отношение шансов (OR) и 95% доверительный интервал (CI_{95%}), при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В нашей работе было исследовано четыре полиморфных маркера *rs1800795*, *rs1800796*, *rs1800797* и *rs1554606* гена *IL6* с риском развития СД типа 1. Результаты распределения частот аллелей и генотипов этих полиморфных маркеров в контрольной группе и группе больных представлены в табл. 2.

Для полиморфных маркёров *rs1800796*, *rs1800797* и *rs1554606* гена *IL6* статистически значимых ассоциаций с риском развития СД типа 1 выявлено не было.

В то же время нами выявлено статистически значимое увеличение частоты предрасполагающего генотипа *CC* полиморфного маркера *rs1800795* гена *IL6* в группе больных СД1 по сравнению с контрольной группой ($\chi^2=9,48$, $p=0,0088$). Следует подчеркнуть, что по данному полиморфному маркёру в мировой литературе опубликовано крайне мало печатных работ [23–25]. Так, в исследовании [24] отмечена связь этого полиморфного маркёра с увеличенным уровнем гликированного гемоглобина, общего холестерина и холестерина низкой плотности у пациентов с СД типа 1, что указывает на патогенную роль полиморфного *rs1800795* гена *IL6* в развитии СД типа 1. Таким образом, наши результаты расширяют представления о роли изученных полиморфных маркёров в патогенезе СД типа 1.

Таблица 1/Table 1

Праймеры и зонды

Primers and probes

| Локус | Праймеры/зонды | t Отжига |
|------------------------|--------------------------------------|----------|
| <i>rs1800795*</i> , ** | F: <i>GACCTAAGCTGCACTTTTC</i> | 60° |
| | R: <i>GGTTGAGACTCTAATATTGAGAC</i> | |
| | VIC/FAM: <i>TGTCTTGC[G/C]ATGCTAA</i> | |
| <i>rs1800796*</i> | F: <i>CAGCAGCCAACCTCCTCTAA</i> | 60° |
| | R: <i>CCAAGCCTGGGATTATGAAG</i> | |
| | VIC/FAM: <i>CAGCC[G/C]CTCACAGGG</i> | |
| <i>rs1800797**</i> | F: <i>GCCTTGAAGTAACTGCACGAAATT</i> | 60° |
| | R: <i>TGTTCTGGCTCTCCCTGTGA</i> | |
| | VIC/FAM: <i>CCTGGCCA[G/A]CCTCA</i> | |
| <i>rs3024505*</i> | F: <i>GATGGTGCCACTGTGGTGAG</i> | 60° |
| | R: <i>TTAATGCTGGGCTGGAACCT</i> | |
| | VIC/FAM: <i>AGTTCAT[G/T]CTGGGAA</i> | |

Примечание. *Праймеры и зонды взяты из [BLAST с проверкой в программной среде DNASTAR LaserGene]. **Праймеры и зонды взяты из: [22]

Note. Primers and probes were taken from BLAST with verification in the DNASTAR LaserGene software environment.

Таблица 2/Table 2

Распределение частот исследованных полиморфных маркёров гена IL6

Frequency distribution of the polymorphic markers of the IL6

| <i>rs1800795</i> | | | | | | |
|-------------------|---------|----------|-------------|---------------|-------|-------------------|
| Аллели и генотипы | Частоты | | χ^2 | <i>p</i> | OR | |
| | случай | контроль | | | знач. | CI _{95%} |
| Аллель <i>G</i> | 0,563 | 0,635 | 4,70 | 0,0301 | 0,74 | 0,56-0,97 |
| Аллель <i>C</i> | 0,437 | 0,365 | | | 1,35 | 1,03-1,77 |
| <i>GG</i> | 0,328 | 0,405 | 9,48 | 0,0088 | 0,74 | 0,61-0,90 |
| <i>GC</i> | 0,470 | 0,460 | | | 0,88 | 0,72-1,07 |
| <i>CC</i> | 0,202 | 0,135 | | | 1,35 | 1,11-1,64 |
| <i>rs1800796</i> | | | | | | |
| Аллели и генотипы | Частоты | | χ^2 | <i>P</i> | OR | |
| | случай | контроль | | | знач. | CI _{95%} |
| Аллель <i>G</i> | 0,888 | 0,911 | 1,25 | 0,2641 | 0,78 | 0,50-1,21 |
| Аллель <i>C</i> | 0,112 | 0,090 | | | 1,29 | 0,83-2,00 |
| <i>GG</i> | 0,795 | 0,827 | 4,16 | 0,1249 | 0,78 | 0,57-1,06 |
| <i>GC</i> | 0,186 | 0,167 | | | 1,01 | 0,83-1,22 |
| <i>CC</i> | 0,019 | 0,006 | | | 1,29 | 0,94-1,76 |
| <i>rs1800797</i> | | | | | | |
| Аллели и генотипы | Частоты | | χ^2 | <i>p</i> | OR | |
| | случай | контроль | | | знач. | CI _{95%} |
| Аллель <i>G</i> | 0,671 | 0,684 | 0,15 | 0,6991 | 0,95 | 0,71-1,26 |
| Аллель <i>A</i> | 0,327 | 0,316 | | | 1,06 | 0,80-1,41 |
| <i>GG</i> | 0,478 | 0,471 | 2,71 | 0,2578 | 0,95 | 0,77-1,16 |
| <i>GA</i> | 0,386 | 0,426 | | | 0,86 | 0,70-1,04 |
| <i>AA</i> | 0,134 | 0,103 | | | 1,06 | 0,86-1,29 |
| <i>rs1554606</i> | | | | | | |
| Аллели и генотипы | Частоты | | χ^2 | <i>p</i> | OR | |
| | случай | контроль | | | знач. | CI _{95%} |
| Аллель <i>G</i> | 0,604 | 0,601 | 0,01 | 0,93 | 1,01 | 0,77-1,33 |
| Аллель <i>T</i> | 0,396 | 0,399 | | | 0,98 | 0,75-1,30 |
| <i>GG</i> | 0,366 | 0,369 | 0,17 | 0,92 | 1,01 | 0,84-1,23 |
| <i>GT</i> | 0,475 | 0,464 | | | 1,04 | 0,86-1,28 |
| <i>TT</i> | 0,158 | 0,167 | | | 0,98 | 0,81-1,20 |

Заключение

Современные способы исследования генома GWAS (Genome-wide association study) [26, 27] позволили выявить множество новых генов, которые могут быть ассоциированы с СД типа 1, в том числе и *IL6*. Полу-

ченные нами данные об ассоциации полиморфного маркёра *rs1800795* с риском развития СД1 дополняют информацию о механизмах его возникновения и патогенеза. Раскрытие этих механизмов поможет понять основы патофизиологии СД1 и определить группы людей с высоким риском развития СД1, для про-

ведения профилактических мероприятий. Разработка и внедрение в практику методов анализа полиморфных вариантов генов, используемых для диагностики СД типа 1, позволит выявить возможность развития этой болезни и/или его прогрессирование у пациентов с аутоиммунными заболеваниями или у людей, находящихся в группе риска.

Литература

(п.п. 1–9; 11–27 см. References)

10. Носиков В.В., Серегин Ю.А. Молекулярная генетика сахарного диабета 1 типа. *ЛИКИ*. 2010; 1(137): 42–51.

References

- Wintrup J. The changing landscape of care: does ethics education have a new role to play in health practice? *BMC Med Ethics*. 2015; 16: 22. doi: 10.1186/s12910-015-0005-0
- Patterson C., Guariguata L., Dahlquist G., Soltész G., Ogle G., Silink M. Diabetes in the young – a global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014; 103(2): 161–75. doi: 10.1016/j.diabres.2013.11.005
- Fatima N., Faisal S.M., Zubair S., Ajmal M., Siddiqui S.S., Moin S., et al. Role of Pro-Inflammatory Cytokines and Biochemical Markers in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes: Correlation with Age and Glycemic Condition in Diabetic Human Subjects. *PLoS One*. 2016; 11(8):e0161548. doi: 10.1371/journal.pone.0161548
- Green A., Hede S.M., Patterson C.C., Wild S.H., Imperatore G., Roglic G., et al. Type 1 diabetes in 2017: global estimates of incident and prevalent cases in children and adults. *Diabetologia*. 2021; 64(12): 2741–50. doi: 10.1007/s00125-021-05571-8
- Songini M., Mannu C., Targhetta C., Bruno G. Type 1 diabetes in Sardinia: facts and hypotheses in the context of worldwide epidemiological data. *Acta Diabetol*. 2017; 54(1):9–17. doi: 10.1007/s00592-016-0909-2
- Bettini M., Bettini M.L. Function, Failure, and the Future Potential of Tregs in Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2021; 70(6): 1211–9. doi: 10.2337/dbi18-0058
- Lu J., Liu J., Li L., Lan Y., Liang Y. Cytokines in type 1 diabetes: mechanisms of action and immunotherapeutic targets. *Clin Transl Immunology*. 2020 Mar 16; 9(3):e1122. doi: 10.1002/cti2.1122
- Budd M.A., Monajemi M., Colpitts S.J., Crome S.Q., Verchere C.B., Levings M.K. Interactions between islets and regulatory immune cells in health and type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2021; 64(11): 2378–88. doi: 10.1007/s00125-021-05565-6
- Chatzigeorgiou A., Harokopos V., Mylona-Karagianni C., Tsouvalas E., Aidinis V., Kamper E.F. The pattern of inflammatory/anti-inflammatory cytokines and chemokines in type 1 diabetic patients over time. *Ann Med*. 2010; 42(6): 426–38. doi: 10.3109/07853890.2010.495951
- Nosikov V.V., Seregin Yu.A. Molecular genetics of type 1 diabetes mellitus. *ЛИКИ*. 2010; 1(137): 42–51. (in Russian)
- Moshapa F.T., Riches-Suman K., Palmer T.M. Therapeutic Targeting of the Proinflammatory IL-6/JAK/STAT Signalling Pathways Responsible for Vascular Restenosis in Type 2 Diabetes Mellitus. *Cardiol Res Pract*. 2019; 2019: 9846312. doi: 10.1155/2019/9846312. PMID: 30719343
- Martínez-Pérez C., Kay C., Meehan J., Gray M., Dixon J.M., Turnbull A.K. The IL6-like Cytokine Family: Role and Biomarker Potential in Breast Cancer. *J Pers Med*. 2021; 11(11): 1073. doi: 10.3390/jpm11111073. PMID: 34834425
- Rajendran S., Anquetil F., Quesada-Masachs E., Graef M., Gonzalez N., McArdle S., et al. IL-6 is present in beta and alpha cells in human pancreatic islets: Expression is reduced in subjects with type 1 diabetes. *Clin Immunol*. 2020; 211:108320. doi: 10.1016/j.clim.2019.108320. PMID: 31809899
- Godarzi E.M., Sarvestani E.K., Aflaki E., Amirghofran Z. Interleukin-6 gene polymorphism in Iranian patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2011; 30(2): 179–84. doi: 10.1007/s10067-010-1452-0. PMID: 20383729
- Giannitrapani L., Soresi M., Balasus D., Licata A., Montalto G. Genetic association of interleukin-6 polymorphism (-174 G/C) with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(16): 2449–55. doi: 10.3748/wjg.v19.i16.2449
- Galimudi R.K., Spurthi M.K., Padala C., Kumar K.G., Mudigonda S., Reddy S.G., et al. Interleukin 6(-174G/C) variant and its circulating levels in coronary artery disease patients and their first degree relatives. *Inflammation*. 2014; 37(2): 314–21. doi: 10.1007/s10753-013-9742-8
- Popovic D., Lalic K., Jotic A., Milicic T., Bogdanovic J., Dorđević M., et al. The Inflammatory and Hemostatic Cardiovascular Risk Markers During Acute Hyperglycemic Crisis in Type 1 and Type 2 Diabetes. *J Med Biochem*. 2019; 38(2): 126–33. doi: 10.2478/jomb-2018-0024. PMID 30867640
- Lu S., Wang Y., Wang Y., Hu J., Di W., Liu S., et al. The IL-6 rs1800795 and rs1800796 polymorphisms are associated with coronary artery disease risk. *J Cell Mol Med*. 2020; 24(11): 6191–207. doi: 10.1111/jcmm.15246. PMID: 32374489
- Plataki M.N., Zervou M.I., Samonis G., Daraki V., Goulielmos G.N., Kofteridis D.P. Association of the Interleukin-6 rs1800795 Polymorphism with Type 2 Diabetes Mellitus in the Population of the Island of Crete, Greece. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2018; 22(7):448–452. doi: 10.1089/gtmb.2017.0220. PMID: 29957071
- Saxena M., Agrawal C.G., Srivastava N., Banerjee M. Interleukin-6 (IL-6)-597 A/G (rs1800797) & -174 G/C (rs1800795) gene polymorphisms in type 2 diabetes. *Indian J Med Res*. 2014; 140(1): 60–8. PMID: 25222779
- Build 153, Released: July 9, 2019; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>
- Slatery M.L., Curtin K., Sweeney C., Wolff R.K., Baumgartner R.N., Baumgartner K.B., et al. Modifying effects of IL-6 polymorphisms on body size-associated breast cancer risk. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Feb; 16(2): 339–47. doi: 10.1038/oby.2007.44. PMID: 18239642
- Rudofsky G.Jr., Schlotterer A., Reismann P., Engel J., Grafe I.A., Tafel J., et al. The -174G>C IL-6 gene promoter polymorphism and diabetic microvascular complications. *Horm Metab Res*. 2009; 41(4): 308–13. doi: 10.1055/s-0028-1119373. PMID: 19140096
- Ururahy M.A., de Souza K.S., Oliveira Y.M., Loureiro M.B., da Silva H.P., Freire-Neto F.P., et al. Association of polymorphisms in IL6 gene promoter region with type 1 diabetes and increased albumin-to-creatinine ratio. *Diabetes Metab Res Rev*. 2015; 31(5): 500–6. doi: 10.1002/dmrr.2621. PMID: 25384728
- Haghnazari L., Sabzi R. Relationship between TP53 and interleukin-6 gene variants and the risk of types 1 and 2 diabetes mellitus development in the Kermanshah province. *J Med Life*. 2021; 14(1): 37–44. doi: 10.25122/jml-2019-0150. PMID: 33767783

26. Kim S.S., Hudgins A.D., Yang J, Zhu Y, Tu Z, Rosenfeld MG, et al. A comprehensive integrated post-GWAS analysis of Type 1 diabetes reveals enhancer-based immune dysregulation. *PLoS One*. 2021; 16(9):e0257265. doi: 10.1371/journal.pone.0257265. PMID: 34529725
27. Sayed S., Nabi AHMN. Diabetes and Genetics: A Relationship Between Genetic Risk Alleles, Clinical Phenotypes and Therapeutic Approaches. *Adv Exp Med Biol*. 2021; 1307: 457-98. doi: 10.1007/5584_2020_518. PMID: 32314317

Сведения об авторах:

Иванова Наталья Анатольевна, мл. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Бурденный Алексей Михайлович, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН;

Логинов Виталий Игоревич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Кураева Тамара Леонидовна, доктор мед. наук, проф., руководитель отд-ния сахарного диабета детей и подростков ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России;

Носиков Валерий Вячеславович, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. постгеномных молекулярно-генетических исследований ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616.36-002.2-022-002:612.6.05:577.21

Булатова И.А.¹, Шевлюкова Т.П.², Щёктова А.П.¹, Кривцов А.В.³

Генетический профиль больных хроническим гепатитом С

¹ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России», 614990, Пермь, Россия, ул. Петропавловская, д. 26;

²ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России, 625023, Тюмень, Россия, ул. Одесская, д. 54;

³ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», 614045, Пермь, Россия, ул. Монастырская, д. 82

Введение. Хронический гепатит С (ХГС) является мультифакториальным заболеванием, в формировании которого имеют значение генетические факторы возбудителя (вирус), хозяина и условия внешней среды. В настоящее время приоритетной областью здравоохранения является оценка роли генетических маркеров при многофакторных заболеваниях. **Цель** – оценка роли генетических маркеров при хроническом гепатите С.

Методика. Обследовано 95 больных ХГС и 50 здоровых доноров. Оценивали концентрацию васкулоэндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor – VEGF), фактора некроза опухоли (tumor necrosis factor alpha – TNF- α), активность ферментов каталазы (catalase – CAT), глутатионпероксидазы (glutathione peroxidase – GPX) в сыворотке крови. Также изучали полиморфизм генов *VEGFA* в регионе -634G/C, *TNF- α* в регионе -308G/A, *CAT* в регионе -262G/A, *GPX4* в регионе -718C/T и *IL28B* в регионе C/T и оценивали генетический профиль в баллах от 0 до 10 путем суммации аллелей риска.

Результаты. Развитие ХГС сопровождается активацией процессов воспаления и неоангиогенеза с повышением концентрации и TNF- α ($p < 0,001$), и VEGF ($p < 0,001$) при истощении ферментов антиоксидантной защиты со снижением активности CAT ($p < 0,001$) и GPX ($p < 0,001$). Носительство аллели С гена *VEGFA* в регионе -634G/C в виде генотипа CC может являться фактором риска развития ХГС ($\chi^2 = 7,52$; $p = 0,01$). Выявлена ассоциация полиморфизма гена *CAT* (G262A) и *GPX4* (C718T) со снижением активности антиоксидантных ферментов. При оценке генетического профиля в группе здоровых 86% имели низкий риск развития ХГС (0-3 балла по шкале), а среди пациентов с ХГС – 68%. При этом 32% лиц с ХГС имели умеренный риск (4-7 баллов), а у доноров эта цифра была ниже и составила 14%. Оценка генетического профиля здоровых доноров и пациентов с ХГС, показала, что среди больных ХГС чаще встречались лица, имеющие одновременно большее количество аллелей риска.

Заключение. Определение генетического профиля с использованием, *TNF- α* в регионе -308G/A, *CAT* в регионе -262G/A, *GPX4* в регионе -718C/T, *VEGFA* в регионе -634G/C и *IL28B* в регионе C/T позволяет оценить риск развития и прогрессирования ХГС.

Ключевые слова: хронический гепатит С; цитокины; антиоксидантные ферменты; дисфункция эндотелия; полиморфизм генов

Для цитирования: Булатова И.А., Шевлюкова Т.П., Щёктова А.П., Кривцов А.В. Генетический профиль больных хроническим гепатитом С. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1): 35–43.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.35-43

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Булатова И.А., Щёктова А.П., Шевлюкова Т.П.; сбор и обработка материала – Булатова И.А., Кривцов А.В.; выполнение лабораторных тестов – Кривцов А.В., Булатова И.А.; статистическая обработка материала и подготовка иллюстративного материала – Шевлюкова Т.П.; написание текста – Булатова И.А., Щёктова А.П.; редактирование – Шевлюкова Т.П., Булатова И.А.

Для корреспонденции: Булатова Ирина Анатольевна, e-mail: bula.1977@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.11.2021

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Bulatova I.A.¹, Shevlyukova T.P.², F.P., Shchekotova A.P.¹, Krivtsov A.V.³**Genetic profile of patients with chronic hepatitis C**

¹Academician E.A. Wagner Perm State Medical University, Petropavlovskaya St. 26, Perm 614990, Russian Federation;

²Tyumen State Medical University, Odesskaya St. 54, Tyumen 625023, Russian Federation;

³Federal Research Center for Medical and Preventive Technologies of Public Health Risk Management, Monastyrskaya St. 82, Perm 614045, Russian Federation

Introduction. Chronic hepatitis C (CHC) is a multifactorial disease. In its formation, the genetic factors of the pathogen (virus) and of the host, as well as the environmental conditions are important. Currently, a public health priority is the assessment of the role of genetic markers in multifactorial diseases. **Aim** – assessment of the role of genetic markers in chronic hepatitis C.

Methods. We examined 95 patients with CHC and 50 healthy subjects. The concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were measured in blood serum. The enzymatic activities of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), and vascular endothelial growth factor (VEGF) were also evaluated. We also studied polymorphism of the *VEGFA* genes in the -634G/C region, *TNF- α* in the -308G/A region, *CAT* in the -262G/A region, *GPX4* in the -718C/T region and *IL28B* in the C/T region, and we assessed the genetic profile in points from 0 to 10 by summing risk alleles.

Results. The development of CHC was accompanied by activation of inflammation and neoangiogenesis with an increase in the concentration of both TNF- α ($p < 0.001$) and VEGF ($p < 0.001$) along with depletion of antioxidant defense enzymes, and with a decrease in the activity of CAT ($p < 0.001$) and GPX ($p < 0.001$). Carriage of the C allele of the *VEGFA* gene in the -634G/C region in the form of the CC genotype may be a risk factor for the development of CHC ($\chi^2 = 7.52$; $p = 0.01$). An association of *CAT* (G262A) and *GPX4* (C718T) gene polymorphism with a decrease in the activity of antioxidant enzymes was found. According to their genetic profile, 86% of the healthy subjects had a low risk of developing CHC (0-3 points on the scale), whereas 68% patients with CHC had a low risk. Furthermore, 32% of patients with CHC had a moderate risk (4-7 points), whereas in healthy subjects, this percentage was almost 50% less (14%). Evaluation of the genetic profiles of healthy subjects and of patients with CHC showed that patients with CHC were more likely to have a greater number of risk alleles.

Conclusion. Evaluation of the genetic profile using *TNF- α* in the -308G/A region, *CAT* in the -262G/A region, *GPX4* in the -718C/T region, *VEGFA* in the -634G/C region and *IL28B* in the C/T region allows assessment of the risk of the development and the progression of CHC.

Keywords: chronic hepatitis C; cytokines; antioxidant enzymes; endothelial dysfunction; gene polymorphism

For citation: Bulatova I.A., Shevlyukova T.P., Shchekotova A.P., Krivtsov A.V. Genetic profile of patients with chronic hepatitis C. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological physiology and experimental therapy. Russian Journal)*. 2022; 66(1): 35-43. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.35-43

Autor's contribution: research concept and design – Bulatova I.A., Shchekotova A.P., Shevlyukova T.P.; collection and processing of material – Bulatova I.A., Krivtsov A.V.; performing laboratory tests – Krivtsov A.V., Bulatova I.A.; stistical processing of material and preparation of illustrative material – Shevlyukova T.P.; writing text – Bulatova I.A., Shchekotova A.P.; editing – Shevlyukova T.P., Bulatova I.A.

For correspondence: *Irina A. Bulatova*, Doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Normal Physiology, Professor of the Department of Faculty Therapy No. 2, Occupational Pathology and Clinical Laboratory Diagnostics, Perm State Medical University named after Academician E.A. Wagner of the Ministry of Health of Russia»; 26 Petropavlovsk str., Perm 614990, Russian Federation, e-mail: bula.1977@mail.ru

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

Financing. The study had no sponsorship.

Information about the authors:

Bulatova I.A., <https://orcid.org/0000-0002-7802-4796>

Shevlyukova T.P., <https://orcid.org/0000-0002-7019-6630>

Shchekotova A.P., <https://orcid.org/0000-0003-0298-2928>

Krivtsov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-7986-0326>

Received 01.11.2021

Accepted 20.01.2022

Publised 15.03.2022

Введение

Хронический гепатит С (ХГС) остается глобальной медико-социальной проблемой в связи с высокой заболеваемостью, поражением наиболее трудоспособной

части населения, часто латентным течением острых форм, что приводит к высокому проценту хронизации, прогрессирующему течению и формированию небла-

гоприятных исходов. По данным ВОЗ заболеваемость ХГС в мире составляет более 70 млн человек [1]. Распространенность ХГС в РФ достигает 4,9 млн с наиболее высокими показателями заболеваемости в возрастных группах 30–39 и 40–49 лет [2, 3]. В этиологической структуре цирроза печени на долю гепатита С приходится 58,2% [4]. Вирус гепатита С признан международным агентством ВОЗ по изучению рака канцерогенным для человека [5].

Проведенные за последние 10 лет исследования показали, что развитие и прогрессирование ХГС, индуцирование фиброза и формирование цирроза печени обусловлены универсальными патогенетическими механизмами: хроническим воспалением, цитокиновым каскадом, окислительным стрессом, дисфункцией эндотелия и активацией механизмов неоангиогенеза [6–14].

ХГС является мультифакториальным заболеванием, в формировании которого имеют значение генетические факторы возбудителя (вирус), хозяина и условия внешней среды. В настоящее время перспективной областью здравоохранения является оценка роли генетических факторов при мультифакториальных заболеваниях. Одним из подходов для идентификации генов предрасположенности к таким заболеваниям является метод геномного сканирования (полногеномного скрининга аллельных ассоциаций), при котором производится анализ полиморфизмов из разных участков генома. Примером такого анализа является исследование, проведенное в США, результатом которого было определение 7 полиморфизмов кандидатных генов — предикторов риска развития цирроза печени на фоне хронического гепатита [6].

Другим подходом можно считать поиск однонуклеотидных полиморфизмов, которые могут кодировать значимые молекулы, реализующие основные звенья патогенеза данного заболевания. К таким патогенетически значимым молекулам относятся: фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor alpha - TNF- α), макроирующий активность воспаления, ферменты антиоксидантной защиты — каталаза (catalase - CAT) и глутатионпероксидаза (glutathione peroxidase — GPX), васкулоэндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor — VEGF), реализующий неоангиогенез и активацию фиброза [7–15]. С этой точки зрения интерес представляет комплексное изучение полиморфизмов генов патогенетически значимых молекул, а также интерлейкина 28В (IL28) как фактора прогноза плохого ответа на противовирусную терапию [16]. Известно также влияние аллельных вариантов генов интерлейкина-1 β и TNF- α на эффектив-

ность терапии и скорость развития фиброза печени при хроническом гепатите [14, 17]. Есть данные, что полиморфизм генов дисфункции эндотелия определяет характер течения ХГС [12, 18]. Было доказано влияние генов, кодирующих продукцию активных форм кислорода, на прогрессирование процесса воспаления и развитие фиброза [10].

Между тем, результаты исследований, касающихся анализа ассоциации ХГС с полиморфными маркерами достаточно противоречивы, что может быть обусловлено изучением изолированного влияния полиморфизмов на фоне популяционных, расовых и региональных особенностей распределения генотипов, а также разным методическим подходом [14, 17, 18]. Поэтому на сегодняшний день актуальным остается поиск диагностических генетических маркеров, обладающих прогностической ценностью в отношении развития и прогрессирования ХГС.

Цель исследования — поиск диагностических генетических маркеров, обладающих прогностической ценностью в отношении развития и прогрессирования ХГС.

Методика

В исследовании приняли участие 95 пациентов с ХГС (43 мужчины и 52 женщины, средний возраст $39,9 \pm 10,1$ лет) и длительностью заболевания $5,8 \pm 3,55$ лет, не получающие на момент исследования и за год до него противовирусную терапию. Контрольная группа состояла из 50 здоровых доноров без патологии печени. Группы были сопоставимы по полу и возрасту. Учитывая количество пациентов с ХГС и в контрольной группе, дизайн исследования был разработан по типу «случай — контроль».

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех пациентов. Работа одобрена этическим комитетом Федерального научного центра медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения.

Для уточнения диагноза ХГС и исключения цирроза печени в качестве референсного метода оценки выраженности фиброза была использована ультразвуковая эластография печени с оценкой плотности печени по шкале «METAVIR». Данное исследование проводилось в Пермской краевой клинической инфекционной больнице. Диагностику проводили с помощью аппарата Fibroscan 502 (Echosens, Франция). Оцениваемый объем печени при использовании этого метода в 200–300 раз больше, чем объем образца биоптата.

Пациентам проводилось лабораторное обследование, включавшее стандартные общеклинические тесты, определение биохимических показателей функционального состояния печени и маркеров вирусных гепатитов методом иммуноферментного анализа (ИФА). Кровь для исследования брали из периферической вены утром натощак в период с 8.00 до 10.00 ч. При взятии венозной крови учитывался ряд факторов, способных оказывать влияние на результаты исследования: взятие венозной крови осуществлялось после отдыха обследуемого (15 мин; пациент во время забора крови находился в положении сидя; прием алкоголя (за 2 сут), пищи (за 12 ч) и курение (за 2 ч) до исследования исключались. Забор венозной крови производился из локтевой вены при помощи одноразовых шприцев в вакуумные системы. Образцы крови доставлялись в лабораторию в течение не более 60 мин. Венозная кровь отстаивалась при комнатной температуре (+15 °С...+20 °С) до образования сгустка 30 мин, после чего образцы крови центрифугировались.

Концентрацию TNF- α и VEGF в сыворотке крови здоровых доноров и лиц с ХГС оценивали методом иммуноферментного анализа на фотометре «Stat-Fax 2100» (США) с применением наборов фирмы ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Проводили построение калибровочной кривой по стандартам концентрации определяемых цитокинов от точки к точке в автоматическом режиме; по сравнению оптических плотностей рассчитывали их концентрацию в пробах. Параллельно определяли содержание изучаемых факторов в контрольных образцах, которые прилагались к набору и при определении концентрации её значение укладывалось в требуемый по паспорту диапазон. Диапазон измеряемых концентраций TNF- α составлял 0 – 250 пг/мл, диапазон референсных значений ФНО- α , указанных производителем реагента равнялся 0 – 6 пг/мл (средняя концентрация – 0,5 пг/мл). Диапазон измеряемых концентраций VEGF составлял 0–2000 пг/мл, диапазон референсных значений ВЭФР, указанных производителем реагента равнялся 10 – 46 пг/мл (средняя концентрация – 127 пг/мл).

Определение сывороточной активности антиоксидантных ферментов проводилось фотометрическим методом: САТ по методике М.А. Королюк (1988), GPX с применением методики J.R. Prohaska (1986). Определение проводилось ручным методом с регистрацией оптических плотностей и расчетом активности на полуавтоматическом биохимическом анализаторе «Clima MC-15».

Однонуклеотидные полиморфные варианты генов изучали с использованием аллель-специфической полимеразной цепной реакции в режиме реального време-

ни на детектирующем амплификаторе «CFX-96» («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) с применением праймеров «SNP-Скрин» (ЗАО «Синтол», г. Москва). Для выявления генотипов определенного гена у всех пациентов с ХГС проводилось выделение ДНК из цельной венозной крови, предварительно стабилизированной динатриевой-3–солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА).

Геномную ДНК выделяли из периферической крови методом высаливания по стандартной процедуре. Полученные образцы ДНК сразу использовали для генотипирования, либо сохраняли при –70 °С. Концентрация ДНК, определенная на спектрофотометре (BioRad, США) составляла от 50 до 100 мкг/мл. Общее время процедуры выделения ДНК 30–40 мин. Праймеры были подобраны к регуляторным некодирующим областям изучаемых генов. Методика тестирования генетического полиморфизма методом ПЦР включала 2 этапа, которые позволяют оценить мутации в режиме реального времени. Этапы: 1 – отбор и подготовка проб (выделение очищенной ДНК методом фенол-хлороформовой экстракции, подготовка реактивов для лизиса клеток и очистки ДНК-матриц, лизис клеток и выделение очищенной ДНК, выделение ДНК методом нуклеосорбции); 2 – проведение ПЦР.

Амплификацию проводили на детектирующем термоциклере «CFX96» (BioRad, США). Каждый цикл амплификации включал в себя 3 температурных режима: денатурацию ДНК (920–94 °С – 1 мин.), отжиг праймеров (450–68 °С в течении 0,5–2 мин.), синтез комплементарной цепи (700–72 °С в течении 1–3 мин.). Регистрация сигнала флуоресценции, возникающего при накоплении продуктов амплификации участков ДНК проводилась в режиме «реального времени» после стадии отжига праймеров для выбранных генов по каналу VIC – для детекции одного из аллельных вариантов генов, и по каналу FAM – для альтернативного варианта. Результаты интерпретировались с использованием метода аллельной дискриминации в зависимости от характера кривых амплификации, отображаемых в программном обеспечении для амплификатора «CFX96». Анализ генетического полиморфизма проводили в автоматическом режиме методом аллельной дискриминации с разделением генотипов по квадратам на программном обеспечении Bio-Rad CFX Maestrj 1.0 v. 4.0.2325.0418.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы «STATISTICA 7.0». Количественные параметры были представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q1 – Q3). Значимость различий независимых групп оценивалась с помощью U-критерия Манна-Уитни

(U). Для оценки взаимосвязей применяли коэффициент корреляции Спирмена (r) с определением уровней зависимости: при $0,00 \leq r < 0,30$ – зависимость нет; $0,30 \leq r < 0,70$ – зависимость умеренная; $0,70 \leq r < 1,00$ – зависимость выраженная. Корреляция считалась статистически значимой при $p < 0,05$. Для описания соотношения частот генотипов и аллелей исследуемых полиморфизмов генов использовали метод χ^2 . Различия в двух популяциях рассчитывались по отношению шансов (OR) с использованием подхода «случай-контроль» для различных моделей наследования и считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки зависимости между количественным и качественным признаками количественные признаки преобразовывались в качественные. Определение зависимости проводилось по таблице сопряженности (кросстабуляции). Зависимость считалась статистически значимой при $p < 0,05$ [19].

Результаты исследования

У пациентов с ХГС было установлено повышение концентрации в сыворотке крови почти в 2 раза уровня провоспалительного цитокина TNF- α и показателя повреждения эндотелия VEGF в 4 раза в сравнении с группой практически здоровых лиц ($p < 0,001$ и $p < 0,001$ соответственно) (табл. 1).

При анализе активности антиоксидантных ферментов у больных ХГС выявлено снижение уровня САТ и GPX в сыворотке крови в сравнении с группой контроля ($p < 0,001$ и $p < 0,001$ соответственно). Полученные результаты характеризуют развитие воспаления на фоне повреждения эндотелия и оксидантного стресса.

При корреляционном анализе выявлена обратная взаимосвязь показателей TNF- α с каталазой ($r = -0,37$; $p = 0,03$) и прямая взаимосвязь антиоксидантных ферментов между собой ($r = 0,41$; $p = 0,04$).

Анализ генотипов гена *TNF- α* в регионе -308G/A не выявил значимых различий в исследуемых группах. В обоих когортах преобладал генотип GG ($\chi^2 = 1,19$; $p = 0,55$) (табл. 2).

Исследование полиморфизма гена *САТ* в регионе -262G/A показало, что в группе контроля и пациентов с ХГС практически с одинаковой частотой выявлялся гомозиготный вариант GG в 60% и 63,16% случаев соответственно ($\chi^2 = 0,86$; $p = 0,71$) и аллель G в 74% и 77,89% ($\chi^2 = 0,55$; $p = 0,47$). Изучение аллельных вариантов гена *GPX4* в регионе -718C/T определило преобладание гетерозиготы СТ в 40% у доноров и 48,42% у лиц с ХГС ($\chi^2 = 0,11$; $p = 0,96$) и C-аллель в 64% и 62,11% случаев соответственно ($\chi^2 = 0,10$; $p = 0,75$). Статистически значимых различий не было выявлено.

В группе контроля чаще встречалась гетерозигота GC гена *VEGFA* в регионе -634G/C в 58% ($\chi^2 = 10,09$; $p = 0,02$), при этом гомозигота CC была найдена с высокой вероятностью только в группе пациентов с ХГС в 13,68%, а у здоровых не обнаруживалась ($\chi^2 = 7,52$; $p = 0,01$). Можно предположить, что аллель C гена *VEGFA* в регионе -634G/C является фактором риска развития ХГС.

Анализ полиморфизма гена *IL28B* в регионе C/T показал почти одинаковое распределение генотипов и аллелей в обеих исследуемых группах. Соотношение генотипов CC, CT и TT в группе больных ХГС данного генетического маркера составило 45,26; 47,37 и 7,37.

Таким образом, проведенный анализ отдельных полиморфизмов генов в группах контроля и пациентов

Таблица 1/ Table 1

Концентрации, фактора некроза опухоли-альфа, каталазы, глутатионпероксидазы и васкулоэндотелиального фактора роста у доноров и у пациентов с хроническим гепатитом С; Ме (Q1 – Q3)

Concentrations of tumor necrosis factor-alpha, catalase, glutathione peroxidase and vascular endothelial growth factor in donors and in patients with chronic hepatitis C; Me (Q1 – Q3)

| Показатели indicators | Контрольная группа Control (n=50) | Больные ХГС patients ChHC (n=95) | p |
|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------|
| TNF- α , пг/мл (pg/ml) | 0 (0 – 0,8) | 1,8 (1,0 – 4,15) | <0,001 |
| САТ, мкат/л (mkat/l) | 24,9 (22,5 – 28,4) | 10,2 (5,3 – 14,4) | <0,001 |
| GPX, мкмоль/л $\mu\text{mol/l}$ | 23,3 (20,5 – 27,2) | 8,1 (4,5 – 12,5) | <0,001 |
| VEGF, пг/мл (pg/ml) | 86,7 (10,7 – 175) | 345 (206 – 559) | <0,001 |

Примечание. p – значимость различий показателей контрольной и основной группы.

Note. p is the significance of the differences between the indicators of the control and the main group.

с ХГС показал значимые различия по распределению генотипов только для маркера *VEGFA* в регионе -634G/C.

Однако, оценка зависимости качественных признаков, проведенная на втором этапе исследования по таблице сопряженности, выявила ассоциацию полиморфизма гена *CAT* (*G262A*) и *GPX4* (*C718T*) со снижением выработки ферментов *CAT* и *GPX* ($K_i=0,523$; $p=0,049$ и $K_i=0,561$; $p=0,047$ соответственно), что может приводить к истощению механизмов антиоксидантной защиты и прогрессированию поражения печени в группе носителей.

Обсуждение

Повышение уровня *TNF-α* отражает активность воспалительного процесса в печени и взаимосвязано с активацией фиброза [7, 10]. При анализе активности антиоксидантных ферментов у больных ХГС выявлено снижение уровня *CAT* и *GPX* в сыворотке крови в сравнении с группой контроля. Дефицит *CAT* и *GPX* может оказывать влияние на прогрессирование заболевания, в том числе на развитие фиброза, что подтверждает взаимосвязь окислительного стресса с па-

Таблица 2/Table 2

Оценка аллельных вариантов генов в группах контроля и пациентов с хроническим гепатитом С, %±SEM

Evaluation of allelic gene variants in the control group and patients with chronic hepatitis C, %± SEM

| Генотип/аллели генов | | Контроль Control n=50 | ХГС CHC n=95 | OR | p |
|-------------------------|------------|-----------------------------|--------------------|------|-------------|
| <i>TNF-α</i> -308G/A | GG,% | 82±5,43 | 77,89±4,26 | 0,77 | 0,55 |
| | GA,% | 18±5,43 | 20±4,1 | 1,14 | 0,77 |
| | AA,% | 0±0 | 2,11±1,47 | 1,29 | 0,16 |
| | G-аллель,% | 91±2,86 | 87,89±2,37 | 0,72 | 0,41 |
| | A-аллель,% | 9±2,86 | 12,11±2,37 | 1,39 | 0,41 |
| <i>CAT</i> -262G/A | GG,% | 60±6,93 | 63,16±4,95 | 1,14 | 0,71 |
| | GA,% | 28±6,35 | 29,47±4,68 | 1,07 | 0,85 |
| | AA,% | 12±4,6 | 7,37±2,68 | 0,58 | 0,39 |
| | G-аллель,% | 74±4,39 | 77,89±3,01 | 1,24 | 0,47 |
| | A-аллель,% | 26±4,39 | 22,11±3,01 | 0,87 | 0,47 |
| <i>GPX4</i> -718C/T | CC,% | 40±6,93 | 37,89±4,98 | 0,92 | 0,81 |
| | CT,% | 48±7,07 | 48,42±5,13 | 1,02 | 0,96 |
| | TT,% | 12±4,6 | 13,68±3,53 | 1,16 | 0,77 |
| | C-аллель,% | 64±4,8 | 62,11±3,52 | 0,92 | 0,75 |
| | T-аллель,% | 36±4,8 | 37,89±3,52 | 1,08 | 0,75 |
| <i>VEGFA</i> -634G/C | GG,% | 42±6,98 | 48,42±5,13 | 1,30 | 0,46 |
| | GC,% | 58±6,98 | 37,89±4,98 | 0,44 | 0,02 |
| | CC,% | 0±0 | 13,68±3,53 | 0,41 | 0,01 |
| | G-аллель,% | 71±4,54 | 67,37±3,4 | 0,84 | 0,52 |
| | C-аллель,% | 29±4,54 | 32,63±3,4 | 1,19 | 0,52 |
| <i>IL28B</i> C/T | CC,% | 42±6,98 | 45,26±5,11 | 1,04 | 0,71 |
| | CT,% | 52±7,07 | 47,347±5,12 | 0,96 | 0,6 |
| | TT,% | 6±3,36 | 7,37±2,68 | 1,14 | 0,75 |
| | C-аллель,% | 68±4,66 | 68,95±3,36 | 0,83 | 0,87 |
| | T-аллель,% | 32±4,66 | 31,05±3,36 | 1,25 | 0,87 |

Примечание. OR — отношение шансов, p — значимость различий между группами.

Note. OR – odds ratio, p – significance of differences between groups.

тогенезом вирусного гепатита, независимое от генотипа вируса [10, 15]. Значимое увеличение выработки VEGF отражает выраженность повреждения эндотелия и характеризует активацию неоангиогенеза и стимуляцию фиброза, в том и числе и в экспериментальных моделях [13].

Таким образом, развитие ХГС сопровождается активацией воспаления с повышением выработки TNF- α при снижении антиоксидантной защиты с уменьшением активности ферментов CAT и GPX, а также стимуляцией процессов неоангиогенеза, ведущим к перестройке сосудистой архитектоники в печени, что способствует прогрессированию заболевания вплоть до развития цирроза печени. При корреляционном анализе выявлена статистически значимая обратная взаимосвязь средней степени TNF- α с активностью каталазы и прямая значимая взаимосвязь средней степени антиоксидантных ферментов между собой. То есть, чем более выражена активность воспаления, тем более угнетена антиоксидантная защита, что также способствует прогрессированию повреждения гепатоцитов. Полученные нами результаты подтверждают данные и других исследований [6-8, 10].

Проведенный анализ отдельных полиморфизмов генов в группах доноров и пациентов с ХГС показал значимые различия по распределению генотипов только для маркера *VEGFA* в регионе -634G/C. Тем не менее, отмечена ассоциация полиморфизма гена *CAT* (G262A) и *GPX4* (C718T) со снижением выработки ферментов CAT и GPX ($K_i=0,523$; $=0,049$ и $K_i=0,561$; $p=0,047$ соответственно), что может приводить к истощению механизмов антиоксидантной защиты и прогрессированию поражения печени в группе носителей. Соотношение генотипов *CC*, *CT* и *TT* в группе больных ХГС данного генетического маркера сопоставимо с данными, полученными при обследовании пациентов с ХГС в Нижегородской области, у которых частота встречаемости генотипов была 40, 44,3 и 15,7% соответственно [17].

Быстрые успехи в технологиях секвенирования ДНК также сделали возможным проведение исследований всего генома сложных заболеваний. В этом контексте исследования общегеномной ассоциации (GWAS) широко использовались для выявления причинных геномных вариантов, подразумеваемых в выражении различных заболеваний человека. Стандартный подход основан на одномерной регрессии (логистическая регрессия в исследованиях случай-контроль), когда пациенты тестируются против здоровых людей в одном или нескольких локусах. Этот подход фокусируется на выявлении общих маркеров с частотой мар-

керных аллелей выше 5%, хотя вполне вероятно, что анализ низкочастотных (<5 %) и редких (<0,5 %) вариантов сможет объяснить дополнительные риски заболеваний или изменчивость признаков. Вместо тестирования каждого варианта по отдельности маркерам предлагается использовать оценку кумулятивных эффектов нескольких генетических вариантов в гене или области для повышения эффективности, когда несколько вариантов в группе связаны с данным заболеванием или признаком [20].

Заключение

Развитие ХГС сопровождается активацией процессов воспаления, оксидантного стресса и неоангиогенеза, что сопровождается повышением выработки TNF- α на фоне снижения активности ферментов антиоксидантной защиты CAT и GPX, а также активацией неоангиогенеза за счет повышения уровня VEGF.

Проведенный анализ отдельных полиморфизмов генов патогенетически значимых молекул: *TNF- α* в регионе -308G/A (rs1800629), *CAT* в регионе -262G/A (rs1001179), *GPX4* в регионе -718C/T (rs713041), *VEGFA* в регионе -634G/C (rs2010963) и *IL28B* в регионе C/T (rs12979860) в группах контроля и пациентов с ХГС показал значимые различия по распределению генотипов только для маркера *VEGFA*. В регионе -634G/C: гомозиготы *CC* были с высокой вероятностью только в группе пациентов с ХГС, а в популяции здоровых не обнаруживались. Можно предположить, что аллель *C* гена *VEGFA* (G634C) является фактором риска развития ХГС при инфицировании вирусом. При этом была выявлена ассоциацию полиморфизма гена *CAT* (G262A) и *GPX4* (C718T) со снижением активности ферментов CAT и GPX, что может приводить к истощению механизмов антиоксидантной защиты и прогрессированию поражения печени в группе носителей.

Литература

1. *Global hepatitis report, 2017* [Geneva, Switzerland]: World Health Organization. 2017; URL:<http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>
2. Пименов Н.Н., Комарова С.В., Карандашова И.В., Цапкова Н.Н., Волчкова Е.В., Чуланов В.П. Гепатит С и его исходы в России: анализ заболеваемости, распространенности и смертности до начала программы. *Инфекционные болезни*. 2018; 16(3): 37-45.
3. Blach S., Zeuzem S., Manns M., Altraif I., Duberg A., Muljono D.H., et al. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017; 2(3): 161-76.
4. Хазанов А.И., Плюснин С.В., Васильев А.П., Павлов А.И., Пехташев С.Г., Скворцов С.В. Алкогольные и вирусные циррозы

- печени у стационарных больных (1996–2005 гг.): распространенность и исходы. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2007; 17(2): 19–27.
5. WHO International Agency for Research on Cancer, editor. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Volume 100: A review of human carcinogens. Part B: Biological agents. Lyon: 2012.
 6. Brenner D.A. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2009; 120: 361–8.
 7. Bataller R., Brenner D.A. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest*. 2005; 115 (2): 209–18. doi: 10.1172/JCI24282
 8. Li K. Activation of chemokine and inflammatory cytokine response in hepatitis C virus-infected hepatocytes depends on Toll-like receptor 3 sensing of hepatitis C virus double-stranded RNA intermediates. *Hepatology*. 2012; 55(3): 666–75. doi: 10.1002/hep.24763. Epub 2012 Jan 30
 9. Кичерова О.А., Рейхерт Л.И., Кичерова К.П. Вред и польза окислительного стресса. *Медицинская наука и образование Урала*. 2019; 20(4): 193–6.
 10. Đorđević V., Đorđević D.S., Kocić B., Dinić M.I., Sokolović D., Stanković J.P. The Impact of Hepatitis C Virus Genotypes on Oxidative Stress Markers and Catalase Activity Research Article | Open Access Volume 2021 | Article ID 6676057 | <https://doi.org/10.1155/2021/6676057>
 11. Battaglia S., Angus P., Chin-Dusting J.P. Role of the endothelium on vasoactive agents in patients with liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 21(7): 1189–93.
 12. Шёкотов В.В., Шёкотова А.П., Булатова И.А. Взаимосвязь маркеров эндотелиальной дисфункции и фиброза при хроническом гепатите и циррозе печени. *Клиницист*. 2011; 3: 68–73.
 13. Yang, Liu., Junghee Kwon., PopovY., Gabriella B. Gajdos., Tamas Ordog., et al. Vascular Endothelial Growth Factor Promotes Fibrosis Resolution and Repair in Mice [Electronic resonance]. *Gastroenterology*. 2014; 146(5): 1339. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.061>
 14. Huang Hongjin. Mitchell L. Shiffman, Ramsey C. Cheung, et al. Identification of Two Gene Variants Associated With Risk of Advanced Fibrosis in Patients With Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*. 2006; 130: 1679–87.
 15. Sarikaya E., Doğan S. Glutathione Peroxidase in Health and Diseases, Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease, Margarete Dulce Bagatini, IntechOpen, Submitted: May 30th 2019 Reviewed: January 2nd 2020 Published: January 31st 2020 DOI: 10.5772/intechopen.91009. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/70955>
 16. Рюмин А.М., Корочкина О.В., Собчак Д.М. Новые возможности прогнозирования эффективности противовирусной терапии хронического гепатита С. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015; 20(2): 25–9.
 17. Николаева Л.И., Колотвин А.В., Самоходская Л.М., Сапронов Г.В. Анализ влияния генетических факторов вируса гепатита С и полиморфизма генов инфицированных людей на развитие фиброза печени. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2012; 5: 7–13.
 18. Таратина О.В., Краснова Т.Н., Самоходская Л.М., Лопаткина Т.Н., Ткачук В.А., Мухин Н.А. Полиморфизм генов дисфункции эндотелия и скорость прогрессирования фиброза печени при хроническом гепатите С. *Терапевтический архив*. 2014; 86(4): 45–51.
 19. Шелудько В.С., Подлужная М.Я. *Теоретические основы медицинской статистики: метод. рекомендации*. Пермь, 2001.
 20. Guinot F., Szafranski M., Ambroise C., et al. Learning the optimal scale for GWAS through hierarchical SNP aggregation. *BMC Bioinformatics*. 2018; 19, 459. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2475-9>

References

1. *Global hepatitis report, 2017* [Geneva, Switzerland]: World Health Organization. 2017; URL:<http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>
2. Pimenov N.N., Komarova S.V., Karandashova I.V., Tsapkova N.N., Volchkova E.V., Chulanov V.P. Hepatitis C and its outcomes in Russia: analysis of morbidity, prevalence and mortality before the start of the program. *Infektsionnye bolezni*. 2018; 16(3): 37–45. (in Russian)
3. Blach S., Zeuzem S., Manns M., Altraif I., Duberg A., Muljono D.H., et al. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017; 2(3): 161–76.
4. Khazanov A.I., Plyusnin S.V., Vasil'ev A.P., Pavlov A.I., Pekhtashev S.G., Skvortsov S.V. Alcohol and viral liver cirrhosis in inpatient patients (1996–2005): prevalence and outcomes. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2007; 17(2): 19–27. (in Russian)
5. WHO International Agency for Research on Cancer, editor. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Volume 100: A review of human carcinogens. Part B: Biological agents. Lyon: 2012.
6. Brenner D.A. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2009; 120: 361–8.
7. Bataller R., Brenner D.A. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest*. 2005; 115 (2): 209–18. doi: 10.1172/JCI24282
8. Li K. Activation of chemokine and inflammatory cytokine response in hepatitis C virus-infected hepatocytes depends on Toll-like receptor 3 sensing of hepatitis C virus double-stranded RNA intermediates. *Hepatology*. 2012; 55(3): 666–75. doi: 10.1002/hep.24763. Epub 2012 Jan 30
9. Kicherova O.A., Reykhert L.I., Kicherova K.P. The harm and benefits of oxidative stress. *Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala*. 2019; 20 (4): 193–6. (in Russian)
10. Đorđević V., Đorđević D.S., Kocić B., Dinić M.I., Sokolović D., Stanković J.P. The Impact of Hepatitis C Virus Genotypes on Oxidative Stress Markers and Catalase Activity Research Article | Open Access Volume 2021 | Article ID 6676057 | <https://doi.org/10.1155/2021/6676057>
11. Battaglia S., Angus P., Chin-Dusting J.P. Role of the endothelium on vasoactive agents in patients with liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 21(7): 1189–93.
12. Shchekotov V.V., Shchekotova A.P., Bulatova I.A. The relationship of markers of endothelial dysfunction and fibrosis in chronic hepatitis and cirrhosis of the liver. *Klinitsist*. 2011; 3: 68–73. (in Russian)
13. Yang, Liu., Junghee Kwon., PopovY., Gabriella B. Gajdos., Tamas Ordog., Rolf A. Brekken., et al. Vascular Endothelial Growth Factor Promotes Fibrosis Resolution and Repair in Mice [Electronic resonance]. *Gastroenterology*. 2014; 146(5): 1339. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.061>
14. Huang Hongjin. Mitchell L. Shiffman, Ramsey C. Cheung, et al. Identification of Two Gene Variants Associated With Risk of Advanced Fibrosis in Patients With Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*. 2006; 130: 1679–87.

15. Sarıkaya E., Doğan S. Glutathione Peroxidase in Health and Diseases, Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease, Margarete Dulce Bagatini, IntechOpen, Submitted: May 30th 2019 Reviewed: January 2nd 2020 Published: January 31st 2020 DOI: 10.5772/intechopen.91009. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/70955>
16. Ryumin A.M., Korochkina O.V., Sobchak D.M. New possibilities for predicting the effectiveness of antiviral therapy for chronic hepatitis C. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2015; 20(2): 25-9. (in Russian)
17. Nikolaeva L.I., Kolotvin A.V., Samokhodskaya L.M., Sapronov G.V. Analysis of the influence of genetic factors of the hepatitis C virus and gene polymorphism of infected people on the development of liver fibrosis. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2012; 5: 7-13. (in Russian)
18. Taratina O.V., Krasnova T.N., Samokhodskaya L.M., Lopatkina T.N., Tkachuk V.A., Mukhin N.A. Polymorphism of endothelial dysfunction genes and the rate of progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2014; 86(4): 45-51. (in Russian)
19. Shelud'ko V.S., Podluzhnaya M.Ya. *Theoretical foundations of medical statistics*. [Theoretical foundations of medical statistics: metod. Rekomendatsii]. Perm; 2001. (in Russian)
20. Guinot F., Szafranski M., Ambroise C., et al. Learning the optimal scale for GWAS through hierarchical SNP aggregation. *BMC Bioinformatics*. 2018; 19, 459. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2475-9>

Сведения об авторах:

Булатова Ирина Анатольевна, доктор мед. наук, зав. каф. нормальной физиологии, проф. каф. факультетской терапии № 2, профессиональной патологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, e-mail: bula.1977@mail.ru;

Шевлюкова Татьяна Петровна, доктор мед. наук, проф. каф. акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России, e-mail: tata21.01@mail.ru;

Щёктова Алевтина Павловна, доктор мед. наук, проф. каф. факультетской терапии № 2, профессиональной патологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, e-mail: al_shchekotova@mail.ru;

Кривцов Александр Владимирович, канд. мед. наук, зав. лаб. иммуногенетики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», e-mail: krivtsov@fcrisk.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Брус Т.В.¹, Васильев А.Г.¹, Трашков А.П.²

Основные биохимические маркеры при неалкогольной жировой болезни печени различной степени тяжести (экспериментальное исследование)

¹ФГБУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, 194000, Санкт-Петербург, Литовская ул., д. 2;

²ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1

Введение. Своевременная диагностика и лечение и профилактика неалкогольной жировой болезни печени остаются одними из наиболее актуальных медицинских и социальных проблем. Ключевую роль в изучении этиологии и механизмов патогенеза играет поиск адекватной экспериментальной модели неалкогольной жировой болезни печени. Принимая во внимание патогенетические особенности развития данной патологии, интерес представляет разработка модели с помощью воздействия на подопытных животных гиперкалорийной гепатогенной диетой, содержащей повышенное количество углеводов. Эта модель применена в настоящем исследовании. **Цель** исследования – анализ биохимического профиля и наиболее значимых маркеров антиоксидантной системы у крыс на фруктозоиндуцированной модели неалкогольной жировой болезни печени

Методика. Оработаны модели неалкогольной жировой болезни печени различной степени тяжести у крыс: легкая степень тяжести – неалкогольный стеатоз печени и средняя степень – неалкогольный стеатогепатит. Исследование проведено на 100 самцах крыс Wistar. Моделирование неалкогольного стеатоза осуществлялось путем замены питьевой воды на 10-процентный раствор фруктозы. Крысы, у которых моделировали развитие стеатогепатита получали сухой гранулированный корм, содержащий по массе 60% фруктозы. Определяли следующие биохимические показатели: уровень глюкозы, общее содержание белков в плазме крови, концентрацию общего билирубина и его прямой фракции, активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы и щелочной фосфатазы, уровень гомоцистеина, содержание общего холестерина, триацилглицеридов, каталазы, супероксиддисмутазы и малонового диальдегида.

Результаты. Воспроизведенные нами модели характеризовались развитием билирубинемии, холестеринемии, активацией перекисного окисления липидов и супрессией антиоксидантных механизмов, цитолитическим и холестатическим синдромами. Степень нарушения обмена веществ крыс зависела от степени тяжести моделируемого заболевания.

Заключение. Показана целесообразность определения биохимических маркеров: активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, уровень общего билирубина, триглицеридов, малонового диальдегида, супероксиддисмутазы с целью определения степени тяжести неалкогольной жировой болезни печени и своевременной коррекции метаболических нарушений.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени; стеатоз печени; стеатогепатит; метаболизм; крысы

Для цитирования: Брус Т.В., Васильев А.Г., Трашков А.П. Основные биохимические маркеры при неалкогольной жировой болезни печени различной степени тяжести (экспериментальное исследование). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1): 44–51.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.44-51

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Брус Т.В., Трашков А.П., Васильев А.Г.; сбор и обработка материала – Брус Т.В., Трашков А.П.; подготовка иллюстративного материала – Васильев А.Г.; написание текста – Брус Т.В.; редактирование – Васильев А.Г.

Для корреспонденции: Брус Татьяна Викторовна, e-mail: bant.90@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.06.2021

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Brus T.V.¹, Vasiliev A.G.¹, Trashkov A.P.²**The main biochemical markers of non-alcoholic fatty liver disease of various severity (experimental study)**¹ St. Petersburg State Pediatric Medical University, Litovskaya St. 2, St. Petersburg 194000;² B.P. Konstantinov St. Petersburg Institute of Nuclear Physics of the National Research Center «Kurchatov Institute», Orlova Roshcha Microdistrict 1, Gatchina 188300

Timely diagnosis, treatment, and prophylaxis of non-alcoholic fatty liver disease remain one of the most important medical and social problems in spite of long-standing, extensive studies of the pathogenesis of this disease. A search for an adequate experimental model for non-alcoholic fatty liver disease plays a key role in the studies of its etiology and mechanisms. Taking into consideration all pathogenetic peculiarities of this pathology, of the utmost interest is developing an animal model using a hypercaloric, hepatogenic diet rich in carbohydrates. This particular approach was used in the present study. **The aim** of the study was to assess changes in the biochemical profile, as well as in the most significant markers of the antioxidant system in a rat model of fructose-induced, non-alcoholic fatty liver disease.

Methods. Non-alcoholic fatty liver disease models of varying severity were used: mild non-alcoholic steatosis and moderate non-alcoholic steatohepatitis. The study was conducted on 100 male Wistar rats. Non-alcoholic steatosis was modeled by replacing the drinking water with a 10% solution of fructose. Development of steatohepatitis was simulated by a dry granular diet containing 60% fructose by weight. The following biochemical parameters were measured: plasma concentrations of plasma glucose, total protein, total bilirubin and its direct fraction, enzyme activities of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase, and plasma concentrations of homocysteine, total cholesterol, triacylglycerides, catalase, superoxide dismutase, and malonic dialdehyde.

Results. Both models were characterized with bilirubinemia, cholesterolemia, lipid peroxidation activation and antioxidation mechanism suppression, cytolytic and cholestatic syndromes. The extent of the metabolic disorders depended on the severity of the modeled ailment.

Conclusion. The study demonstrated the expediency of determining biochemical markers, including levels of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, total bilirubin, triglycerides, malondialdehyde, and superoxide dismutase, to determine the severity of non-alcoholic fatty liver disease and the timely correction of the related metabolic disorders.

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease; hepatitis; hepatic steatosis; metabolism; rats

For citation: Brus T.V., Vasiliev A.G., Trashkov A.P. The main biochemical markers of non-alcoholic fatty liver disease of various severity (experimental study). *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(1): 44–51. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.44-51

Author's contribution: concept and design of the study – Brus T.V., Trashkov A.P., Vasiliev A.G.; collection and processing of material – Brus T.V., Trashkov A.P.; preparation of illustrative material – Vasiliev A.G.; statistical processing – Brus T.V., Vasiliev A.G.; witing the text – Brus T.V.; editing – Vasiliev A.G.

For correspondence: *Tatiana V. Brus*. Ph.D. in Medicine, Docent of the Department of Pathological Physiology with the course of Immunopathology of St. Petersburg State Medical Pediatric University, Saint Petersburg, Russian Federation, e-mail: bant.90@mail.ru

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

Financing. The study had no sponsorship.

Information about authors:Brus T.V., <https://orcid.org/0000-0001-7468-8563>Vasiliev A.G., <https://orcid.org/0000-0002-8539-7128>

Received 16.06.2021

Accepted 20.01.2022

Publised 15.03.2022

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) – клинко-лабораторный синдром, характеризующийся глубокими нарушениями липидного обмена, структурно проявляющийся патологическим накоплением гепатоцитами липидов [1–3]. В настоящее время НАЖБП является преобладающей гепатопатией в мире и одной из составляющих метаболического синдрома [4, 5]. Со-

временная классификация течения заболевания включает 3 стадии: неалкогольный стеатоз (НАС), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) и цирроз. Накопление липидов в гепатоцитах – следствие снижения окисления свободных жирных кислот (СЖК) в митохондриях, а также повышенного их поступления в печень. Прогрессирующее нарастание СЖК приводит к прямому

повреждающему действию на мембраны клеток, активации перекисного окисления липидов (ПОЛ), развитию оксидативного стресса, хронического воспаления (НАСГ), стимуляции коллагеногенеза и прогрессирующей фиброза.

В Российской Федерации по данным скрининговых исследований НАЖБП встречалась у 27% обследованных пациентов, из них НАС имели 80%, НАСГ 17%, цирроз 3% [6]. 80% всех циррозов в РФ являются прямым результатом НАЖБП [6, 7]. Каждый третий пациент у терапевта в России имеет те или иные проявления НАЖБП и метаболического синдрома [4-6]. Рост выявляемости НАЖБП при первичном приеме пациентов напрямую коррелирует с увеличением патологий сердечно-сосудистой и эндокринной систем [8]. Неудивительно, что распространенность НАЖБП растет с каждым годом с учетом текущих тенденций в питании и преобладании малоподвижного образа жизни [9, 10].

Ввиду отсутствия четкого понимания причин и патогенеза развития НАЖБП, отсутствуют и эффективные методы профилактики и лечения этого заболевания. Золотым стандартом в диагностике, подтверждающим прогрессирование НАЖБП, является биопсия печени. Однако применение биопсии у всех пациентов невозможно [6, 11, 12]. Это ставит задачу при разработке тест-систем для воспроизведения различных компонентов заболевания в модельных экспериментах *in vivo* обращать особое внимание на углубленное изучение особенностей динамики показателей системы крови.

Принимая во внимание вышеизложенное, мы посчитали важным исследовать особенности биохимического профиля и антиоксидантной системы крыс на модели НАЖБП, наиболее часто встречающейся в научных и доклинических исследованиях – модели фруктозоиндуцированной жировой дистрофии.

Методика

Все процедуры, связанные с содержанием и использованием животных в эксперименте проводили с соблюдением директив Европарламента и Совета европейского союза (2010/63/EU), регламентирующих использование животных в научных целях. Исследование проведено на 100 самцах крыс Wistar, массой тела на момент включения в исследование 220-240 г. Животные получены из ФГУП ПЛЖ «Рапполово» (Ленинградская область). Перед началом исследования план испытаний и стандартные операционные процедуры прошли этическую экспертизу и получили одобрение.

Было сформировано 3 экспериментальные группы: 1) «Контроль» ($n=12$) – крысы, у которых произ-

водили исследование показателей системы крови для расчета референсных значений. 2) «Стеатогепатит» ($n=44$) – крысы, которые на протяжении всего эксперимента в качестве корма получали брикеты, содержащие пищевые компоненты в следующих соотношениях (по массе): 21% белок, 5% животный жир, 60% фруктоза, 8% целлюлоза, 5% минеральные вещества, 1% витамины. 3) «Стеатоз печени» ($n=44$) – крысы, у которых в качестве питьевой воды на всем протяжении эксперимента использовали 10%-й раствор фруктозы.

Взятие крови производили в контрольных точках исследования путем транскутанной пункции сердца крысы в вакуумные пробирки в объеме 6 мл. После взятия крови животные подвергались эвтаназии. В группе «Контроль» взятие крови производили в день начала эксперимента, в группах «Стеатогепатит» и «Стеатоз печени» – на 21-, 28- и 37-е сут от начала эксперимента.

Общепринятыми методами *in vitro* определяли: уровень глюкозы (Glu), общее содержание белков в плазме крови (Обелок), концентрацию общего билирубина (Об) и его прямой фракции (ПБ), активность ферментов: аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и щелочной фосфатазы (ЩФ). Определяли также уровень гомоцистеина, содержание общего холестерина (ОХ), триацилглицеридов (ТАГ). Оценивали интенсивность ПОЛ (уровень малонового диальдегида (МДА), и состояние антиоксидантной системы (уровень каталазы и, супероксиддисмутазы (СОД).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью программного обеспечения SPSSforWindows 13.0. С помощью расчета критерия Колмогорова-Смирнова определялся характер распределения данных. С помощью t-критерия Стьюдента сравнивались средние данные независимых выборочных совокупностей (при нормальном распределении вариант в выборке) и U-критерия Манна-Уитни (при распределении вариант, отличным от нормального). С помощью дисперсионного анализа ANOVA осуществляли сравнение средних данных зависимых выборочных совокупностей (при нормальном характере распределения вариант в выборке) и χ^2 -критерия Фридмана (при распределении, отличным от нормального), $p<0,05$ (вероятность не менее 95%) принимали статистически значимым уровнем отличий.

Результаты и обсуждение

Интегральным показателем, позволяющим определить степень тяжести патологического процесса и, как следствие, напряженность используемых моделей, яв-

ляется уровень летальности крыс в обследуемых группах (рис. 1).

Высокоуглеводная (60% фруктозы от общей массы корма) и насыщенная липидами диета приводит к быстрому развитию патологических процессов в сердечно-сосудистой системе и печени крыс, что подтверждается 32-процентной летальностью животных к моменту окончания эксперимента (37-е сут). Точную причину смерти (острая сердечно-сосудистая недостаточность) удалось установить только у 2 животных группы «Стеатогепатит» (из 14 погибших особей) с минимальными изменениями со стороны внутренних органов. «Питьевая модель» фруктозоиндуцированной НАЖБП приводит к медленному и умеренному развитию нарушений работы печени и других органов у подопытных крыс. Наблюдаемые случаи летальности (2 особи из 44 в группе «Стеатоз печени») статистически значимо напрямую не связаны с развитием поражения печени и объясняются индивидуальными особенностями животных.

Анализ основных биохимических параметров крови характеризующих структурно-функциональное состояние печени подопытных животных также подтверждает обоснованность выбора модели фруктозоиндуцированной неалкогольной жировой болезни печени для изучения особенностей патогенеза НАЖБП [13, 14]. Наблюдались значительные различия в динамике изучаемых параметров в группах животных с различной степенью тяжести заболевания. Функции печени у животных со стеатогепатитом нарушены в значительно большей степени, чем у животных со стеатозом печени, что проявляется более тяжелыми нарушениями пигментного и липидного обменов, цитолитиче-

ским и холестатическим синдромами и развитием гипергомоцистеинемии.

Уже начиная с 21-х сут у животных группы «Стеатогепатит» отмечалось увеличение концентрации общего билирубина в плазме крови, преимущественно за счет увеличения его непрямой фракции, которая продолжала существенно нарастать в течение всего периода наблюдений ($p < 0,001$). Такой рост, на наш взгляд, являлся отражением прогрессирующей дисфункции печени по мере развития стеатогепатита. Подтверждением этого тезиса является отсутствие параллельного увеличения концентрации прямого билирубина в крови подопытных крыс ($p = 0,363$), статистически значимо отличающегося от показателей группы «Контроль» на всем протяжении эксперимента (рис. 2). В противоположность модели жировой дистрофии печени средней степени тяжести (Стеатогепатит), на модели стеатоза печени нарушения пигментного обмена были умеренными. Отмечалось медленное, но статистически значимое увеличение концентрации общего билирубина в крови животных группы «Стеатоз печени» ($p = 0,045$). При этом значительных колебаний содержания прямого билирубина не отмечалось (рис. 2), что свидетельствует о развитии умеренной дисфункции гепатоцитов.

Анализ активности у животных со стеатогепатитом внутриклеточных ферментов, характеризующих интенсивность цитолитического синдрома поражения печени (АЛТ и АСТ) выявил факт синхронного, увеличения их активности (рис. 3), достигающей статистически значимого уровня отличий с контрольными значениями уже на начальных этапах эксперимента (АЛТ: $p < 0,001$, АСТ: $p < 0,001$) и медленно нарастающей в течение всего периода наблюдений.

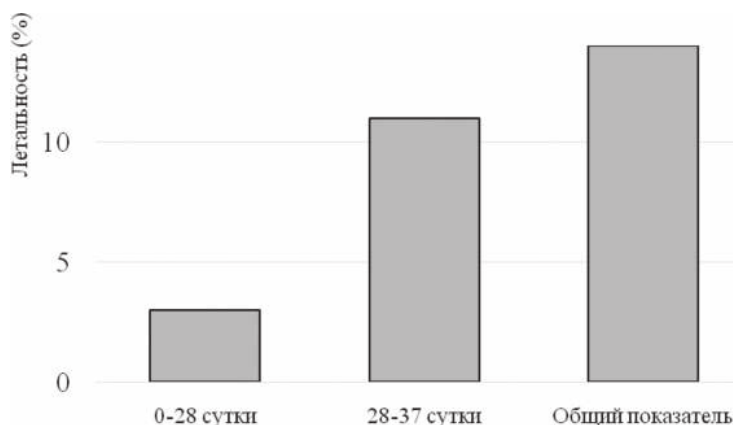


Рис. 1. Динамика показателей летальности (%) в экспериментальной группе «Стеатогепатит».

Fig. 1. Dynamics of mortality rates (%) in the steatohepatitis experimental group.

Показатели активности печеночных трансаминаз на модели жировой дистрофии печени легкой степени тяжести (группа «Стеатоз печени») нарастали медленно, только на 37-е сут эксперимента достигая статистически значимого уровня отличий с контрольными значениями (АЛТ: $p=0,001$, АСТ: $p=0,002$). При этом интенсивность цитолитического синдрома у животных группы «Стеатоз печени» была выражена в значительной меньшей степени, что подтверждается статистически значимо более низким уровнем активности АЛТ и АСТ в обследуемой группе, по сравнению с по-

казателями в группе «Стеатогепатит» (показатель АСТ в среднем ниже на 8,5 ЕД/л ($p=0,011$), показатель АЛТ – на 13,4 ЕД/л ($p=0,004$)) (рис. 3). Это подтверждает правильность выбора моделей поражения печени, отличающихся степенью тяжести НАЖБП.

Анализ уровня ЛДГ в крови животных со стеатогепатитом выявил значимую, умеренную тенденцию к увеличению. Уровень ЛДГ в группе «Стеатоз печени» на всем протяжении эксперимента статистически значимо не отличался от показателей интактных животных ($p=0,110$). Сравнительный анализ содержания ЛДГ между группами «Стеатоз печени» и «Стеатогепатит» установил статистически значимо более низкое значение активности изучаемого фермента у животных с более легкой формой поражения печени (рис. 3): в среднем, в группе «Стеатоз печени» уровень ЛДГ был ниже чем в группе «Стеатогепатит» на 13,9 ЕД/л, ($p=0,026$), что является еще одним доказательством отличий между используемыми моделями по степени тяжести патологических изменений в печени.

Изучение динамики ЩФ – основного биохимического маркера холестатического синдрома, выявило умеренное, но значимое нарастание активности этого фермента в группе «Стеатогепатит» ($p<0,001$). Уровень глюкозы в крови крыс группы «Стеатогепатит» медленно умеренно повышался ($p=0,015$). Статистически значимого увеличения концентрации глюкозы в крови крыс со стеатозом печени не выявлено ($p=0,067$).

Анализ динамики уровня гомоцистеина – важного маркера печеночной и эндотелиальной дисфункции, у крыс со стеатогепатитом выявил значимое увеличе-

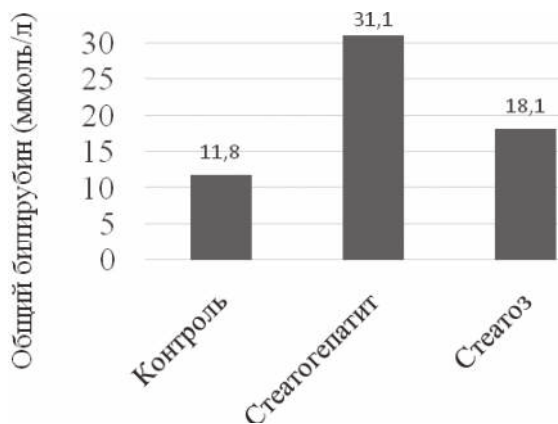


Рис. 2. Динамика общего билирубина (моль/л) в экспериментальных группах.

Fig. 2. Dynamics of total bilirubin (mmol/l) in the experimental groups.

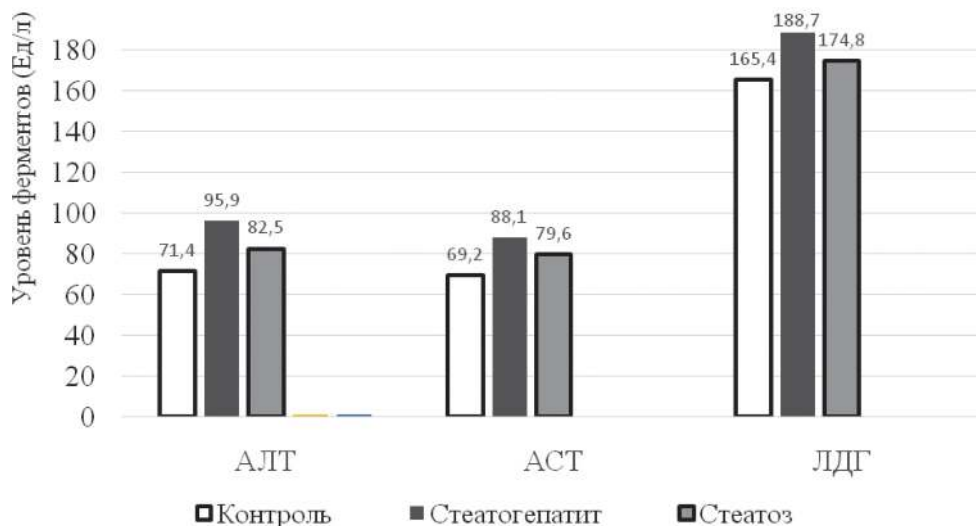


Рис. 3. Уровень АЛТ, АСТ, ЛДГ (Ед/л) в экспериментальных группах.

Fig. 3. ALT, AST and LDH (units/l) in the experimental groups.

ние этого показателя в ходе проведения эксперимента ($p=0,001$). Нарастание уровня гомоцистеина показано и при биохимическом анализе крови животных группы «Стеатоз печени», однако оно носило медленный, умеренный характер и не было статистически значимым ($p=0,109$).

Основу патогенеза жировой дистрофии печени в обеих используемых в исследовании моделях поражения печени составляет глубокое нарушение липидного обмена с развитием гиперхолестеринемии и гипертриглицеридемии (рис. 4). В группе «Стеатогепатит» наблюдалось выраженное, значимое увеличение концентрации общего холестерина в крови подопытных животных уже на ранних этапах эксперимента ($p<0,001$). Параллельно, значительно более высокими темпами по сравнению с другими фракциями холестерина крови, происходило существенное нарастание концентрации триглицеридов ($p<0,001$). При этом, соотношение ТГ/ОХ увеличилось с 0,53 на 21-е сут эксперимента до 0,79 на 37-е сут (контрольное значение – 0,52). В группе животных «Стеатоз печени» также наблюдалось увеличение концентрации общего холестерина и триглицери-

дов в крови (рис. 4), однако оно происходило значительно медленнее и было более умеренным (ОХ: $p=0,003$, ТГ: $p=0,002$). При этом, соотношение ТГ/ОХ увеличилось с 0,46 на 21-е сут до 0,67 на 37-е, т.е. было несколько меньшим, по сравнению с группой «Стеатогепатит».

Гиперкалорийная диета и избыточное накопление жировых отложений приводят к тканевой гипоксии, митохондриальной дисфункции и развитию окислительного стресса [13, 15]. Это подтверждают серьезные метаболические расстройства в организме экспериментальных животных, сопровождающие развитие НАЖБП, приводящие к активации процессов перекисного окисления липидов и выраженной депрессии активности ферментативного звена антиоксидантной системы. Это отражалось в прогрессивном увеличении концентрации МДА и снижении активности основных антиоксидантных ферментов (каталаза, супероксиддисмутаза) (табл.).

Анализ динамики МДА в крови животных группы «Стеатогепатит» показал быстрое, и выраженное нарастание этого признака активации ПОЛ, регистрируемое уже на ранних стадиях развития заболевания,

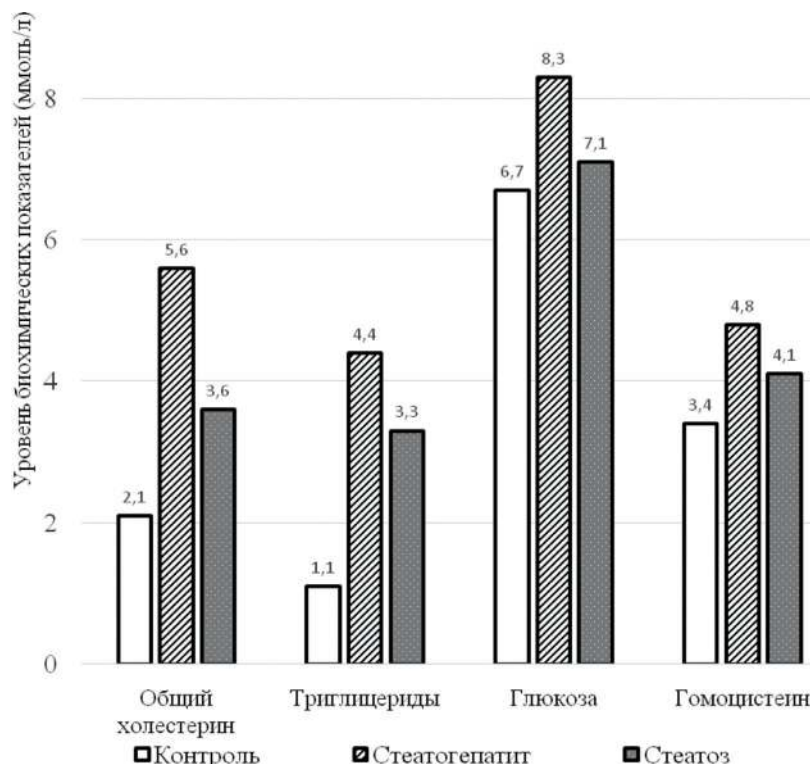


Рис. 4. Динамика основных биохимических показателей (ОХ,ТГ,Глу, Нсг) (ммоль/л).

ОХ – общий холестерин; ТГ – триглицериды; Глу – глюкоза; Нсг– гомоцистеин

Fig. 4. Dynamics of the main biochemical variables, OH, TG, Glu, and Hct (mmol/l).

Таблица /Table

Ферменты антиоксидантной системы и интенсивность перекисного окисления у крыс с НАЖБП различной степени тяжести, (M±SE)

The state of the enzymes of the antioxidant system and the intensity of peroxidation in rats with non-alcoholic fatty liver disease of varying severity, (mean ±SE)

| Группы Groups | Период наблюдений (сут) Observation period (day) | n | Исследуемые показатели Researched indicators | |
|-----------------------------------|---|----|---|---------------------------------------|
| | | | СОД, у.е./мл SOD, units/ml | Каталаза, ммоль/л Catalase, mmol/l |
| Контроль (Control) | 0 | 12 | 6,8±0,10 | 0,18±0,01 |
| Стеатогепатит Steatohepatitis | 21 | 12 | 5,9±0,19 ¹ | 0,15±0,01 |
| | 28 | 10 | 5,7±0,15 ¹ | 0,11±0,01 ¹ |
| | 37 | 12 | 4,9±0,23 ¹ | 0,09±0,01 ¹ |
| Стеатоз печени Liver steatosis | 21 | 15 | 6,2±0,26 | 0,15±0,01 |
| | 28 | 15 | 5,9±0,07 ¹ | 0,15±0,01 |
| | 37 | 16 | 5,5±0,10 ¹ | 0,13±0,01 ¹ |

Примечание. ¹ – отличия от группы «Контроль» значимы на принятом уровне значимости ($p<0,05$); ² – отличия от группы «Стеатогепатит» значимы на принятом уровне значимости ($p<0,05$) НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени.

Note. ¹ – differences from the “Control” ($p<0.05$); ² – differences from the “Steatohepatitis” group ($p<0.05$). NAFLD -non-alcoholic fatty liver disease.

$p<0,001$ (табл.). Интенсивность перекисного окисления в организме животных группы «Стеатоз печени» была значительно меньшей, чем у животных с более тяжелой формой НАЖБП (группа «Стеатогепатит»). Это проявлялось в более медленном и умеренном нарастании уровня МДА в течение периода наблюдений ($p=0,010$). К моменту окончания эксперимента (37-е сут исследования) содержание МДА в обследованной группе было выше показателей контрольной группы в среднем на 9,6 ммоль/л ($p=0,001$) и при этом статистически значимо ниже показателей группы «Стеатогепатит» в среднем на 11,9 ммоль/л ($p=0,001$).

На фоне активации перекисного окисления в группах животных с НАЖБП различной степени тяжести наблюдалось значительное уменьшение активности основных ферментов антиоксидантной системы (СОД и каталазы крови) (табл.). В группе «Стеатогепатит» активность СОД быстро, прогрессивно и значимо уменьшалась по мере развития патологического процесса ($p<0,001$). Аналогично происходило снижение содержания и другого важного фермента антиоксидантной системы – каталазы крови ($p=0,001$). Анализ динамики содержания ферментов антиоксидантной системы в крови животных группы «Стеатоз печени» выявил более умеренное снижение их активности. Статистически значимое по сравнению с контрольными группами уменьшение активности СОД у животных этой группы было отмечено на 28-е сут эксперимента ($p=0,002$), а каталазы – только на 37-е сут ($p=0,009$).

Таким образом, полученные результаты подтверждают, что фруктоза в различной концентрации приводит к развитию НАЖБП различной степени тяжести: стеатозу или к стеатогепатиту. Данные проявления могут быть обусловлены стимулированием липогенеза, ингибированием β-окисления жирных кислот и нарушением выведения липидов из печени [13, 16, 17]. Исползованный способ моделирования является адекватным для экстраполяции результатов на организм человека, благодаря отражению всех звеньев исследуемой патологии в достаточно короткие сроки: формирование гиперхолестеринемии, триглицеридемии, инсулинорезистентности, развитию метаболического синдрома. Исследование показало целесообразность определения биохимических маркеров структурно-функционального состояния печени с целью определения степени тяжести неалкогольной жировой болезни печени и своевременной коррекции метаболических нарушений.

Литература

(п.п. 1-5; 8-17 см. References)

- Брус Т. В., Васильев А.Г. Современное представление о неалкогольной жировой болезни печени. *Российские биомедицинские исследования.* 2020; 5(1): 18–25.
- Трашков А.П., Брус Т.В., Васильев А.Г., Артеменко М.Р., Печатникова В.А. и др. Динамика показателей красной крови у крыс с неалкогольной жировой болезнью печени и возможности ее коррекции. *Клиническая патофизиология.* 2017; 23(3): 66–72.

References

1. Unalp-Arida A., Ruhl C.E. Noninvasive fatty liver markers predict liver disease mortality in the U.S. population. *J Hepatol.* 2016; 63: 1170–83.
2. Younossi Z.M. Non-alcoholic fatty liver disease – a global public health perspective. *J Hepatol.* 2019; 70(3): 531–44.
3. Zeinab S., Mahboobe R., Mahyar M., Bitra B., Ehsan A. Comparison of platelet number and function between non-alcoholic fatty liver disease and normal individuals. *J Resear Med Sciences.* 2017; 22: 75.
4. Kanwar P., Kowdley K.V. The Metabolic syndrome and its influence on non-alcoholic steatohepatitis. *Clinics in Liver Disease.* 2016; 20: 225–43.
5. Winkler T.W., Gunther F., Hollerer S., et al. A joint view on genetic variants for adiposity differentiates subtypes with distinct metabolic implications. *Nature Commun.* 2018; 9(1): 1946.
6. Brus T.V., Vasil'ev A.G. Modern understanding of non-alcoholic fatty liver disease. *Rossiyskie biomeditsinskie issledovaniya.* 2020; 5(1): 18–25. (in Russian)
7. Trashkov A.P., Brus T.V., Vasil'ev A.G., Artemenko M.R., Pechatnikova V.A. i dr. Dynamics of red blood indicators in rats with non-alcoholic fatty liver disease and the possibility of its correction. *Clinicheskaya patofiziologiya.* 2017; 23(3): 66–72. (in Russian)
8. Federico A., Dallio M., Masarone M., Persico M., Loguercio C. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease and its connection with cardiovascular disease: role of endothelial dysfunction. *Eur Rev Med Pharmacol Scienc.* 2016; 20 (22): 4731–41.
9. Sayiner M., Koenig A., Henry L., Younoss Z.M. Epidemiology of Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Non-alcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World. *Clinics in Liver Disease.* 2016; 20: 205–14. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2015.10.001>
10. Mitra S., De A., Chowdhury A. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver diseases. *Translational Gastroenterology and Hepatology.* 2020; 5:16.
11. Chang Y., Cho Y.K., Kim Y. et al. Nonheavy drinking and worsening of noninvasive fibrosis markers in nonalcoholic fatty liver disease: a cohort study. *Hepatology.* 2019; 69(1): 64–75.
12. Rich N.E., Oji S., Mufti A.R., et al. Racial and ethnic disparities in nonalcoholic fatty liver disease prevalence, severity, and outcomes in the United States: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology.* 2018; 16(2): 198–210.
13. Asgharpour A. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J Hepatol.* 2016; 65: 579–88.
14. Haas J.T., Francque S., Staels B. Pathophysiology and mechanisms of non-alcoholic fatty liver disease. *Annual Review of Physiology.* 2016; 78: 181–205.
15. Romero-Gomez M., Zelber-Sagi S., Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol.* 2017; 67(4): 829–46.
16. Patel V., Sanyal A.J., Sterling R. Clinical Presentation and Patient Evaluation in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Clinics in Liver Disease.* 2016; 20: 277–92.
17. Benedict M., Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol.* 2017; 9(16): 715–32.

Сведения об авторах:

Брус Татьяна Викторовна, канд. мед. наук, доцент, каф. патологической физиологии с курсом иммунопатологии ФГБУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, e-mail: bant.90@mail.ru;

Васильев Андрей Глебович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии с курсом иммунопатологии ФГБУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России;

Трашков Александр Петрович, канд. мед. наук, зав. центром доклинических и клинических исследований отделения молекулярной и радиационной биофизики ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092.9

Астахов Д.А.^{1,3}, Забозлаев Ф.Г.², Галямова А.Р.², Иванов Ю.В.^{1,2}, Дикова Т.С.⁴,
Сафонова В.М.⁴, Дыдыкин С.С.⁴, Нечунаев А.А.^{1,2}, Злобин А.И.^{1,2}, Панченков Д.Н.^{1,2,3}

Динамика морфологических изменений в ткани печени при необратимой электропорации в условиях возрастающей напряженности электрического поля

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, 127473, Москва, Россия, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1;

²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства, 115682, Москва, Россия, ул. Ореховый бульвар, д. 28;

³ФГБУ «Государственный научный центр лазерной медицины им. О.К. Скобелкина» Федерального медико-биологического агентства России, 121165, Москва, Россия, ул. Студенческая, д. 40, стр. 1;

⁴ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Необратимая электропорация – новый метод абляции тканей, используемый в лечении нерезектабельного рака. Имеется ряд публикаций, описывающих развитие клеточной гибели посредством апоптоза при применении технологии необратимой электропорации, однако динамика эффектов необратимой электропорации остается мало освещенной. **Цель исследования** – сравнительная оценка изменений в ткани печени и сосудах при необратимой электропорации вызванной токами возрастающей мощности и определение минимального порогового значения напряженности электрического поля, вызывающего формирование зоны необратимой нетермической электропорации посредством апоптоза клеток на равноудаленном расстоянии между электродами.

Методика. Исследование выполнено на 6-8-мес самцах белых беспородных крыс массой 240-330 г. Электропорации осуществлялась электродом состоящим из 2 рабочих игл. Животные выводились из эксперимента декапитацией на 1-е, 2-е; 3-е, 7-е и 14-е сут. 1–7 серии – последовательно повышалась напряженность электрического поля от 400 до 1000 В/см, с шагом 100 В/см. При неизменных параметрах: длительность серии импульсов 0,5 с, количество импульсов в серии 8, количество серий импульсов 225/мин, вид импульса – прямоугольный биполярный, длительность 1 импульса 8 мкс, максимальный импульсный ток 7 А. Морфологически оценивали состояние гепатоцитов, характер клеточной гибели. Для проведения морфометрического исследования использовали аппаратно-программный комплекс Nis-Elements AR 4.12.00 на базе исследовательского микроскопа NICON 50s, снабженного цифровой камерой NICON DS-Fi 1.

Результаты. При процедуре необратимой электропорации с напряженностью электрического поля от 400, до 1000 В/см с шагом в 100 В/см отмечалось нарастание гистопатологических признаков коагуляционного некроза от минимальных проявлений при мощности 400-600 В/см до начальных 700 В/см и грубых проявлений в, так называемой, «белой зоне» при 1000 В/см. При повышении напряженности более 900 В/см отмечалось преобладание некротических изменений над апоптотическими в межэлектродном пространстве. При низкой напряженности электрического поля 400–700 В/см в ряде репрезентативных образцов выявлялись скопления интактных жизнеспособных клеток без признаков повреждения.

Заключение. Проведенные исследования необратимой электропорации выявили комплекс изменений обусловленных термическим некрозом тканей в области расположения электродов. Морфологические признаки клеточной гибели посредством апоптоза продемонстрированы во всех сравниваемых группах, однако изменения носят сочетанный характер и вклад коагуляционных изменений нарастает по мере роста напряженности электрического поля. Минимально достаточная напряженность электрического поля, позволяющая получить апоптотические изменения клеток в ткани печени на всем протяжении между электродами соответствует 900 В/см, при которой процессы термического коагуляционного некроза не преобладают над апоптотическими изменениями.

Ключевые слова: необратимая электропорация; апоптоз; некроз; напряженность электрического поля; зона абляции ткани

Для цитирования: Астахов Д.А., Забозлаев Ф.Г., Галямова А.Р., Иванов Ю.В., Дикова Т.С., Сафонова В.М., Дыдыкин С.С., Нечунаев А.А., Злобин А.И., Панченков Д.Н. Динамика морфологических изменений в ткани печени при необратимой электропорации в условиях возрастающей напряженности электрического поля. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1): 52–60.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.52-60

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Панченков Д.Н., Забозлаев Ф.Г.; сбор и обработка материала – Астахов Д.А., Забозлаев Ф.Г., Галямова А.Р., Дикова Т.С., Сафонова В.М.; морфологическое исследование – Забозлаев Ф.Г., Галямова А.Р.; подготовка иллюстративного материала – Забозлаев Ф.Г., Галямова А.Р., Нечунаев А.А.; статистическая обработка – Астахов Д.А., Злобин А.И.; написание текста – Астахов Д.А., Забозлаев Ф.Г., Галямова А.Р., Нечунаев А.А.; редактирование – Панченков Д.Н., Забозлаев Ф.Г., Иванов Ю.В., Дыдыкин С.С.

Для корреспонденции: Астахов Дмитрий Анатольевич, e-mail: astakhovd@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках Государственного задания (№ гос.регистрации проекта НИР: АААА-А20-120021890091-1)

Поступила 29.10.2021

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Astakhov D.A.^{1,3}, Zabozaev F.G.², Galyamova A.R.², Ivanov Yu.V.^{1,2}, Dikova T.S.⁴, Safonova V.M.⁴, Dydykin S.S.⁴, Nechunaev A.A.^{1,2}, Zlobin A.I.^{1,2}, Panchenkov D.N.^{1,2,3}

The dynamics of morphological changes in liver tissue during irreversible electroporation with electrical fields of increasing strength

¹ Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Delegatskaya St. 20, Bldg. 1, Moscow 127473, Russian Federation;

² Federal Research Clinical Center for Specialized Health Care and Medical Technologies of the Federal Medical Biological Agency, Orekhovy Bulvar St. 28, Moscow 115682, Russian Federation;

³ Skobelkin State Scientific Center of Laser Medicine of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Studencheskaya St. 40, Bldg. 1, Moscow 121165, Russian Federation;

⁴ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya St. 8, Bldg 2, Moscow 119991, Russian Federation

Introduction. Irreversible electroporation is a new technique for tissue ablation used in the treatment of unresectable cancer. The non-thermal mechanism of cell death occurs mainly through apoptosis rather than necrosis as induced by thermal ablation. A number of reports have described the development of apoptotic cell death in irreversible electroporation but the dynamics of this effect remains poorly understood. **The aim** of this study was to compare morphological changes in liver tissue and blood vessels exposed to irreversible electroporation with the electrical field of increasing strength and to determine the minimum threshold electric field strength that causes formation of a zone of irreversible nonthermal electroporation through apoptosis at an equal distance between the electrodes.

Methods. 7 series of experiments were performed on 140 white outbred male rats aged 6-8 months and weighing 240-330 g. An electrode consisting of 2 working needles was used for the experiments. Animals were decapitated on days 1, 2, 3, 7, and 14. In series 1-7, the electrical field strength was sequentially increased from 400 to 1000 V/cm with a step of 100 V/cm. With unchanged parameters, the duration of the pulse train was 0.5 sec, the number of pulses in the train was 8, the number of pulse trains was 225/min, the pulse type was rectangular bipolar, the duration of each pulse was 8 µs, and the maximum pulse current was 7 amps. The following morphological changes were assessed: fragmentation of cell nuclei, hyperbasophilia of nuclei, intussusception of cytoplasm, cell swelling, presence of apoptotic bodies, cell compression, phagocytosis of apoptotic cells, demarcation zone, ablation zone, lympho-leukocytic infiltration, expansion of sinusoids with venous congestion (+ dilatation; ++ severely expanded), thrombosis, hemorrhages (+ focal; ++ confluent), fatty degeneration of hepatocytes, protein degeneration of hepatocytes, discomplexation of hepatic cords, and coagulation necrosis.

Results. During the procedure of irreversible electroporation with an electric field strength from 400 to 1000 V/cm with a step of 100 V/cm, histopathological signs of coagulation necrosis increased from minimal at a strength of 400-600 V/cm to initial at 700 V/cm and to gross manifestations in the so-called «white zone» at 1000 V/cm. With an increase in the intensity to more than 900 V/cm, predominance of necrotic changes over apoptotic changes was observed in the interelectrode space. At a low electric field strength of 400-700 V/cm, aggregations of intact viable cells without signs of damage were detected in a number of representative samples. **Conclusion.** This study of irreversible electroporation revealed the presence of changes caused by tissue thermal necrosis in the area of electrode location. Morphological signs of cell death through apoptosis were observed in all groups; however, the changes were composite with the contribution of coagulation changes increasing with the increase in the electric field strength. The minimum effective strength of the electric field, which is sufficient to induce apoptotic changes in hepatic cells throughout the entire distance between the electrodes, corresponds to 900 V/cm, when the processes of thermal coagulation necrosis do not prevail over apoptotic changes.

Keywords: irreversible electroporation; apoptosis; necrosis; electric field strength; tissue ablation zone

For citation: Astakhov D.A., Zabozaev F.G., Galyamova A. R., Ivanov Yu.V., Dikova T.S., Safonova V.M., Dydykin S.S., Nechunaev A.A., Zlobin A.I., Panchenkov D.N. The dynamics of morphological changes in liver tissue during irreversible electroporation with electrical fields of increasing strength. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(1): 52–60. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.52-60

Author's contribution: research concept and design – Panchenkov D.N., Zabozaev F.G.; collection and processing of material – Astakhov D.A., Zabozaev F.G., Galyamova A.R., Dikova T.S., Safonova V.M.; morphological research – Zabozaev F.G., Galyamova A.R.; statistical processing – Astakhov D.A., Zlobin A.I.; text writing – Astakhov D.A., Zabozaev F.G., Galyamova A.R., Nechunaev A.A.; editing – Panchenkov D.N., Zabozaev F.G., Ivanov Yu.V., Dydykin S.S.

For correspondence: **Dmitry A. Astakhov**, Cand. of Sci. (Med.), Leading Research Fellow of the Laboratory of Minimally Invasive Surgery, Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry; 20, p. 1, Delegatskaya str., Moscow, 127473, Russian Federation, e-mail: astakhovd@mail.ru

Financing. The work was carried out with financial support within the framework of the State Assignment (No. of state registration of the research project: AAAA-A20-120021890091-1)

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

Information about the authors:

Astakhov D.A., <https://orcid.org/0000-0002-8776-944X>

Zabozaev F.G., <https://orcid.org/0000-0002-7445-8319>

Ivanov Yu.V., <https://orcid.org/0000-0001-6209-4194>

Dikova T.S., <https://orcid.org/0000-0003-4174-6637>

Dydykin S.S., <https://orcid.org/0000-0002-1273-0356>

Nechunaev A.A., <https://orcid.org/0000-0002-2854-3109>

Zlobin A.I., <https://orcid.org/0000-0002-8241-659X>

Panchenkov D.N., <https://orcid.org/0000-0001-8539-4392>

Received 29.10.2021

Accepted 20.01.2022

Published 15.03.2022

Введение

Необратимая электропорация — новая техника абляции, используемая в лечении нерезектабельных опухолей. Мощные микросекундные импульсы приводят к нарушению гомеостаза в клетках аблируемых тканей посредством пермеабиллизации, термического воздействия или их сочетания [1–8]. В противовес методикам термической абляции, необратимая электропорация сохраняет окружающие ткани интактными, вызывая меньше коллатеральных повреждений и, таким образом, ведет к уменьшению побочных эффектов и более быстрому восстановлению [4–8]. Также, вследствие нетермического характера воздействия при необратимой электропорации, отсутствуют ограничения обусловленные так называемым эффектом радиатора, когда поток крови, обладающей более низкой температурой в крупных сосудах в зоне воздействия не позволяет достигнуть достаточной для абляции температуры вокруг сосудов, что приводит к сохранению жизнеспособных опухолевых клеток. Как следствие, необратимая электропорация имеет преимущества при лечении нерезектабельных опухолей и опухолей, не подлежащих термическим видам абляции. Необратимая электропорация обладает еще одним значительным преимуществом, которое основано на факте, что зона абляции имеет четкую очерченную границу — это позволяет обеспечить планирование процедуры абляции на основе математического ожидания. В настоящее время данная технология интенсивно исследуется для применения при опухолях поджелудочной железы, печени, мочевых путей, предстательной железы и др. [9–13]. Однако, консенсус о механиз-

ме действия необратимой электропорации до сих пор не достигнут. Неизвестно, вызваны ли указанные эффекты термическим или нетермическим механизмом, поскольку гистологическая оценка тканей подвергнутых процедуре необратимой электропорации описывает характеристики как некроза, так и апоптоза, выявляя признаки присущие этим механизмам гибели клеток [4–8]. Апоптоз клеток ассоциируется с регенерацией ткани и меньшим воспалительным ответом и потому является наиболее предпочтительным эффектом. Тем не менее, то, что необратимая электропорация вызывает сопутствующий коагуляционный некроз на некотором протяжении — установленный факт [6–8, 14, 15]. Это можно объяснить вторичными тепловыми эффектами необратимой электропорации, поскольку часть электрической энергии конвертируется в тепловую энергию при прохождении через ткани, обладающие определенным сопротивлением.

Ведущая парадигма применения необратимой электропорации в клинической практике строится на утверждении о нетермическом типе воздействия. Таким образом, характеристика потенциальных термических эффектов необратимой электропорации необходима для понимания вклада термического компонента и связанного с ним некроза аблируемой ткани и обеспечения планирования лечебной процедуры.

С учетом выше сказанного, целями данного исследования явилось проведение сравнительной морфологической оценки изменений в ткани печени и сосудах подвергнутых воздействию тока с заданными параме-

трами силы, частоты и длительности импульсов при повышающейся напряженности электрического поля. Определение минимального порогового значения напряженности электрического поля вызывающего формирование зоны необратимой нетепловой электропорации посредством апоптоза клеток на равноудаленном расстоянии между электродами.

Методика

Проведено 7 серий экспериментов. Исследования выполнено на 140 белых беспородных крысах самцах, приблизительно одного возраста (6–8 мес, массой 240–330 г. Все животные находились в одинаковых условиях стандартного вивария при постоянной температуре окружающей среды 23–26 °С, получали одинаковое питание, были прооперированы в одинаковых временных рамках. За 20 мин до процедуры электропорации производилась анестезия по стандартной методике с использованием ксилазина 2% и золетила (тилетомин). Мониторинг за вхождением животного в наркоз осуществлялся путем наблюдения за исчезновением ряда рефлексов. Во время наркоза следили за ритмом, частотой и глубиной дыхания, тонусом животного. В состоянии наркоза животное фиксировали к операционному столу и помещали в положение на спине на стерильной хирургической подложке. Передняя брюшная стенка рассекалась линейным разрезом по средней линии. Печень мобилизовывалась в рану стерильной салфеткой подведенной между задней диафрагмальной поверхностью печени и брюшной стенкой. В открытый сегмент печени вводились 2 центральные иглы на расстоянии 1 см на глубину 5 мм. Диаметр игл составлял 1,0 мм. Проводилась процедура электропорации. Исследование режима электропорации осуществлялось электродом состоящим из 2 рабочих игл. Животные выводились из эксперимента на 1-е; 2-е; 3-е; 7-е; 14-е сут декапитацией на гильотине. 1–7 серии – последовательно повышалась напряженность электрического поля от 400 до 1000 В/см. При неизменных параметрах: длительность серии импульсов 0,5 с, количество импульсов в серии 8, количество серий импульсов 225/мин, вид импульса – прямоугольный биполярный, длительность 1 импульса 8 мкс, максимальный импульсный ток 7 А.

Эксперимент выполняли с соблюдением принципов гуманности, и в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «правила работы с лабораторными грызунами и кроликами», согласованном с нормативными положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS No 123), в частности приложения А и статьи No5 Конвенции.

Исследование одобрено межвузовским комитетом по этике № 06-17.

Зоны абляции определялись посредством визуального осмотра и ручной пальпации. Тканевые блоки толщиной 3–5 мм нарезали параллельно ходу электродов и перпендикулярно плоскости абляции между электродами. Материал фиксировали в 10% забуференном растворе формалина, подвергали проводке в тканевом гистопроцессоре MicromSTP 120 и заливали в парафиновую среду «Гистомикс» с использованием модульной системы заливки парафином TissueTek ® Tec 5. Депарафинированные срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, заключали в среду BioMount. При морфологическом исследовании срезов измеряли и фотографировали зоны абляции.

Для проведения морфометрического исследования использовался аппаратно-программный комплекс Nis-Elements AR 4.12.00 на базе исследовательского микроскопа NICON 50s, снабженного цифровой камерой NICON DS-Fi 1. Оценку удельного объема (V_i) зоны демаркации, зоны абляции, воспалительно-клеточной инфильтрации, венозного полнокровия синусоидов, паренхиматозных кровоизлияний производили при увеличении $\times 200$ с применением измерительной сетки Г.Г.Автандилова для цито-гистостереометрических исследований. Для каждого случая обрабатывали по 10 полей зрения. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы «Stat-Soft Statistica 7.0». Сравнение независимых групп проводили с использованием критерия Крускала-Уоллиса с последующим межгрупповым сравнением с помощью критерия Манна-Уитни при 95 % уровне значимости.

Результаты и обсуждение

При морфологическом исследовании отмечалась следующая динамика изменений.

400 В/см, 1-е сут – зона абляции (удельный объем $V_i = 16,38 \pm 1,06$) с признаками коагуляционного некроза гепатоцитов в области расположения электродов, гемолизом эритроцитов в разрушенных синусоидах, со слабо выраженной неравномерной диффузной лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией (удельный объем $V_i = 2,16 \pm 0,11$), эктазированными полнокровными сосудами (удельный объем $V_i = 11,84 \pm 0,97$), формирующимися тромбами. Зона демаркации четкая без воспалительно-клеточной инфильтрации. Близлежащие гепатоциты – с эозинофильной цитоплазмой с явлениями гиалиновокапельной дистрофии, по периферии – гидropическая дистрофия гепатоцитов, конденсация хроматина ядер. Цитоплазматическая оболочка неровная. (рис. 1).

400 В/см, 2-е, 3-и сут – картина прежняя. Из дополнительных изменений отмечается формирование тромбов в синусоидах области абляции.

400 Вольт/см, 7-е сут – зона абляции (удельный объем $V_i = 13,41 \pm 0,98$) с неравномерно выраженными признаками коагуляционного некроза гепатоцитов, гемолизом эритроцитов в разрушенных полнокровных синусоидах, выраженной неравномерной диффузной и очаговой лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией (удельный объем $V_i = 3,84 \pm 0,17$), с фиброзом зоны демаркации (удельный объем $V_i = 2,08 \pm 0,16$) с умеренной воспалительно-клеточной лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией. Близлежащие и на периферии гепатоциты – с эозинофильной цитоплазмой с явлениями гиалиновокапельной дистрофии.

400 Вольт/см, 14-е сут – зона абляции не определяется. Мелкий участок гепатоцитов с гиалиновокапель-

ной дистрофией, ядра гиперхромные, хроматин фрагментирован. Клетки сжаты, вокруг ядра образование типа «гало». Ядерная мембрана неровная.

Описанные ранне изменения при повышении напряженности электрического поля с 400 до 800 В/см носили схожий характер и отличались нарастанием выраженности признаков в динамике. Отмечалось постепенное увеличение удельного объема зоны абляции, очаговой лимфо-лейкоцитарной инфильтрации. Помимо эктазии и полнокровия отмечено появление некротических изменений стенки кровеносных сосудов со сладжированием эритроцитов. Некротические изменения определяются в непосредственной близости к области введения электрода. 500 Вольт/см, 3-и сут – картина дополняется очаговыми кровоизлияниями. 600 Вольт/см, 3-и сут – при сохраняющихся описанных изменениях прослеживается конденсация хроматина ядер. Наиболее по-

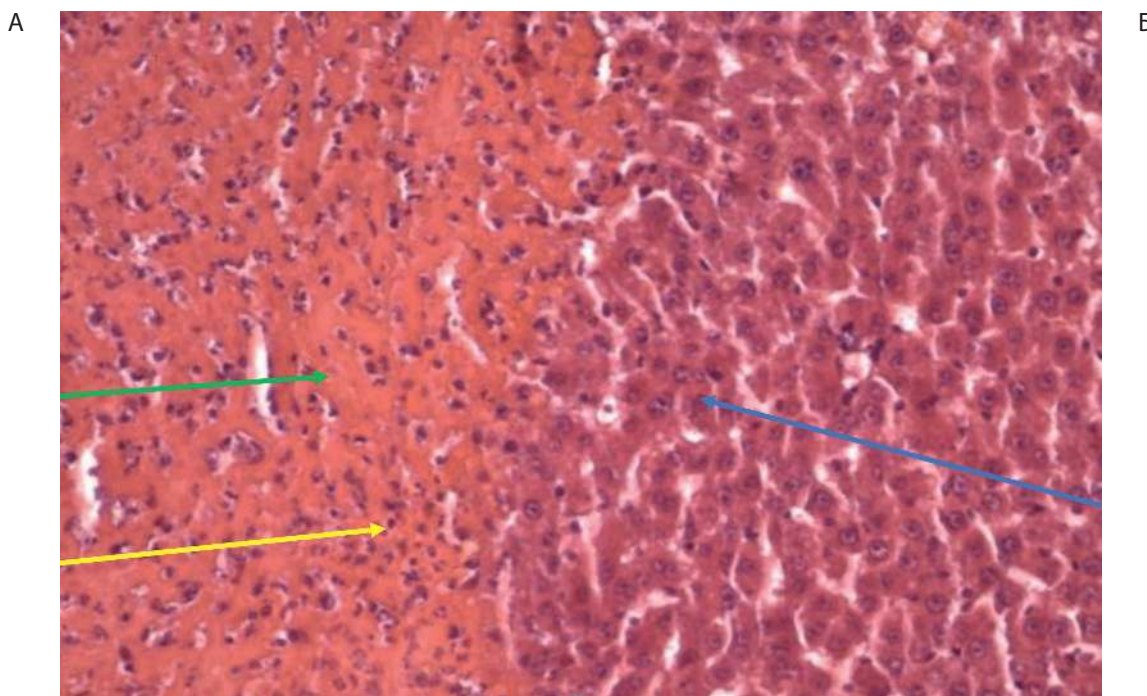


Рис. 1. Печень. Окраска гематоксилином и эозином, x 200, E 400 В/см. 1-е сут.

А – зона абляции (необратимой электропорации); Б – неизменная ткань печени

Наблюдается четкая граница раздела между аблированной тканью и нормальной тканью печени. Синяя стрелка – неизменные гепатоциты; зеленая стрелка – коагуляционный некроз; желтая стрелка – формирующаяся демаркационная зона с инфильтрацией лимфоцитами, полинуклеарными лейкоцитами.

Fig. 1. Liver. Staining with hematoxylin and eosin, x 200, E 400 V / cm.

A – ablation zone (irreversible electroporation); B – unchanged liver tissue There is a clear interface between ablated tissue and normal liver tissue. Blue arrow – unchanged hepatocytes; Green arrow – coagulative necrosis; Yellow arrow – the emerging demarcation zone with infiltration by lymphocytes, polynuclear leukocytes.

стоянным признаком, на протяжении всего периода наблюдения и после разрешения воспалительных явлений – была эктазия и полнокровие сосудов в зоне необратимой электропорации. Остаточные явления наблюдаемые на 7-е сут при напряженности 400-700 В/см и сохранявшиеся до 14-х сут при напряженности 800-1000 В/см характеризовались дискомплексацией печеночных балок. Отмечено, что в зоне необратимой электропорации по истечении периода наблюдения фиброзные изменения не определялись.

При повышении напряженности электрического поля до 900 В/см, 1-е сут – отмечена обширная зона абляции (удельный объем $V_i = 48,18 \pm 2,87$) с выраженными признаками коагуляционного некроза гепатоцитов, со сливными центральными участками колликации, гемолизом эритроцитов в разрушенных синусоидах, умеренно выраженной неравномерной диффузной и очаговой лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией (удельный объем $V_i = 13,26 \pm 1,09$), эктазированными полнокровными сосудами с гомогенными некротически измененными

стенками (удельный объем $V_i = 14,31 \pm 1,18$). Обращало внимание сладжирование эритроцитов. Зона демаркации четкая (удельный объем $V_i = 8,75 \pm 0,95$) с умеренно выраженной воспалительноклеточной инфильтрацией. Близлежащие гепатоциты – с эозинофильной цитоплазмой с явлениями гиалиновокапельной дистрофии, по периферии – гидropическая дистрофия гепатоцитов, конденсация хроматина ядер с четко различимым ядрышком. Цитоплазматическая оболочка неровная. Отдельно расположенные очаги коагуляционного некроза.

900 вольт/см, 2-е, 3-и сут – сохраняются описанные изменения, отмечается формирование эктазированных полнокровных сосудов (удельный объем $V_i = 15,37 \pm 1,35$) с очаговыми и сливными кровоизлияниями (удельный объем $V_i = 11,88 \pm 1,06$) (рис. 2).

900 /см, 7-е сут – обширная зона абляции (удельный объем $V_i = 40,86 \pm 2,71$), с выраженными признаками коагуляционного некроза гепатоцитов с распространенной колликацией, гемолизом эритроцитов в разрушенных синусоидах, выраженной неравномер-

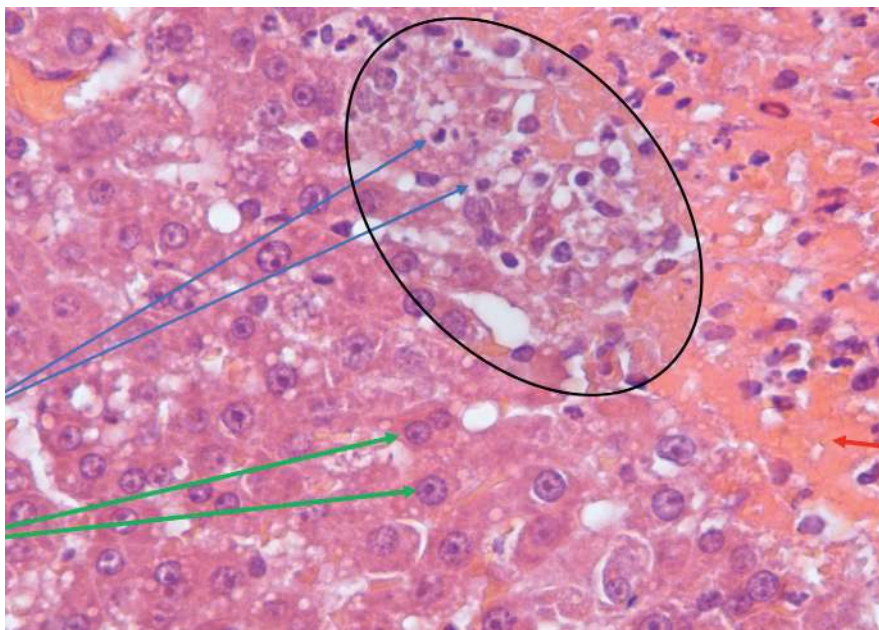


Рис. 2. Печень. Окраска гематоксилин эозин, х 400, E 900 В/см. 2-е сут.

Препарат печени с нарушенной структурой печеночных балок, гепатоциты их составляющие с вакуолизацией цитоплазмы, неравномерным кариопикнозом и фрагментацией хроматина единичных ядер (синие стрелки), циторексисом, полнокровием синусоидов с распространяющимися кровоизлияниями, лизисом эритроцитов в зонах некроза (красные стрелки), очаговой периваскулярной лимфоидной инфильтрацией. Зеленые стрелки – неизмененные гепатоциты. Контур – зона апоптоза

Fig. 2. Liver. Stained with hematoxylin eosin, x 400, E 900 V / cm. 2nd day. A liver specimen with a disturbed structure of the hepatic tracts, hepatocytes with vacuolization of the cytoplasm, uneven karyopycnosis and fragmentation of chromatin of single nuclei (blue arrows), cytorhexis, plethora of sinusoids with spreading hemorrhages, erythrocyte lysis in the areas of necrosis (red arrows), focal perivascular lymphoid infiltration. Green arrows are unchanged hepatocytes. Black contour – zone of apoptosis.

ной диффузной лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией (удельный объем $V_i = 14,89 \pm 1,83$), эктазированных полнокровными сосудами (удельный объем $V_i = 15,68 \pm 1,49$), очаговыми и сливными кровоизлияниями (удельный объем $V_i = 11,73 \pm 1,17$). Зона демаркации четкая, (удельный объем $V_i = 7,84 \pm 0,96$) с выраженной воспалительноклеточной инфильтрацией, гистиоцитарной инфильтрацией, разрастанием грануляционной ткани. Близлежащие гепатоциты – с эозинофильной цитоплазмой с явлениями гиалиновокапельной дистрофии, по периферии с явлениями гидропической дистрофии, конденсация хроматина ядер (**рис. 3**).

900 В/см, 14-е сут – зона абляции не определяется. Дискомплексація печеночных балок с фрагментацией. Близлежащие и на периферии гепатоциты с эозинофильной цитоплазмой, явлениями гиалиновокапельной и гидропической дистрофии. Ядра гиперхромны с фрагментированным хроматином. Сосуды резко расширены, полнокровны.

Дальнейшее повышение напряженности электрического поля до 1000 вольт/см и выше характеризовалось нарастанием объема коагуляционного некроза, воспалительно-клеточных изменений с очаговыми и сливными кровоизлияниями (**рис. 4**). Выраженные изменения в виде эозинофилии цитоплазмы с явлениями гиалиновока-

пельной и гидропической дистрофии, гиперхромией ядер с фрагментацией хроматина персистировали до 14-х сут.

Таким образом, при процедуре необратимой электропорации с напряженностью электрического поля от 400 до 1000 В/см с шагом в 100 В/см отмечалось нарастание микроскопических признаков коагуляционного некроза от минимальных проявлений при мощности 400-600 до начальных 700 и грубых проявлений в так называемой «белой зоне» при 1000 В/см. Удельный объем зоны абляции статистически значимо увеличивался ($p < 0,001$). При более низких показателях напряженности электрического поля при необратимой электропорации отмечались такие изменения как набухание синусоидов, обезвоживание клеток и геморрагическое пропитывание ткани печени в области введения электродных игл. При повышении напряженности более 900 В/см отмечалось преобладание некротических изменений над апоптотическими в межэлектродном пространстве. Следует отметить, что при низкой напряженности электрического поля 400 – 700 В/см в ряде репрезентативных образцов выявлялись скопления интактных жизнеспособных клеток без признаков повреждений с минимальными показателями удельного объема воспалительной инфильтрации и кровоизлияний.

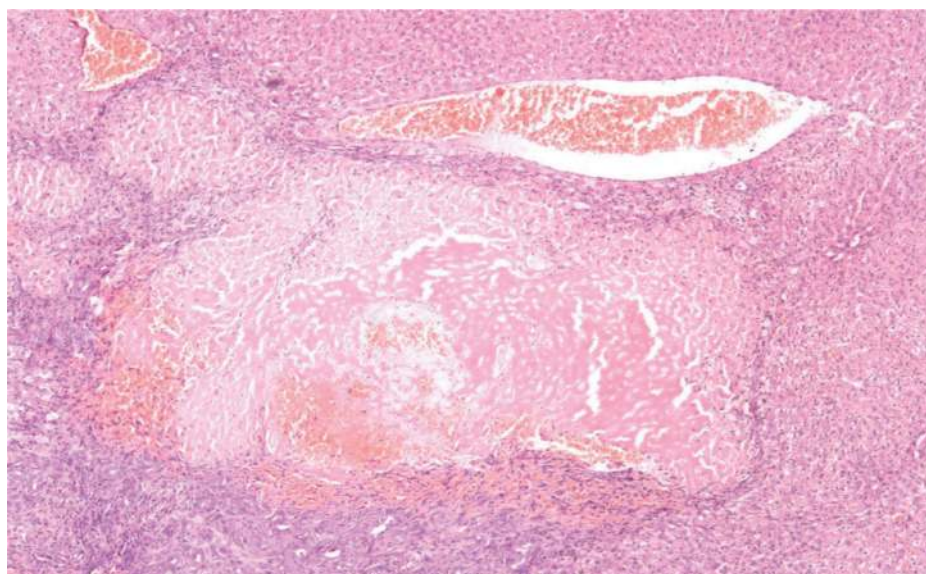


Рис. 3. Печень. Окраска гематоксилин эозин, x 40, E 900 В/см. Участок печени в области воздействия (7-е сут после проведения процедуры электропорации), на котором отмечается зона с массивными полями некроза, окруженного лимфо-гистиоцитарным воспалительноклеточным инфильтратом, сливными и очаговыми кровоизлияниями, полнокровными сосудами.

Fig. 3. Liver. Stained with hematoxylin eosin, x 40, E 900 V/cm. The liver sample in the area of exposure on the 7th day after the electroporation procedure, demonstrates the zone with massive fields of necrosis, surrounded by lympho-histiocytic inflammatory cell infiltrate, drainage and focal hemorrhages, plethoric vessels.

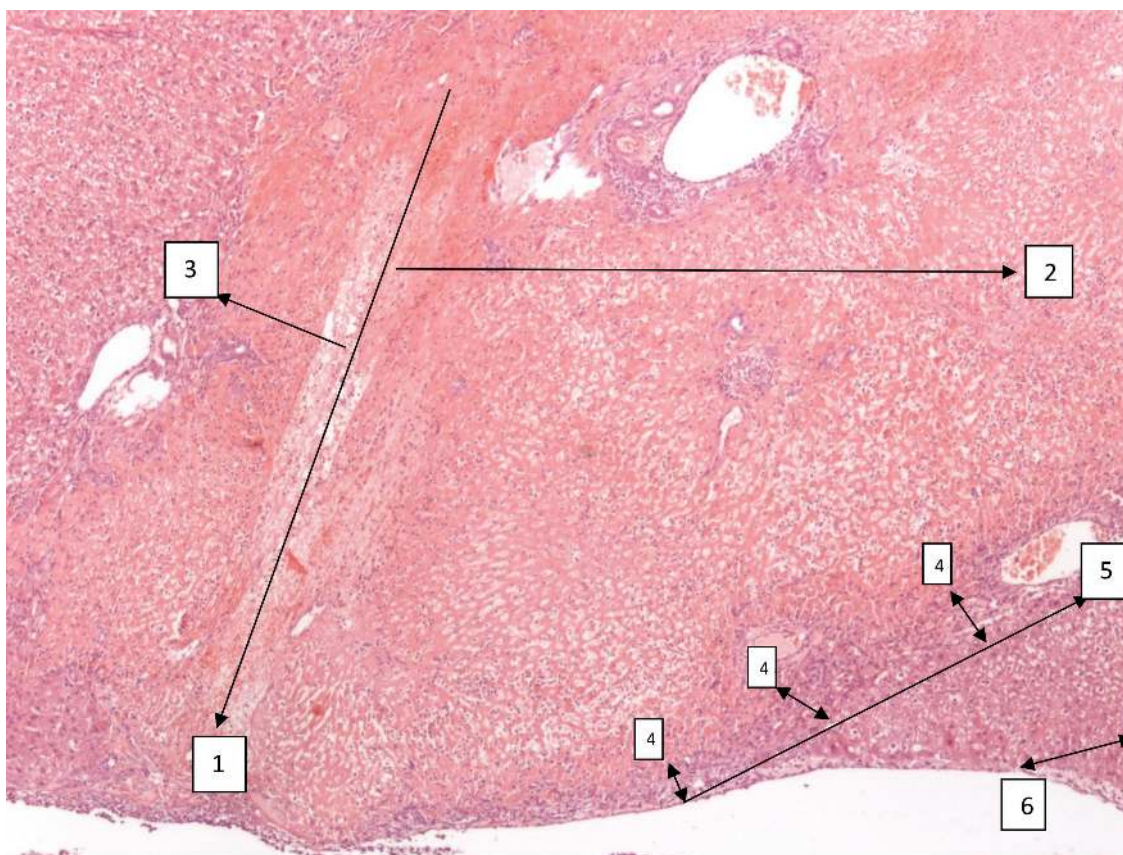


Рис. 4. Печень. Окраска гематоксилин эозин, х 40, E 1000 В/см.

1 – трек от электрода; 2 – направление до 2-го электрода (зона коагуляционного некроза и порации); 3 – зона коагуляционного некроза (электропорации) в направлении от электрода на периферию; 4 – лимфо-лейкоцитарная инфильтрация; 5 – область между некрозом и электропорацией; 6 – область восстановления нормальной структуры балок.

Fig. 4. Liver. Stained with hematoxylin eosin, x 40, E 1000 V / cm. 1 – track from the electrode; 2 – direction to the 2nd electrode (zone of coagulation necrosis and poration); 3 – zone of coagulation necrosis (electroporation) in the direction from the electrode to the periphery; 4 – lymph-leukocyte infiltration; 5 – area between necrosis and electroporation; 6 – area of restoration of the normal structure of beams.

Заключение

Полученные собственные предварительные экспериментальные данные выявили наличие изменений обусловленные термическим некрозом тканей в области расположения электродов. Механизм клеточной гибели посредством апоптоза также не вызывает сомнений, однако, справедливо заметить, что изменения носят сочетанный характер и вклад коагуляционных изменений нарастает по мере роста напряженности электрического поля. Исходя из полученных данных можно заключить, что минимально достаточная напряженность электрического поля, позволяющая получить апоптотические изменения клеток в ткани печени на всем протяжении между электродами соответ-

ствует 900 В/см, при которой процессы термического коагуляционного некроза не преобладают над апоптотическими изменениями.

Литература

(п.п. 1–8; 12–15 см. References)

- Панченков Д.Н., Иванов Ю.В., Пикунов Д.Ю., Забозлаев Ф.Г., Нечунаев А.А., Кочиева М.П. и др. Необратимая электропорация метастазов колоректального рака в печень с использованием системы “NANOKNIFE”. *Клиническая практика*. 2013; 13(1): 37–42.
- Панченков Д.Н., Иванов Ю.В., Соловьев Н.А., Астахов Д.А., Нечунаев А.А. Необратимая электропорация с использованием системы “nanoknife” в лечении рака поджелудочной железы (клиническое наблюдение). *Анналы хирургической гепатологии*. 2014; 19(1): 50–4.

11. Астахов Д.А., Панченков Д.Н., Иванов Ю.В., Шабловский О.Р., Кедрова А.Г., Соловьев Н.А. и др. Необратимая электропорация при местнораспространенном раке поджелудочной железы. *Анналы хирургической гепатологии*. 2018; 23(2): 59–68. DOI: 10.16931/1995-5464.2018259-68
8. Lee Y.J., Lu DSK, Osuagwu F., Lassman C. Irreversible electroporation in porcine liver: short-and long-term effect on the hepatic veins and adjacent tissue by ct with pathological correlation. *Invest Radiol*. 2012; 47(11): 671-5.

References

1. Tarek M. Membrane Electroporation: A Molecular Dynamics Simulation. *Biophys. J.* 2005; 88(6): 4045–4053. DOI:10.1529/biophysj.104.050617
2. Meaking W.S., Edgerton J., Wharton C.W., Meldrum R.A. Electroporation induced damage in mammalian cell DNA. *Biochim. Biophys. Acta*. 1995; 1264: 357–362. DOI:10.1016/0167-4781(95)00177-8
3. Beebe S.J., Blackmore P.F., White J., Joshi R.P., Schoenbach K.H. Nanosecond pulsed electric fields modulate cell function through intracellular signal transduction mechanisms. *Physiol. Meas.* 2004; 25: 1077–93.
4. Ben-David E., Appelbaum L., Sosna J., Nissenbaum I., Goldberg S.N. Characterization of irreversible electroporation ablation in vivo porcine liver. *AJR Am J Roentgenol*. 2012; 198(1): 62-8.
5. Sugimoto K., Moriyasu F., Kobayashi Y., et al. Assessment of various types of US findings after irreversible electroporation in porcine liver: comparison with radiofrequency ablation. *J Vasc Interv Radiol*. 2015; 26(2): 279-87.
6. Golberg A., Bruinisma B.G., Uygun B.E., Yarmush M.L. Tissue heterogeneity in structure and conductivity contribute to cell survival during irreversible electroporation ablation by “electric fields inks”. *Sci Rep*. 2015; 5: 8485.
7. van den Bos W., Scheffer H.J., Vogel J.A., et al. Thermal energy during irreversible electroporation and the influence of different ablation parameters. *J Vasc Interv Radiol*. 2016; 27(3): 433-43.
9. Panchenkov D.N., Ivanov Yu.V., Pikunov D.Yu., Zabolzaev F.G., Nechunaev A.A., Kochieva M.P., Aleksanyan G.B. Irreversible electroporation of colorectal liver metastases using “NANOK-NIFE” system. *Klinicheskaya praktika*. 2013; 13 (1): 37–42. (In Russian)
10. Panchenkov D.N., Ivanov Yu.V., Soloviev N.A., Astakhov D.A., Nechunaev A.A. Irreversible electroporation using “NanoKnife” system in management of pancreatic cancer (case report). *Annaly khirurgicheskoy gepatologii*. 2014; 19(1): 50–4. (In Russian)
11. Astakhov D.A., Panchenkov D.N., Ivanov Yu.V., Shablovsky O.R., Kedrova A.G., Soloviev N.A., et al. Irreversible electroporation in locally advanced pancreatic cancer. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii*. 2018; 23(2): 59–68. (In Russian) DOI: 10.16931/1995-5464.2018259-68
12. Liu Y., Xiong Z., Zhou W., Hua Y., Li C., Yao C. Percutaneous ultrasound-guided irreversible electroporation: a goat liver study. *Oncol Lett*. 2012; 4(3): 450-4.
13. Lee E.W., Chen C., Prieto V.E., Dry S.M., Loh C.T., Kee S.T. Advanced hepatic ablation technique for creating complete cell death: irreversible electroporation. *Radiology*. 2010; 255(2): 426-33.
14. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4): 495-516.
15. Levin A.A., Klimov D.D., Vorotnikov A.A., Prokhorenko L.S., Poduraev Y.V., Nechunaev A.A., et al. The comparison of the process of manual and robotic positioning of the electrode performing radiofrequency ablation under the control of a surgical navigation system. *Scientific Reports*. 2020; 10(1): 8612. DOI: 10.1038/s41598-020-64472-9

Сведения об авторах:

Астахов Д.А., канд. мед. наук, доцент каф. хирургии и хирургических технологий; с ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; ст. науч. сотр. отделения лазерной онкологии и фотодинамической терапии, ФГБУ «ГНЦ лазерной медицины им. О.К. Скобелкина»; **Заболзаев Ф.Г.**, доктор мед. наук, проф., зав. отд-нием патологической анатомии; гл. специалист по патологической анатомии, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА; **Галямова А.Р.**, врач патологоанатом, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА; **Иванов Ю.В.**, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. минимально инвазивной хирургии НИИ «ТЕХНОБИОМЕД» ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА, зав. отд-нием хирургии; **Дикова Т.С.**, студент, курс-5, факультет – Лечебное дело: Международная школа «Медицина будущего»; ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); **Сафонова В.М.**, студент, курс-5, факультет – Лечебное дело: Международная школа «Медицина будущего»; ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); **Дыдыкин С.С.**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. оперативной хирургии и топографической анатомии; ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); **Нечунаев А.А.**, канд. мед. наук, доцент кафедры хирургии и хирургических технологий¹, ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; врач хирург ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА; **Злобин А.И.**, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. минимально инвазивной хирургии НИИ «ТЕХНОБИОМЕД» ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; врач хирург ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА; **Панченков Д.Н.**, доктор мед. наук, проф., зав. каф. хирургии и хирургических технологий, ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; зав. лаб. минимально инвазивной хирургии НИИ «ТЕХНОБИОМЕД», ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА; советник директора по инновационной деятельности ФГБУ «ГНЦ лазерной медицины им. О.К. Скобелкина» ФМБА России.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Максимова М.Ю., Галанина А.С.

Автономная дисфункция у пациентов с постковидным синдромом

ФГБНУ «Научный центр неврологии»,
125367, Москва, Россия, Волоколамское шоссе, д. 80

Введение. В условиях пандемии SARS-CoV-2 (COVID-19) растет количество пациентов с последствиями перенесенной инфекции. Это состояние получило название постковидный синдром или длительный (затянувшийся) COVID-19. **Цель исследования** -- изучение взаимосвязи между клиническими проявлениями постковидного синдрома и вегетативной дисфункцией.

Методика. В исследование были включены 35 пациентов (15 мужчин и 20 женщин) в возрасте от 23 до 49 лет, обратившиеся к неврологу амбулаторно с остаточными неврологическими симптомами после перенесенного COVID-19. В контрольную группу было включено 20 здоровых лиц. Для оценки состояния вегетативной нервной системы использовались компьютерный многофункциональный комплекс «Нейро-МВП-4» и программа «Поли-Спектр-Ритм» (Нейрософт). Исследование также включало оценку реакций на стандартизированные стимулы (ортостатическая проба, проба Вальсальвы, проба с глубоким управляемым дыханием, проба с изометрическим сокращением) и анализ кардиоваскулярных проб по Д. Ивингу

Результаты У пациентов с постковидным синдромом по сравнению с группой здоровых лиц наблюдается резкое снижение фоновых временных (SDNN, RRNN, RMSSD, RNN50) и спектральных (LF, HF) характеристик вариабельности ритма сердца. При сравнении групп между собой после ортостатической пробы у пациентов с постковидным синдромом определялись более низкие показатели RRNN и LF, а также более высокий показатель HF. Во время пробы Вальсальвы в группе пациентов с постковидным синдромом по сравнению с группой здоровых лиц отмечены более низкие показатели SDNN, RRNN, LF. Проба с глубоким дыханием у пациентов с постковидным синдромом характеризовалась более низким RRNN и более высоким HF, а проба с изометрическим сокращением – более высокими показателями RMSSD и HF.

Заключение. У пациентов с постковидным синдромом показатели кардиоваскулярных тестов свидетельствуют о дисбалансе вегетативной нервной системы с преобладанием активности симпатической регуляции.

Ключевые слова: постковидный синдром; автономная дисфункция; вариабельность ритма сердца; кардиоваскулярные пробы

Для цитирования: Максимова М.Ю., Галанина А.С. Автономная дисфункция у пациентов с постковидным синдромом.

Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2022; 66(1): 61–67.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.61-67

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Максимова М.Ю.; сбор и статистическая обработка материала – Галанина А.С.; написание текста – Максимова М.Ю., Галанина А.С.; редактирование – Максимова М.Ю.

Для корреспонденции: Максимова Марина Юрьевна, e-mail: ncnmaximova@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания ФГБНУ НЦН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.12.2021

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Maksimova M.Yu., Galanina A.S.

Autonomic dysfunction in patients with post-COVID syndrome

Research Center of Neurology,
Volokolamskoye Shosse 80, Moscow 125367, Russian Federation

Introduction. Under the impact of SARS-CoV-2 (COVID-19) pandemic, the number of patients with the aftermath of the disease is growing. This condition was named post-COVID syndrome or long-term (prolonged) COVID 19. **The aim.** Study of the relationship between the clinical manifestations of post-covid syndrome and autonomic dysfunction by analyzing parameters the heart rate variability.

Methods. The study included 35 patients (15 men and 20 woman) aged 23 to 49 years, who were consulted by an outpatient neurologist. All of them had residual neurological symptoms after COVID-19. Control group included 20 healthy people. The condition of autonomic nervous system was evaluated with the Neuro-MEP-4 computerized multi-functional complex and the Poly-Spec-

trum-Rhythm (Neurosoft) software. This study also included evaluation of responses to standardized stimuli (orthostatic test, Valsalva maneuver, deep breath test, maximum isometric voluntary contraction testing) and the cardiovascular Ewing test. Statistical analysis was performed with the StatTech v 2.5.7 software.

Results. In patients with post-COVID syndrome compared to the group of healthy people, sharp declines in timed (SDNN, RRNNm, RMSSD, RNN50) and spectral (LF, HF) characteristics of heart rate variables were noted. The intergroup comparison of responses to the orthostatic test showed that patients with post-COVID syndrome had lower RRNN and LF values, as well as higher HF values. During the Valsalva test, patients with post-COVID syndrome showed lower SDNN, RRNN and LF values than healthy individuals. In patients with post-COVID syndrome, the deep breathing test showed lower RRNN and higher HF, and the isometric contraction test showed higher RMSSD and HF.

Conclusion. In patients with post-COVID syndrome, cardiovascular tests demonstrated an imbalance of the autonomic nervous system with predomination of the sympathetic regulatory activity.

Keywords: post-COVID syndrome; autonomic dysfunction; heart rate variability; cardiovascular tests

For citation: Maksimova M.Yu., Galanina A.S. Autonomic dysfunction in patients with post-COVID syndrome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological physiology and experimental therapy. Russian Journal)*. 2022; 66(1): 61–67. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.61-67

Autor's contribution: study concept and design – Maksimova M. Yu.; material collection and statistical analysis – Galanina A.S.; text writing – Maksimova M.Yu, Galanina A.S.; editing – Maksimova M.Yu.

For correspondence: Marina Yu. Maksimova, D. Sci (Med), Prof., Head of the 2nd Neurology Department, Research Center of Neurology, e-mail: ncnmaksimova@mail.ru

Financing. The study was performed as a part of the public assignment of the Research Center of Neurology.

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

Information about the authors:

Maksimova M.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-7682-6672>

Received 16.12.2021

Accepted 20.01.2022

Publised 15.03.2022

Введение

В условиях пандемии SARS-CoV-2 (COVID-19) с прекращающимся ростом числа заболевших острой инфекцией также растет количество пациентов с последствиями перенесенной инфекции. Это состояние получило название постковидный синдром или длительный (затянувшийся) COVID-19 и связано с медицинскими, социальными и экономическими последствиями. Длительный (затянувшийся) COVID-19 принято диагностировать при наличии его временной связи с перенесенным COVID-19. Он может проявляться в первые 4–12 нед после COVID-19 (продолженный симптомный период COVID-19) и спустя 12 нед (постковидный синдром) и включает в себя широкий спектр клинических симптомов, которые значительно ухудшают профессиональную деятельность и качество жизни пациентов [1, 2].

Субъективные нарушения характеризуются наличием жалоб пациента на учащенное сердцебиение, дискомфорт в грудной клетке, утомляемость и одышку со сниженной толерантностью к физической нагрузке, мышечную боль, головную боль, головокружение, «туман в голове», снижение памяти и концентрации внимания, эмоциональную лабильность, тревогу, раздражительность, расстройства сна [3–6].

Важно подчеркнуть, что тщательное обследование пациентов во многих случаях не выявляет конкретные причины постковидного синдрома. Тем не менее, некоторые авторы считают, что часто встречающиеся симптомы после COVID-19 могут быть связаны с дисфункцией вегетативной нервной системы [7]. Патофизиологические механизмы, ответственные за автономную дисфункцию, остаются дискуссионными, однако к настоящему времени накоплены данные о прямом влиянии вируса COVID-19 и/или связанного с ним иммунного ответа на вегетативную нервную систему, что может проявляться ортостатической гипотензией и синдромом постуральной тахикардии [7, 8]. В работах K. Shuman и соавт. при изучении показателей вегетативного статуса у пациентов с постковидным синдромом было показано, что у 22% пациентов после тилт-теста наблюдался синдром постуральной тахикардии (POTS), а у 11% пациентов выявлены признаки ортостатической гипотензии [9]. A.B. Stella и соавт. при сравнении пациентов после перенесенного COVID-19 с наличием неврологических симптомов и без них продемонстрировали высокую чувствительность вегетативного тестирования и обосновали

необходимость использования тилт-теста для оценки автономной дисфункции у пациентов с постковидным синдромом [10]. Все эти данные подчеркивают необходимость изучения дисфункции вегетативной нервной системы у пациентов с постковидным синдромом с использованием стандартизированного тестирования вегетативных функций.

Методом количественной оценки вегетативной активности и анализа вариабельности ритма сердца (ВРС) является «кардиоваскулярное тестирование по Д. Ивингу». Эти простые неинвазивные тесты стали основой диагностики автономной невропатии при сахарном диабете и хроническом алкоголизме. Также спектральный анализ ВРС с применением функциональных проб позволяет оценить состояние напряженности вегетативной системы и степень влияния ее центральных отделов на нижележащие уровни. Одной из информативных проб является ортостатическая проба, основанная на исследовании динамики частоты сердечных сокращений [11].

Цель исследования – изучение взаимосвязи между клиническими проявлениями постковидного синдрома и вегетативной дисфункцией с помощью анализа показателей вариабельности ритма сердца.

Методика

В исследование были включены 35 пациентов (15 мужчин и 20 женщин) в возрасте от 23 до 49 лет, обратившиеся к неврологу амбулаторно с остаточными неврологическими симптомами после перенесенного COVID-19. При этом обследованные жаловались на утомляемость (87,1%), раздражительность и сниженный фон настроения (84,3%), низкую толерантность к физическим нагрузкам (96,4%), головокружение (93,9%), «туман в голове» (96,4%), чувство тревоги (87,1%), панические атаки (94,1%), снижение памяти на текущие события (87,1%), неустойчивый сон (82,3%), сердцебиение и нестабильность АД (78,2%), предобморочные состояния (75,4%). Описанные симптомы, продолжавшиеся от 3 до 9 мес с момента перенесенной коронавирусной инфекции, отличались полиморфизмом и снижением трудоспособности (пациенты хуже справлялись с работой по специальности, не могли в прежнем объеме вести домашние дела). Критериями исключения были: применение препаратов, влияющих на вегетативную нервную систему, уровень АД и частоту сердечных сокращений (антидепрессанты, анксиолитики, нейролептики, антиконвульсанты, бета-блокаторы, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, блокаторы кальциевых каналов, альфа-1-адреноблокаторы, антигистаминные

препараты). Также не включались пациенты с уровнем АД > 160/90 мм рт. ст., нарушениями ритма сердца, перенесенными острыми нарушениями мозгового кровообращения, черепно-мозговой травмой, инфекционными и воспалительными заболеваниями центральной нервной системы, декомпенсированной соматической патологией, а также психическими заболеваниями, сопровождающимися сенестопатиями, затрудняющими объективную оценку состояния пациента. В контрольную группу было включено 20 здоровых лиц, не находящихся в состоянии психологического стресса.

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004). Все участники подписывали информированное добровольное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных. Работа проводилась на базе ФГБНУ «Научный центр неврологии» и была одобрена этической комиссией института.

Для уточнения состояния вегетативной нервной системы использовались компьютерный многофункциональный комплекс «Нейро-МВП-4» и программа «Поли-Спектр-Ритм» (Нейрософт). Исследование также включало оценку реакций на стандартизированные стимулы (ортостатическая проба, проба Вальсальвы, проба с глубоким управляемым дыханием, проба с изометрическим сокращением) и анализ кардиоваскулярных проб по Д. Ивингу с автоматическим вычислением показателей вегетативной реактивности.

Кардиоваскулярные тесты по Д. Ивингу. Исследование проводилось в первой половине дня, через 2 ч после приема пищи, в затемненном тихом помещении при комфортной комнатной температуре (20–22 °С) при условии отсутствия курения, употребления алкоголя в течение последних суток, значительно выраженных эмоциональных и физических нагрузок и достаточного времени сна. Исследование у женщин проводилось в межменструальный период для исключения гормонального влияния на ритмограмму. Перед записью пациенту предоставлялось 10 мин для адаптации к условиям исследования и исключения нежелательных ориентировочных реакций. Пациент располагался на кушетке лежа с открытыми глазами. Для регистрации ЭКГ использовались стандартные отведения (по W. Einthoven и E. Goldberger) по схеме: красный электрод (R) — нижняя треть правого предплечья; желтый электрод (L) — нижняя треть левого предплечья; зеленый электрод (F) — нижняя треть левой голени; черный электрод (N) — нижняя треть правой голени. Протокол кардиоваскулярного тестирования последовательно включал в себя: измерение АД в нача-

ле тестирования, фоновую пробу (в состоянии лежа на спине в течение 5 мин; ортостатическую пробу (при быстром вставании из положения лежа и нахождении в вертикальном положении в течение 6 мин); измерение АД в конце ортостатической пробы; пробу с глубоким управляемым дыханием (в положении лежа на спине пациента просят дышать глубоко и редко в течение 1 мин); пробу Вальсальвы (в положении лежа пациента просят сделать глубокий вдох, а затем с усилием выдохнуть в трубку, соединенную с манометром; давление в дыхательных путях 40 мм рт. ст. должно поддерживаться в течение 20 с) с последующим измерением АД; пробу с изометрическим сокращением (в ходе теста в положении лежа пациент в течение 3 мин должен сжимать кистевой динамометр с силой, составляющей 30% от максимально возможной); измерение АД в конце пробы с изометрическим сокращением.

Среди показателей variability ритма сердца определяли:

- RRNN (мс) – средняя длительность интервалов N-N и величина, обратная к ЧСС ($ЧСС=60000/RRNN$). Парасимпатические влияния снижают ЧСС (т.е. повышают RRNN), а симпатические – повышают ЧСС (т.е. снижают RRNN).

- SDNN (мс) – стандартное отклонение интервалов R-R. SDNN отражает суммарный эффект вегетативной регуляции ритма сердца. В норме равен 40-80 мс. Увеличение SDNN указывает на преобладание парасимпатических влияний на ритм сердца, снижение SDNN – на преобладание тонуса симпатической нервной системы.

- RMSSD (мс) – квадратный корень из средней суммы квадратов разностей между соседними NN интервалами. Показатель отражает парасимпатическую активность вегетативной регуляции. В покое этот показатель равен 20-50 мс.

- PNN 50 (%) – количество пар соседних NN интервалов, различающихся более чем на 50 мс, в течение всей записи, деленное на общее число NN-интервалов. Показатель характеризует высокочастотные колебания в структуре variability ритма сердца, а именно степень преобладания парасимпатической активности над симпатической.

- При спектральном анализе оценивается вклад спектральных компонент в динамические изменения длительности RR-интервалов.

HF (High Frequency, $мс^2$) – высокочастотные колебания 0.15-0.40 Гц, характеризующие преимущественно парасимпатические влияния на сердечный ритм. HF составляет 15-25% от суммарной мощности спектра. Снижение доли HF менее 10% указывает на

смещение вегетативного баланса в сторону преобладания симпатического тонуса.

LF (Low Frequency, $мс^2$) – низкочастотные колебания 0.04-0.15 Гц, характеризующие преимущественно симпатические влияния на ритм сердца. LF составляет 15-40% от суммарной мощности спектра [12].

Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 2.5.7 (разработчик – ООО «Статтех», Россия). Для определения средних величин и стандартных отклонений использовалась описательная статистика. В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1 – Q3). Сравнение двух групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью U-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считались различия $p < 0,05$.

Результаты

Нами был проведен сопоставительный анализ показателей кардиоваскулярного тестирования по Д. Ивингу у пациентов с постковидным синдромом и у здоровых лиц.

У пациентов с постковидным синдромом по сравнению с группой здоровых лиц наблюдается резкое снижение фоновых временных (SDNN, RRNN, RMS-SD, RNN50) и спектральных (LF, HF) характеристик variability сердечного ритма, что отражает недостаточность автономной регуляции и процесс нарушения симпатических и парасимпатических влияний на ритм сердца (**таблица**). При сравнении групп между собой после ортостатической пробы у пациентов с постковидным синдромом определялись более низкие показатели RRNN и LF, а также более высокий показатель HF. Во время пробы Вальсальвы в группе пациентов с постковидным синдромом по сравнению с группой здоровых лиц отмечены более низкие показатели SDNN, RRNN, LF. Проба с глубоким дыханием у пациентов с постковидным синдромом характеризовалась более низким RRNN и более высоким HF, а проба с изометрическим сокращением – более высокими показателями RMSSD и HF.

Таким образом, у пациентов с постковидным синдромом показатели кардиоваскулярных тестов свидетельствуют о дисбалансе вегетативной нервной системы с преобладанием активности симпатического контура регуляции.

Обсуждение

Состояние системы вегетативной регуляции ритма сердца может оказывать влияние на течение вос-

Показатели кардиоваскулярного тестирования у пациентов с перенесенным COVID-19 в сравнении с группой здоровых лиц

Parameters of cardiovascular testing in patients with post COVID-19 compared with a group of healthy people

| Показатели Indicators | Пациенты с перенесенным COVID-19 (n=35) Patients with post COVID-19 (n=35) | Здоровые лица Healthy people (n=20) | <i>p</i> |
|--|---|---|----------|
| SDNN при фоновой пробе (мс) (ms) during background test (ms) | 55,0 (47,5 – 74,5) | 80,5 (54,0 – 97,0) | 0,009* |
| SDNN при ортостатической пробе (мс) at orthostatic test (ms) | 60,0 (38,0 – 86,0) | 74,0 (65,8 – 79,3) | 0,420 |
| SDNN при пробе с глубоким дыханием (мс) on deep breathing test (ms) | 85,0 (76,0 – 92,0) | 88,0 (83,8 – 91,0) | 0,461 |
| SDNN при пробе Вальсальвы (мс) during Valsalva maneuver (ms) | 128,0 (88,5 – 150,5) | 163,5 (123,5 – 176,5) | 0,021* |
| SDNN при изометрической пробе (мс) with isometric test (ms) | 68,0 (60,5 – 96,0) | 66,0 (61,0 – 79,8) | 0,655 |
| RRNN при фоновой пробе (мс) during background test (ms) | 754,0 (679,0 – 810,0) | 837,5 (758,5 – 876,0) | < 0,001* |
| RRNN при ортостатической пробе (мс) at orthostatic test (ms) | 682,0 (614,0 – 752,5) | 767,0 (682,0 – 832,3) | 0,004* |
| RRNN при пробе с глубоким дыханием (мс) on deep breathing test (ms) | 785,0 (677,0 – 825,0) | 978,0 (813,3 – 996,3) | < 0,001* |
| RRNN при пробе Вальсальвы (мс) during Valsalva maneuver (ms) | 735,0 (672,0 – 780,0) | 862,5 (757,0 – 890,0) | 0,001* |
| RRNN при изометрической пробе (мс) with isometric test (ms) | 720,0 (631,5 – 793,0) | 924,0 (775,8 – 924,0) | < 0,001* |
| RMSSD при фоновой пробе (мс) during background test (ms) | 35,0 (28,0 – 62,0) | 76,5 (54,5 – 88,3) | 0,002* |
| RMSSD при ортостатической пробе (мс) at orthostatic test (ms) | 49,0 (28,5 – 88,0) | 35,5 (30,5 – 42,8) | 0,415 |
| RMSSD при пробе с глубоким дыханием (мс) on deep breathing test (ms) | 55,0 (49,0 – 84,0) | 48,5 (40,5 – 55,5) | 0,070 |
| RMSSD при пробе Вальсальвы (мс) during Valsalva maneuver (ms) | 70,0 (57,0 – 102,0) | 90,5 (80,0 – 99,5) | 0,326 |
| RMSSD при изометрической пробе (мс) with isometric test (ms) | 60,0 (40,0 – 115,0) | 31,5 (29,0 – 74,0) | 0,007* |
| PNN50 при фоновой пробе (%) during background test (%) | 7,0 (4,0 – 8,8) | 14,5 (8,1 – 19,2) | 0,018* |
| PNN50 при ортостатической пробе (%) at orthostatic test (%) | 4,8 (3,5 – 9,3) | 6,7 (5,6 – 7,2) | 0,285 |
| PNN50 при пробе с глубоким дыханием (%) on deep breathing test (%) | 19,6 (12,7 – 28,1) | 24,1 (19,9 – 25,5) | 0,358 |
| PNN50 при пробе Вальсальвы (%) during Valsalva maneuver (%) | 19,4 (12,0 – 24,9) | 19,2 (18,4 – 21,4) | 0,700 |
| PNN50 при изометрической пробе (%) with isometric test (%) | 15,6 (8,4 – 28,3) | 4,0 (2,9 – 28,0) | 0,052 |
| LF при фоновой пробе (мс ²) during background tes (ms ²) | 997,0 (600,0 – 1410,0) | 2950,0 (946,0 – 3205,0) | 0,031* |
| LF при ортостатической пробе (мс ²) at orthostatic test (ms ²) | 622,0 (515,0 – 2151,0) | 3053,5 (602,3 – 3270,5) | 0,038* |
| LF при пробе с глубоким дыханием (мс ²) on deep breathing test (%) | 2608,0 (1950,0 – 5109,5) | 5159,0 (2458,5 – 5490,0) | 0,189 |
| LF при пробе Вальсальвы (мс ²) during Valsalva maneuver (ms ²) | 4200 (1307 – 4545) | 8706 (4214 – 8953) | 0,003* |
| LF при изометрической пробе (мс ²) with isometric test (ms ²) | 1513,0 (1064,0 – 2289,5) | 1339,0 (1243,5 – 1605,5) | 0,441 |
| HF при фоновой пробе (мс ²) during background tes (ms ²) | 377,0 (235,0 – 1207,5) | 1895,0 (572,8 – 2204,0) | 0,005* |
| HF при ортостатической пробе (мс ²) at orthostatic test (ms ²) | 608,0 (165,5 – 1151,5) | 107,0 (98,8 – 359,5) | < 0,001* |
| HF при пробе с глубоким дыханием (мс ²) on deep breathing test (ms) | 1200,0 (616,0 – 1781,0) | 455,0 (419,5 – 862,0) | 0,005* |
| HF при пробе Вальсальвы (мс ²) at orthostatic test (ms ²) | 1860,0 (786,0 – 2146,0) | 910,0 (900,0 – 1210,5) | 0,037* |
| HF при изометрической пробе (мс ²) with isometric test ms ²) | 1230,0 (569,5 – 1812,5) | 110,0 (103,0 – 1320,0) | 0,003* |

Примечание. * – различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$).

Note. * – differences in indicators are statistically significant ($p < 0.05$).

становительного периода после COVID-19, а оценка variability ритма сердца может использоваться в прогнозе осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы.

Кардиоваскулярные тесты Д. Ивинга и анализ variability сердечного ритма являются методами оценки вегетативных функций. Проба Вальсальвы и проба с глубоким дыханием в основном оценивают функцию парасимпатической системы, в то время как ортостатическая проба и тест с изометрической нагрузкой – состояние симпатической иннервации [13].

В исследовании проведена оценка адаптационных реакций сердечно-сосудистой системы в ответ на функциональные пробы. Исходя из полученных данных, общая variability сердечного ритма, отраженная в SDNN, свидетельствует о преобладании активности симпатической системы у пациентов с постковидным синдромом [14]. С другой стороны, показатели RMSSD и HF при пробе с изометрической нагрузкой у пациентов с постковидным синдромом были выше, чем у здоровых лиц, что указывает на сдвиг вегетативных реакций с увеличением парасимпатических влияний [15]. Некоторые авторы предполагают, что повышение уровня провоспалительных цитокинов при COVID-19 сопровождается дисфункцией вегетативной нервной системы с преимущественной активацией симпатической системы [16]. Возможно, что чрезмерная активация симпатической нервной системы лежит в основе длительного постковидного синдрома и оказывает негативное влияние на процесс выздоровления [17]. L. Østergaard высказал предположение, что SARS-CoV-2 приводит к повреждению эндотелиоцитов и пероцитов, образованию тромбов в сосудах микроциркуляторного русла [18]. Выявлена прямая корреляционная связь между дисфункцией эндотелия и дизрегуляторной патологией вегетативной нервной системы [19].

Полученные данные подчеркивают роль вегетативной дисфункции в развитии длительного постковидного синдрома и обосновывают необходимость дальнейших исследований с использованием большей выборки пациентов и дополнительных методов оценки функций вегетативной нервной системы.

Литература

(п.п. 1-10; 13-19 см. References)

11. Ахмерова Л.Р., Фомин Ф.Ю. *Применение метода variability сердечного ритма в психоневрологической практике (Часть I)*. 2020.

12. Новиков Е.М., Стеблецов С.В., Ардашев В.Н., Кириллова Т.Б., Тарабарина Н.Б. Методы исследования сердечного ритма по данным ЭКГ: variability сердечного ритма и дисперсионное картирование (Обзорная статья). *Кремлевская медицина. Клинический вестник*. 2019; 4: 81-9.

References

1. Augustin M., Schommers P., Stecher M., Dewald F., Giesemann L., Gruell H., et al. Post-COVID syndrome in non-hospitalized patients with COVID-19: a longitudinal prospective cohort study. *Lancet Reg Health Eur*. 2021 Jul;6:100122. doi: 10.1016/j.lanepe.2021.100122

2. Chan A.T., Drew D.A., Nguyen L.H., Joshi A.D., Ma W., Guo C.G., et al. COPE Consortium. The Coronavirus Pandemic Epidemiology (COPE) Consortium: A call to action. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2020; 29(7): 1283-9. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-20-0606.

3. Gallagher S. *What is long Covid? Three quarters of people hospitalised suffer symptoms for three months or more*. Independent, 12 October 2020.

4. Nalbandian A., Sehgal K., Gupta A., Madhavan M.V., McGroder C., Stevens J.S., et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med*. 2021 Apr; 27(4): 601-15. doi: 10.1038/s41591-021-01283-z

5. van den Borst B., Peters J.B., Brink M., Schoon Y., Bleeker-Rovers C.P., Schers H., et al. Comprehensive health assessment three months after recovery from acute COVID-19. *Clin Infect Dis*. 2021 Sep 7; 73(5): e1089-e1098.

6. Blazhenets G., Schroeter N., Bormann T., Thurow J., Wagner D., Frings L., et al. Slow but evident recovery from neocortical dysfunction and cognitive impairment in a series of chronic COVID-19 patients. *J Nucl Med*. 2021 Jul 1; 62(7): 910-5. doi: 10.2967/jnumed.121.262128

7. Dani M., Dirksen A., Taraborrelli P., Torocastro M., Panagopoulos D., Sutton R., et al. Autonomic dysfunction in “long COVID”: rationale, physiology and management strategies. *Clin Med (Lond)*. 2021 Jan; 21(1): e63-e67. doi: 10.7861/clinmed.2020-0896

8. Raj S.R., Arnold A.C., Barboi A., Claydon V.E., Limberg J.K., Lucchi V.M., et al. American Autonomic Society. Long-COVID postural tachycardia syndrome: an American autonomic society statement. *Clin Auton Res*. 2021 Jun; 31(3): 365-8. doi: 10.1007/s10286-021-00798-2

9. Shouman K., Vanichkachorn G., Cheshire W.P., Suarez M.D., Shelly S., Lamotte G.J., et al. Autonomic dysfunction following COVID-19 infection: an early experience. *Clin Auton Res*. 2021 Jun; 31(3): 385-94. doi: 10.1007/s10286-021-00803-8

10. Buoite Stella A., Furlanis G., Frezza N.A., Valentinotti R., Ajcevic M., Manganotti P. Autonomic dysfunction in post-COVID patients with and without neurological symptoms: a prospective multidomain observational study. *J Neurol*. 2022 Feb; 269(2): 587-96. doi: 10.1007/s00415-021-10735-y

11. Akhmerova L.R., Fomin F.Yu. *Primenenie metoda variabel'nosti serdechnogo ritma v psikhonevrologicheskoi praktike (Chast' I)*. [Primenenie metoda variabel'nosti serdechnogo ritma v psikhonevrologicheskoi praktike (Chast' I)]. 2020.

12. Novikov E.M., Stebletsov S.V., Ardashev V.N., Kirillova T.B., Taranina N.B. ECG-based investigation methods: heart rate variability and dispersion mapping (literature review). *Kremlevskaya meditsina. Klinicheskiy vestnik*. 2019; 4: 81-9.

13. Ewing D.J., Campbell I.W., Murray A., Neilson J.M., Clarke B.F. Immediate heart-rate response to standing: simple test for autono-

- mic neuropathy in diabetes. *Br Med J.* 1978 Jan 21; 1(6106): 145-7. doi: 10.1136/bmj.1.6106.145.
14. Johnson C.D., Roe S., Tansey E.A. Investigating autonomic control of the cardiovascular system: a battery of simple tests. *Adv Physiol Educ.* 2013 Dec; 37(4):401-4. doi: 10.1152/advan.00065.2013
 15. Michael S., Graham K.S., Davis G.M. Oam. Cardiac Autonomic Responses during Exercise and Post-exercise Recovery Using Heart Rate Variability and Systolic Time Intervals-A Review. *Front Physiol.* 2017 May 29; 8:301. doi: 10.3389/fphys.2017.00301
 16. Fudim M., Qadri Y.J., Ghadimi K., MacLeod D.B., Molinger J., Piccini J.P., et al. Implications for neuromodulation therapy to control inflammation and related organ dysfunction in COVID-19. *J Cardiovasc Transl Res.* 2020 Dec; 13(6): 894-9. doi: 10.1007/s12265-020-10031-6
 17. Guilmot A., Maldonado Sloopjes S., Sellimi A., Bronchain M., Hansseeuw B., Belkhir L., et al Immune-mediated neurological syndromes in SARS-CoV-2-infected patients. *J Neurol.* 2021 Mar; 268(3): 751-7. doi: 10.1007/s00415-020-10108-x
 18. Østergaard L. SARS CoV-2 related microvascular damage and symptoms during and after COVID-19: Consequences of capillary transit-time changes, tissue hypoxia and inflammation. *Physiol Rep.* 2021 Feb; 9(3):e14726. doi: 10.14814/phy2.14726
 19. Cieślak-Guerra U.I., Fila M., Kamiński M., Kotas R., Wróblewski J., Trzos E., et al. Correlation between the activity of the autonomic nervous system and endothelial function in patients with acute coronary syndrome. *Pol Arch Med Wewn.* 2014; 124(10): 509-15. doi: 10.20452/pamw.2456

Сведения об авторах:

Максимова Марина Юрьевна, доктор мед. наук, проф., руководитель 2-го неврологического отделения ФГБНУ «Научный центр неврологии», eLibrary SPIN: 5389-7907. Researcher ID: C-7408-2012. Scopus Author ID: 7003900736, e-mail: ncnmaximova@mail.ru;

Галанина Анна Сергеевна, аспирант 2-го неврологического отделения ФГБНУ «Научный центр неврологии».

© Мухамадияров Р.А., Кутихин А.Г., 2022

УДК 616-092

Мухамадияров Р.А., Кутихин А.Г.

Полиморфизм эндотелиальных клеток на поверхности створок митрального клапана и сосудов микроциркуляторного русла при инфекционном эндокардите

ФБГНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», 650002, Кемерово, Россия, Сосновый бульвар, д. 6

Цель работы – изучение структурных особенностей эндотелия, микрососудистого русла, интерстициальных клеток створок митрального клапана при инфекционном эндокардите (ИЭ) и оценка их роли в развитии патологического процесса.

Методика. Исследовано 14 митральных клапанов, извлеченных при хирургических вмешательствах у пациентов с инфекционным эндокардитом (ИЭ). Образцы фиксировали в забуференном параформальдегиде с постфиксацией в тетраокиси осмия. После обезвоживания в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне образцы помещали в эпоксидную смолу. После полимеризации смолы образцы шлифовали, а затем полировали до нужной глубины образца. Для повышения электронного контраста образцы обрабатывали спиртовым раствором уранилацетата в процессе обезвоживания и цитратом свинца по Рейнольдсу после полировки эпоксидных блоков. Образцы визуализировали посредством сканирующей электронной микроскопии с детекцией обратно рассеянных электронов при ускоряющем напряжении 15 кВ.

Результаты. На поверхности створок были выявлены структурные изменения эндотелиальных клеток, степень изменений зависела от состояния находящихся под ними участков створок. Минимальные изменения структуры наблюдали при максимальной сохранности структуры, максимальные вблизи зон некрозов и других типовых проявлениях ИЭ. Одновременно со структурными изменениями эндотелия отмечали активацию интерстициальных клеток, которые, по мере развития патологического процесса, мигрировали в направлении эндотелия, образуя параллельный ему слой клеток. В сосудах микроциркуляторного русла обращал внимание полиморфизм эндотелиоцитов, отмечался диапедез с миграцией гранулоцитов в толщу створок. В пораженных участках створок выявлялись признаки неоангиогенеза.

Заключение. Полученные результаты указывают на комплекс изменений направленных на поддержание структурной целостности эндотелия и самих створок в целом. Конечным результатом этих процессов является замещение поврежденных клеток эндотелия интерстициальными клетками и активизация неоангиогенеза в толще створок.

Ключевые слова: инфекционный эндокардит; митральный клапан; ультраструктура эндотелия; эндотелий; интерстициальные клетки; неоангиогенез

Для цитирования: Мухамадияров Р.А., Кутихин А.Г. Полиморфизм эндотелиальных клеток на поверхности створок митрального клапана и сосудов микроциркуляторного русла при инфекционном эндокардите. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1): 68–77.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.68-77

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, сбор и обработка данных, составление рисунков, написание текста – Мухамадияров Р.А.; концепция и дизайн исследования, составление рисунков, написание статьи, редактирование – Кутихин А.Г.

Для корреспонденции: Мухамадияров Ринат Авхадиевич, e-mail: rem57@rambler.ru

Финансирование. Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 08.04.2020

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Mukhamadiyarov R.A., Kutikhin A.G.

Polymorphism of endothelial cells on the surface of mitral valves and microcirculatory vessels in infectious endocarditisResearch Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,
Sosnovy Blvd. 6, Kemerovo 650002, Russian Federation

Aim. To investigate the structural features of endothelial cells of the surface layer of the mitral valve leaflet and microvascular bed, as well as interstitial cells in infective endocarditis (IE) of the mitral valve leaflets and to discuss their role in the development of the pathological process.

Methods. We examined 14 mitral valves extracted during surgical interventions for structural incompetence due to IE. The samples were fixed in buffered paraformaldehyde with post-fixation in osmium tetroxide. After dehydration in alcohols of increasing concentration and acetone, the samples were placed in epoxy resin. After resin polymerization, the specimens were ground and then polished to the desired specimen depth. To increase the electronic contrast, the samples were treated with an alcohol solution of uranyl acetate during dehydration and with lead citrate, according to Reynolds method, after polishing the epoxy blocks. The samples were visualized by scanning electron microscopy with detection of backscattered electrons at an accelerating voltage of 15 kV.

Results. Structural changes in endothelial cells were evident on the surface of the valves. The degree of these changes depended on the state of the underlying valve structure. Minimal changes in endothelial structure were associated with the maximal structural preservation of the leaflet. The maximal changes in endothelial structure were near the zones of leaflet necrosis and other serious manifestations of IE. Simultaneously with structural disorders of the endothelium, activation of interstitial cells was noted. As the pathological process progressed, these cells migrated towards the endothelium, and formed a layer of cells parallel to it. In microcirculatory vessels, endothelial cell polymorphism was also observed. In these vessels, diapedesis with migration of granulocytes into the valves was noted. Neoangiogenesis in the affected areas of the valves was noted.

Conclusion. The results showed processes in the cusps of mitral valves with IE that aim to maintain the structural integrity of the endothelium and of the cusps. The end result of these processes is the replacement of damaged endothelial cells with interstitial cells and activation of neoangiogenesis in the thickness of the cusps.

Keywords: mitral valve infective endocarditis; endothelial ultrastructure; endothelium; interstitial cells; neoangiogenesis

For citation: Mukhamadiyarov R.A., Kutikhin A.G. Polymorphism of endothelial cells on the surface of mitral valves and microcirculatory vessels in infectious endocarditis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological physiology and experimental therapy. Russian Journal)*. 2022; 66(1): 68–77. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.68-77

Authors' contribution: concept and design of the study, collection and processing of material, preparation of illustrative material, writing the text – Mukhamadiyarov R.A.; concept and design of the study, preparation of illustrative material, writing and editing text – Kutikhin A.G.

For correspondence: *Rinat A. Mukhamadiyarov*, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, 6, Sosnovy Blvd, Kemerovo, Russian Federation, e-mail: rem57@rambler.ru

Financing. The study was supported by a complex program for basic scientific research of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences as a part of the basic project of the Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases # 0546-2019-0002: «Pathogenetic justification for development of implants for cardiovascular surgery on the basis of biocompatible materials with implementation of the patient-centered approach using mathematical modeling, tissue engineering, and genomic predictors.

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

Information about the authors:Mukhamadiyarov R.A., <https://orcid.org/0000-0002-5558-3229>Kutikhin A.G., <https://orcid.org/0000-0001-8679-4857>

Received 08.04.2020

Accepted 20.01.2022

Published 15.03.2022

Введение

Исследование процессов, связанных с развитием инфекционного эндокардита (ИЭ), продолжают привлекать внимание исследователей. Это связано с тем, что даже в настоящее время ИЭ является опасным для жизни заболеванием с летальностью 30% и недоста-

точно изученными патогенетическими особенностями процесса. В существующей ситуации большие надежды возлагаются на исследования, направленные на создание новых вариантов ранней диагностики ИЭ, а также изучение участия клеточных и молеку-

Методика

лярных механизмов на разных стадиях развития ИЭ [1–3]. Многие исследователи подчеркивают важную роль эндотелия в развитии и течении заболевания [4–6]. Выступая в качестве выстилающего створки слоя, эндотелий при ИЭ выполняет двоякую роль. С одной стороны, в интактном состоянии он изолирует внутренние структуры створок клапана от агрессивного воздействия факторов крови, включая возможные циркулирующие инфекционные агенты. С другой стороны, при формировании фибриновых масс на поверхности створок, эндотелий, напротив, адгезирует различные микроорганизмы [7–9]. Важным фактором, определяющим положительную или отрицательную роль эндотелия в развитии ИЭ, является его функциональное состояние. В норме эндотелий играет ключевую роль в поддержании клапанного гемостаза, однако в связи с возрастом и развитием системных заболеваний эндотелий претерпевает существенные изменения, в результате чего снижается способность клапанных эндотелиальных клеток управлять про- и анти-тромбогенными механизмами. Кроме непосредственного участия в поддержании клапанного гемостаза, эндотелий также выполняет важную роль в управлении дифференцировкой клапанных интерстициальных клеток [10, 11].

При воспалительных процессах, обусловленных ИЭ, важную роль выполняет не только эндотелий, локализованный на поверхности створок, но и эндотелий сосудов микроциркуляторного русла в ткани клапана [10, 11]. Именно через сосуды малого диаметра происходит транспорт иммунокомпетентных клеток, удаление продуктов распада, а также доставка кислорода и пластических материалов, обуславливающих регенерацию створок, вследствие чего их эндотелий может играть важную роль в патогенезе заболеваний сердца [12, 13]. Поэтому можно ожидать, что исследования структурных особенностей эндотелия могут дать важную информацию о состоянии эндотелиального барьера, а также функциональном состоянии эндотелиальных клеток и их ближайшего окружения. Понимание роли эндотелиальных клеток поверхностного слоя створок клапанов и сосудов микроциркуляторного русла, наряду с оценкой участия интерстициальных клеток, позволит более полно оценить механизмы функционирования митрального клапана при ИЭ.

Цель работы — изучение структурных особенностей клеток эндотелия микрососудистого русла и поверхностного слоя створки митрального клапана и а также интерстициальных клеток клапана при инфекционном миокардите.

В качестве основного метода исследования была использована оригинальная методика визуализации клеточного строения, основанная на использовании сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах [14] после специальной пробоподготовки и контрастирования исследуемых тканей [15]. Изображение, полученное этим методом, аналогично получаемым при сканирующей электронной микроскопии и сопоставимо с электрограммами, приводимыми в атласах по электронной микроскопии. Несмотря на меньшую разрешающую способность нового метода, он позволил уверенно идентифицировать клетки и структуры внеклеточного матрикса в составе створок митрального клапана. Важным преимуществом использованного метода является возможность сразу просматривать всю область поперечного сечения клапана без приготовления ультратонких срезов.

Исследовано 14 митральных клапанов (МК), извлеченных при хирургических вмешательствах в связи с развитием структурной несостоятельности вследствие ИЭ. Когорту пациентов составили 6 женщин и 8 мужчин. Средний возраст пациентов на момент выполнения операций составил $54,3 \pm 7,9$ лет. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией о правах человека. Все больные подписали добровольное информированное согласие. Исследование одобрено этической комиссией. НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. Критериями диагноза ИЭ были клинические проявления инфекционно-токсического синдрома до хирургических вмешательств, а также выявление микробных вегетаций при предоперационной эхокардиографии клапанов сердца. Результаты гемокультур в большинстве случаев были отрицательными, что являлось следствием предшествующего использования антимикробных препаратов широкого спектра действия. Для исключения случаев аутоиммунного поражения створок дополнительно выполняли ревизию образцов — в исследовании брали только образцы, имеющие поверхностные вегетации. Предварительно выполняли рутинную макроскопическую оценку всех эксплантированных клапанов на наличие кальцинатов. При обнаружении крупных отложений, вызывающих деструкцию соединительнотканых структур и значительно нарушающих послойное строение створок, образцы исключались из последующего анализа. Единичные мелкокристаллические включения не являлись препятствием для проведения исследования. Для микроскопических ис-

следований выбирали участки створок с минимальными визуальными повреждениями поверхности створок.

После извлечения фрагменты створок помещали в забуференный (рН 7,4) 10% водный раствор формалина (В06-003, БиоВитрум). После суточной фиксации (2 смены раствора формалина по 12 ч каждая) фрагменты МК постфиксировали 1% тетраоксидом осмия (OsO_4 , 19110, Electron Microscopy Sciences) в 0,1М фосфатном буфере в течение 12 ч, затем окрашивали 2% тетраоксидом осмия в течение 48 ч. Далее образцы обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации, окрашивали 2% уранилацетатом (22400-2, Electron Microscopy Sciences) в 95% этаноле (10 ч), обезвоживали 99,7% изопропанолом (06-002, БиоВитрум) в течение 5 ч и ацетоном (150495, Лен-Реактив) в течение 1 ч, пропитывали смесью ацетона с эпоксидной смолой Epon (Epon (14120, Electron Microscopy Sciences)) в соотношении 1:1 (10 ч), после чего переносили в свежую порцию эпоксидной смолы (на 24 ч) и далее проводили ее полимеризацию в емкостях FixiForm (Struers, США) в свежей порции смолы при 60 °С. После этого образцы в эпоксидных блоках подвергали шлифовке и полировке на установке TegraPol-11 (Struers, США). Шлифы контрастировали цитратом свинца (17810, Electron Microscopy Sciences) в течение 7 мин путем нанесения раствора на поверхность шлифованного образца с последующей его отмывкой бидистиллированной водой. Далее проводили напыление поверхности эпоксидных блоков углеродом (толщина покрытия 10-15 нм) с помощью вакуумного напылительного поста (EM ACE200, Leica). Образцы просматривали с использованием сканирующего электронного микроскопа Hitachi-S-3400N (Hitachi, Япония) в режиме BSECOMP при ускоряющем напряжении 15 кВ.

На цифровых микрофотографиях исследовали общую структуру инфицированных МК, нарушение структуры внеклеточного матрикса, идентифицировали различные клеточные популяции, определяли их локализацию и взаимодействие между собой и с другими элементами ткани.

Результаты исследования

Полученные результаты показали, что зоны инфекционного поражения в структуре створок располагаются неравномерно. В пределах одной и той же створки встречались зоны с минимальным изменением гистологической структуры и зоны с выраженным некрозом (рис. 1, А). Для удобства представления материала в структуре створок выделяли несколько зон в зависимости от гистологической сохранности: зона

с высокой сохранностью исходной гистологической структуры, зона с умеренным нарушением гистологической структуры без зон некроза и зона со значительными повреждениями структуры, обычно включающими в себя зоны некроза.

В областях створок с относительно сохранной структурой с предсердной поверхности створок эндотелий образовывал гладкую поверхность, клетки имели тонкий слой цитоплазмы и уплощенные ядра, с внутренней стороны цитоплазма клеток была погружена в субэндотелиальный слой (рис. 1, Б, В). С желудочковой поверхности клетки эндотелиального слоя располагались более рыхло, в области локализации ядер эндотелиоциты немного выступали над поверхностью (рис. 1, Г). В целом клетки эндотелия, лежащие на одной и той же поверхности в относительно сохранных зонах створок, имели между собой большое структурное сходство. Незначительные отличия отмечали только в электронной плотности ядер.

В зонах с умеренным нарушением внутренней структуры также наблюдали сохранность эндотелия на всей поверхности участка с редко встречающимися дефектами. Отмечали небольшое разрыхление субэндотелиального матрикса. Со стороны поверхности желудочка часть эндотелия была представлена уплощенными клетками с высокой сохранностью и выраженным субэндотелиальным слоем (рис. 2, А, Б). Реже эндотелиоциты в этой области демонстрировали выраженный полиморфизм (рис. 2, В).

Со стороны предсердия клетки имели более округлую форму (рис. 2, Г, Д, Е) с довольно широким слоем цитоплазмы и утолщенные ядра различной формы. Среди этих клеток можно было выделить клетки с темными и светлыми ядрами. У клеток с темными ядрами цитоплазма имела повышенную электронную плотность, в ней иногда встречались отдельные светлые вакуоли. Эти клетки располагались параллельно поверхности створки. Клетки со светлыми ядрами имели широкий слой цитоплазмы с низкой электронной плотностью. Часто сами клетки и их ядра находились под углом к поверхности створки. В этой зоне под слоем эндотелия часто встречались слабо дифференцированные интерстициальные клетки, не имеющие плотного контакта друг с другом.

В зоне с максимальными структурными изменениями створок наблюдали увеличение выраженности структурных изменений клеток эндотелия в этих участках (рис. 3, А-Ж). Типичные эндотелиоциты, имеющие вытянутую форму самой клетки, цитоплазму умеренной плотности и ядра с одним ядрышком и слоем конденсированного хроматина по периферии ядерной

мембраны, встречались относительно редко. На основании морфологических критериев среди часто встречающихся клеток можно было выделить 2 варианта клеточной организации: 1) клетки со светлыми ядрами с выраженными ядрышками и светлой, часто вакуолизированной цитоплазмой; 2) клетки с темным округлой формы ядром и цитоплазмой с большим количеством вакуолей. Обращает на себя внимание нарушение непрерывности слоя эндотелия. В участках створок со значительными изменениями эндотелия отмечали появление под ним большого количества слабо дифференцированных клеток со светлыми ядрами, имеющими по несколько ядрышек и находящихся в непосредственной близости к эндотелиоцитам.

Структура поверхности створок, на которой отсутствует сплошной слой эндотелия, показана на рис. 4. Обычно наблюдали 2 варианта таких поверх-

ностей: в одном варианте специализированные структуры на поверхности отсутствовали (рис. 4, А), в другом поверхность была покрыта плотно расположенными гладкомышечными клетками, ориентированными параллельно поверхности створки (рис. 4, Б).

Мелкие сосуды во внутреннем слое створок МК при ИЭ можно было разделить на 2 группы. В 1-й группе сосуды мало отличались от типичных капилляров, они имели сплошной эндотелий, уплощенные клетки с цитоплазмой умеренной электронной плотности и были окружены по всему периметру волокнами соединительной ткани (рис. 5, А, Б). Во 2-м варианте сами капилляры имели звездчатую форму, а эндотелиальный слой содержал клетки, имеющие значительные морфологические различия (рис. 5, В-Е). Субэндотелиальная область таких капилляров была светлой, без присутствия волокон соединительной ткани. Главной

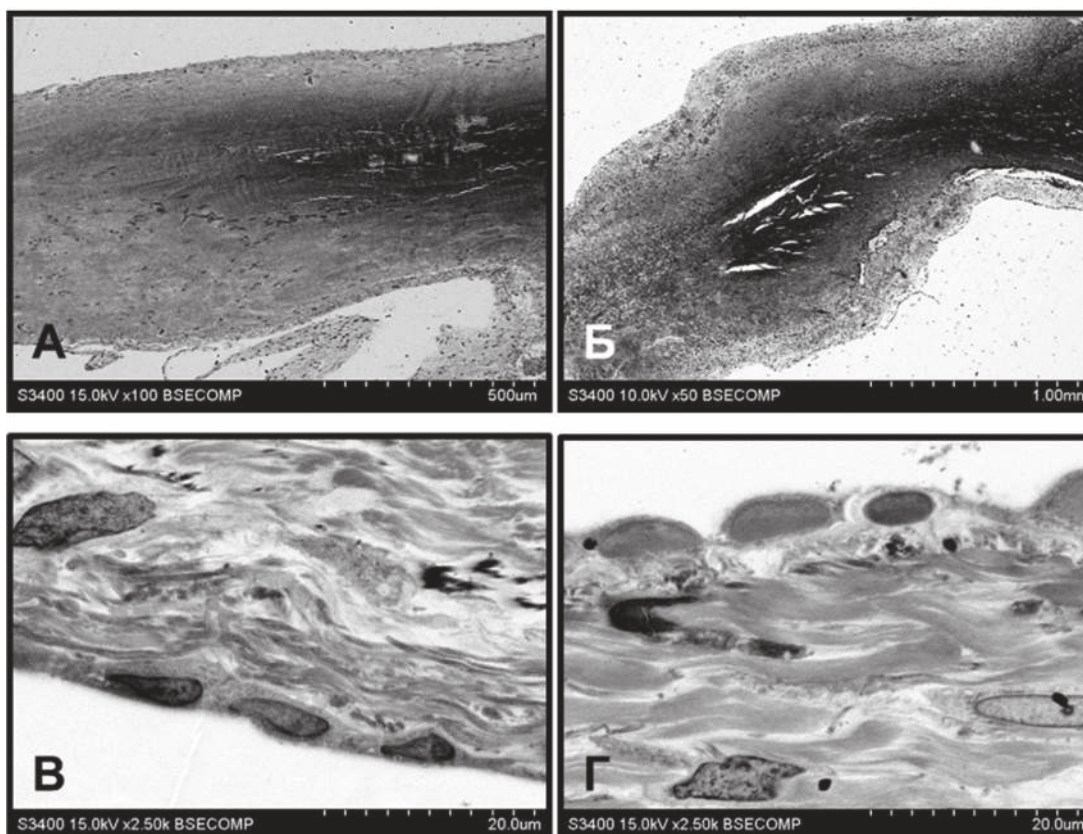


Рис. 1. Ультраструктура зоны сохранного участка створки и эндотелиального слоя участка митрального клапана с инфекционным эндокардитом (ИЭ). А, Б – общий вид створок, В – эндотелий относительно сохранного участка створки с «желудочковой» поверхности, Г – эндотелий относительно сохранного участка створки с «предсердной» поверхности.

Fig. 1. Ultrastructure of the section of the leaflet with infective endocarditis (IE) and the endothelial layer of the mitral valve section with IE. А, Б (A,B) general view of the valves; В (C) endothelium relative to the intact part of the valve from the ventricular surface; Г (D) endothelium relative to the intact part of the valve from the atrial surface.

особенностью этих капилляров было наличие большого количества гранулоцитов, находящихся вокруг капилляра, и гранулоцитов, пересекающих стенку сосуда. На поверхности эндотелия наблюдали наличие адгезированных клеток (рис. 5, Ж).

Обсуждение

Инфекционный эндокардит створок МК индуцирует структурные нарушения эндотелиального слоя, а степень морфологических проявлений этих нарушений кор-

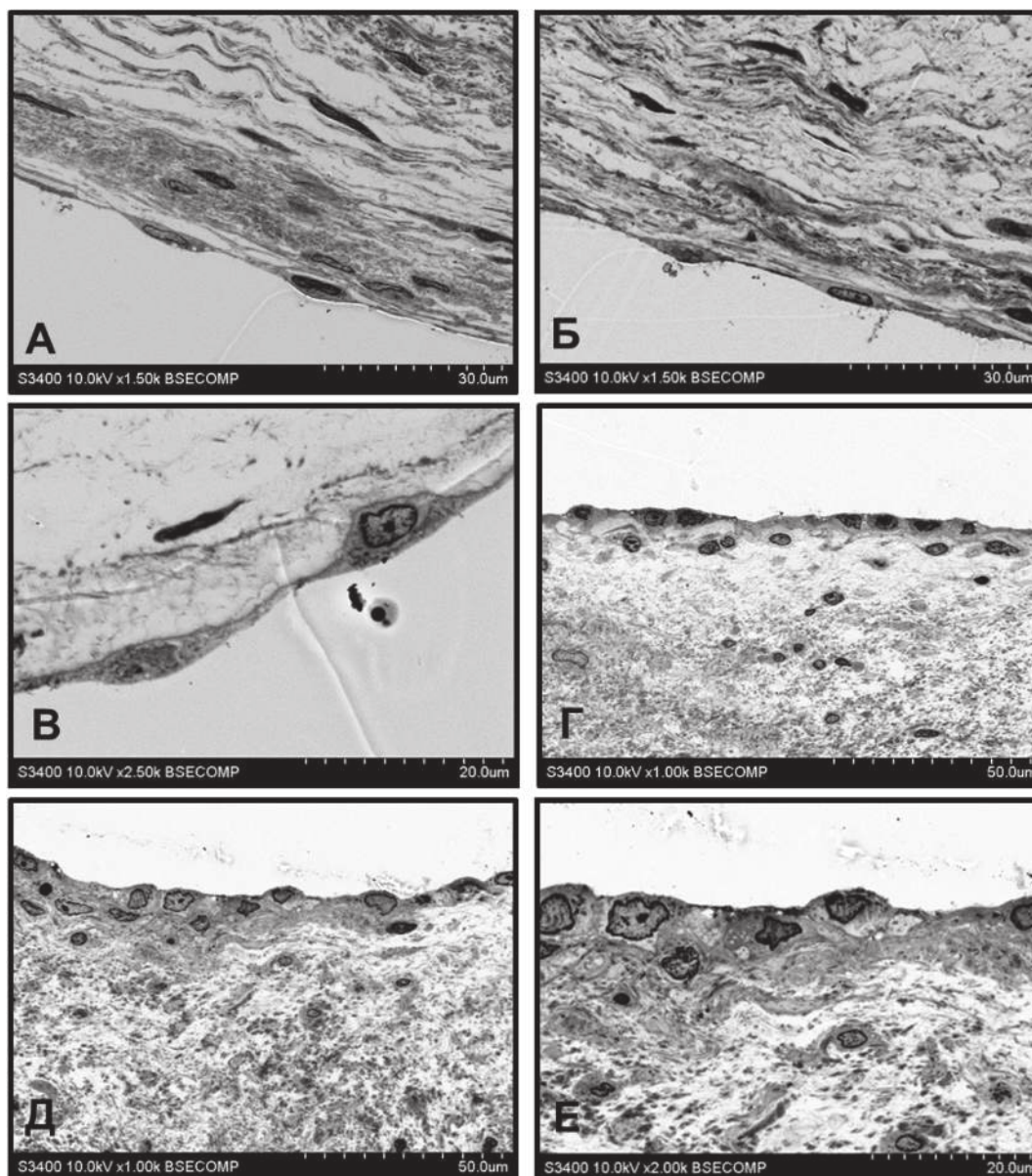


Рис. 2. Ультраструктура клеток эндотелиального слоя в участках створок с умеренным ИЭ. А, Б – клетки с высокой структурной сохранностью, но различной электронной плотностью ядер на желудочковой поверхности створки, В – полиморфизм клеток на предсердной поверхности створки, Г, Д, Е – полиморфизм клеток на желудочковой поверхности эндотелия, наличие интерстициальных клеток вблизи эндотелия.

Fig. 2. Ultrastructure of cells of the endothelial layer in areas of valves with pronounced IE. A, B (A, B): cells with high structural integrity but different electron density of nuclei on the ventricular surface of the valve, B(C) polymorphism of cells on the atrial surface of the valve; Г, Д, Е (D, E, F) polymorphism of cells on the ventricular surface of the endothelium, the presence of interstitial cells near the endothelium.

релирует с уровнем деструктивных изменений внутренних структур. Факторами, вызывающими повреждение эндотелия, являются бактериальные токсины, аутоиммунные реакции, гемодинамические силы и цитокины иммунного ответа [16]. После повреждения эндотелиального слоя сосудистая стенка и сердечные клапаны, выставленные эндотелиальными клетками, утрачивают способ-

ность к поддержанию гемостаза и склонны к образованию вегетаций [5, 6]. Следствием этого является потеря антикоагулянтной функции эндотелия, а также индуцированного бактериальными или иммунными факторами прокоагулянтного действия. Можно ожидать, что повреждения структуры створки активизируют различные варианты регенеративных процессов. Поэтому различ-

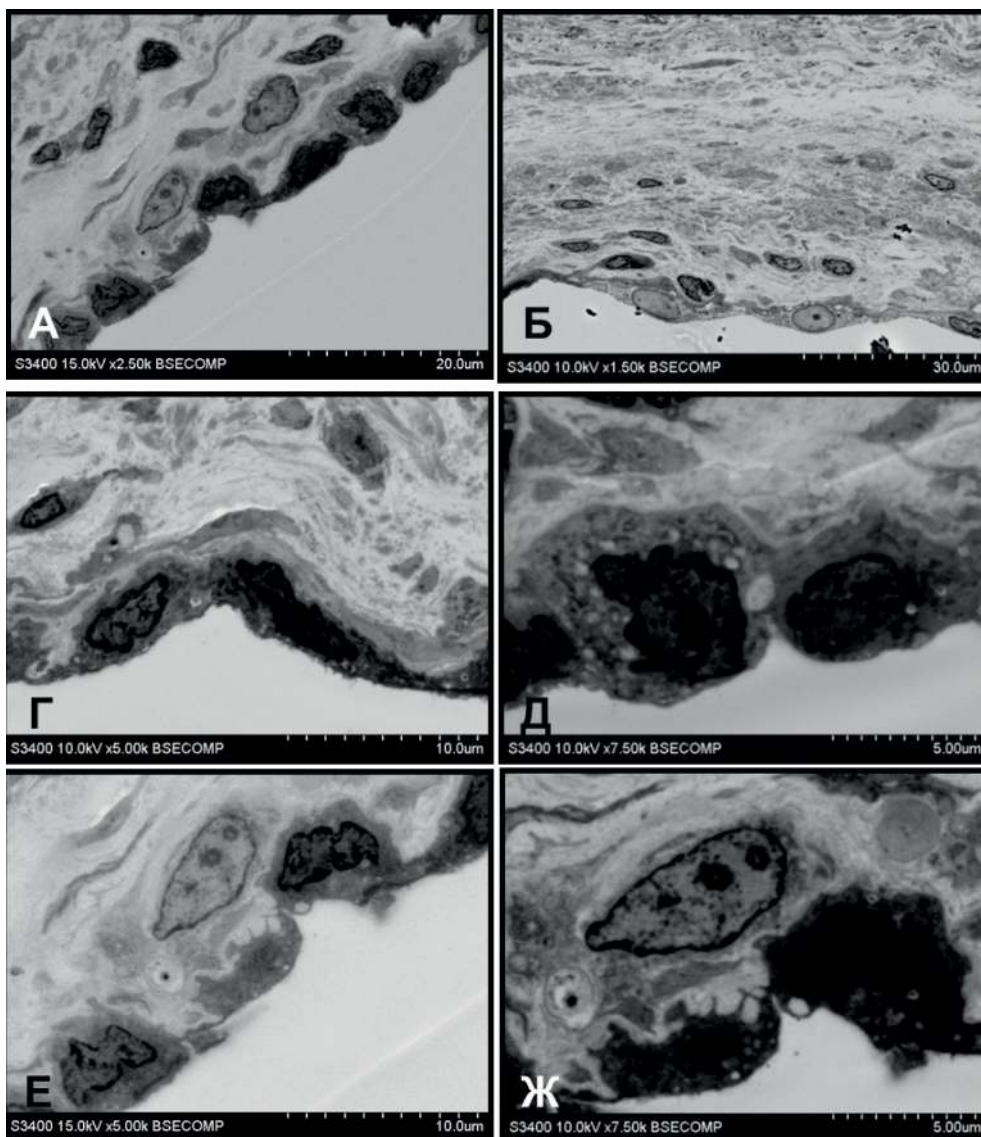


Рис. 3. Структура эндотелиального слоя в участках створки с выраженным некрозом. А – полиморфизм клеток эндотелия, Б – клетки со светлыми ядрами и Г, Д – эндотелиоциты с темными ядрами и вакуолизированной цитоплазмой, Е, Ж – контакт интерстициальных клеток с эндотелиоцитами.

Fig. 3. The structure of the endothelial layer in areas of the valve with pronounced necrosis. А(A) -- polymorphism of endothelial cells, Б(B) -- cells with light nuclei and cytoplasm as part of the endothelial layer, Г, Д (C, D)-- endothelial cells with dark nuclei and vacuolated cytoplasm, Е, Ж (E, F) -- contact of interstitial cells with endothelial cells.

ная степень структурной сохранности эндотелиального слоя поверхности створок может рассматриваться как показатель сохранности его функциональной активности.

В варианте с минимальными структурными нарушениями наблюдали непрерывность эндотелиального слоя, однородность входящих в него клеток и отсутствие развитого микроциркуляторного русла. В качестве отклонения от нормы можно назвать только появление в эндотелиальном слое единичных клеток с более светлыми ядрами и отдельных интерстициальных клеток вблизи этого слоя, вероятно, связанное с патологической активацией эндотелия.

В участках со средним уровнем повреждения эндотелиального слоя отмечали выраженный полиморфизм клеток эндотелия. Это проявлялось в различиях электронной плотности ядер и цитоплазмы, формы клеток и их ориентации. Могли встречаться единичные дефекты целостности эндотелиального слоя. Под слоем эндотелия могли присутствовать крупные, слабо дифференцированные интерстициальные клетки со светлыми ядрами и цитоплазмой. Клетки образовывали неплотный слой, параллельный поверхности створки. Капилляры во внутренней структуре створок в этих участках были единичными.

В зонах створок МК с выраженной деструкцией наблюдали высокий уровень полиморфизма клеток эндотелия. Структурные различия были отмечены как для клеток, находящихся отдаленно в разных участках створок, так и для соседних клеток в одном и том же участке. Эндотелиоциты в этой зоне демонстрировали наиболее выраженный уровень клеточного полиморфизма. Вблизи друг от друга часто находились клетки

на различных стадиях деструкции и клетки со светлыми ядрами и цитоплазмой.

Наряду с другими авторами мы рассматриваем следующий механизм регенерации [4–6]. Бактериальное обсеменение створок клапана индуцирует дегенерацию клеток эндотелия, экскрецию в среду воспалительных факторов, запускающих иммунные реакции, что активизирует адаптивные процессы регенерации створок. Особенностью регенерации створок клапанов сердца является включение в этот процесс интерстициальных клеток [9, 10]. Это связано с тем, что в процессе своего функционирования створки испытывают высокую нагрузку, что повышает вероятность их повреждения. Так как регенерация створок происходит во время их функционирования и при постоянных механических деформациях, эволюционно их регенераторный потенциал является достаточно высоким. Кроме того, эндотелиальные клетки регулируют дифференцировку интерстициальных клеток, обеспечивая тем самым поддержание структурной целостности створок [17, 18]. Полученные данные подтверждают миграцию интерстициальных клеток в направлении наружного эндотелиального слоя. Появление в составе слоя нетипичных клеток со светлыми ядрами и цитоплазмой может рассматриваться как встраивание интерстициальных клеток в структуру эндотелия с последующей трансформацией в эндотелий.

Еще одним действующим механизмом, участвующим в процессах регенерации створок при ИЭ, является трансформация микроциркуляторного русла створок [12, 13]. В наших исследованиях также отмечено появление в структуре МК участков с высокой плотностью капилляров. Особенностью этих капилляров является

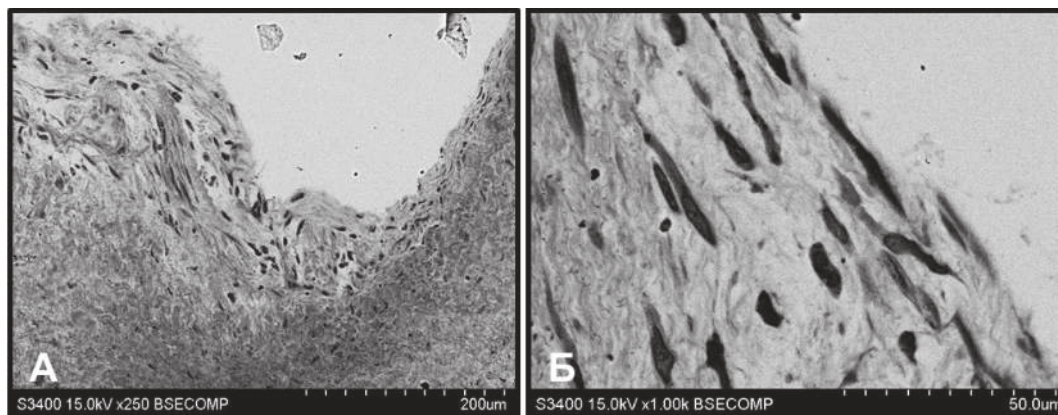


Рис. 4. Структура поверхности митрального клапана при ИЭ без эндотелиального слоя. А – поверхность без сплошного клеточного слоя, Б – поверхность, покрытая несколькими параллельными слоями гладкомышечных клеток.

Fig. 4. The structure of the mitral valve surface in IE without the endothelial layer. A (A): surface without a continuous cell layer; Б (B): surface covered with several parallel layers of smooth muscle cells.

присутствие в субэндотелиальном слое элементов волокнистой соединительной ткани и полиморфизм клеток эндотелия. Такая структура капилляров облегчает транмиграцию лейкоцитов, но не обеспечивает стабильность просвета сосуда при механических деформациях створки при сокращении миокарда.

Заключение

Представленные данные подтверждают важную роль эндотелия в поддержании структурной целостности МК при ИЭ. Повреждение поверхностного эндотелиального слоя индуцирует активацию интерстициальных кле-

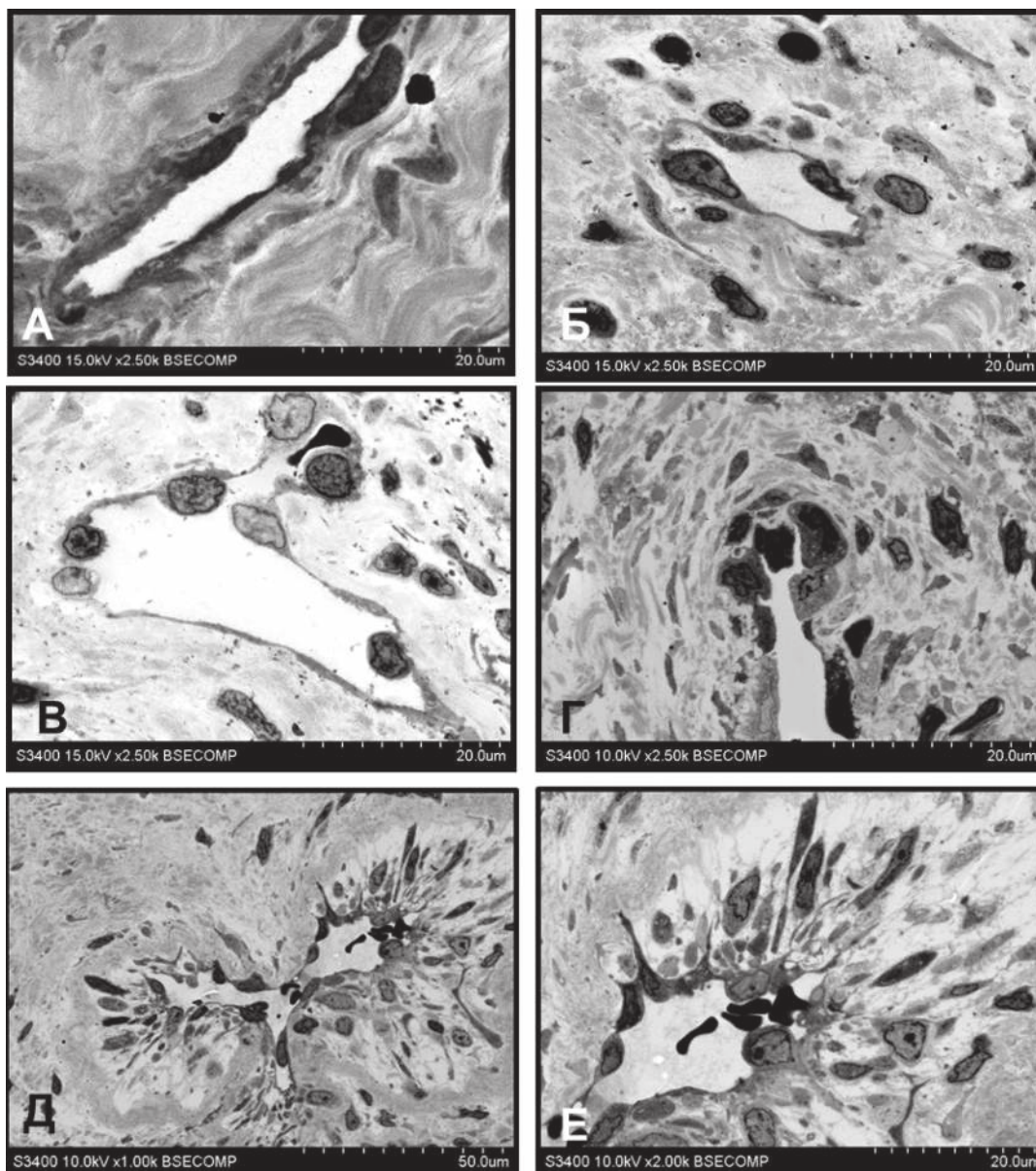


Рис. 5. Эндотелий микроциркуляторного русла клапана. А, Б – обычная форма строения капилляров и эндотелия, В, Г, Д – звездчатая форма эндотелия, полиморфизм эндотелиоцитов и диапедез лейкоцитов через стенки сосудов, Е – адгезия клеток на поверхности эндотелиального слоя капилляра.

Fig. 5. Endothelium of the microvasculature of the valve. А, Б (A, B) – the usual form of the structure of capillaries and endothelium, В, Г, Д (C, D, E) – stellate form of the endothelium, polymorphism of endothelial cells and diapedesis of leukocytes through the walls of blood vessels, Е (F) -- adhesion of cells on the surface of the endothelial layer.

ток и их миграцию в направлении поверхности створки МК. Конечным результатом этой миграции является замещение поврежденных клеток эндотелия интерстициальными клетками и их дифференцировка в клетки эндотелия. Со стороны сосудов микроциркуляторного русла наблюдали активацию ангиогенеза и высокий уровень диапедеза, обеспечивающие улучшение кровообращения в пораженных участках и активную миграцию гранулоцитов в толщу створки. Наблюдавшиеся изменения строения эндотелия могут рассматриваться в качестве маркеров прогрессирующей дегенерации МК.

Литература

(п.п. 1; 2; 4-13; 15-18 см. References)

3. Аль-Ганади А.А., Гриценко В.В., Зуева Е.Е., Кадинская М.И., Галкина О.В., Чефу С.Г. Значение исследования функции эндотелия в диагностике и оценке эффективности лечения инфекционного эндокардита. *Вестник хирургии*. 2008; 167(4): 21-5.
14. Мухамадияров Р.А., Севостьянова В.В., Шишкова Д.К., Насонова М.В., Зинчук С.Ф., Кудрявцева Ю.А. Применение композиционного контраста для исследования биологических объектов методом сканирующей электронной микроскопии. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2017; (3): 93-103. <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2017-6-3-93-103>. <https://www.nii-kpssz.com/jour/article/view/310/274>

References

1. Jung B., Duval X. Infective endocarditis: innovations in the management of an old disease. *Nat Rev Cardiol*. 2019; 16(10): 623-35. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0215-0> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31175343/>
2. Holland T.L., Baddour L.M., Bayer A.S., Hoen B., Miro J.M., Fowler V.G. Infective endocarditis. *Nat Rev Dis Primers*. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.59> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27582414>
3. Al'-Ganadi A.A., Gricenko V.V., Zueva E.E., Kadinskaya M.I., Galikina O.V., Chefu S.G. The value of the study of endothelial function in the diagnosis and assessment of the effectiveness of treatment of infective endocarditis. *Vestnik khirurgii*. 2008; 167(4): 21-5. (In Russian)
4. Guerrero M.L.F., Álvarez B., Manzarbeitia F., Renedo G. Infective endocarditis at autopsy: a review of pathologic manifestations and clinical correlates. *Medicine (Baltimore)*. 2012; 91(3): 152-64. doi: 10.1097/MD.0b013e31825631ea. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22543628/>
5. Liesenborghs L., Meyers S., Vanassche T., Verhamme P. Coagulation: at the heart of infective endocarditis. *J Thromb Haemost*. 2020; 18: 995-1008. <https://doi.org/10.1111/jth.14736>. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jth.14736>
6. Chorianopoulos E., Bea F., Katus H.A., Frey N. The role of endothelial cell biology in endocarditis. *Cell Tissue Res*. 2009; 335(1): 153-

63. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0687-4>. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19015889/>

7. Leask R.L., Jain N., Butany J. Endothelium and valvular diseases of the heart. *Microsc Res Tech*. 2003;60(2):129-37. doi: 10.1002/jemt.10251. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12539167/>
8. Salhiyyah K, Yacoub MH, Chester AH. Cellular mechanisms in mitral valve disease. *J Cardiovasc Transl Res*. 2011; 4(6): 702-9. doi: 10.1007/s12265-011-9318-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21892743/>
9. Li C., Xu S., Gotlieb A.I. The response to valve injury. A paradigm to understand the pathogenesis of heart valve disease. *Cardiovasc Pathol*. 2011; 20(3): 183-90. doi: 10.1016/j.carpath.2010.09.008. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21075649/>
10. Butcher J.T., Nerem R.M. Valvular endothelial cells regulate the phenotype of interstitial cells in co-culture: effects of steady shear stress. *Tissue Eng*. 2006; 12(4): 905-15. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.905>
11. Wang H., Leinwand L.A., Anseth K.S. Cardiac valve cells and their microenvironment--insights from in vitro studies. *Nat Rev Cardiol*. 2014; 11(12): 715-27. doi: 10.1038/nrcardio.2014.162. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4485434>
12. Barcelos A., Tibirica E., Lamas C. Evaluation of microvascular endothelial function and capillary density in patients with infective endocarditis using laser speckle contrast imaging and video-capillaroscopy. *Microvasc Res*. 2018; 118: 61-8. doi: 10.1016/j.mvr.2018.02.007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28754178/>
13. Franssen C., Chen S., Unger A., Korkmaz H.I., De Keulenaer G.W., Tschöpe C., et al. Myocardial microvascular inflammatory endothelial activation in heart failure with preserved ejection fraction. *JACC Heart Fail*. 2016; 4(4): 312-24. doi: 10.1016/j.jchf.2015.10.007. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26682792/>
14. Mukhamadiarov P.A., Sevostianova V.V., Shishkova D.K., Nasonova M.V., Zinchuk S.F., Kudryavceva U.A. Composite contrast using to research biological objects by scanning electron microscopy. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2017; (3): 93-103. doi:10.17802/2306-1278-2017-6-3-93-103 <https://www.nii-kpssz.com/jour/article/view/310/274> (In Russian)
15. Mukhamadiarov R.A., Kutikhin A.G. Backscattered scanning electron microscopy approach for assessment of microvessels under conditions of normal microanatomy and pathological neovascularization. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020; 169(4): 525-30. doi: 10.1007/s10517-020-04927-1. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10517-020-04927-1>
16. Mahler G.J., Farrar E.J., Butcher J.T. Inflammatory cytokines promote mesenchymal transformation in embryonic and adult valve endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013; 33(1): 121-30. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300504. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23104848/>
17. Bischoff J., Aikawa E. Progenitor cells confer plasticity to cardiac valve endothelium. *J Cardiovasc Transl Res*. 2011; 4(6): 710-9. doi: 10.1007/s12265-011-9312-0. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21789724>
18. Gao X., Wu D., Dou L., Zhang H., Huang L., Zeng J., et al. Protective effects of mesenchymal stem cells overexpressing extracellular regulating kinase 1/2 against stroke in rats. *Brain Res Bull*. 2019; 149: 42-52. doi: 10.1016/j.brainresbull.2019.04.006. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31002912>

Сведения об авторах:

Мухамадияров Ринат Авхадиевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины, e-mail: rem57@rambler.ru;

Кутихин Антон Геннадьевич, канд. мед. наук, зав. лаб. фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

© Коллектив авторов, 2022

УДК 612.116.2:612.111.7+578.282

Баринов Э.Ф., Малинин Ю.Ю., Григорян Х.В.

Молекулярные механизмы, контролирующие выраженность геморагии при ингибировании синтеза ТхА2 в тромбоцитах

ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский институт им. М. Горького»,
283064, Донецк

Цель исследования – оценка патогенетических и компенсаторных механизмов, участвующих в поддержании и ограничении гематурии при длительном назначении НПВП пациентам с нефролитиазом.

Методика. В исследование включены пациенты (21 человек) с нефролитиазом, у которых для анальгезии назначались высокие дозы НПВП в течении 9 сут. Тяжесть гематурии и лейкоцитурии оценивали на момент госпитализации, через 24 ч и 48 ч после уретеролитотрипсии (УЛТ) в верхнем отделе мочеточника. Статистический анализ осуществлялся с использованием пакета MedCalc. В исследовании применялись участвующие в модуляции тромбогенеза агонисты рецепторов в частности: АДФ, АТФ, ангиотензин-2, адреналин, коллаген IV-типа, фактор активации тромбоцитов (ФАТ), аденозин, изадрин. Агонисты использовали в концентрациях EC_{50} и EC_{10} . Анализ функциональной активности рецепторов и оценку агрегации АТЦ проводили турбидиметрическим методом на анализаторе ChronoLog (США). Анализ агрегатограмм проводили по следующим параметрам: амплитуда агрегации тромбоцитов; максимальный наклон кривой (Slope); площадь под кривой (AUC).

Результаты. На фоне назначения пациентам НПВП через 48 ч после УЛТ сохранялась частота гематурии; выраженность микрогематурии уменьшилась ($p < 0,001$) по сравнению с уровнем через 24 ч после оперативного вмешательства. Уровень лейкоцитурии снижался ($p < 0,001$) через 24 ч и 48 ч после УЛТ. Гематурия поддерживалась на фоне гиперреактивности α_2 -адренорецептора, нормореактивности ФАТ-рецептора и пуринового $P2X_1$ -рецептора. При сравнении параметров кривых агрегации установлено, что максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии α_2 -адренорецептора и $P2X_1$ -рецептора. Менее значимый эффект синергизма выявлен при одновременной стимуляции α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора, а также $P2X_1$ -рецептора и ФАТ-рецептора.

Заключение. Анализ функциональной активности рецепторов на тромбоцитах после УЛИ при назначении высоких доз НПВП свидетельствует, что активация симпато-адреналовой системы является триггером компенсаторной реакции направленной на ограничение гематурии. Эффективность компенсаторной реакции гемостаза усиливается в результате потенцирования проагрегантных эффектов α_2 -адренорецептора, $P2X_1$ -рецептора и ФАТ-рецептора.

Ключевые слова: нестероидные противовоспалительные препараты; уретеролитотрипсия, гематурия; рецепторы тромбоцитов; гемостаз

Для цитирования: Баринов Э.Ф., Малинин Ю.Ю., Григорян Х.В. Молекулярные механизмы, контролирующие выраженность геморагии при ингибировании синтеза ТхА2 в тромбоцитах. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1): 78–84.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.78-84

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, исследование активности рецепторов тромбоцитов, интегральный анализ полученных данных, редактирование рукописи – Баринов Э.Ф.; набор клинического материала, статистическая обработка данных, анализ полученных результатов, написание текста – Малинин Ю.Ю.; проведение лабораторных исследований, статистическая обработка данных – Григорян Х.В.

Для корреспонденции: Баринов Эдуард Федорович, e-mail: barinov.ef@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 26.11.2021

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Barinov E.F., Malinin Yu.Yu., Grigoryan Kh.V.

Molecular mechanisms controlling the severity of hemorrhage after inhibition of TxA2 synthesis in plateletsM. Gorky Donetsk National Medical University,
Donetsk 283064

The aim of the study was to establish the pathogenetic and compensatory mechanisms involved in maintaining and limiting hematuria when prescribing high-dose NSAIDs in patients with nephrolithiasis.

Methods. The study included 21 patients with nephrolithiasis, in whom high doses of NSAIDs were prescribed for analgesia for 9 days. The severity of hematuria and leukocyturia was assessed at the time of hospitalization, and at 24 hrs, and 48 hrs after ureterolithotripsy (ULT) in the upper ureter. The study used receptor agonists involved in the modulation of thrombogenesis, in particular, ADP, ATP, angiotensin II, adrenaline, type IV collagen, platelet activating factor (PAF), adenosine, and isoprenaline. Agonists were used at a concentration of EC50 and EC10. The analysis of the functional activity of the receptors was performed by the turbidimetric method on a ChronoLog analyzer (USA). The analysis of the aggregates was performed according to the following parameters: the amplitude of platelet aggregation; maximum slope of the curve (Slope); area under the curve (AUC). Statistical analysis was performed using the MedCalc package.

Results. When NSAIDs were prescribed, the incidence of gross hematuria persisted for 48 hrs after URT; the severity of microhematuria decreased ($p < 0.001$) compared to the level 24 hrs after minimally invasive surgery. Leukocyturia decreased ($p < 0.001$) 24 hrs and 48 hrs after ULT. Hematuria persisted in the presence of α_2 -adrenoceptor hyperreactivity and of PAF receptor and purine P2X1 receptor normoreactivity. When comparing the parameters of the aggregation curves, it was found that the maximum effect of platelet aggregation was observed during the interaction of the α_2 -adrenoceptor and the P2X1 receptor. A less significant synergistic effect was evident with simultaneous stimulation of the α_2 -adrenoceptor and PAF receptor, as well as the P2X1 receptor and the PAF receptor.

Conclusion. Analysis of the functional activity of platelet receptors after ULT with high doses of NSAIDs indicates that the activation of the sympathoadrenal system is a trigger of a compensatory response aimed at limiting hematuria. The effectiveness of the compensatory reaction of hemostasis is enhanced as a result of the potentiation of the pro-aggregant effects of the α_2 -adrenoceptor, the P2X1 receptor, and the PAF receptor.

Keywords: non-steroidal anti-inflammatory drugs; ureterolithotripsy; hematuria; platelet receptors; hemostasis

For citation: Barinov E.F., Malinin Yu.Yu., Grigoryan Kh.V. Molecular mechanisms controlling the severity of hemorrhage after inhibition of TxA2 synthesis in platelets. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(1): 78–84. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.78-84

Author's contribution: Barinov E.F. – research concept and design, integrated analysis of the data obtained, editing of the manuscript; Malinin Yu.Yu. – set of clinical material, statistical analysis of the results, text writing; Grigoryan Kh.V. – laboratory research, statistical data processing.

For correspondence. **Edward F Barinov**, Doctor of Med. Sciences, Prof., head of the department the Histology, Cytology and Embryology, «M. Gorky Donetsk National Medical University», 83003 Donetsk, e-mail: barinov.ef@gmail.com

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

Financing. The study had no sponsorship.

Information about the authors:

Barinov E.F., <https://orcid.org/0000-0002-8070-2242>

Received 26.11.2021

Accepted 20.01.2022

Published 15.03.2022

До настоящего времени отсутствует концепция формирования компенсаторных механизмов гемостаза при длительном назначении нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП). Актуальность данной проблемы просматривается в урологии, когда НПВП используются для обезболевания у пациентов с мочекаменной болезнью в процессе литокинетической терапии и/или после малоинвазивного опе-

ративного вмешательства. Однако, как известно, при подобных вмешательствах возможно усиление гематурии [1, 2]. Значимость фундаментальных знаний в области поддержания гемостаза при блокаде циклооксигеназы (ЦОГ) в тромбоцитах (Тц) – очевидна, т.к. арсенал фармакологических препаратов для остановки кровотечений ограничен и, в основном, сориентирован на повышение коагуляции крови. С нашей точки

зрения, к факторам риска выраженности гематурии при нефролитиазе следует отнести и наличие воспаления (пиелонефрит), поскольку активированные лейкоциты: а) вызывают дегградацию коллагена IV типа и гликопротеинов в базальной мембране сосудов микроциркуляторного русла, что способствует диapedезу эритроцитов [3]; б) секретируют в периваскулярное пространство различные биологически активные вещества, влияющие на проницаемость эндотелиального монослоя [4]. Казалось бы, назначение НПВП после литотрипсии закрывает эту проблему, однако ингибирование ЦОГ и снижение синтеза ТхА2 в Тц, как уже отмечалось, вызывает нарушение их адгезии и агрегации, что может провоцировать геморрагию. Спонтанное ограничение гематурии после оперативного лечения свидетельствует о включении компенсаторных механизмов гемостаза, однако, от чего зависит их эффективность остается не ясным.

Гипотеза. При длительном назначении пациентам НПВП возможна гетерогенность активности рецепторов Тц, в силу как резистентности ЦОГ, так и «ускользания» от ингибирующего воздействия лекарственных форм [5]. Нельзя исключить функционирование ЦОГ-независимых внутриклеточных сигнальных путей в Тц, которые определяют спектр и эффективность компенсаторных реакций ограничивающих гематурию. В этой связи моделирование взаимодействия рецепторов Тц *in vitro* позволило бы анализировать проагрегантный потенциал механизмов, способных ограничивать послеоперационную гематурию. В перспективе такой подход открывает возможности прогнозирования риска развития макрогематурии и позволяет уточнить пути разработки эффективных методов фармакологической коррекции геморрагии, возникающей после оперативного вмешательства.

Цель исследования — установить патогенетические и компенсаторные механизмы, участвующие в поддержании и ограничении гематурии при длительном назначении НПВП пациентам с нефролитиазом.

Методика

Исследование носило проспективный характер и включало 61 пациента с визуализационными признаками наличия конкрементов в верхней трети мочеочника. Всем пациентам на этапе госпитализации проведено комплексное клиническое обследование по традиционной схеме, принятой для диагностики нефролитиаза (жалобы, сбор анамнеза, физикальный осмотр, клинико-инструментальные исследования, ультразвуковое обследование и компьютерная томография почек, микробиологический посев мочи, ла-

бораторные исследования крови и мочи). В соответствие с поставленной целью отобраны 21 пациент (10 мужчин и 11 женщин; средний возраст $60,3 \pm 3,5$ года), у которых на фоне стандартной литокинетической терапии (включающей диклофенак натрия, 100-150 мг/сут) в течение 7 сут по данным визуализационного контроля не произошло перемещение конкремента из пиело-уретеральной зоны в среднюю треть мочеочника. Средний размер конкремента составил $14,3 \pm 0,9$ мм (min-max 8,0-30,0 мм). По показаниям проведена антеградная перкутанная уретеролитотрипсия (УЛТ) с использованием электроимпульсного литотриптера «Уролит» (ООО «МедЛайн»), ультразвукового литотриптера Karl Storz CALCUSON, гольмиевого лазерного литотриптера KARL STORZ Calculase II или их комбинации. После операции в течении 2 сут с целью анальгезии сохранялась стандартная противовоспалительная терапия, включающая НПВП и антибиотики.

Контрольными точками исследования у пациентов были момент госпитализации, через 24 ч и 48 ч после УЛТ (последний срок назначения НПВП, общая длительность назначения препарата в дозе 100-150 мг/сут составила 9 сут). Микрогематурию определяли при наличии 3 и более эритроцитов в поле зрения при микроскопии осадка мочи; при этом выделяли легкую степень — 3-10 э/пз, среднюю 11-49 э/пз и тяжелую степень микрогематурии 50-100 э/пз. Макрогематурия диагностировалась, если количество эритроцитов составляло $\frac{1}{2}$ и более поля зрения. Для оценки показателей плазменного гемостаза использовался метод оптической коагулометрии (Коагулометр К-3002 OPTIC, Польша). Анализ функциональной активности Тц проводили *in vitro*, для чего из периферической крови путем центрифугирования выделяли обогащенную тромбоцитами плазму. В пробе содержание тромбоцитов в 1 мкл составляло $200\ 000 \pm 20\ 000$. В исследовании применяли агонисты рецепторов (EC_{50}), участвующие в модуляции тромбогенеза, в частности: АДФ (лиганд пуриновых P2Y-рецепторов), АТФ (лиганд пуриновых P_X-рецепторов), ангиотензин-2 (лиганд АТ₁-рецептора), адреналин (неселективный лиганд α_2 -адренорецептора), коллаген IV-типа (лиганд GPVI-рецептора), фактор активации тромбоцитов (лиганд ФАТ-рецептора), аденозин (лиганд А2А-рецептора), изадрин (лиганд β_2 -адренорецепторов). В работе также были использованы субпороговые концентрации агонистов, которые в контрольной группе (5 здоровых доноров) вызывали АТц на уровне 10% (EC_{10}). Оценку агрегации АТц проводили турбидиметрическим методом на анализаторе ChronoLog (США). Анализ агрегатограмм про-

водили по следующим параметрам: амплитуда агрегации тромбоцитов (%); максимальный наклон кривой (Slope, %/мин); площадь под кривой (AUC, U). У всех обследованных пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании. Статистический анализ осуществлялся с использованием пакета MedCalc 18.10.2. Во всех случаях отличие считалось статистически значимым при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Выраженность гематурии, тяжесть лейкоцитурии и функциональная активность рецепторов тромбоцитов после УЛТ на фоне назначения НПВП. Через 24 ч после УЛТ микрогематурия имела место у 15 (71,4%) и макрогематурия – у 6 (28,6%) пациентов. У 14 (93,3%) пациентов имела место тяжелая степень микрогематурии, в среднем $-75,6 \pm 2,1$ э/пз (95% ДИ 71,1 -80,2 э/пз); и у 1 (6,7%) пациента – средняя степень тяжести. Через 48 ч после оперативного вмешательства микрогематурия выявлена у 12 (80,0%) и макрогематурия – у 9 (20,0%) пациентов. У 5 (41,7%) пациентов микрогематурия соответствовала средней степени тяжести $-45,8 \pm 1,5$ э/пз (95% ДИ 41,5 -50,1 э/пз) и у 7 (58,3%) пациентов тяжелой степени – $63,6 \pm 4,0$ э/пз (95% ДИ 54,5-72,6 э/пз; $p=0,002$). Таким образом, после УЛТ на фоне назначения НПВП сохранялась частота макрогематурии; выраженность микрогематурии

уменьшилась на 25,7% ($p < 0,001$), в среднем до $56,2 \pm 3,4$ э/пз (95% ДИ 48,6-63,7 э/пз) по сравнению с уровнем через 1 сут после оперативного вмешательства. О целесообразности и эффективности назначения НПВП свидетельствует динамика лейкоцитурии. Через 24 ч после УЛТ уровень лейкоцитурии уменьшился на 19,4% ($p < 0,001$) по сравнению с таковой на момент госпитализации, соответственно, $17,5 \pm 0,8$ э/пз (95% ДИ 15,8-19,3 э/пз) и $21,7 \pm 0,8$ (95% ДИ 20,1-23,4%); через 48 ч показатель снизился еще на 22,3% ($p < 0,05$) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения – до $13,6 \pm 0,7$ э/пз (95% ДИ 12,4-14,8 э/пз).

Анализ функциональной активности рецепторов Тц позволяет установить спектр рецепторов принимающих участие в гемостазе после оперативного вмешательства на мочеточнике при назначении пациентам НПВП. Выявленная корреляционная связь между гематурией и тромбиновым временем ($-0,503$; $p < 0,05$) свидетельствует о сохранении конечного этапа коагуляции крови на момент завершения введения НПВП (через 48 ч после УЛТ). Установлена гиперреактивность α_2 -адренорецептора, нормореактивность ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора, а также гипореактивность P2Y-рецепторов, β_2 -адренорецептора, АТ₁-рецептора, GPVI-рецептора и А2А-рецептора (табл. 1).

Таким образом, предполагаемыми триггерами активации Тц, обеспечивающими ограничение гематурии

Таблица 1/ Table 1

Функциональная активность рецепторов тромбоцитов у пациентов через 48 ч после выполнения уретеролитотрипсии (n=21)

Functional activity of platelet receptors in patients 48 hrs after ureterolithotripsy

| Тип рецепторов | Среднее значение $\bar{X} \pm SD$ | Min – Max | Левый (95% ДИ) | Правый (95% ДИ) |
|----------------------------|---|-----------|----------------|-----------------|
| α_2 -адренорецептор | $59,8 \pm 0,9$ | 55,0-66,0 | 58,1 | 61,5 |
| ФАТ-рецептор | $45,6 \pm 1,4$ $p_{\alpha_2\text{-адрен}} < 0,001$ | 38,0-59,0 | 42,7 | 48,4 |
| P2X ₁ -рецептор | $45,6 \pm 1,2$ | 40,0-57,0 | 42,9 | 48,0 |
| P2Y-рецепторы | $41,0 \pm 1,3$ $p_{P2Y} < 0,05$ | 34,0-50,0 | 38,4 | 43,7 |
| β_2 адренорецептор | $41,3 \pm 1,1$ | 34,0-50,0 | 38,9 | 43,7 |
| АТ ₁ -рецептор | $39,7 \pm 1,2$ | 33,0-48,0 | 37,1 | 42,3 |
| GPVI-рецептор | $36,0 \pm 1,2$ $p_{AT_1} < 0,05$ | 30,0-49,0 | 33,4 | 38,6 |
| А2А-рецептор | $32,3 \pm 0,6$ $p_{GPVI} < 0,05$ | 29,0-37,0 | 31,1 | 33,6 |

Примечание. p – вероятность различий активности рецептора относительно таковой предыдущего рецептора.

Note. p – the probability of differences in receptor activity relative to that of the previous receptor.

рии, несмотря на ингибирование синтеза ТхА2 являются агонисты: адреналин, АТФ и ФАТ. Подтверждением данной концепции может быть наличие отрицательной корреляционной связи между выраженностью гематурии и активностью α_2 -адренорецептора, P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора (соответственно, $r_{ГТ-\alpha_2AP} = -0,775$; $r_{ГТ-АТФ} = -0,589$; $r_{ГТ-ФАТ} = -0,500$; $p < 0,05$), что отражает участие рецепторов Тц в поддержании гемостаза при ингибировании оси ЦОГ-ТхА2. Судя по силе корреляционной связи, вероятно, ведущую роль в адгезии и АТц после УЛТ играют адреналин и АТФ, тогда как паракринная стимуляция Тц посредством ФАТ выполняет аддитивную роль. Роль адреналина в гемостазе объясняется усилением активации Тц, образованием тромбоцито-фибриновых конгломератов и снижением скорости фибринолиза [6]. Катионные P2X₁-рецепторы увеличивают агрегацию, вызванную рецептором Fc γ RIIa тромбоцитов, за счет увеличения концентрации внутриклеточного Ca²⁺, начального фосфорилирования тирозина и раннего высвобождения плотных гранул [7]. ФАТ является одним из ключевых агонистов стимуляции Тц, который модулирует провоспалительные и коагуляционные процессы [8]. Возника-

ет вопрос — почему в течение 2 сут после малоинвазивного оперативного вмешательства не снижается частота макрогематурии, а выраженность микрогематурии уменьшается, но не прекращается? Наиболее вероятной причиной может быть недостаточная активация Тц. Для проверки этой гипотезы использовали метод стимуляции α_2 -адренорецептора, P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора субпороговыми дозами агонистов.

Исследовательский вопрос — *отличается ли функциональная активность Тц при стимуляции разных рецепторов у пациентов через 48ч после УЛТ на фоне назначения НПВП?*

При сравнении параметров кривых агрегации установлено, что адреналин воспроизводил максимальные значения амплитуды АТц, наклона (*Slope*) и площади под кривой (AUC) (табл. 2).

Так, значения амплитуды АТц при стимуляции α_2 -адренорецептора, превышали таковые при стимуляции P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора, соответственно, на 43,2% ($p < 0,001$, 0,001) и 74,7% ($p < 0,001$). При сравнении значений амплитуды АТц, индуцированной субпороговыми дозами агонистов у пациентов и здоровых лиц (10,7±0,6%; 95% 9,3-12,0%; $p < 0,001$),

Таблица 2/ Table 2

Характеристика показателей функциональной активности тромбоцитов через 48 ч после выполнения уретеролитотрипсии
Characteristics of functional activity of platelets 48 hours after ureterolithotripsy

| Агонисты | Показатели агрегатограммы | | |
|---|---|---|---|
| | Амплитуда агрегации (%) | Slope (% мин) | AUC (U) |
| Адреналин EC ₁₀ | 15,9±0,8 (95% ДИ 14,2-17,6) | 19,7±1,0 (95% ДИ 17,5-21,9) | 23,1±0,8 (95% ДИ 21,3-24,8) |
| АТФ EC ₁₀ | 11,1±0,5 ^{##} (95% ДИ 9,8-13,3) | 13,3±0,5 ^{##} (95% ДИ 12,1-14,5) | 16,9±0,8 ^{##} (95% ДИ 15,2-18,3) |
| ФАТ EC ₁₀ | 9,1±0,5 [#] (95% ДИ 14,0-17,4) | 10,0±1,0 [#] (95% ДИ 17,7-22,3) | 14,6±0,4 [#] (95% ДИ 21,6-25,2) |
| Адреналин EC ₁₀ + АТФ EC ₁₀ | 16,5±0,5 (95% ДИ 15,5-17,5) | 21,1±0,7 (95% ДИ 19,7-22,6) | 31,60±0,9 (95% ДИ 29,6-33,5) |
| АТФ EC ₁₀ + ФАТ EC ₁₀ | 12,1±0,6 ^{***} (95% ДИ 10,8-13,3) | 15,3±1,0 ^{***} (95% ДИ 13,0-17,6) | 21,0±1,3 ^{***} (95% ДИ 18,2-23,7) |
| Адреналин EC ₁₀ + ФАТ EC ₁₀ | 14,1±0,6 [*] (95% ДИ 12,8-15,4) | 17,3±0,8 (95% ДИ 15,7-19,0) | 24,7±1,3 [*] (95% ДИ 22,0-27,4) |

Примечание. [#] – статистически значимое различие значений показателя агрегатограммы при изолированном воздействии агониста на уровне $p < 0,05$ по сравнению со значениями предыдущего агониста; ^{##} – на уровне $p < 0,001$. ^{*} – различие значений показателя агрегатограммы при комбинации воздействия агонистов на уровне $p < 0,05$ по сравнению со значениями предыдущей комбинации агонистов; ^{***} – на уровне $p < 0,001$.

Note. [#], $p < 0,05$, ^{##}, $p < 0,001$, significant difference in the aggregogram index during the isolated effect of the agonist compared with the previous agonist; ^{*}, $p < 0,05$, ^{***}, $p < 0,001$, the difference in the aggregogram index during a combination of agonist exposure compared with the previous combination of agonists.

можно прийти к заключению, что только адреналин воспроизводил значимое повышение амплитуды АТц (на 48,6%; $p < 0,001$), тогда как различия воздействия АТФ и ФАТ на соответствующие рецепторы не отличались от таковых у здоровых лиц. При наличии гиперреактивности α_2 -адренорецептора повышение скорости агрегации (*Slope*) и AUC (отражающее увеличение количества Тц, вовлеченных в процесс агрегации), лежат в основе включения компенсаторного механизма гемостаза воспроизводимого адреналином. Для сравнения, при стимуляции α_2 -адренорецептора Тц, значения AUC превышали таковые при стимуляции P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора, соответственно на 35,7% ($p < 0,001$) и 58,2% ($p < 0,001$); тогда как, значения AUC агрегатограмм воспроизводимых АТФ и ФАТ – не отличались. Таким образом, при длительном назначении НПВП реактивность рецепторов экспрессированных на Тц может различаться. Наличие гипер- и нормореактивных рецепторов может быть основой для становления компенсаторных механизмов гемостаза.

Гипотеза – при наличии на Тц рецепторов с различной реактивностью существует вероятность их взаимодействия, позволяющего потенцировать стимулирующий эффект агонистов. Исследовательские вопросы – возможно ли достигнуть потенцирования эффекта агрегации Тц при синергизме агонистов после оперативного вмешательства (стресс-реакция), если пациентам в качестве анальгетиков назначаются НПВП? Какие процессы в этом случае определяют усиление функциональной активности Тц при взаимодействии нескольких рецепторов?

Установлено, что максимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора, связывающих субпороговую дозу агонистов (табл. 2). В основе данного эффекта может лежать ко-активация внутриклеточных сигнальных систем и главным образом между G_i и G_q сигнальными путями [9]. Считается, что α_2 A-адренергические рецепторы имеют общие перекрестные механизмы с G_q-сигнальным путем, опосредованные фосфоинозитол3-киназой/Akt. При реализации эффекта синергизма адреналин дополнительно вызывает секрецию плотных гранул, фосфорилирование белка плекстрина протеинкиназы С и усиливает сигнализацию от рецептора P2X₁. Добавление адреналина к Тц также может стимулировать активацию Rap-1b [10]. Обращает на себя внимание, что амплитуда и скорость агрегации (*Slope*) при одновременной стимуляции двух рецепторов не отличались ($p > 0,05$) от таковых при изолированной стимуляции α_2 -адренорецептора, тогда как значения AUC превышали таковую на 66,7% ($p < 0,001$).

Амплитуда, скорость агрегации (*Slope*) и AUC при одновременной стимуляции α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора были ниже, соответственно, на 26,7%, 27,5% и 33,5% ($p < 0,001$), по сравнению с таковыми при взаимодействии α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора. Основные параметры агрегатограмм не отличались при одновременной стимуляции α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора ($p > 0,05$) от таковых при изолированной стимуляции α_2 -адренорецептора, но превышали таковые при изолированной стимуляции ФАТ-рецептора; в частности значения AUC превышали таковую на 69,2% ($p < 0,001$). Таким образом, взаимодействие α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора оказывает более выраженный потенцирующий эффект, чем одновременная стимуляция α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора. Минимальный эффект агрегации Тц воспроизводился при взаимодействии P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора. Амплитуда, скорость агрегации (*Slope*) и AUC при одновременной стимуляции данных рецепторов были ниже, соответственно, на 14,5% ($p < 0,05$), 11,6% и 15,0% ($p < 0,05$), чем при взаимодействии α_2 -адренорецептора и ФАТ-рецептора, а также на 26,7%, 27,5% и 33,5% ($p < 0,001$) меньше, по сравнению с комбинацией α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора. Необходимо подчеркнуть, что амплитуда, скорость агрегации (*Slope*) и AUC при одновременной стимуляции P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора были сопоставимы с эффектом изолированной стимуляции α_2 -адренорецептора ($p > 0,05$), но превышали эффект изолированной стимуляции ФАТ-рецептора; в частности значения AUC превышали таковую на 43,8% ($p < 0,001$). Моделирование взаимодействия других рецепторов не сопровождалось значимой стимуляцией клеток крови, позволяющей запускать компенсаторные механизмы гемостаза, по сравнению с изолированным эффектом агонистов. Таким образом, повышение уровня внеклеточного АТФ и секреция ФАТ активированными лейкоцитами воспроизводят слабый потенцирующий эффект на Тц. Вероятно, эффективность компенсаторной реакции гемостаза, формирующейся при взаимодействии P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора в Тц, ограничивается назначением НПВП, ингибирующих лейкоциты, вследствие чего снижается синтез и продукция ФАТ [11]. В контексте анализа причин различной эффективности синергизма α_2 -адренорецептора, P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора представляет интерес исследование авторов [12], которые доказали: а) возможность синергизма в агрегации Тц при одновременном введении адреналина и ФАТ; б) нивелирование эффекта при использовании не только ингибиторов ЦОГ-1,2 и блокаторов Ca²⁺-каналов,

но также антагонистов адренорецептора и ФАТ-рецептора; ингибиторов фосфолипазы С и MAP-киназы. В этой связи можно предположить, что эффективность компенсаторной реакции гемостаза при ингибировании синтеза ТхА2 в Тц зависит от сопряженности внутриклеточных сигнальных систем, которые являются ЦОГ-независимыми. В перспективе, исследование *in vitro* молекулярных механизмов поддерживающих агрегацию Тц при назначении пациентам различных групп фармакологических препаратов, позволит определять таргетные внутриклеточные мишени, позволяющие управлять гемостазом.

Выводы:

1. Длительное введение НПВП пациентам при консервативном и хирургическом лечении нефролитиаза сопровождается макро- и микрогематурией, выраженность которой зависит от эффективности компенсаторных механизмов гемостаза. После УЛТ триггером компенсаторной реакции, направленной на ограничение гематурии, является активация симпато-адреналовой системы. При этом выявляется гиперреактивность α_2 -адренорецептора, нормореактивность ФАТ-рецептора и P2X₁-рецептора, а также гипореактивность P2Y-рецепторов, β_2 -адренорецептора, АТ₁-рецептора, GRV1-рецептора и А2А-рецептора. Наличие гипер- и нормореактивных рецепторов на тромбоцитах является основой для становления компенсаторных механизмов гемостаза у пациентов с нефролитиазом при назначении НПВП.

2. При ингибировании в тромбоцитах синтеза ТхА2, связанного с необходимостью введения высоких доз НПВП для анальгезии после малоинвазивного оперативного вмешательства на мочеточнике, эффективность компенсаторных реакций гемостаза усиливается в результате потенцирования проагрегантных эффектов α_2 -адренорецептора, P2X₁-рецептора и ФАТ-рецептора. Максимальный эффект агрегации воспроизводится *in vitro* при взаимодействии α_2 -адренорецептора и P2X₁-рецептора, что связано с повышением скорости и количества взаимодействующих тромбоцитов, вероятно, вследствие сопряженности внутриклеточных сигнальных систем.

Сведения об авторах:

Баринов Эдуард Федорович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, e-mail: bari-nov.ef@gmail.com;

Малинин Юрий Юрьевич, канд. мед. наук, зав. каф. урологии, e-mail: jora2@list.ru;

Григорян Хачен Владимирович, канд. мед. наук, асс. каф. урологии, e-mail: khachengrigoryan@gmail.com

Литература/References

1. Minhaj F.S., Hoang-Nguyen M., Tenney A., et al. Evaluation of opioid requirements in the management of renal colic after guideline implementation in the emergency department. *Am J Emerg Med.* 2020; 38(12): 2564-9. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2019.12.042>
2. Semen K.O., van der Doelen R.H.A., van der Lugt M., et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs increase urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in recreational runners. *Scand J Med Sci Sports.* 2020; 30(10): 1888-95. <https://doi.org/10.1111/sms.13755>
3. Lahti M., Heino J., Käpylä J. Leukocyte integrins α L β 2, α M β 2 and α X β 2 as collagen receptors--receptor activation and recognition of FFOGER motif. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013; 45(7): 1204-11. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.03.016>
4. Bodiga V.L., Bathula J., Kudle M.R., Vemuri P.K., Bodiga S. Andrographolide suppresses cisplatin-induced endothelial hyperpermeability through activation of PI3K/Akt and eNOS-derived nitric oxide. *Bioorg Med Chem.* 2020; 28(23): 115809. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115809>
5. Wang H., Sun X., Dong W., et al. Association of GPIa and COX-2 gene polymorphism with aspirin resistance. *Clin Lab Anal.* 2018; 32(4): e22331. <https://doi.org/10.1002/jcla.22331>
6. Golaszewska A., Misztal T., Marcinczyk N., Chabińska E., Rusak T. Adrenaline May Contribute to Prothrombotic Condition via Augmentation of Platelet Procoagulant Response, Enhancement of Fibrin Formation, and Attenuation of Fibrinolysis. *Front Physiol.* 2021; 12: 657881. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.657881>
7. Ilkan Z., Watson S., Watson S.P., Mahaut-Smith M.P. P2X1 Receptors Amplify Fc γ RIIa-Induced Ca²⁺ Increases and Functional Responses in Human Platelets. *Thromb Haemost.* 2018; 118(2): 369-80. <https://doi.org/10.1160/TH17-07-0530>
8. Lordan R., Tsoupras A., Zabetakis I. Platelet activation and prothrombotic mediators at the nexus of inflammation and atherosclerosis: Potential role of antiplatelet agents. *Blood Rev.* 2021; 45:100694. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100694>
9. Haaland H.D., Holmsen H., Dorsam R.T. Potentiation by adrenaline of agonist-induced responses in normal human platelets *in vitro*. *Platelets.* 2011; 22(5): 328-37. <https://doi.org/10.3109/09537104.2011.551949>
10. Lova P., Guidetti G.F., Canobbio I., et al. Epinephrine-mediated protein kinase C and Rap1b activation requires the co-stimulation of G_z-, G_q-, and G_i-coupled receptors. *Thromb Haemost.* 2011; 105(3): 479-86.
11. Hellman K.M., Yu P.Y., Oladosu F.A., et al. The effects of platelet-activating factor on uterine contractility, perfusion, hypoxia, and pain in mice. *Reprod Sci.* 2018; 25(3): 384-94. <https://doi.org/10.1177/1933719117715122>
12. Saeed S.A., Rasheed H. Calcium-dependent synergistic interaction of platelet activating factor and epinephrine in human platelet aggregation. *Acta Pharmacol Sin.* 2003; 24(1): 31-6.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 57.014

Гильяно Н.Я.¹, Дуботолова М.М.¹, Носкин Л.А.¹, Степанов С.И.¹, Арутюнян А.В.¹, Алчинова И.Б.², Ибатуллин Ф.М.¹

D-глюкозамин индуцирует различные формы гибели опухолевых клеток

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, Россия, ул. Орлова Роцца, д. 1;²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Введение. D-глюкозамин – природный аминсахар, который используются в медицинской практике поскольку проявляет противовоспалительное, антиоксидантное, антивозрастное, противодифиброзное, нейропротекторное и кардиопротекторное действие. **Цель работы** – оценка влияния D-глюкозамина на пролиферацию, апоптоз и аутофагию в нейронах крысы линии PC12 в норме и в условиях аминокислотного и углеводного голодания.

Методика. Работа выполнена на клеточной линии PC 12, которая представляет собой феохромоцитому крысы. Клетки имеют физиологические и биохимические характеристики нейронов, способны продуцировать катехоламины и широко используются в исследованиях болезни Альцгеймера и Паркинсона. Клетки выращивали в условиях аминокислотного голодания и/или при низком уровне глюкозы (углеводное голодание). Для оценки активности деления клеток и клеточной гибели использовали проточную цитометрию, морфологический анализ состава и размера клеточных популяций с использованием специфических красителей. Оценку размера везикул, образующихся в результате аутофагии, проводили методом лазерной корреляционной спектроскопии.

Результаты. Культивирование клеток линии PC12 в среде с низким содержанием глюкозы и аминокислот запускает механизм апоптотической гибели, но добавление D-глюкозамина в концентрации 1 ммоль/л оказывает протекторное воздействие и снижает уровень популяции <2с. *Добавление D-глюкозамина* в концентрациях 5 ммоль/л и 10 ммоль/л снижало выживаемость клеток и уменьшало количество колоний. Прижизненная окраска клеток акридиновым оранжевым не выявила фрагментации ядерного материала, окраска клеток монодансилкадаверином позволила наблюдать множество аутофагальных вакуолей. Наличие свободной аминогруппы у молекулы D-глюкозамина является фактором, вызывающим аутофагию большей интенсивности. Микровезикулы, формирующиеся в результате отпочковывания плазматической мембраны, образуют две фракции частиц: одна в пределах 200, другая – 1000 нм.

Заключение. Цитотоксический эффект D-глюкозамина на клетках PC12 реализуется через индукцию аутофагии, вероятно, через ингибирование фосфорилирования m-TOR, что делает этот природный представитель аминсахаров возможным конкурентом рапамицина. D-глюкозамин безопасен даже при длительном применении у людей, включая пациентов с нарушенной толерантностью к глюкозе или диабетом.

Ключевые слова: апоптоз, аутофагия, D-глюкозамин, ингибиторы гликолиза, клеточный цикл, нейроны.

Для цитирования: Гильяно Н.Я., Дуботолова М.М., Носкин Л.А., Степанов С.И., Арутюнян А.В., Алчинова И.Б., Ибатуллин Ф.М. D-глюкозамин индуцирует различные формы гибели опухолевых клеток. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1): 85–95.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.85-95

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Гильяно Н.Я., Ибатуллин Ф.М.; сбор и обработка материала – Дуботолова М.М., Степанов С.И., Арутюнян А.В., Гильяно Н.Я.; подготовка иллюстративного материала – Дуботолова М.М., Степанов С.И., Арутюнян А.В., Гильяно Н.Я., Алчинова И.Б.; статистическая обработка – Дуботолова М.М.; написание текста – Гильяно Н.Я., Носкин Л.А., Алчинова И.Б.; редактирование – Алчинова И.Б., Ибатуллин Ф.М.

Для корреспонденции: Гильяно Надежда Яковлевна, e-mail: gilyano_nj@npni.nrcki.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме: «Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально-значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения» (регистрационный номер №121060200125-2) и частично «Оценка адаптивных реакций организма на действие физико-химических и экологических факторов среды» (№FGFU-2022-0010).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Материалы статьи нигде ранее не публиковались.

Поступила 16.11.2021

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Giliano N.Ya.¹, Dubotolova M.M.¹, **Noskin L.A.**¹, Stepanov S.I.¹, Arutyunyan A.B.¹, Alchinova I.B.², Ibatullin F.M.¹**D-Glucosamine induces various forms of cancer cell death**¹B.P. Konstantinov Petersburg Institute of Nuclear Physics of the Kurchatov Institute National Research Center, Orlova Roshcha St. 1, Leningradskaya Region, Gatchina 188300, Russian Federation;²Institute of General Pathology and Pathophysiology», Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation

D-glucosamine is a natural amino sugar that is used in medical practice due to its anti-inflammatory, antioxidant, anti-aging, anti-fibrotic, neuroprotective and cardioprotective properties. The aim of this work was to evaluate the effects of D-glucosamine on proliferation, apoptosis, and autophagy in PC12 rat neurocytes during starvation and under normal conditions. Methods. The study was performed on PC 12 cells, which represent rat pheochromocytoma. These PC12 cells have the physiological and biochemical characteristics of neurons. They are able to produce catecholamines, and they are widely used in Alzheimer's and Parkinson's disease research. Starvation conditions were achieved by reducing the concentration of glucose (carbohydrate starvation) and/or serum (amino acid starvation). Cell division activity and cell death were assessed by flow cytometry and by morphological analysis of the composition and size of cell populations using acridine orange and monodansylcadaverine staining. The size of vesicles formed due to autophagy was assessed using laser correlation spectroscopy.

Results. Cultivation of PC12 cells under the starvation conditions triggered the mechanism of apoptotic death, whereas D-glucosamine at 1 mM had a protective effect and reduced the cell population to <2c. The addition of glucosamine at 5 and 10 mM reduced both cell survival and the number of colonies. Intravital staining of cells with acridine orange did not detect fragmentation of nuclear material, whereas staining of cells with monodansylcadaverine detected autophagic vacuoles. Microvesicles resulting from budding of the plasma membrane formed two fractions of particles with average sizes of 200 and 1000 nm.

Conclusion. The cytotoxic effect of D-glucosamine on PC12 cells is caused by the induction of autophagy, probably through the inhibition of m-TOR phosphorylation, which allows us to consider D-glucosamine as a possible competitor of rapamycin. D-glucosamine is safe even for long-term use in humans, including patients with impaired glucose tolerance or diabetes.

Keywords: apoptosis, autophagy, D-glucosamine, glycolysis inhibitors, cell cycle, neurocytes.

For citation: Giliano N.Ya., Dubotolova M.M., **Noskin L.A.**, Stepanov S.I., Arutyunyan A.B., Alchinova I.B., Ibatullin F.M. D-Glucosamine induces various forms of cancer cells death. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(1): 85–95. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.85-95

Autor's contribution: study concept and design – Giliano N.Ya, Ibatullin F.M.; collection and processing of material – Dubotolova M.M., Stepanov S.I., Arutyunyan A.B., Giliano N.Ya.; preparation of illustrative material – Dubotolova M.M., Stepanov S.I., Arutyunyan A.B., Alchinova I.B., Giliano N.Ya.; statistical processing – Dubotolova M.M.; writing text – Giliano N.Ya., **Noskin L.A.**, Alchinova I.B.; editing – Alchinova I.B., Ibatullin F.M.

For correspondence: *Nadezhda Ya. Gilyano*, Doctor of Biological Sciences, Principal Researcher, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», e-mail: gilyano_nj@pnpi.nrcki.ru

Financing. The work was carried out within the framework of the state task on the topic: «The study of molecular and cellular components of the pathogenesis of socially significant diseases for the development of methods of early diagnosis and treatment» (registration number No. 121060200125-2) and partially «Assessment of adaptive responses of the organism to the action of physicochemical and environmental factors» (No. FGFU-2022-0010).

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

Information about the authors:Dubotolova M.M. <https://orcid.org/0000-0001-6950-1135>**Noskin L.A.**, <https://orcid.org/0000-0001-6162-8246>Alchinova I.B., <https://orcid.org/0000-0001-5294-7317>Ibatullin F.M., <https://orcid.org/0000-0002-7660-4172>

Received 16.11.2021

Accepted 20.01.2022

Published 15.03.2022

Giliano N.Ya., <https://orcid.org/0000-0002-1910-2598>Stepanov S.I., <https://orcid.org/0000-0001-8850-6265>

D-глюкозамин (GlcN) — представитель природных аминокислот, который давно используются в медицинской практике, поскольку обладает целым рядом защитных свойств. Он оказывает противовоспалительное, антиоксидантное, антивозрастное, противомитохондриальное, нейропротекторное и кардиопротекторное действие. Показано, что GlcN обладает также противо-

опухолевой активностью, влияя на ферментативные каскады, участвующие в гибели клеток, их пролиферации и ангиогенезе [1]. Ранее нами была показана селективная цитотоксичность GlcN в отношении опухолевых клеток человека в культуре в концентрациях, нетоксичных для нормальных клеток. При сочетанном воздействии GlcN и 2-дезоксид-Д-глюкозы (2DG) реги-

стрировали синергизм в индукции апоптоза, который усиливался при культивировании клеток в питательной среде с низким содержанием глюкозы [5]. Известно, что GlcN может как индуцировать, так и ингибировать апоптоз в зависимости от типа клеток и активности специфического биохимического пути. Кроме того, показано, что GlcN может активировать аутофагию как *in vitro*, так и *in vivo* [6]. Аутофагия и апоптоз часто запускаются одними и теми же стимулами, у них общие эффекторы и регуляторы, и, очевидно, что между этими двумя процессами существует сложная перекрестная связь.

Известно, что GlcN ингибирует N-гликозилирование, которое коррелирует с глюкозамин-индуцированной цитотоксичностью. Гликозилирование является одной из форм посттрансляционной модификации белков, определяющей их структуру и функции. Для включения аутофагии и образования вакуолей необходим белок Arg2, который является белком периферической мембраны. Функция белков ATG, в частности, их способность взаимодействовать с рядом макроаутофагических регуляторов, модулируется посттрансляционными модификациями. Например, модификация аутофагии TOR (мишень рапамицина) происходит частично за счет фосфорилирования киназы – инициатора аутофагии Atg1 (ULK1 у млекопитающих) и ее регулятора Atg13 [7]. Предполагается, что в основе механизма действия GlcN лежит ингибирование фосфорилирования m-TOR [7, 8]. При этом регистрируется и mTOR-независимый путь глюкозамин-индуцированной аутофагии [9].

Цель – оценка влияния GlcN на пролиферацию, апоптоз и аутофагию в норме и в условиях аминокислотного и глюкозного голодания в нейронах крысы линии PC12.

Методика

Работа выполнена на клеточной линии PC 12, которая представляет собой феохромоцитому крыс. Клетки имеют физиологические и биохимические характеристики нейронов, способны продуцировать катехоламины и широко используются в исследованиях болезни Альцгеймера и Паркинсона.

Для культивирования клеток использовали среды и добавки фирмы «Биолот», Россия. Клетки культивировали в среде Игла с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки и гентамицина (50 мкг/мл). В работе использованы гидрохлорид D-глюкозамина (GlcN), 2-дезоксид-глюкозы (2DG) и рапамицин («Sigma», США).

Для окрашивания клеток использовали бромистый этидий, акридиновый оранжевый (АО), флуоресцеин

диацетат (ФДА), метилвиолет и монодансилкадаверина (MDC). Все красители производства «Sigma», США.

Цитометрический анализ распределения клеток по содержанию ДНК. Проточно-цитометрический анализ проводили на цитометре (FACS, США). Клетки, выросшие на поверхности флаконов, снимали раствором Версена («Биолот», Россия). Клеточную суспензию центрифугировали, осадок суспендировали в растворе бромистого этидия [10]. Затем оценивали распределение клеток по содержанию ДНК, которое позволяет проследить как за прогрессией клеток по циклу: 2с- G_1 -фаза; 3с- S – фаза; 4с- G_2/M -фазы, так и оценить цитотоксичность препаратов, анализируя долю клеток с содержанием ДНК меньше диплоидного (<2с или sub- G_1 -популяцию), возникающую в результате фрагментации ядра в процессе апоптотической гибели клеток [11].

Морфологический анализ состава клеточной популяции. Аутофагию оценивали по вакуолизации цитоплазмы и образованию везикул при морфометрическом анализе и по окрашиванию клеток акридиновым оранжевым (АО), а также по накоплению селективного флуоресцентного маркера аутофагических вакуолей монодансилкадаверина (MDC), который взаимодействуя с мембранными липидами, концентрируется в аутофагических компартментах. АО интеркалирует в ДНК, имеет максимальное возбуждение при длине волны 502 нм и 525 нм (зеленый цвет). Способность противостоять низкому pH позволяет АО проникать в «кислые» органеллы, такие как лизосомы и фаголизосомы.

Клетки культивировали в течение 24 ч в нормальной питательной среде с 10% сыворотки и 4 г/л глюкозы, затем для индукции аутофагии часть клеток культивировали в течение 3 ч в питательной среде без сыворотки или с низким содержанием глюкозы (1 г/л). Для индукции аутофагии также использовали ингибитор mTOR рапамицин (50 мкмоль/л). После 3-часовой инкубации среду аккуратно удаляли, флаконы промывали раствором фосфатного буфера. Для выявления аутофагосом добавляли MDC (50 мкмоль/л) и инкубировали при 37 °C в течение 10 мин. Изображения получали под флуоресцентным микроскопом «EVOS» (возбуждение: 390 нм, испускание: 460 нм). В каждой группе было проанализировано не менее 100 клеток.

Оценка аутофагии методом лазерной корреляционной спектроскопии. Клетки, подвергшиеся аутофагии, очень легко отсоединяются от подложки и всплывают. Анализ проводили как на нативных, так и на фиксированных этанолом образцах. При увеличении продолжительности инкубации клеток в голодной среде или

с ингибитором аутофагии значительная часть аутофагических клеток, распавшись на везикулы, переходит в питательную среду.

Для приготовления образцов культуральную жидкость сливали, во флаконы вносили буфер без KCl, после аккуратного встряхивания образцы переносили в пробирки типа «эппендорф» и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 20 мин. Супернатант проанализировали на установке многоуглового динамического светорассеяния (Dynamic Light Scattering — DLS) [12]. Источник линейно поляризованного излучения — одномодовый He-Ne лазер ЛГН-215 со световой мощностью 15 мВт. Фотоприемником служит фотосенсорный модуль (ФЭУ) серии H10721 (Hamamatsu). Спектр рассеянного света определяли посредством быстрого Фурье-анализа фототока с помощью IBM-совместимого многофункционального измерительного устройства E14-440, разработанного ЗАО «L-CARD» [13].

Оценка репродуктивной выживаемости клеток. Влияние GlcH на жизнеспособность клеток PC12 оценивали также и по репродуктивной выживаемости. Для этого в планшеты высевали по 500 клеток на лунку и через 24 ч после инкубации в части лунок меняли питательную среду на среду с 5 и 10 ммоль/л GlcH. После 24-часового воздействия глюкозамина клетки культивировали 7 сут и фиксировали колонии спиртовым раствором метилвиолет. Подсчет количества и клеточности колоний проводили с использованием микроскопа «EVOS».

Статистическая обработка результатов проводилась в программе Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, США) с использованием *t*-теста Стьюдента (уровень значимости $p < 0.05$). Эксперимент повторяли не менее 3 раз. В каждом образце анализировали не менее 20 тыс. клеток. Каждая точка представляет среднее арифметическое значение 3-5 повторов (%) \pm стандартное отклонение ($M \pm \sigma$).

Результаты и обсуждение

Ранее нами была исследована роль супероксида, оксида азота и металлов переменной валентности в цитотоксическом эффекте перекиси водорода и бета-амилоида на клетки линии PC 12. Оба агента индуцировали окислительный стресс, который приводил к индукции апоптотической гибели клеток. Обработка клеток донором NO или хелатором ионов железа снижала внутриклеточный уровень супероксида и долю апоптотически гибнущих клеток [14]. Позднее причинно-следственная связь окислительного стресса и апоптотической гибели клеток PC 12 была показана в работе

других авторов, которые показали индукцию апоптоза культивированием клеток в голодной среде (без глюкозы) [15]. Однако, известно, что в условиях голодания в первую очередь включается аутофагия, которую и характеризовали как клеточный ответ на нехватку аминокислот.

В представленной работе клетки культивировали в питательной среде с разным уровнем глюкозы (4 г/л или 1 г/л), с 10% эмбриональной сывороткой или без сыворотки. Для оценки влияния глюкозамина на клетки его добавляли в концентрациях 1 ммоль/л, 5 и 10 ммоль/л и через 24 ч после этого проводили цитометрический анализ состава популяции (**рис. 1**).

Такая многокомпонентная схема проведения эксперимента позволила оценить протекторный эффект глюкозамина при ограниченном доступе клеток к глюкозе и аминокислотам.

При оценке цитотоксичности по доле клеток с содержанием ДНК меньше диплоидного (<2с или sub-G₁-популяцию), возникающей в результате апоптотической фрагментации ядра показано, что клетки линии PC12 были более чувствительны к отсутствию сыворотки в питательной среде, чем к снижению уровня глюкозы. Так, отсутствие сыворотки более чем вдвое увеличивало долю с содержанием ДНК <2с при нормальном уровне глюкозы, а снижение уровня глюкозы с 4 г/л до 1 г/л существенно увеличивало долю таких клеток до 19.4 \pm 2.0 (таблица).

Обработка клеток GlcH при культивировании клеток в нормальной среде и среде с низким содержанием глюкозы существенно не меняла долю апоптотических клеток. При отсутствии в среде сыворотки добавление GlcH в концентрации 1 ммоль/л к клеточной культуре снижало уровень клеток в суб-G₁ фракции как при нормальном уровне глюкозы, так и при низком. При высоких концентрациях 5 ммоль/л и 10 ммоль/л GlcH не оказывал протекторного действия.

Таким образом, культивирование клеток в среде с низким содержанием глюкозы и аминокислот запускает механизм апоптотической гибели, но добавление глюкозамина в концентрации 1 ммоль/л оказывает протекторное воздействие и снижает уровень популяции <2с.

Добавление GlcH к суточной культуре клеток PC 12 и экспонирование с ним в течение 24 ч в концентрациях 5 ммоль/л и 10 ммоль/л снижало выживаемость клеток и колониестимулирующую способность. Оценку этих параметров проводили через 7 сут после добавления GlcH. Обработанные клетки образовали меньше колоний, и количество клеток в колониях сильно различалось (**рис. 2**).

В контрольной группе каждая колония содержала в себе более 100 клеток, после обработки 5 ммоль/л GlcH около 50, а после 10 ммоль/л GlcH <50 клеток. Под влиянием D-глюкозамина количество колоний существенно снижалось. В процентном отношении к контролю обработка 5 ммоль/л снижала клоногенную выживаемость на 26%, а 10 ммоль/л – на 40%. Очевидно, что GlcH в используемых концентрациях ингибирует рост и выживаемость клеток линии PC12,

так же, как и клеток линии HeLaG63, описанных нами ранее [16].

Параллельные морфологический и цитометрический анализы культуры клеток PC12 после 24-х-часовой обработки их 10 ммоль/л GlcH показали, что уровень суб-G1 популяции по сравнению с контролем не меняется. Прижизненная окраска этих клеток АО не выявила фрагментации ядерного материала, свидетельствующей об апоптотиче-

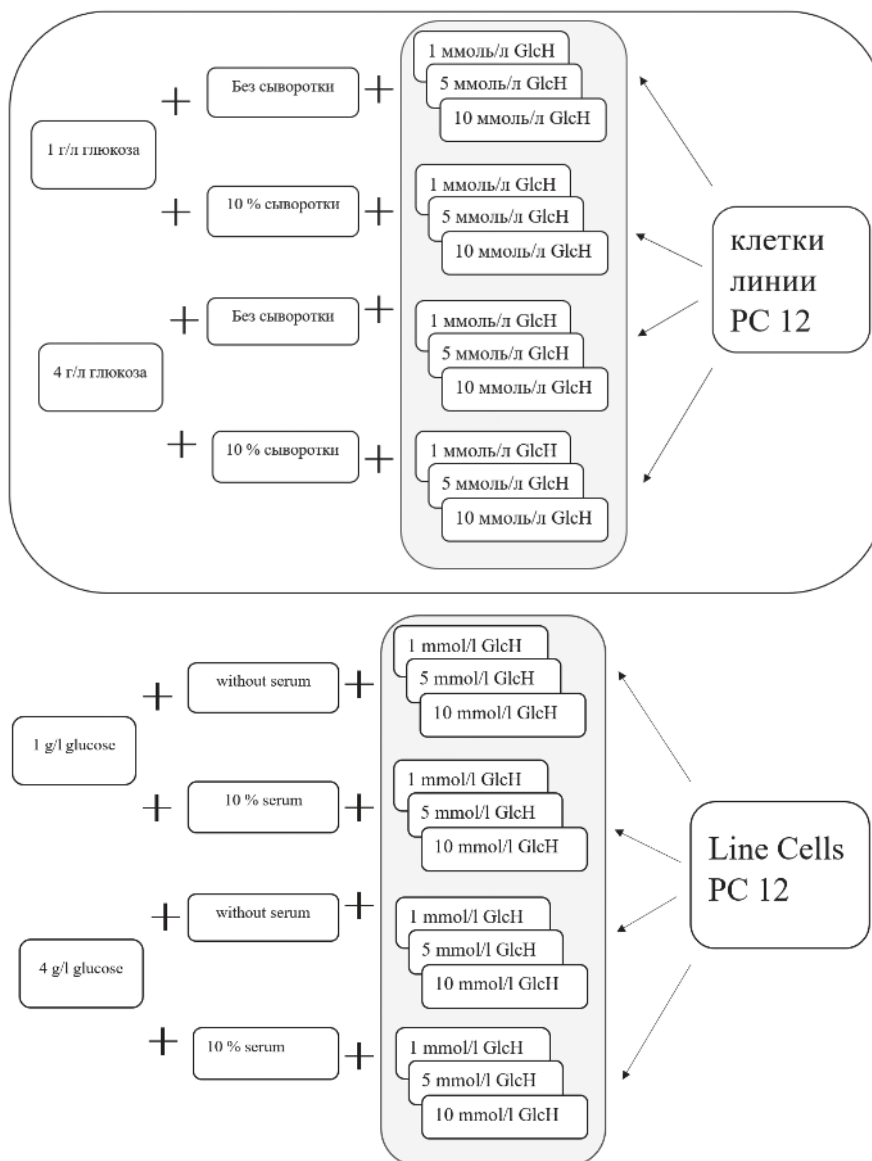


Рис. 1. Схема подготовки образцов для цитометрического анализа распределения клеток по количеству ДНК.

Fig. 1. Scheme of sample preparation for cytometric analysis of cell distribution by DNA amount.

ской гибели клеток. В то же время, дополнительная окраска клеток МДС специфическим красителем для обнаружения аутофагальных вакуолей позволяет наблюдать множество везикул (рис. 3).

Как положительный контроль были использованы клетки HeLa G63. Обработка клеток этой клеточной линии 10 ммоль/л GlcH приводит к появлению признаков апоптотической гибели: возрастание суб-G1 по-

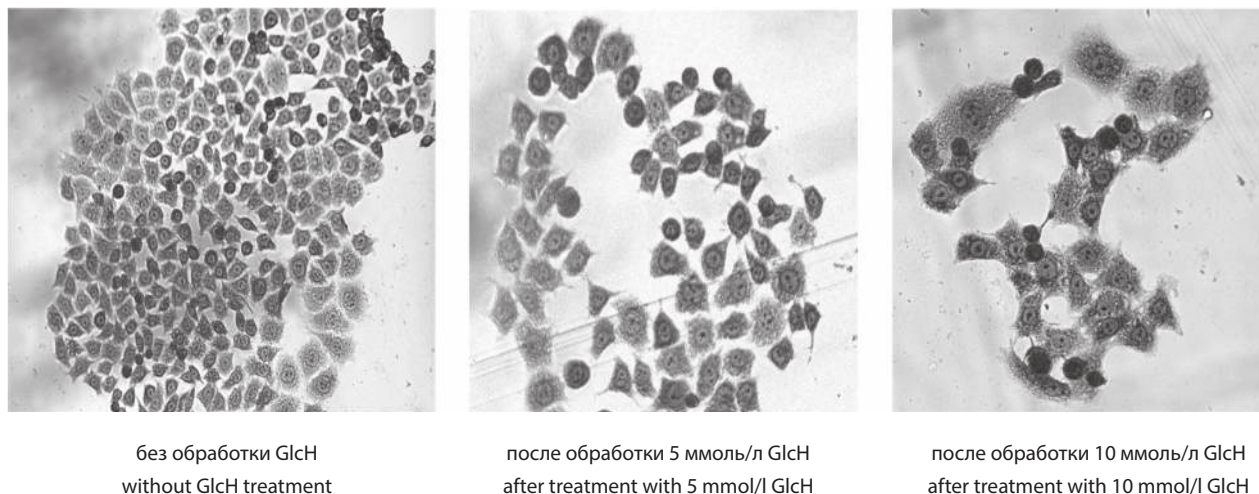


Рис. 2. Клоногенная выживаемость клеток до и после 24-х-часовой обработки клеток глюкозамин (GlcH) в разных концентрациях.

Fig. 2. Clonogenic survival of cells before and after 24-hour treatment of cells with glucosamine (GlcH) at different concentrations.

Таблица 1/ Table 1

Влияние D- глюкозамина на распределение клеток по содержанию ДНК после культивирования их на питательных средах с разным содержанием глюкозы и сыворотки

The effect of D-glucosamine on the distribution of cells by DNA content after their cultivation on nutrient media with different glucose and serum contents

| Содержанию ДНК на клетку DNA content per cell | Состав культуральной среды The composition of the culture medium | | | | | | | |
|---|---|--------------------------------|--|--|------------------------------|--------------------------------|--|---------------------------------------|
| | глюкоза 4г/л 4g/l glucose | | | | глюкоза 1г/л 1g/l glucose | | | |
| | 10% сыворотки 10% serum | без сыворотки without serum | 10% сыворотки +GlcH 1мМ 10% serum +GlcH 1mM | без сыворотки +GlcH 1мМ without serum +GlcH 1mM | 10% сыворотки 10% serum | без сыворотки without serum | 10% сыворотки 1мМ +GlcH 1мМ 10% serum +GlcH 1mM | без сыворотки without serum +GlcH 1мМ |
| <2c (суб- G ₁) <2c (sub- G ₁) | 6.3±0.5 | 13.5±1.4 | 5.3±0.5 | 8.7±0.9 | 6.5±0.2 | 19.4±2.0 | 6.6±0.8 | 14.3±1.4 |
| 2c (G ₁ -фаза) 2c (G ₁ -phase) | 71.5±0.3 | 74.9±1.8 | 70.4±0.9 | 79.5±0.7 | 61.9±1.3 | 67.1±0.9 | 63.9±0.9 | 66.3±1.3 |
| 3c (S-фаза) 3c (S-phase) | 15.4±1.6 | 6.5±0.8 | 15.2±0.8 | 7.0±0.7 | 19.3±1.2 | 8.9±1.8 | 18.4±1.2 | 11.9±1.1 |
| 4c (G ₂ /M фазы) 4 c (G ₂ /M phases) | 6.8±1.7 | 5.0±1.0 | 9.1±0.7 | 4.8±0.6 | 12.3±0.8 | 4.6±0.5 | 11.2±0.7 | 7.5±0.8 |

Примечание. Каждая точка представляет среднее арифметическое значение 3-5 повторов (%) ± стандартное отклонение (M±σ). Жирным шрифтом выделены показатели, достигающие уровня статистической значимости p<0,05.

Note. Each point represents the arithmetic mean of 3-5 repetitions (%) ± standard deviation (M±σ). Bold face indicates indicators reaching the level of statistical significance p<0.05.

пуляции, фрагментации ядерного материала при прижизненной окраске АО (рис. 3).

Морфологический анализ согласуется с цитометрическим анализом распределения ДНК. Очевидно, что обработка клеток PC 12 GlcH в исследованных концентрациях не индуцировала апоптоз. Отсутствие фрагментации ядерного материала и образование цитоплазматических вакуолей указывает на то, что GlcH включает вакуоль/лизосомальный путь деградации клеток PC12.

Обработка клеток ингибиторами гликолиза приводит к снижению уровня АТФ, так 2-DG, GlcH и оксамат снижают уровень АТФ в клетках, при этом 2-DG, GlcH индуцируют аутофагию, оксамат — не индуцирует. Обработка клеток 2-DG, GlcH индуцирует стресс эндоплазматического ретикулума (ER), а обработка ок-

саматом не вызывает стресса ER [6, 17]. Очевидно, что не все эффекты, индуцируемые ингибиторами гликолиза, проявляют корреляцию с уровнем АТФ. Кроме того, показано, что аутофагию индуцируют сахара со свободной аминогруппой [9]. Мы сравнили эффективность индукции аутофагии в клетках PC12 двумя ингибиторами гликолиза: 2-DG и GlcH, со сходной структурой и сходными механизмами действия. GlcH отличается от 2-DG наличием свободной аминогруппы (рис. 4).

Отчетливо видна вакуолизация цитоплазмы в клетках обработанных и GlcH, и 2-DG. При этом в контроле на 400 просчитанных клеток встречается всего одна вакуолизированная, при обработке 10 ммоль/л GlcH вакуолизированных клеток было $68.0 \pm 4.1\%$, а после 10 ммоль/л 2-DG $27.8 \pm 2.3\%$ от общего числа про-

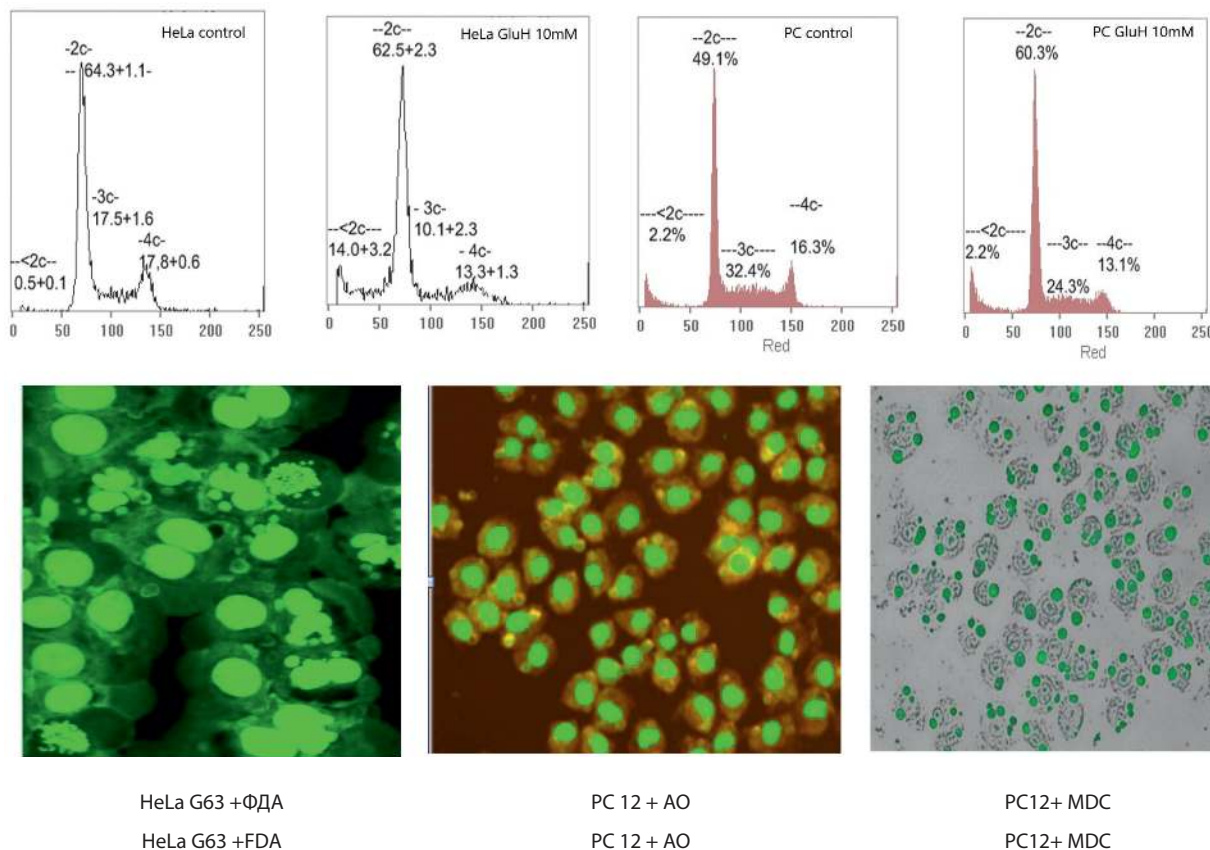


Рис. 3. Цитометрический анализ состава клеточной популяции до и после 24-х-часовой обработки клеток HeLa G63 (А) и PC12 (Б) 10 ммоль/л GlcH. Верхний ряд – гистограммы распределения клеток по содержанию ДНК.

Нижний ряд – морфологический анализ при окрашивании клеток дифференцирующими флуоресцентными красителями

Fig. 3. Cytometric analysis of the composition of the cell population before and after 24-hour treatment of HeLa G63 (A) and PC12 (B) cells with 10 mmol/l GlcH.

Top row – histograms of cell distribution by DNA content.

Bottom row – morphological analysis when staining cells with differentiating fluorescent dyes.

считанных (не менее 500 клеток на точку). Большая эффективность GlcH, по сравнению с 2-DG, согласуется с результатами других исследователей и подчеркивает физиологическую роль аминокетонной группы в составе GlcH [9]. Вакуолизация цитоплазмы является показателем включения нового таргетного пути, включающего перестройку мембраны с образованием везикул в цитозоле [18].

Как было показано выше, клетки линии PC12 были чувствительны к отсутствию сыворотки в среде и менее чувствительны к снижению уровня глюкозы, но эта оценка была проведена с помощью проточной цитометрии по появлению фрагментации ДНК (суб-S1 фракции), возникающей при апоптотической гибели клеток. Поскольку GlcH в исследованных концентрациях в этой клеточной линии апоптоз не индуцировал, но сильно снижал репродуктивную выживаемость клеток и индуцировал образование вакуолей, то мы попытались проследить за кинетикой этого процесса. Клетки были высажены во флаконы с питательной средой, содержащей 10% сыворотки, и через 24 ч после посева в часть флаконов добавили 10 ммоль/л GlcH. Для положительного контроля в часть флаконов с клетками добавили рапамицин 50 мкмоль/л, который является ингибитором mTOR и функционирует как клеточный сенсор на изменения уровня глюкозы и аминокислот, имитирует клеточное голодание, блокируя сигналы, необходимые для роста и пролиферации клеток. В ча-

сти флаконов просто заменили среду на идентичную без сыворотки.

Через каждый час анализировали состояние клеток при помощи инвертированного микроскопа «EVOS». Через 2 ч во флаконах со средой без сыворотки стали появляться глобулы пузырьков (везикул), во флаконах с GlcH и рапамицином также видна вакуолизация и образование везикул, но в меньшей степени. При увеличении продолжительности обработки увеличивалось не только количество, но и размер вакуолей и везикул. Через 3 ч их стало очень много, они отрывались от монослоя и всплывали. После 6-часовой обработки они почти все флотировали. На фото представлены результаты 3-х-часовой инкубации клеток в нормальной питательной среде, в среде без сыворотки, в среде с рапамицином, в среде с 10 ммоль/л GlcH. На всех фото, кроме контроля, видно образование вакуолей и везикул (рис. 5).

Размер везикул оценивали методом лазерной корреляционной спектроскопии. Результатом обработки спектра является гистограмма распределения рассеивающих частиц по размерам (по удвоенным гидродинамическим радиусам). Характерные и выраженные пики такого распределения отвечают разным группам рассеивающих частиц в немонодисперсном образце. Относительная площадь характерного пика гистограммы показывает относительный вклад в спектр рассеяния этими группами рассеивающих частиц (рис. 6).

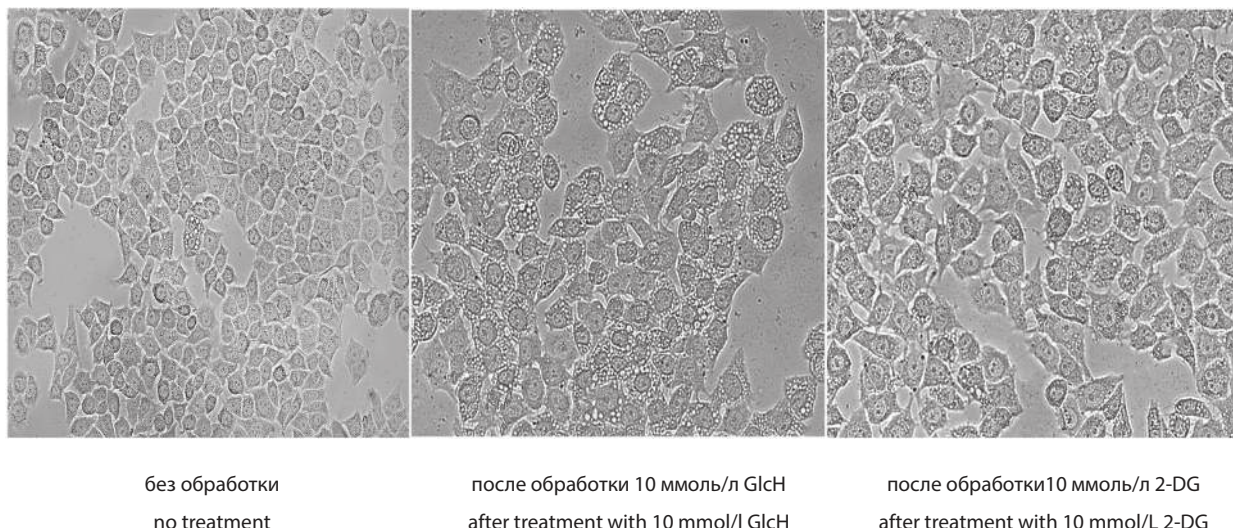


Рис. 4. Вакуолизация цитоплазмы в клетках без обработки, после 24-х-часовой обработки 10 ммоль/л GlcH и после обработки 10 ммоль/л 2-DG.
Fig. 4. Vacuolization of the cytoplasm in cells without treatment, after 24 hours of treatment with 10 mmol/l GlcH and after treatment with 10 mmol/l 2-DG.

Микровезикулы, формирующиеся в результате отпочковывания плазматической мембраны, образуют две фракции частиц: одна в пределах 200 нм и вторая 1000 нм (рис. 6). Известно, что со стороны цитоплазмы плазматическая мембрана покрыта (около 20 нм) волокнистым слоем, который на ультратонких срезах как бы окаймляет небольшие впячивания, ямки. Окаймляющий слой состоит в основном из белка клатрина, ассоциированного с рядом белков. Клатриновый слой покрывает периметр отделяющихся первичных вакуолей. Размер клатриновых везикул около 100 нм. При потере клатринового слоя вакуоли начинают сливаться друг с другом. Можно предположить, что первый пик обусловлен слившимися клатриновыми везикулами. Показано,

что мембраны окаймленных вакуолей содержат сравнительно мало холестерина, что может определять снижение жесткости мембран и способствовать образованию пузырьков. Известно, что GlcN нарушает биосинтез холестерина в клетках [19], поэтому обработка клеток этим веществом может служить фактором инициации аутофагии в клетках. Несмотря на то, что способность GlcN индуцировать аутофагию в различных типах клеток показана рядом исследователей, механизмы этой реакции до конца не выяснены, поскольку они зависят от иницирующего фактора, от дозы инициатора, от продолжительности воздействия, от типа клеток [6, 20].

В ответ на изменения метаболического состояния и клеточный стресс активируются клеточные сигналь-

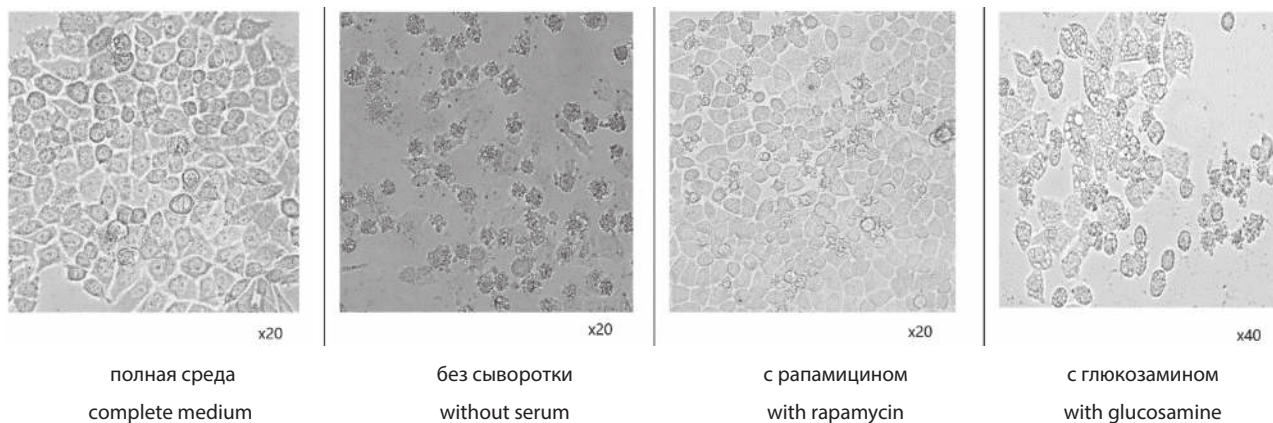


Рис. 5. Морфологические изменения в клетках PC 12 при различных условиях культивирования.

Fig. 5. Morphological changes in PC 12 cells under different culture conditions.

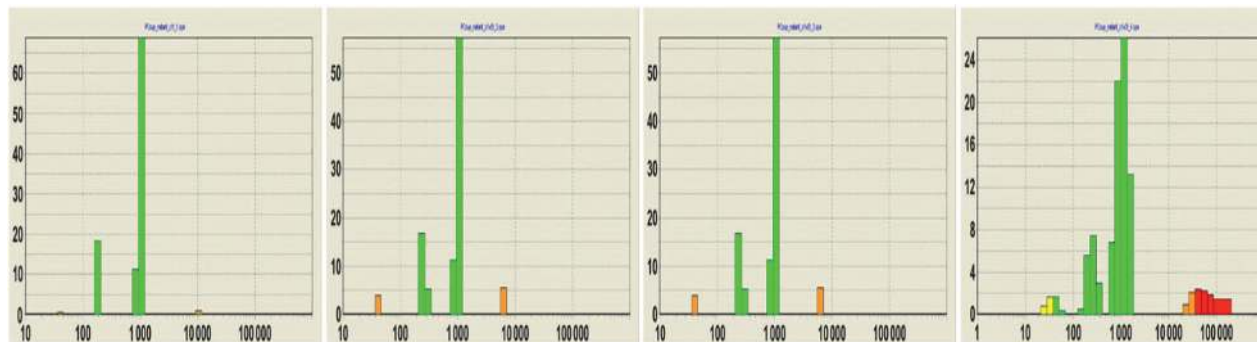


Рис. 6. Распределение по размерам частиц в супернатанте клеток PC 12 по вкладу в светорассеяние. По оси X — диаметр частиц в нанометрах, по оси Y — процентный вклад в светорассеяние. Устойчивые «пики» распределения приходятся на размеры ~ 1000 нм и 200-300 нм. Все остальные «пики» распределения сравнительно не велики по вкладу и неустойчивы.

Fig. 6. Particle size distribution in the supernatant of PC 12 cells according to the contribution to light scattering. On the X axis – the particle diameter in nanometers, on the Y axis – the percentage contribution to light scattering. Stable “peaks” of distribution fall on sizes ~ 1000 nm and 200-300 nm. All other “peaks” of the distribution are relatively minor in terms of contribution and are unstable.

ные механизмы, которые строго контролируют аутофагию [21], такие как mTOR, который функционирует как клеточный сенсор на изменения уровня глюкозы и аминокислот.

Заключение

Таким образом, можно предположить, что форма гибели клеток зависит как от индуцирующего агента, так и от типа клеток. GlcN в концентрациях 1–10 ммоль индуцировал апоптотическую гибель клеток HeLa, но не клеток PC12. Цитотоксический эффект GlcN на клетках PC12 реализуется через индукцию аутофагии, в то время как индуктор окислительного стресса перекись водорода усиливала апоптотическую гибель клеток PC12 [5]. GlcN был эффективнее в индукции вакуолизации клеток, чем 2-DG, что косвенно указывает на роль аминокислотной группы в индукции аутофагии. GlcN – индуцированный апоптоз в клетках HeLa усиливался снижением уровня глюкозы в питательной среде. В клетках PC12 GlcN-индуцированная аутофагия слабо зависела от содержания глюкозы в среде, но усиливалась снижением содержания сыворотки в питательной среде. Предполагалось, что одной из причин включения апоптотической гибели является GlcN-индуцированное снижение АТФ в клетках, но не все эффекты, индуцируемые ингибиторами гликолиза, проявляют корреляцию с уровнем АТФ. Можно предположить, что в основе механизма действия GlcN лежит ингибирование фосфорилирования m-TOR, при этом не исключается и включение других механизмов, выявлению которых будут способствовать дальнейшие исследования. Сигнальный путь mTOR считается основным регулятором множества взаимосвязанных функций и механизмов, имеющих отношение к росту, пролиферации и гибели клеток. Рапамицин, как индуктор аутофагии, используется для профилактики и лечения ряда заболеваний, но он имеет побочные эффекты, которые создают проблему при хроническом использовании. GlcN безопасен даже при длительном применении у человека, включая пациентов с нарушенной толерантностью к глюкозе или диабетом.

Литература

(п.п. 1-4; 6-11; 15; 17-21 см. References)

5. Гильяно Н.Я., Носкин Л.А., Журишкина Е.В., Степанов С.И., Ибатуллин Ф.М., Торшин В.И. и др. Комбинация низких доз глюкозамина и 2-DG усиливает цитотоксический эффект в опухолевых клетках человека в культуре. *Патол. физиол. и эксперим. тер.* 2019; 63 (2): 41–9
12. Арутюнян А.В., Завачкий Е.И., Козлов В.С., Суясова М.В. Особенности агрегации фуллерена C₇₀ в растворе о-ксилола выявлен-

ные методами динамического светорассеяния. *Письма в ЖЭТФ.* 2018; 108(10): 706–12

13. Лебедев А.Д., Левчук Ю.Н., Ломакин А.В., Носкин В.А. *Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии.* Киев, Наукова думка. 1987: 50–4.
14. Гильяно Н.Я., Степанов С.И., Носкин Л.А. Архипова Е.Н., Коневега Л.В. Исследование роли супероксида, оксида азота и ионов металлов переменной валентности в цитотоксическом эффекте перекиси водорода и бета амилоида. *Патол. физиол. и эксперим. тер.* 2013; 3: 42–6.
16. Гильяно Н.Я., Дуботолова М.М., Носкин Л.А., Коневега Л.В., Степанов С.И., Ибатуллин Ф.М. Цитостатический и радиомодифицирующий эффекты D глюкозамина на клетках человека в культуре. *Радиаци. биол. Радиоэкология.* 2021; 61(2): 145–51.

References

1. Dalirfardouei R., Rfrimi G., Jamialahmadi K. Molecular mechanisms and biomedical applications of glucosamine as a potential multifunctional therapeutic agent. *Life Science.* 2016; 152: 21–9.
2. Zahedipour F., Dalirfardouei R., Karimi G., Jamialahmadi Kh. Molecular mechanisms of anticancer effects of Glucosamine. *Biomed Pharmacother.* 2017; 95: 1051–58.
3. Zhang L., Liu W.-S., Han B.-Q., et al. Antitumor activities of D-glucosamine and its derivatives. *J Zhejiang University SCIENCE B.* 2006; 7: 608–14.
4. Jung C.W., Jo J.R., Lee S.H., et al. Anti-cancer properties of glucosamine-hydrochloride in YD-8 human oral cancer cells: Induction of the caspase-dependent apoptosis and down-regulation of HIF-1 α . *Toxicol In Vitro.* 2012; 26(1): 42–50
5. Giliano N.Ja., Zhurishkina E.V., Stepanov S.I., et al., A combination of low-dose glucosamine D and 2-deoxy-D-glucose enhances the cytotoxic effect on cultured human tumor cells. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2019; 63: 41–9. (in Russian)
6. Caramés B., Kiosses W.B., Akasaki Yu., Brinson D.C., Eap W., Koziol Ja., et al. Glucosamine activates autophagy in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum.* 2013; 65(7): 1843–52.
7. Wang C.W., Kim J., Huang W.P., Abeliovich H., Stromhaug P.E., Dunn Jr.W.A., et al. Apg2 is a novel protein required for the cytoplasm to vacuole targeting, autophagy, and pexophagy pathways. *J Biol Chem.* 2001; 276(32): 30442–51.
8. Chen Lv, Lu Wang, Xiongbai Zhu, Wenjun Lin, Xin Chen, Zhengxiang Huang, et al. Glucosamine promotes osteoblast proliferation by modulating autophagy via the mammalian target of rapamycin pathway. *Biomed Pharmacother.* 2018; 99: 271–7.
9. Shintani T., Yamazaki F., Katoh T., Umekawa M., Matahira Y., Hori S., et al. Glucosamine induces autophagy via an mTOR-independent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 391(4): 1775–9.
10. Freid J., Perez A.G. Clarkson B.D. Rapid hypotonic method for flow cytometry of monolayer cell culture. Some pitfalls in staining and data analysis. *J Histochem Cytochem.* 1978; 26(11): 921–33.
11. Watson J.V. *Flow Cytometry Data Analysis: Basic Concepts and Statistics.* Cambridge university press. 2005.
12. Arutyunyan A.V., Zavatskii E.I., Kozlov V.S., Suyasova M.V. Features of the aggregation of C70 Fullerene in an o-Xylo solution revealed by the dynamic light scattering method. *Jetp Lett.* 2018; 108: 680–685. (in Russian)
13. Lebedev A.D., Levchuk Yu.N., Lomakin A. V., et al. *Laser correlation spectroscopy in biology [Lazernaya korrelyatsionnaya spektroskopiya v biologii].* Kiev; Naukova dumka; 1987. (in Russian)

14. Giliano N.Ya., Stepanov S.I., Noskin L.A., Arkhipova E.N., Konevega L.V. Assessing of the role superoxide, nitric oxide and redox metals in cytotoxic effect of the H₂O₂ and amyloid- β -protein. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2013; 57: 42-6. (in Russian)
15. Seyed Hadi Mousavi, Elham Bakhtiari, Azar Hosseini, Khadijeh Jamialahmadi. Protective effects of glucosamine and its acetylated derivative on serum/glucose deprivation-induced PC12 cells death: Role of reactive oxygen species. *Res Pharm Sci*. 2018; 13(2): 121–9.
16. Giliano N.Ya., Stepanov S.I., Noskin L.A., Konevega L.V., Stepanov S.I., Ibatullin F.M. Cytostatic and radiomodifying effects of D-Glucosamine on human cells in culture. *Radiatsionnaya biologiya. Radiobiology*. 2021; 61: 145-51. (in Russian)
17. Hwang M.S., Baek W.K. Glucosamine induces autophagic cell death through the stimulation of ER stress in human glioma cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 13; 399(1): 111-6.
18. Scott V., Klionsky D.J. Delivery of proteins and organelles to the vacuole from the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol*. 1998; 10(4): 523-9.
19. Friedman SJ, Cheng S, Skehan P. Mechanisms of cholesterol synthesis inhibition by D-glucosamine. *Can J Biochem Cell Biol*. 1985; 63(12): 1253-7.
20. Haibin Xi, Metin Kurtoglu, Huaping Liu, Medhi Wangpaichitr, Min You, Xiongfei Liu, et al. 2-Deoxy-D-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011; 67(4):899-910.
21. Mizushima N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36: 2491-502.

Сведения об авторах:

Гильяно Надежда Яковлевна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. медицинской биофизики Петербургского института ядерной физики им. Б.П. Константинова, НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: giliano@omrb.pnpi.spb.ru;

Дуботолова Мария Михайловна, студентка, «Петербургский Государственный Университет»;

Носкин Леонид Алексеевич, доктор биол. наук, проф. «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова», НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: lanoskin42@mail.ru;

Степанов Сергей Иванович, науч. сотр. лаб. медицинской биофизики, «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова», НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: stepanov_si@pnpi.nrcki.ru;

Арутюнян Александр Владимирович, науч. сотр. лаб. медицинской биофизики «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова», НИЦ «Курчатовский институт», e-mail: arutb1@mail.ru;

Алчинова Ирина Борисовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии, ФГБНУ НИИОПП, e-mail: alchinovairina@yandex.ru;

Ибатуллин Фарид Миникасимович, канд. хим. наук, «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова», НИЦ «Курчатовский институт», зав. лаб. биоорганической и медицинской химии, e-mail: ibatullin_fm@pnpi.nrcki.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 615.847.8:616.153.857.5].015.45.076.9

Терехина Н.А.¹, Селин А.Д.¹, Терехин Г.А.²

Мочевая кислота – мишень для действия электромагнитного излучения

¹ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, 614990, Пермь, Россия, ул. Петропавловская, д. 26;

²ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, 614089, Пермь, Россия, ул. Полевая, д. 2

Цель исследования – оценка влияния электромагнитного излучения дециметрового диапазона на содержание мочевой кислоты в плазме крови крыс и выявление корреляционных связей уровня мочевой кислоты с основными показателями антиоксидантной защиты.

Методика. Эксперименты выполнены на крысах, которые находились под действием электромагнитного поля дециметрового диапазона в течение 3 мес. Спектрофотометрически в динамике через 1, 2 и 3 мес определяли в плазме крови содержание мочевой кислоты. Проведен корреляционный анализ взаимосвязи уровня мочевой кислоты и основного антиоксиданта плазмы крови – церулоплазмينا, а также уровня мочевой кислоты и главного неферментативного антиоксиданта эритроцитов – глутатиона.

Результаты. Содержание животных в течение 3 мес под действием электромагнитного излучения дециметрового диапазона приводит к увеличению в плазме крови уровня мочевой кислоты наряду с увеличением содержания церулоплазмينا и меди. В эритроцитах периферической крови при этом увеличивалось содержание восстановленного глутатиона. Установлены тесные корреляционные связи содержания мочевой кислоты с уровнем церулоплазмينا и двухвалентной меди (Cu^{2+}) в плазме крови, а также уровня мочевой кислоты с содержанием глутатиона в эритроцитах крыс.

Заключение. Содержание животных в течение 3 мес под действием электромагнитного излучения дециметрового диапазона приводит к увеличению содержания мочевой кислоты в плазме крови крыс. Мочевая кислота наряду с церулоплазмином и глутатионом является мишенью для действия электромагнитного излучения, при этом изменения мочевой кислоты более значимы.

Ключевые слова: мочевая кислота; электромагнитное излучение; антиоксидантная защита; корреляционный анализ

Для цитирования: Терехина Н.А., Селин А.Д., Терехин Г.А. Мочевая кислота – мишень для действия электромагнитного излучения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1) 96–103.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.96-103

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, редактирование статьи – Терехина Н.А.; сбор и обработка материала – Селин А.Д., Терехин Г.А.; написание статьи и статистическая обработка результатов исследования – Терехина Н.А., Селин А.Д. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Терехина Наталья Александровна, e-mail: terekhina@list.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.12.2021

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Terekhina N.A.¹, Selin A.D.¹, Terekhin G.A.²

Uric acid as a target for the action of electromagnetic radiation

¹E.A. Vagner Perm State Medical University
Petropavlovskaya St. 26, Perm 614990, Russian Federation ;

²Perm State Pharmaceutical Academy,
Polevaya St. 2, Perm 614089, Russian Federation

The aim of the study was to evaluate the effect of decimeter range electromagnetic radiation on the concentration of uric acid in rat plasma and to assess a correlation between uric acid and major indexes of the antioxidant defense.

Methods. Experiments were performed on rats exposed to decimeter-range electromagnetic field for three mos. The plasma concentration of uric acid was measured spectrophotometrically at one, two, and three mos. Correlations were assessed between concentrations of uric acid and ceruloplasmin, the main plasma antioxidant, as well as between uric acid and glutathione, the main non-enzymatic red blood cell antioxidant.

Results. The long-term exposure of animals to the decimeter-range electromagnetic radiation for three mos. led to an increase in plasma concentrations of uric acid, ceruloplasmin, and copper. In peripheral red blood cells, the concentration of reduced glutathione increased. A significant correlation was found between plasma concentrations of uric acid and ceruloplasmin and copper (Cu²⁺) as well as between plasma uric acid and red cell glutathione.

Conclusion. The long-term exposure of rats to decimeter-range electromagnetic radiation for three mos. leads to an increase in plasma concentration of uric acid. Uric acid, as well as ceruloplasmin and glutathione, is a target for the action of electromagnetic radiation with more pronounced changes in uric acid.

Keywords: uric acid; electromagnetic radiation; antioxidant defense; correlation analysis

For citation: Terekhina N.A., Selin A.D., Terekhin G.A. Uric acid as a target for the action of electromagnetic radiation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(1): 96–103. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.96-103

Author's contribution: The concept and design of the study, editing – Terekhina N.A.; collection and processing of material – Selin A.D., Terekhin G.A.; text writing, statistical processing – Terekhina N.A., Selin A.D. Approval of the final version of the article, responsibility of the integrity of all parts of the article – all co-authors.

For correspondence: *Terekhina Natalya Aleksandrovna*, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Biochemistry Department, Perm State Medical University named after academician E.A. Vagner, 26, Petropavlovskaya Str, 614990, Perm, Russia, e-mail: terekhina@list.ru

Financing. The study had no sponsorships.

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

Information about the authors:

Terekhina N.A., <https://orcid.org/0000-0002-0168-3785>

Received 16.12.2021

Accepted 20.01.2022

Published 15.03.2022

Введение

Длительное и интенсивное использование мобильных устройств способствует изменению общего электромагнитного фона и является неблагоприятным фактором загрязнения окружающей среды [1]. Повсеместное использование источников низкоинтенсивного электромагнитного излучения (ЭМИ) в диапазоне ультравысоких частот (300–3000 МГц) на дециметровых длинах волн оказывает негативное влияние на состояние различных органов и тканей [2]. Продолжительное нахождение биологических объектов в условиях действия электромагнитного поля (ЭМП) способствует интенсификации свободнорадикальных процессов [3], изменяет активность и содержание ферментативных [4] и неферментативных антиоксидантов [5], нарушает проницаемость клеточных мембран [6] и гематоэнцефалического барьера [7]. Антиоксидантная система (АОС) является ведущим регулирующим звеном в защите от действия избытка свободных радикалов. Наибольший интерес представляет изучение свободнорадикальных процессов и состояния антиоксидантной защиты (АОЗ) на доклинической стадии при длительном влиянии ЭМИ. Мочевая кислота (МК) — основной продукт катаболизма пуринов. В зависимости от ряда факторов МК может оказывать двоякое действие на процессы свободнорадикального окисления.

При одних условиях МК — антиоксидант, выступает в качестве акцептора свободных радикалов, в других же проявляет окислительную активность, рассматривается в качестве повреждающего фактора [8]. МК выступает в качестве антиоксиданта при различных патологических процессах: ишемическом инсульте [9], бактериальном менингите [10] и моделировании ожоговой болезни [11] у крыс. В других научных публикациях представлены сведения о том, что повышение уровня МК может способствовать увеличению окислительного повреждения [12], нарушать проницаемость гематофтальмического барьера [13]. Проявление про- или антиоксидантной активности МК зависит от ее концентрации [12]. Повышение уровня мочевой кислоты коррелирует с увеличением общей антиоксидантной активности плазмы крови [14–16].

В литературе отсутствуют сведения, посвященные изучению влияния ЭМИ дециметрового диапазона на уровень МК. Актуальным является вопрос о содержании МК в плазме крови при действии ЭМИ дециметрового диапазона, генерируемого от мобильных телефонов.

Цель исследования — оценка влияния электромагнитного излучения дециметрового диапазона на содержание мочевой кислоты в плазме крови крыс и прове-

дение корреляционного анализа взаимосвязи уровня мочевой кислоты и основных показателей антиоксидантной защиты (церулоплазмин, глутатион).

Методика

Биохимические исследования были выполнены в лаборатории кафедры биохимии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера». Затравка и облучение животных, расчеты значений плотности потока электромагнитной энергии выполнены в токсикологической лаборатории ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия». Экспериментальное исследование проведено в соответствии с международными требованиями правил проведения работ на позвоночных животных, с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕСС) и Хельсинской декларации. Выполнение работы одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера» МЗ РФ (протокол № 2 от 26.02.2020).

Эксперименты выполнены на 50 белых лабораторных крысах массой 185 ± 35 г, содержащихся на стандартном рационе вивария, с естественной сменной светового цикла при свободном доступе к пище и воде. Животные были разделены на 4 группы. В 1-ю контрольную группу составили 20 интактных крыс, которые находились в помещении вивария. Животные 2-й, 3-й и 4-й групп ($n=30$) были размещены в изолированном помещении и подвергались воздействию электромагнитного излучения дециметрового диапазона: 2-я группа крыс – в течение 1 мес, 3-я – 2 мес, 4-я группа – 3 мес. Была спроектирована экспериментальная модель облучения на животных [5]. Электромагнитное поле генерировали с помощью мобильных телефонов со следующими параметрами: несущая частота 1745 МГц, экспозиция 170 минут в сутки, средняя плотность потока электромагнитной энергии – $67 \pm 5,0$ мкВт/см², фракционно по 30 с в режиме автодозвона с интервалом 4 мин. Таким образом достигался предельно допустимый суточный уровень энергетических экспозиций в 200 мкВт/см²/ч для дециметрового диапазона частот. Животных выводили из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом. Уровень мочевой кислоты в плазме крови крыс определяли спектрофотометрически с помощью набора реактивов «Ольвекс Диагностикум» (Санкт-Петербург). Проведен корреляционный анализ взаимосвязи содержания МК и основного антиоксиданта плазмы крови – церулоплазмينا (ЦП), а также МК и главного неферментативного антиоксиданта эритроцитов – глутатиона.

Статистическую обработку результатов проводили с применением методов вариационной статистики в программах Statistica 10.0 (StatSoft, США) и Microsoft Excel. Оценку статистической значимости результатов проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента, данные представлены как $M \pm m$. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Степень тесноты корреляционной связи между параметрами антиоксидантной защиты (АОЗ) определяли с помощью расчета линейного коэффициента корреляции. Результат оценки значимости уравнения линейной регрессии представлен коэффициентом детерминации R^2 . Определение прочности связи между исследуемыми параметрами оценивали по шкале Чеддока.

Результаты

В крови интактных крыс содержание мочевой кислоты составило $45,5 \pm 4,7$ мкмоль/л, что значительно не отличается от представленных в литературе значений [11]. Действие ЭМИ дециметрового диапазона в течение 1 и 2 мес не приводило к статистически значимым изменениям содержания мочевой кислоты в плазме крови животных (табл. 1). Статистически значимое увеличение уровня мочевой кислоты в плазме крови крыс выявлено только через 3 мес воздействия ЭМИ (табл. 1). Антиоксиданты формируют единую многофакторную защитную систему организма, в которой изменение содержания одного из компонентов может привести к дисбалансу или недостаточной активности всей системы с последующим нарушением регуляции процессов свободнорадикального окисления. Значительная роль в формировании общей антиоксидантной защиты организма отводится белкам и низкомолекулярным пептидам (церулоплазмин и глутатион). Нами установлено, что при воздействии ЭМИ в течение 3 мес происходит увеличение содержания глутатиона в эритроцитах почти на 20% и церулоплазмينا в плазме крови крыс на 14% соответственно [5]. При этом содержание мочевой кислоты возрастает почти на 40% (табл. 1).

Представляло интерес провести корреляционный анализ для определения степени тесноты связи исследуемых параметров. Уравнение регрессии $y = ax + a_1$ дает сведения о форме связи между величинами x и y . Качественное выражение силы связи между данными показателями определяется коэффициентом корреляции r_{xy} . Оценку значимости уравнения регрессии производили с помощью расчета коэффициента детерминации (R^2).

При проведении корреляционного анализа взаимосвязи между содержанием мочевой кислоты в плазме крови и уровнем восстановленного глутатиона в эри-

троцитах интактной группы крыс была установлена высокая прочность связи ($r=+0,73$; $R^2=0,53$), (табл. 2). В экспериментальной группе животных при действии ЭМИ в течение 1 и 2 мес, коэффициент детерминации находился в диапазоне от 0,30 до 0,37, что говорит о низкой приемлемости исследуемой корреляционной модели. Однако при воздействии ЭМИ в течение 3 мес корреляционная зависимость приобретает

высокий характер взаимосвязи между исследуемыми параметрами ($r=+0,79$; $R^2=0,63$).

Установлена высокая прочность связи между содержанием мочевой кислоты и церулоплазмينا в плазме крови интактных крыс (табл. 3). В интактной группе точность подбора уравнения регрессии высокая ($R^2=0,81$), которая показывает, что в 81% случаев изменения содержания мочевой кислоты приводят к из-

Таблица 1/Table 1

Содержание мочевой кислоты (мкмоль/л), церулоплазмينا (мг/л) в плазме и глутатиона (мкмоль/г Hb) в эритроцитах крови крыс при электромагнитном облучении дециметрового диапазона, (M±m)

Content of uric acid (μmol/l), ceruloplasmin (mg/l) in plasma and glutathione (μmol/g Hb) in rat erythrocytes exposed to the decimeter-range electromagnetic irradiation, (M±m)

| Группы животных animal groups | Мочевая кислота Uric Acid | Церулоплазмин Ceruloplasmin | Глутатион Glutathione |
|--|------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| Интактная группа intact group | 45,5±4,7 | 255,9±12,2 | 2,28±0,1 |
| Экспериментальные группы Experienced groups | | | |
| ЭМИ (1 мес) EMI (1 month) | 47,8±3,5 | 257,6±15,6 | 2,35±0,2 |
| ЭМИ (2 мес) EMI (2 month) | 51,6±4,8 | 270,3±17,1 | 2,49±0,2 |
| ЭМИ (3 мес) EMI (3 month) | 73,8±5,9* | 295,2±14,5* | 2,83±0,1* |

Примечание. * – статистически значимые различия ($p<0,05$) с группой интактных животных. ЭМИ – электромагнитное излучение.

Note. * – $p<0.05$, significant differences from control rats. EMI – electromagnetic irradiation.

Таблица 2/Table 2

Корреляционный анализ связи показателей содержания мочевой кислоты (мкмоль/л) в плазме крови и глутатиона (мкмоль/г Hb) в эритроцитах периферической крови крыс при электромагнитном облучении

Correlation analysis of indicators of the content of uric acid (μmol/l) in blood plasma and glutathione (μmol/g Hb) in rat peripheral blood erythrocytes exposed to the electromagnetic irradiation

| Исследуемые группы animal groups | a0 | a1 | гху | Теснота связи | R ² |
|--|-------|-------|-------|-------------------------|----------------|
| Интактная группа intact group | +0,01 | +1,64 | +0,73 | Высокая high | 0,53 |
| Экспериментальные группы Experienced groups | | | | | |
| ЭМИ (1 мес) EMI (1 month) | +0,02 | +1,45 | +0,55 | Заметная perceptible | 0,30 |
| ЭМИ (2 мес) EMI (2 month) | +0,02 | +1,27 | +0,61 | Заметная perceptible | 0,37 |
| ЭМИ (3 мес) EMI (3 month) | +0,01 | +1,97 | +0,79 | Высокая high | 0,63 |

Примечание. Перевод количественного значения (гху) в качественное по шкале Чеддока: 0,1–0,3 – слабая, 0,3–0,5 – умеренная, 0,5–0,7 – заметная, 0,7–0,9 – высокая (тесная), 0,9–0,99 – весьма высокая (очень тесная). R² – коэффициент детерминации.

Note. Converting a quantitative value (гху) to a qualitative one Chaddok's scale: 0.1–0.3 – insignificant, 0.3–0.5 – moderate, 0.5–0.7 – perceptible, 0.7–0.9 – high, 0.9–0.99 – strong. R² – coefficient of determination

менению церулоплазмина. При нахождении животных в условиях действия ЭМИ в течение 1 мес степень корреляционной зависимости исследуемых показателей расценивается как «заметная». Установлено, что у крыс экспериментальных групп (ЭМИ – 1 мес), коэффициент детерминации составил 0,50, что свидетельствует о приемлемости исследуемой модели. У животных групп, которые находились в течение 2 и 3 мес под действием ЭМИ, установленный коэффициент детерминации находился в диапазоне от 0,65 до 0,72, что свидетельствует о высокой тесноте связи изученных параметров. Таким образом, в экспериментальных группах коэффициент детерминации изменяется в зависимости от длительности действия воздействия ЭМИ.

Антиоксидант церулоплазмин — является белком острой фазы воспаления, обеспечивающим транспорт двухвалентной меди Cu^{2+} в организме. Проявление про- или антиоксидантной активности меди Cu^{+} — металла переменной валентности зависит от ряда факторов: концентрации металла в организме, возможности связывания металла с хелатными соединениями (церулоплазмин), концентрации восстановителей (мочевая кислота) и определяется их валентностью. Cu^{2+} -- является антиоксидантом. Длительное в течение 3 мес нахождение крыс в условиях действия ЭМИ дециметрового диапазона со-

провождается статистически значимым снижением содержания железа Fe^{2+} и увеличением содержания меди Cu^{2+} в плазме крови (в 1,3 раза; $p < 0,05$) [5]. При изучении содержания меди Cu^{2+} в динамике действия ЭМИ установлено, что через 1 мес статистически значимых изменений не выявлено. Значимое увеличение содержания меди Cu^{2+} в плазме крови крыс установлено уже через 2 мес воздействия ЭМИ (табл. 4).

Результаты корреляционного анализа взаимосвязей между содержанием мочевой кислоты и Cu^{2+} при длительном действии ЭМИ представлены в таблице (табл. 5). В интактной группе крыс теснота корреляционной связи между исследуемыми показателями высокая, коэффициент детерминации 0,81. У животных экспериментальных групп, которые находились под действием ЭМИ в течение 1, либо 2 мес, коэффициент детерминации находился в диапазоне от 0,50 до 0,76, что свидетельствует о приемлемости исследуемой модели. В экспериментальных группах теснота связи исследуемых параметров зависит от длительности воздействия ЭМИ.

Установлена очень тесная корреляционная зависимость ($r = +0,97$; $R^2 = 0,94$) между содержанием меди Cu^{2+} и уровнем мочевой кислоты у крыс, находящихся под действием ЭМИ дециметрового диапазона в течение 3 мес (табл. 5).

Таблица 3/Table 3

Корреляционный анализ показателей содержания мочевой кислоты (мкмоль/л) и церулоплазмина (мг/л) в плазме крови крыс при электромагнитном облучении

Correlation analysis of indicators of the content of uric acid (μmol/l) and ceruloplasmin (mg/l) in the blood plasma of rats exposed to the electromagnetic irradiation

| Исследуемые группы animal groups | a0 | a1 | гху | Теснота связи | R ² |
|---|-------|---------|-------|----------------------|----------------|
| Интактная группа Intact group | +2,47 | +145,26 | +0,90 | Высокая high | 0,81 |
| Экспериментальные группы Experienced groups | | | | | |
| ЭМИ (1 мес) EMI (1 month) | +3,33 | +102,00 | +0,70 | Заметная perceptible | 0,50 |
| ЭМИ (2 мес) EMI (2 month) | +2,48 | +140,17 | +0,81 | Высокая high | 0,65 |
| ЭМИ (3 мес) EMI (3 month) | +2,26 | +123,33 | +0,85 | Высокая high | 0,72 |

Примечание. Перевод количественного значения (гху) в качественное по шкале Чеддока: 0,1–0,3 – слабая, 0,3–0,5 – умеренная, 0,5–0,7 – заметная, 0,7–0,9 – высокая (тесная), 0,9–0,99 – весьма высокая (очень тесная). R² – коэффициент детерминации.

Note. Converting a quantitative value (гху) to a qualitative one Chaddok's scale: 0.1–0.3 – insignificant, 0.3–0.5 – moderate, 0.5–0.7 – perceptible, 0.7–0.9 – high, 0.9–0.99 – strong. R² – coefficient of determination.

Обсуждение

Нахождение животных в течение 3 мес под действием электромагнитного излучения дециметрового диапазона приводит к увеличению в плазме крови содержания мочевой кислоты наряду с увеличением содержания церулоплазмينا и меди. В эритроцитах пе-

риферической крови при этом увеличивается содержание восстановленного глутатиона.

Установленные корреляционные взаимосвязи между уровнем мочевой кислоты, церулоплазмينا, меди и глутатиона определяют единый вектор изменений, заключающийся в увеличении АОЗ при длительном действии ЭМИ. При оценке установленных соотношений между изученными показателями было выявлено, что при длительном действии ЭМИ увеличение содержания мочевой кислоты происходит более интенсивно по сравнению с другими антиоксидантами крови (глутатион, церулоплазмин, Cu^{2+}).

При высокой концентрации Cu^{2+} мочевая кислота может восстанавливать Cu^{2+} до Cu^+ , образуя стабильный уратный радикал ($\text{UH}^{\bullet-}$) [8]. В этом случае образовавшийся уратный радикал обладает высоким восстановительно-окислительным потенциалом, позволяющим в процессе одноэлектронного окисления взаимодействовать с другими антиоксидантами (аскорбат, α -токоферол), что усиливает способность мочевой кислоты действовать в качестве антиоксиданта. С другой стороны, усиление восстановления Cu^{2+} до Cu^+ на фоне нарушения соотношения параметров АОЗ и отсутствия достаточного количества ко-антиоксидантов может способствовать восстановлению гидроперекисей липидов до алкоксильных радикалов, способствуя цепной реакции образования свободнорадикальных метаболитов.

Установленные изменения соотношения мочевой кислоты и церулоплазмينا, свидетельствуют о том, что

Таблица 4/Table 4

Содержание меди (мкмоль/л) в плазме крови крыс при электромагнитном облучении дециметрового диапазона, ($M \pm m$)

Content of Cu^{2+} ($\mu\text{mol/l}$) in the blood plasma of rats exposed to the decimeter-range electromagnetic irradiation, ($M \pm m$)

| Исследуемые группы animal groups | Медь (Cu^{2+}) |
|--|---------------------------|
| Интактная группа Intact group | 55,8 \pm 2,1 |
| Экспериментальные группы Experienced groups | |
| ЭМИ (1 мес) EMI (1 month) | 59,4 \pm 3,2 |
| ЭМИ (2 мес) EMI (2 month) | 63,6 \pm 3,7* |
| ЭМИ (3 мес) EMI (3 month) | 73,5 \pm 3,6* |

Примечание. * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой интактных животных.

Note. * – $p < 0.05$, significant differences from control rats.

Таблица 5/Table 5

Корреляционный анализ показателей содержания мочевой кислоты и меди Cu^{2+} (мкмоль/л) в плазме крови крыс при электромагнитном облучении

Correlation analysis of indicators of uric acid and copper Cu^{2+} content ($\mu\text{mol/l}$) in blood plasma of rats exposed to the electromagnetic irradiation

| Исследуемые группы Animal groups | a0 | a1 | r_{xy} | Теснота связи | R^2 |
|--|-------|--------|----------|--------------------------|-------|
| Интактная группа Intact group | +1,21 | +21,74 | +0,90 | Высокая High | 0,81 |
| Экспериментальные группы Experienced groups | | | | | |
| ЭМИ (1 мес) EMI (1 month) | +0,61 | +29,90 | +0,70 | Заметная Perceptible | 0,50 |
| ЭМИ (2 мес) EMI (2 month) | +0,57 | +34,13 | +0,87 | Высокая High | 0,76 |
| ЭМИ (3 мес) EMI (3 month) | +1,63 | +46,70 | +0,97 | Весьма высокая Strong | 0,94 |

Примечание. Перевод количественного значения (r_{xy}) в качественное по шкале Чеддока: 0,1–0,3 – слабая, 0,3–0,5 – умеренная, 0,5–0,7 – заметная, 0,7–0,9 – высокая (тесная), 0,9–0,99 – весьма высокая (очень тесная). R^2 – коэффициент детерминации.

Note. Converting a quantitative value (r_{xy}) to a qualitative one Chaddok's scale: 0.1–0.3 – insignificant, 0.3–0.5 – moderate, 0.5–0.7 – perceptible, 0.7–0.9 – high, 0.9–0.99 – strong. R^2 – coefficient of determination.

увеличение содержания мочевой кислоты происходит несколько интенсивнее по сравнению с церулоплазмином спустя 3 мес воздействия ЭМИ на животных. Белок острой фазы воспаления церулоплазмин обладает ферроксидазной активностью в отношении ионов железа. Ранее нами было установлено, что при длительном действии ЭМИ происходит снижение содержания Fe^{2+} в плазме крови с последующим его накоплением в тканях и органах [5]. Известно, что самые выраженные нарушения при окислительном повреждении клеточных мембран генерируются с участием железа в окислительно-восстановительных реакциях. Хелатные соединения, обладающие способностью связывать ионы металлов переменной валентности (церулоплазмин, мочевая кислота), являются важнейшей составной частью антиоксидантной системы организма, так как нейтрализуют основные катализаторы свободно-радикального окисления в организме [17].

При проведении корреляционного анализа между содержанием мочевой кислоты в плазме и глутатиона в эритроцитах было установлено, что характер взаимосвязи изученных параметров изменяется в зависимости от длительности воздействия ЭМИ. При воздействии ЭМИ в течение 1 и 2 мес корреляционные взаимосвязи между исследуемыми параметрами носят лишь заметный характер, что может быть обусловлено различной внутриклеточной локализацией. Однако при воздействии ЭМИ в течение 3 мес увеличение глутатиона происходит менее интенсивно по сравнению с мочевой кислотой. Несмотря на статистически значимое увеличение восстановленного глутатиона в эритроцитах и церулоплазмина в плазме крови ранее нами было установлено, что длительное нахождение животных в условиях действия ЭМИ приводит к изменению равновесия в системе прооксиданты – антиоксиданты с последующим увеличением проницаемости эритроцитарных мембран [6]. Несмотря на повышение показателей АОЗ (церулоплазмин, Cu^{2+} , глутатион) при действии ЭМИ в течение 3 мес, увеличение проницаемости эритроцитарных мембран свидетельствует о повреждении биологических мембран, в том числе мембран эритроцитов и гепатоцитов [5]. Проявление про- или антиоксидантной активности мочевой кислоты напрямую зависит от ее концентрации и содержания антиоксидантов в крови (церулоплазмин, глутатион), ионов металлов переменной валентности (медь, железо).

ЭМИ дециметрового диапазона способно оказывать повреждающее действие на ядерные структуры различных тканей и органов [18, 19], усиливать катаболизм пуриновых оснований [20], что способствует увеличению

продукции МК и как следствие интенсификации образования пероксидных радикалов. Повышение уровня МК является ведущим фактором в прогрессировании хронической болезни почек [13], маркером повышенного риска сердечно-сосудистых заболеваний [21, 22].

Установлены тесные корреляционные зависимости между содержанием мочевой кислоты и содержанием церулоплазмина, меди (Cu^{2+}) в плазме крови, а также между мочевой кислотой и глутатионом в эритроцитах у крыс, находящихся под действием электромагнитного излучения в течение 3 мес. Определение содержания МК, металлов переменной валентности (железо, медь), церулоплазмина в плазме и глутатиона в эритроцитах имеет ключевое значение для оценки степени поражения органов и тканей при длительном действии ЭМИ дециметрового диапазона.

Заключение

Воздействие электромагнитного излучения дециметрового диапазона в течение 3 мес приводит к увеличению содержания мочевой кислоты в плазме крови крыс. Мочевая кислота наряду с церулоплазмином и глутатионом является мишенью для действия электромагнитного излучения, при этом изменения мочевой кислоты более значимы.

Литература

(п.п. 2-4; 7; 9; 10; 14-16; 18; 19; 21; 22 см. References)

1. Григорьев Ю.Г. От электромагнитного смога до электромагнитного хаоса. К оценке опасности мобильной связи для здоровья населения. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2018; 63(3): 28–33.
5. Терехина Н.А., Селин А.Д., Терехин Г.А. Влияние электромагнитного излучения на показатели антиоксидантной защиты в эритроцитах и плазме крови крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2021; 65(3): 73–9.
6. Селин А.Д., Терехина Н.А., Терехин Г.А. Влияние электромагнитного излучения на проницаемость эритроцитарных мембран. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2020; 10 (4): 43–9.
8. Галунска Б., Паскалев Д., Янкова Т., Чанкова П. Двуликий Янус биохимии: мочевая кислота-оксидант или антиоксидант? *Нефрология*. 2004; 8(4): 25–31.
11. Кузнецова В.Л., Соловьева А.Г., Перетягин С.П., Костина О.В., Преснякова М.В., Перетягин П.В., Лузан А.С. и др. Биохимические показатели сыворотки крови крыс при лечении ожоговой раны в условиях влажной среды. *Вестник новых медицинских технологий*. 2017; 24(3): 104–8.
12. Халфина Т.Н., Валеева И.Х., Салихов И.Г. Мочевая кислота как про-/антиоксидант у пациентов с подагрой. *Практическая медицина*. 2011; 52: 129–32.
13. Терехина Н.А., Петрович Ю.А. Диагностическая ценность анализа слезы при уремии, уремиемии и холестеринемии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 1994; 6: 17–18.

17. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшикова Е.Б. *Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты*. М.: «Наука/Интерпериодика»; 2001.
20. Марутян С.В., Петросян Г.О., Марутян С.А., Навасардян Л.А., Трчунян А.А. Влияние рентгеновского и микроволнового излучений на дезаминирование пуриновых нуклеотидов в дрожжевых клетках *Candida guilliermondii* НП-4. *Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология*. 2019; 62(2): 48–52.
10. Christen S., Bifrare Y.D., Siegenthaler C., et al. Marked elevation in cortical urate and xantine oxidoreductase activity in experimental bacterial meningitis. *Brain Res*. 2001; 900: 244–51.
11. Kuznetsova V.L., Soloveva A.G., Peretyagin S.P., Kostina O.V., Presnyakova M.V., Peretyagin P.V., et al. Biochemical parameters of blood serum in rats during therapy of thermal injury in the water environment. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2017; 24(3): 104–8. (in Russian)
12. Khalfina T.N., Valeeva I.K., Salikhov I.G. Uric acid as a pro-antioxidant in patients with gout. *Prakticheskaya meditsina*. 2011; 52: 129–32. (in Russian)

References

1. Grigoriev Yu.G. From Electromagnetic Smog to Electromagnetic Chaos. To Evaluating the Hazards of Mobile Communication for Health of the Population. *Meditsinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost'*. 2018; 63(3): 28–33. (in Russian)
2. Sarika S., Neeru K. Health implications of electromagnetic fields, mechanisms of action, and research needs. *Advances in biology*. 2014; 1–24.
3. Achudume A., Onibere B., Aina F., Tchokossa P. Induction of Oxidative Stress in Male Rats Subchronically Exposed to Electromagnetic Fields at Non-Thermal Intensities. *J Electromagn Anal Applic*. 2010; 2(8): 482–7.
4. Kivrak E.G., Yurt K.K., Kaplan A.A., et al. Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system. *J Microsc Ultrastruct*. 2017; 5(4): 167–76.
5. Terekhina N.A., Selin A.D., Terekhin G.A. The effect of electromagnetic radiation on indexes of antioxidant defense in rat erythrocytes and blood plasma. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2021; 65(3): 73–9. (in Russian)
6. Selin A.D., Terekhina N.A., Terekhin G.A. Influence of electromagnetic radiation on the permeability of erythrocyte membranes. *Krymskiy zhurnal eksperimental'noy i klinicheskoy meditsiny*. 2020; 10(4): 43–9. (in Russian)
7. Sirav B., Seyhan N. Effects of GSM modulated radio-frequency electromagnetic radiation on permeability of blood–brain barrier in male & female rats. *J Chem Neuroan*. 2016; 75: 123–7.
8. Galunskaya B., Paskalev D., Yankova T., Chankova P. The biochemical Ianus: uric acid oxidant or antioxidant? *Nefrologiya*. 2004; 8(4): 25–31. (in Russian)
9. Chamorro A., Obach V., Cervera A. Prognostic significance of uric acid serum concentration in patients with acute ischemic stroke. *Stroke*. 2002; 33: 1048–52.
13. Terekhina N.A., Petrovich Y.A. Diagnostic value of tear analysis in uremia, uricemia and cholesterolemia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 1994; 6: 17–18. (in Russian)
14. Waring W.S., Convery A., Mishra V., et al. Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *The Biochemical Society. Clinical Science*. 2003; 105(4): 425–30.
15. Hink H.U., Santanam N., Dikalov S., et al. Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase. Role of uric acid in modulating in vivo activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22(9): 1402–8.
16. So A., Thorens B. Uric acid transport and disease. *J. Clin. Invest*. 2010; 120(6): 1791–9.
17. Zenkov N.K., Lankin V.Z., Mentshchikova E.B. *Oxidative stress. Biochemical and pathophysiological aspects. [Okislitel'nyy stress. Biokhimicheskie i patofiziologicheskie aspekty]*. Moscow: MAIK «Наука/Интерпериодика»; 2001. (in Russian)
18. Alkis M.E., Bilgin H.M., Akpolat V., et al. Effect of 900-, 1800-, and 2100-MHz radiofrequency radiation on DNA and oxidative stress in brain. *Electrom Biol Med*. 2019; 38(1): 32–47.
19. Campisi A., Gulino M., Acquaviva R., et al. Reactive oxygen species levels and DNA fragmentation on astrocytes in primary culture after acute exposure to low intensity microwave electromagnetic field. *Neuroscience letters*. 2010; 473(1): 52–5.
20. Marutyan S.V., Petrosyan G.H., Marutyan S.A., Navasardyan L.A., Trchounian A.H. Influence of X-ray and microwave radiation on deamination of purine nucleotides in yeast cells *Candida guilliermondii* NP-4. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya*. 2019; 62(2): 48–52. (in Russian)
21. Purnima S., Bahiga Galal Abd El-Aal. Serum uric acid as prognostic marker of coronary heart disease (CHD). *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. 2016; 28(5): 216–24.
22. Reddy R.P., Monigari N., Hande M. Study of serum uric acid in essential hypertension. *Int J Scient Resear Publ*. 2015; 5(8): 1–12.

Сведения об авторах:

Терехина Наталья Александровна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. биохимии, ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, e-mail: terekhina@list.ru;

Селин Алексей Дмитриевич, ст. преподаватель каф. биохимии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, e-mail: adselin13@gmail.com;

Терехин Георгий Анатольевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. экстремальной медицины и товароведения, ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, e-mail: terehin-ga@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092.6

Козлов В.А., Сапожников С.П., Карышев П.Б., Воронов Л.Н.

Локальный амилоидоз шишковидной железы

ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»,
428045, Чебоксары, Россия, Московский просп., д. 15

Введение. Шишковидная железа (эпифиз), кровоснабжение которой осуществляется от ветвей *a. chorioidea posterior*, а отток крови происходит в большую мозговую вену или её приток, может подвергаться локальному амилоидному поражению без вовлечения в процесс больших полушарий, то есть, представлять собой самостоятельный процесс не связанный с болезнью Альцгеймера. **Цель** исследования – выявление частоты встречаемости локального амилоидоза эпифиза у взрослых людей и изучение его возможной связи с кальцинозом железы.

Методика. Проведено патогистологическое исследование шишковидных желез 92 суицидентов и 69 лиц, погибших в результате насильственных действий или различных несчастных случаев (группа сравнения). Всего 37 женщин и 124 мужчины. Средний возраст суицидентов мужчин – $41,0 \pm 13,0$, женщин – $57,0 \pm 15,0$, лиц группы сравнения – $41,0 \pm 13,0$ и $54,0 \pm 13,0$ соответственно. Для выявления амилоида и кальцинатов использовали окраску гистопрепаратов конго красным, а также тιοфлавином Т. Тяжесть амилоидного поражения и количество кальцинатов в шишковидной железе оценивали в условных баллах.

Результаты. При окрашивании образцов конго красным вне зависимости от возраста и причины смерти в 48,5% случаев было выявлено различной тяжести амилоидное поражение шишковидной железы и наличие кальцинатов. Частота встречаемости, тяжесть амилоидного поражения железы и количество кальцинатов не зависели от возраста, пола и причин смерти (анализ различий частот проведен по тесту Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса). В образцах от суицидентов выявлено зависимое от тяжести амилоидного процесса статистически значимое увеличение массы шишковидной железы по сравнению с массой желез умерших в результате насильственной смерти и несчастных случаев. При отсутствии признаков амилоидного поражения различий в массе эпифизов «суицидентов» и «несуицидентов» не обнаружено. Причиной локального амилоидоза шишковидной железы, возможно является прижизненный гематогенный занос бактерий, который в том числе приводит к образованию кальцинатов.

Заключение. Примерно у 50% популяции был выявлен бессимптомный локальный амилоидоз эпифиза; наличие амилоидоза не являлось причиной суицида; в материале от «суицидентов» выявлена зависимость влажной массы железы от тяжести амилоидного поражения

Ключевые слова: шишковидная железа; локальный амилоидоз; конго красный; тιοфлавин; суициденты; несчастный случай; убийство

Для цитирования: Козлов В.А., Сапожников С.П., Карышев П.Б., Воронов Л.Н. Локальный амилоидоз шишковидной железы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1): 104–111.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.104-111

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Сапожников С.П., Карышев П.Б., Козлов В.А.; сбор и обработка материала – Карышев П.Б.; подготовка иллюстративного материала – Козлов В.А., Воронов Л.Н.; статистическая обработка – Козлов В.А.; написание текста – Сапожников С.П., Карышев П.Б., Козлов В.А., Воронов Л.Н.

Для корреспонденции: Козлов Вадим Авенирович, e-mail: pooh12@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.06.2020

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P., Karyshev P.B., Voronov L.N.

Local amyloidosis of the pineal gland

I.N. Ulyanov Chuvash State University,
Moskovsky Prospekt 15, Cheboksary 428045, Russian Federation

Introduction. The pineal gland is supplied with blood by branches of the posterior choroidal artery, and the blood drains into the great cerebral vein or its tributaries. This gland may undergo local amyloid damage without involving the large hemispheres. Thus, this damage is an independent process not related to Alzheimer's disease. **The aim** of the study was to determine the incidence of local amyloidosis in pineal glands of adults and to study a possible connection of amyloidosis with calcification of the gland.

Methods. This pathohistological study was performed in 92 suicides and 69 victims of murders and accidents (the comparison group), a total of 37 women and 124 men. The mean age of male and female suicides was 41.0 ± 13.0 and 57.0 ± 15.0 yrs, respectively, and the mean age of men and women in the comparison group was 41.0 ± 13.0 and 54.0 ± 13.0 yrs, respectively. Amyloid lesion and calcinates were detected with Congo red and thioflavin T staining. Severity of the amyloid lesion and the number of calcinates in the pineal gland were scored conventionally. Differences in findings were analyzed using the Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors significance correction.

Results. Congo red staining revealed pineal amyloid lesions of varying severity and the presence of calcinates in 48.5% of cases, regardless of the age, gender or the cause of death. The incidence and severity of amyloid lesions and the number of calcinates in the pineal gland did not depend on the age, gender or the cause of death. However, in suicides, the pineal gland weight was significantly increased (154.0 ± 89.0 mg (D $64.0 \div 298.0$, $p=0.0143$) compared to the weight of pineal glands from victims of accidents and murders (104.0 ± 34.0 mg (D $51.0 \div 198.0$)). This increase depended on the severity of the amyloid process. In the absence of amyloid lesions, there were no differences in pineal gland weights between suicides and non-suicides. Local amyloidosis of the pineal gland is possibly caused by hematogenic flux of bacteria, which also leads to the formation of calcinates.

Conclusions. Approximately 50% of the population had asymptomatic, local amyloidosis of the pineal gland. The presence of amyloidosis was not the cause of suicide. In suicides, the wet weight of the pineal gland depended on the severity of amyloid lesion.

Keywords: pineal gland; local amyloidosis; Congo red; thioflavin; suicides; accident; murder

For citation: Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P., Karyshev P.B., Voronov L.N. Local amyloidosis of the pineal gland. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(1): 104–111. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.104-111

Authors' contribution: concept and design of the study – Sapozhnikov S.P., Karyshev P.B., Kozlov V.A.; collection and processing of material – Karyshev P.B.; preparation of illustrative material – Kozlov V.A., Voronov L.N.; statistical processing – Kozlov V.A.; writing the text – Sapozhnikov S.P., Karyshev P.B., Kozlov V.A., Voronov L.N.; editing – Sapozhnikov S.P., Kozlov V.A., Voronov L.N.

For correspondence: **Kozlov Vadim Avenirovich**, Doctor of Biology, Candidate of Medical Sciences, Professor of the Department of Medical Biology with a course in Microbiology and Virology, e-mail: pooh12@yandex.ru

Financing. The study had no sponsorship

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

Information about the authors:

Kozlov V.A., <https://orcid.org/0000-0001-7488-1240>

Sapozhnikov S.P., <https://orcid.org/0000-0003-0967-7192>

Voronov L.N., <https://orcid.org/0000-0003-0504-4216>

Received 13.06.2020

Accepted 20.01.2022

Published 15.03.2022

Введение

К настоящему времени в литературе описано 39 различных системных и локальных амилоидозов [1]. Этот список был дополнен нами после выявления случаев локального амилоидоза небных миндалин у 32% больных с хроническим тонзиллитом [2]. Шишковидная железа – наименее исследованный орган, присутствие кальцинатов в котором является источником различных домыслов. Как правило, кальцинаты образуются в местах бактериальной инвазии в тех случаях, когда иммунная система организма не может справиться с возбудителем. Так известно образование кальцинатов в легких при туберкулезной инвазии и других инфекционных процессах [3]. В головном мозге также нередко кальцинаты обнаруживаются, например, при токсоплазмозе [4], либо у плодов при герпетической инфекции у матерей [5]. Поэтому наличие кальцинатов в ткани можно считать маркером ее бак-

териального инфицирования. Но, как мы обнаружили на примере небной миндалины, хроническая микробная инвазия сопровождается независимым от возраста пациента и длительности течения хронического тонзиллита сопутствующим амилоидозом миндалин, возможно, являющимся защитной реакцией.

Известно, что у части людей развивается возрастной амилоидоз, известный как болезнь Альцгеймера. Недавно эту патологию связали с инфицированием головного мозга *Porphyromonas gingivalis* – бактерией, вызывающей пародонтит [6]. Эти данные хорошо подтверждают выявленную нами связь локального амилоидоза миндалин с хроническим тонзиллитом.

Также известно, что гематоэнцефалический барьер в шишковидной железе и гипофизе выражен слабо. По этой причине следует ожидать, что по крайней мере шишковидная железа, кровоснабжение ко-

торой осуществляется от ветвей *a. chorioidea posterior*, а отток крови происходит в большую мозговую вену или её проток, может подвергаться локальному амилоидному поражению без вовлечения в процесс больших полушарий, то есть, представлять собой самостоятельный процесс, не связанный с болезнью Альцгеймера.

Цель исследования – выявление частоты встречаемости локального амилоидоза шишковидной железы у взрослых людей и изучение его возможной связи с кальцинозом шишковидной железы.

Методика

Материалом исследования служили изъятые при аутопсии шишковидные железы 92 суицидентов (90 случаев – повешение, 2 – отравление уксусной кислотой) и 69 лиц, погибших в результате насильственной смерти (удавление руками, петлей, ножевые ранения) и различных несчастных случаев (автотравма, черепномозговая травма, отравление суррогатами алкоголя). Из 161 исследованного случая – 37 женщин и 124 мужчин. Средний возраст суицидентов $43,0 \pm 14,0$ год (мужчин – $41,0 \pm 13,0$, женщин – $57,0 \pm 15,0$). Средний возраст погибших $45,0 \pm 14,0$ год (мужчин – $41,0 \pm 13,0$, женщин – $54,0 \pm 13,0$). Группа погибших служила эталоном сравнения. Обезличенный патогистологический материал, собранный в период с 1999 по 2003 гг. был предоставлен БУ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» Минздрава Чувашии. Во всех случаях при судебно-медицинском исследовании трупов морфологических признаков системного или локального амилоидоза, а также болезни Альцгеймера не установлено.

Гравиметрия. Изъятые шишковидные железы были зафиксированы в нейтральном 10% формалине, после чего они были частично препарированы для удаления жира и рядом расположенных тканей. Препарированные железы взвешивали на аналитических весах с точностью до миллиграмма. После этого железы обезжировали и заключали в парафин.

Окрашивание. Депарафинированные по обычному протоколу 4-х микронные парафиновые срезы окрашивали гематоксилином Карazzi, после чего проводили окрашивание 1% водным раствором конго красного по Н. Bennhold. Вторую серию срезов препаратов с выявленным амилоидом для верификации амилоидного поражения дополнительно окрашивали тиофлавином S.

Полученные препараты изучены методами световой и люминесцентной микроскопии. Интенсивность амилоидного поражения оценивали в баллах.

Дифференцировка препаратов по интенсивности локального амилоидного поражения. В связи с тем, что методы количественной оценки тяжести амилоидного поражения при оценке гистологических срезов шишковидной железы не разработаны, мы использовали условную шкалу в баллах. Балл 1 – «амилоидоз отсутствует» (никакие участки парафинового среза шишковидной железы не окрашиваются конго красным); 2 балла – «начальный амилоидоз» (конго окрашены отдельные септы и/или стенки сосудов мышечного типа, плотность окраски слабая, септы и стенки сосудов утолщены); 3 балла – «интенсивный амилоидоз» (конго окрашивает большую часть или весь срез, в том числе стенки сосудов, визуально наблюдается градиент интенсивности окрашивания конго, убывающий от центра среза к периферии); 4 балла – «гиперинтенсивный амилоидоз» (срез ярко окрашен в цвета конго, структура долек не выявляется, цитоархитектоника полностью нарушена, встречаются далеко отстоящие друг от друга клетки, «замурованные» в соединительную ткань, замещение долек песком носит сливной характер, могут обнаруживаться кисты).

Дифференцировка препаратов по количеству кальцинатов. Поскольку кальцинаты в срезах присутствуют, как правило, в виде множества накладывающихся друг на друга осколков, часть которых при резке явно выпала из препарата, а часть крупных кальцинатов была удалена сознательно при подготовке препарата к резке на микротоме вследствие риска повреждения ножа, – количественное содержание песка было оценено в условных баллах. Балл 1 – «кальцинаты отсутствуют», в пределах нескольких последовательных срезов кальцинаты не обнаружены, цитоархитектоника железы не изменена; 2 балла – «кальцинатов мало», в пределах нескольких последовательных срезов кальцинаты обнаруживаются в виде мелких жемчужин синего цвета, как правило, по периферии железы, структура долек не изменена; 3 балла – «кальцинатов много», в пределах нескольких последовательных срезов песком полностью замещено от одной до нескольких долек, контактов между замещенными дольками нет, песок представлен как жемчужинами синего и фиолетового цвета, так и острыми фиолетовыми множественными осколками; четыре балла – «кальцинатов очень много», в пределах нескольких последовательных срезов наблюдается картина замещения долек фиолетового цвета осколками кальцинатов с образованием многокамерных соединяющихся между собой полостей различного размера, песком замещена большая часть среза.

Статистическая оценка результатов. Полученные данные обработаны методами дескриптивной статистики, представлены в виде $M \pm m$, где M – средняя, m – среднее отклонение. Различия групп определяли с помощью z-теста. Анализ частот после рандомизации методом прямой стандартизации данных проводили с помощью теста Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Наличие связи между отдельными связанными параметрами оценивали с помощью регрессионного анализа.

Результаты

При последовательном окрашивании четырехмикронных парафиновых срезов шишковидной железы гематоксилином Карацци, а затем конго красным по Н. Vennhold у лиц, в железах которых не было отложений амилоида, наблюдается картина гистологической нормы. Дольки обычного размера, форма овально-гексагональная, больший диаметр овала преобладает над меньшим. В дольках наблюдаются светлые и темные пинеалоциты. Септы между дольками тонкие, едва визуализируются. В септах обнаруживаются фибробласты от 2 до 5 штук вокруг дольки. В пределах долек встречаются фиолетового цвета кальцинаты, замещающие часть дольки.

У 48,5% обследованных лиц вне зависимости от возраста и причины смерти обнаружено различной степени выраженности амилоидное поражение эпифиза.

При начинающемся амилоидозе структура долек близка к гексагональной, размеры большего и меньшего диаметров значительно не различаются. Дольки ярко выражены за счет разрастания соединительно-тканых септ, толщина которых по сравнению с нормой несколько увеличена. Часть долек замещена кальцинатами. Могут наблюдаться мелкие жемчужины кальцинатов, как правило, расположенные по периферии железы. Часть септ и стенок сосудов мышечного типа окрашены в цвета конго (**рис. а**) Может наблюдаться прорастание соединительной ткани септ внутрь некоторых долек с окрашиванием их в цвета конго.

При интенсивном амилоидозе шишковидной железы большая часть среза, либо срез полностью окрашены в цвета конго. Септы и стенки сосудов мышечного типа резко утолщены, окрашены в кирпично-красный цвет. Вследствие разрастания соединительной ткани структура долек нарушена, морфология клеток определяется с трудом. Наблюдается большое количество фибробластов, (**рис. б**). Могут встречаться полностью замещившие вещество долек крупные кальцинаты, окрашенные в цвета конго, вокруг которых

наблюдается аморфное вещество, окрашенное в цвета гематоксилина. Чаще дольки полностью замещены осколками кальцинатов фиолетового цвета.

При гиперинтенсивном амилоидном поражении срезы шишковидной железы плотно окрашены в кирпично-красный цвет. Большая часть долек замещена кальцинатами фиолетового цвета как в виде отдельных крупных и мелких жемчужин, так и, большей частью, в виде острых осколков, накладывающихся друг на друга. Структура долек не определяется, наблюдаются пустые полости, имеющие тенденцию к слиянию в многокамерные пустоты, (**рис. в**). Обнаруживается большое количество фибробластов, другие клетки дифференцируются с трудом. Могут встречаться группами и по одиночке лимфоциты и одиночные нейтрофилы. В некоторых случаях тяжелого амилоидного поражения обнаруживались явные кисты, заполненные гомогенным веществом, окрашенным в цвета конго, в этих случаях большая часть оставшегося органа была замещена соединительной тканью с «замурованными» в ней клетками. Кальцинаты могли встречаться как внутри кисты, так и за ее пределами.

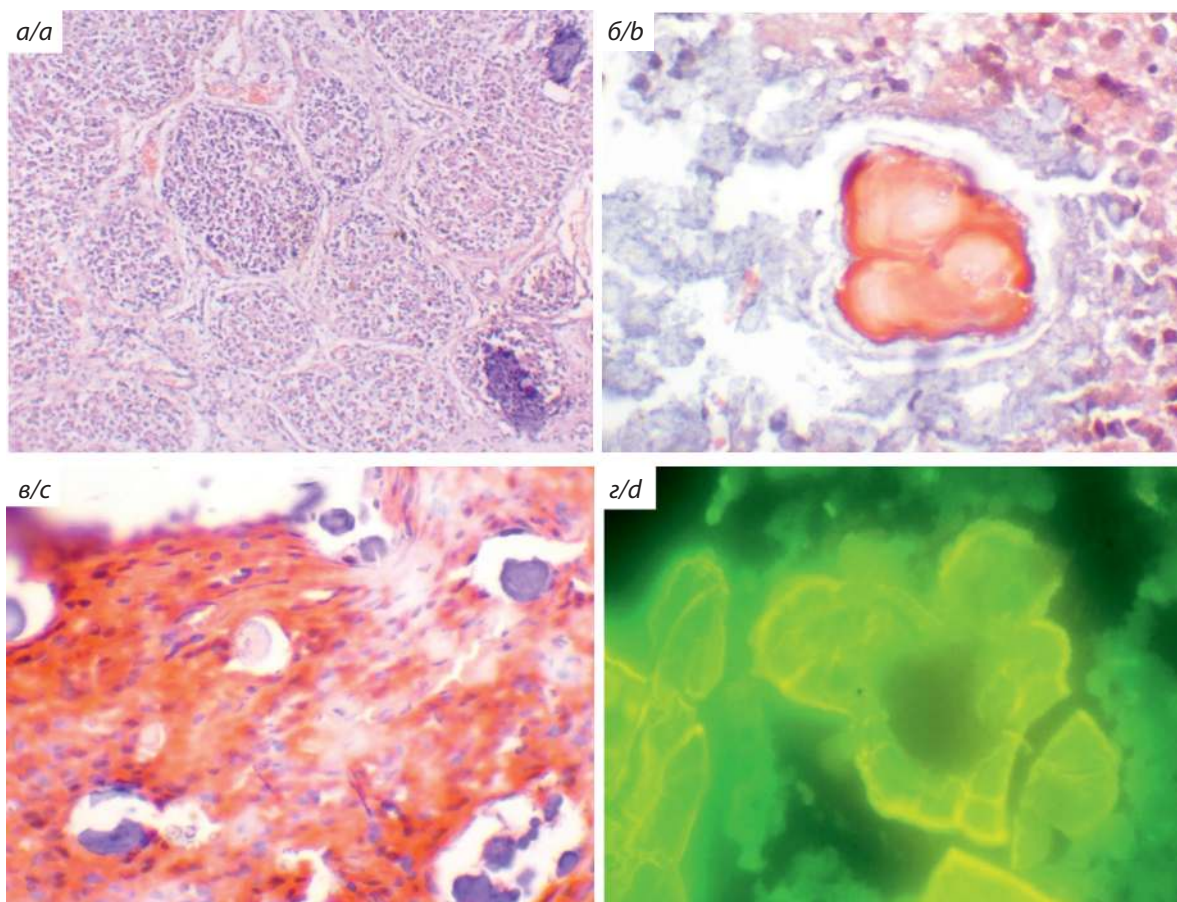
Во всех выявленных случаях локального амилоидоза шишковидных желез вне зависимости от тяжести амилоидного поражения в препаратах обнаруживались единичные, либо расположенные группами крупные клетки с цитоплазмой, окрашенной в цвета конго и хорошо дифференцируемым ядром, как правило, расположенным ацентралью.

Для подтверждения того, что конго в нашем исследовании специфично окрашивал амилоид, а наблюдавшаяся картина не была случайным артефактом, другая серия срезов была окрашена высокоселективным к амилоиду красителем – тиюфлавином S [7]. Как известно, тиюфлавины, связываясь с амилоидом, резко увеличивают свою флуоресценцию более чем в 1000 раз, по сравнению фоновой флуоресценцией вне присутствия амилоида [8]. Препараты, окрашенные тиюфлавином S, светятся зеленым и желто-коричневым цветом. Особенно ярко светятся кальцинаты (**рис. г**), интенсивность флуоресценции которых составила $33,8 \pm 14,8$ Мв (D $14,2 \div 56,1$ Мв). Интенсивность флуоресценции сосудов и соединительнотканной стромы была вдвое меньше $15,2 \pm 4,6$ Мв (D $4,2 \div 17,3$ Мв, $p=0,0001$). Результаты окрашивания тиюфлавином подтверждают, что в исследованных шишковидных железах действительно прижизненно развился локальный амилоидоз. Следует заметить, что индуцированная ультрафиолетом флуоресценция кальцинатов эпифиза без окрашивания срезов имеет голубой цвет [9].

Половозрастной состав обследованных и влажная масса их эпифизов без деления на суицидентов и погибших в результате несчастных случаев представлен в **табл. 1**. Средний возраст мужчин статистически значимо на 13 лет меньше, чем женщин. При этом средняя влажная масса шишковидных желез у женщин на 14% меньше, чем у мужчин. Также у женщин менее выражена вариабельность массы железы. Судя по гравиметрическим данным, вариабельность влажной массы шишковидной железы связана с полом, но не с возрастом. Коэффициент

корреляции Пирсона между возрастом обследованных и массой шишковидной железы как с учетом пола, так и без учета пола оказался равным в группе срвнения (у не суицидентов) $-0,09$ и у суицидентов $0,01$ ($p < 0,05$), что также свидетельствует об отсутствии связи влажной массы железы с возрастом. Без деления на подгруппы $r = 0,22$.

При гистологическом изучении шишковидных желез с помощью окрашивания конго красным и у части мужчин, и у части женщин обнаруживается различной степени плотности и протяженности



Цитоархитектоника пораженной амилоидозом шишковидной железы при окрашивании конго красным с предварительным окрашиванием ядер гематоксилином Карацци.

a – шишковидная железа начинающийся локальный амилоидоз. Полнокровие сосудов. Ув. 400; *б* – шишковидная железа интенсивный локальный амилоидоз. В центре кальцинат, окрашенный в цвета конго. Ув. 400; *в* – шишковидная железа гиперинтенсивный локальный амилоидоз. Ув. 400; *г* – кальцинаты в пораженной амилоидозом шишковидной железе при окрашивании тиофлавином S. Ув. 400.

Cytoarchitectonics of amyloid-affected pineal gland when stained with congo red with preliminary staining of the nuclei with hematoxylin Carazzi.

a – Pineal gland incipient local amyloidosis. Fullness of blood vessels. Magnification 400. *b* – Pineal gland intense local amyloidosis. In the center is calcinate, colored in the colors of the congo. Magnification 400. *А* – Pineal gland hyperintensive local amyloidosis. Magnification 400.

d – Calcinates in amyloid-affected pineal gland when stained with thioflavin S. Magnification 400.

по площади среза характерное для амилоидного поражения окрашивание соединительнотканной стромы железы и стенок сосудов. Для объективизации тяжести поражения нами была разработана описанная выше шкала тяжести амилоидного поражения. Поскольку число мужчин и женщин различается в 3,7 раза, для установления различий частот встречаемости амилоидного поражения в зависимости от тяжести поражения, нами был применен метод прямой стандартизации для выравнивания частот. За стандарт была принята полусумма обследованных (80 человек). Данные после проведения рандомизации представлены в **табл. 2**.

Из полученных данных следует, что амилоидное поражение шишковидной железы явление распространенное – локальный амилоидоз не обнаружен менее чем у 50% обследованных. Следует заметить, что об-

следованные – достаточно молодые люди и какие-либо прижизненные признаки возрастной деменции или болезни Альцгеймера не наблюдались. Кроме того, частоты встречаемости форм различной тяжести по полу не различаются.

Поскольку гендерные различия частот встречаемости амилоидного поражения и влажной массы шишковидных желез у обследованных не были выявлены, дальнейший статистический анализ в группах суицидентов и «не суицидентов» проводили без гендерного деления (**табл. 3, 4**). Анализ частот встречаемости амилоидного поражения шишковидной железы у суицидентов и «не суицидентов» по Колмогорову-Смирнову с поправкой Лиллиефорса не выявил различий ($p > 0,1$). Как видим, тяжелое поражение шишковидной железы наблюдается примерно у 20–30% обследованных. С увеличением тяжести амилоидного поражения

Таблица 1/Table 1

Половозрастной состав исследованных Gender and age composition of the studied**Gender and age composition of the subjects**

| Показатели/Indication | $M \pm m$ | D | Значения $p =$ P values = |
|--|------------------|-------------------|------------------------------|
| Женщины/Women, $n=37$ | | | |
| Возраст, лет/Age, years | 54 ± 18 | $18 \div 90$ | |
| Влажная масса шишковидной железы, мг Wet mass of the pineal gland, mg | 105 ± 46 | $52 \div 262$ | |
| Мужчины /Men, $n=124$ | | | |
| Возраст, лет/Age, years | $41,0 \pm 16,0$ | $14,0 \div 83,0$ | 0,0000 |
| Влажная масса шишковидной железы, мг Wet mass of the pineal gland, mg | $122,0 \pm 60,0$ | $42,0 \div 406,0$ | 0,0571 |

Таблица 2/Table 2

Число случаев амилоидоза после стандартизации данных по полусумме случаев ($n=80$)**The number of cases of amyloidosis after standardization of data by the half-sum of cases ($n=80$)**

| Амилоидоз: Amyloidosis: | Абсолютные значения Absolute values | | % | | Значения $p =$ P values = |
|------------------------------------|--|------------------|----------------|------------------|------------------------------|
| | Мужчины Men | Женщины Women | Мужчины Men | Женщины Women | |
| отсутствует absent | 28 | 32 | 35 | 41 | 0,6332 |
| начальный primary | 21 | 22 | 27 | 27 | 1,0000 |
| интенсивный intensive | 25 | 23 | 32 | 29 | 0,1381 |
| гиперинтенсивный hyperintensive | 6 | 2 | 7 | 3 | 0,3173 |

эпифизов у суицидентов наблюдается статистически значимое увеличение влажной массы железа (табл. 3). У не суицидентов такой закономерности не наблюдается, напротив, можно предполагать, что масса железа даже снижается, но различия статистически не значимы в связи с малым количеством наблюдений (табл. 4).

Средняя влажная масса эпифизов суицидентов и «не суицидентов», эпифизы которых не содержали амилоида (табл. 3 и 4), статистически не различается ($p=0,1371$).

В шишковидной железах с амилоидным поражением встречались подвижные клетки с окрашенной в цвет конго цитоплазмой и хорошо дифференцируемым ядром. В срезах эпифизов без амилоидного поражения данный тип клеток не встречался. У суицидентов эти клетки встречались в 51% исследованных срезов шишковидной железы. У «не суицидентов» – в 46%. В то же время, исходя из наших данных, можно сделать вывод, что амилоидное поражение шишковидной железы не влияло на частоту суицидов в исследуемой выборке.

Обсуждение

Кальцинаты шишковидной железы представлены различными гидрокси- и карбонатитами, фосфатами и гидрофосфатами. Кальцинаты могут включать в свой состав белки, нейраминаы, отдельные клетки [9] и, как мы видим, на наших препаратах, по-видимому, амилоид. В связи с особенностями кровоснаб-

жения шишковидная железа считается уязвимой для образования фторидов кальция и алюмофосфатов [10]. Алюминий, как полагают, участвует в образовании амилоида и, возможно, ответственен за развитие болезни Альцгеймера [11] и диализного амилоидоза [12]. В связи с вышеперечисленным, допустимо утверждение, что кальцинаты и амилоидоз шишковидной железы есть различные звенья одного процесса – защитной реакции органа на инфекционное и/или электролитное поражение. Ранее мы уже высказывали предположение, что патогенез амилоидозов может быть связан с неблагоприятной ионной силой среды, в которой оказывается белок-предшественник амилоида [13].

Обнаруженное нами амилоидное поражение шишковидной железы встречается с частотой, сопоставимой с амилоидным поражением миндалин, при котором тяжесть амилоидоза также не зависела от возраста обследуемых и была связана с хроническим тонзиллитом [2].

Полученные нами данные позволяют говорить о том, что отсутствие сведений о локальном амилоидозе шишковидной железы ведет к неправильной интерпретации результатов исследований этого органа. Например, было обнаружено, что по сравнению со взрослыми людьми у стариков наблюдается дезорганизация структуры шишковидной железы в виде стирания границ между дольками и преобладания стромы (трабекул) над паренхимой [14]. Но в нашем исследовании аутентичные гистологические изменения происходили в результате амилоидного процесса. То есть, амилоидный процесс этими авторами был принят за возрастную инволюцию.

Таблица 3/ Table 3

Средняя влажная масса эпифизов у суицидентов в зависимости от наличия или отсутствия амилоидного поражения

Average wet weight of epiphyses in suicidal patients, depending on the presence or absence of amyloid lesion

| Амилоидоз: Amyloidosis: | N | M±m | D | p= |
|------------------------------------|---------|------------|------------|---------------|
| отсутствует absent | 35 (30) | 104,0±37,0 | 51,0÷198,0 | |
| начальный primary | 31 (27) | 105,0±25,0 | 55,0÷183,0 | 0,6637 |
| интенсивный intensive | 18 (16) | 136,0±83,0 | 51,0÷406,0 | 0,0570 |
| гиперинтенсивный hyperintensive | 8 (7) | 154,0±89,0 | 64,0÷298,0 | 0,0143 |

Примечание. Здесь и в табл. 4 в столбце N в скобках представлены рандомизированные методом прямой стандартизации данные частот встречаемости, стандарт – 80.

Note. Here and in table 4, column N, in parentheses, there are incidence rates with standard 80 randomized by direct standardization.

Таблица 4/ Table 4

Средняя влажная масса эпифизов у «не суицидентов» в зависимости от наличия или отсутствия амилоидного поражения

Average wet weights of epiphyses in non-suicidal patients, depending on the presence or absence of amyloid lesion

| Амилоидоз: Amyloidosis: | N | M±m | D | p= |
|------------------------------------|---------|------------|------------|--------|
| отсутствует absent | 23 (27) | 123,0±64,0 | 53,0÷275,0 | |
| начальный primary | 25 (29) | 121,0±51,0 | 52,0÷262,0 | 0,6396 |
| интенсивный intensive | 19 (22) | 114,0±51,0 | 42,0÷260,0 | 0,6288 |
| гиперинтенсивный hyperintensive | 2 (2) | 78,0±16,0 | 66,0÷89,0 | 0,3403 |

Выводы:

- 1) примерно у 50% населения встречается бессимптомный локальный амилоидоз шишковидной железы;
- 2) наличие амилоидоза шишковидной железы не является причиной суицида;
- 3) у суицидентов наблюдается зависимое от тяжести амилоидного поражения увеличение влажной массы железы.

Литература

(п.п. 1; 2; 4; 6–8; 10–12 см. References)

3. Коновалов В.К., Колмогоров В.Г., Лобанов М.Н., Леонов С.Л., Шайдук А.М., Федоров В.В. и др. Особенности селективной денситометрии шаровидных образований легких при мульти-спиральной компьютерной томографии. *Российский онкологический журнал*. 2014; 19(5): 14–23.
5. Санталова Г.В., Гасилина Е.С., Валева Г.Р., Шарыпова М.А., Ефимова И.Л., Плахотникова С.В. и др. Оценка состояния здоровья детей, рожденных от герпес-инфицированных матерей. *Бюллетень медицинских интернет-конференций*. 2013; 3(1): 20.
9. Гульков А.Н., Рева И.В., Рева Г.В., Ямамото Т., Альбрандт К.Ф., Грахова Н.В., и др. Мозговой песок эпифиза при ишемии мозга. *Фундаментальные исследования*. 2014; 10-4: 654–9.
13. Козлов В.А., Сапожников С.П., Шептухина А.И., Голеньков А.В. Сравнительный анализ различных моделей амилоидоза. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2015; 70(1): 5–11.
14. Соколов Д.А., Бугримов Д.Ю. Материалы к возрастной морфологии шишковидной железы человека. *Вестник новых медицинских технологий*. 2011; 18(2): 268–9.

References

1. Sipe J.D., Benson M.D., Buxbaum J.N., Ikeda S.-i., Merlini G., Saraiva M.J.M., et al. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification. International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid. The Journal of protein folding disorders*. 2016; 23(4): 209–13.
2. Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P., Fufaeva A.I. *Chronic tonsillitis as an inducer of the tonsils amyloidosis / Materials of the International Conference «Scientific research of zzhthe SCO countries: synergy and integration»*. Reports in English. Part 4. March 26, 2019. Beijing, PRC. P. 118–27.

Сведения об авторах:

Козлов Вадим Авенирович, доктор биол. наук, канд. мед. наук, проф., доцент, каф. медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии, e-mail: pooh12@yandex.ru;

Сапожников Сергей Павлович, доктор мед. наук, доцент, зав. каф. медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии;

Карышев Павел Борисович, лаборант каф. медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии;

Воронов Леонид Николаевич, доктор биол. наук, проф., каф. медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии.

3. Konovalov V.K., Kolmogorov V.G., Lobanov M.N., Leonov S.L., Shaiduk A.M., Fedorov V.V., et al. Features of selective densitometry of spherical lung formations in multispiral computed tomography. *Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal*. 2014; 19(5): 14–23. (in Russian)
4. Kuratsu J., Matsukado Y., Nonaka N., Itoyama Y., Miura G. Acquired intracerebral toxoplasmosis presented as calcified mass lesions. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 1985; 25(1): 42–4. DOI: 10.2176/nmc.25.42
5. Santalova G.V., Gasilina E.S., Valeeva G.R., Sharypova M.A., Efimova I.L., Plakhotnikova S.V., et al. Assessment of the health status of children born from herpes-infected mothers. *Byulleten meditsinskikh internet-konferentsiy*. 2013; 3(1): 20. (in Russian)
6. Dominy S.S., Lynch C., Ermini F., Benedyk M., Marczyk A., Konradi A., et al. Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv*. 2019; 5(1): eaau3333. doi: 10.1126/sciadv.aau3333
7. LeVine H. 3rd. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol*. 1999; 309: 274–84. DOI: 10.1016/s0076-6879(99)09020-5
8. Maskevich A.A., Stsiapura V.I., Kuzmitsky V.A., Kuznetsova I.M., Povarova O.I., Uversky V.N., et al. Spectral properties of thioflavin T in solvents with different dielectric properties and in a fibril-incorporated form. *J Proteome Res*. 2007; 6(4): 1392–401. DOI: 10.1021/pr0605567
9. Gulkov A.N., Reva I.V., Reva G.V., Yamamoto T., Albrandt K.F., Grakhova N.V., et al. Brain sand of the epiphysis in cerebral ischemia. *Fundamentalnye issledovaniya*. 2014; 10-4: 654–9. (in Russian)
10. Luke J. Fluoride deposition in the aged human pineal gland. *Caries Res*. 2001; 35(2): 125–8. DOI: 10.1159/000047443
11. Exley C., Esiri M.M. Severe cerebral congophilic angiopathy coincident with increased brain aluminum in a resident of Camelford, Cornwall, UK. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006; 77(7): 877–9. DOI: 10.1136/jnnp.2005.086553
12. Toni A., Paderni S., Sudanese A., Guerra E., Stea S., Savarino L., et al. Osteoarticular amyloidosis in a patient under dialysis treated by total hip arthroplasty: case report and review of the literature. *Chir Organi Mov*. 2003; 88(4): 385–96.
13. Kozlov V.A., Sapozhnikov S.P., Sheptukhina A.I., Golenkov A.V. Comparative analysis of various models of amyloidosis. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2015; 70(1): 5–11. (in Russian)
14. Sokolov D.A., Bugrimov D.Yu. Materials for the age morphology of the human pineal gland. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2011; 18(2): 268–9. (in Russian)

Обзоры

© Гарбузенко Д.В., 2022

УДК 616-092

Гарбузенко Д.В.

Молекулярные стимулы фиброгенной активации звёздчатых клеток печени

ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 454092, Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64

Цель обзора – оценка роли молекулярных стимулов фиброгенной активации звёздчатых клеток печени (ЗКП), играющих важную роль в печёночном фиброгенезе. Показано, что для переформатирования неподвижных ЗКП в активированный миофибробластоподобный фенотип требуется изменение экспрессии нескольких сотен различных генов. Ряд стимулирующих факторов способны влиять на рецепторы для множества паракринных и аутокринных индукторов этого процесса. Возможными ключевыми регуляторами активации ЗКП являются мультидоменная сигнальная молекула GIV/Girdin и метил-СрG-связывающий белок 2 (MeCP2). Кроме того, их трансдифференцировка может быть обусловлена эпигенетическими механизмами, которые включают метилирование ДНК и модификации гистонов, и контролируются многочисленными некодирующими РНК. Сохранять экспансию и профиброгенную активность ЗКП при постоянном воздействии агрессивного агента способно устойчивое увеличение сигнальной трансдукции hedgehog (Hh). Содействует печёночному фиброгенезу и аутофагия в ЗКП. Под влиянием молекулярных стимулов ЗКП вступают в клеточный цикл и проходят фазу начальной, а затем устойчивой активации. В это время происходят многочисленные изменения в транскрипции генов коллагена I типа, α-гладкомышечного актина (α-SMA), трансформирующего фактора роста (TGF)-β1 и его рецепторов, матриксной металлопротеиназы (ММП)-2, тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ (ТИМП)-1 и 2, чему способствуют отсутствующие в неподвижных ЗКП транскрипционные факторы Ets-1, Mef2, CREB, Egr-1, JunD, рецептор витамина D, CCAAT/энхансер-связывающий белок β (C/EBP-β) и другие. Понимание патофизиологических механизмов активации ЗКП является чрезвычайно важным для разработки таргетной антифибротической терапии. Внедрение её в клиническую практику позволит улучшить прогноз при хронических заболеваниях печени и повысить качество жизни пациентов.

Ключевые слова: фиброз печени; патогенез; звёздчатые клетки печени; активация

Для цитирования: Гарбузенко Д.В. Молекулярные стимулы фиброгенной активации звёздчатых клеток печени. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1): 112–119.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.112-119

Участие автора: концепция и дизайн исследования, сбор и анализ материала, подготовка иллюстративного материала, написание текста – Гарбузенко Д.В.

Для корреспонденции: Гарбузенко Дмитрий Викторович, e-mail: garb@inbox.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.09.2021

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Garbuzenko D.V.

Molecular stimuli of fibrogenic activation in hepatic stellate cells

South Ural State Medical University,
Vorovskogo St. 64, Chelyabinsk 454092, Russian Federation

The aim of this review was to describe the molecular stimuli of fibrogenic activation in hepatic stellate cells (HSCs), which play an important role in hepatic fibrogenesis. It has been established that the transformation of quiescent HSCs into activated, myofibroblast-like phenotypes requires changes in the expression of several hundred different genes. A number of stimulating factors is able to influence the receptors for a variety of paracrine and autocrine inducers of this process. Possible key regulators of HSCs activation are the multidomain signaling molecules GIV/Girdin and methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2). In addition, their trans-differentiation may be due to epigenetic mechanisms, which include DNA methylation and histone modifications, and are con-

trolled by numerous non-coding RNAs (ncRNAs). A steady increase in the hedgehog (Hh) signal transduction is able to maintain the expansion and pro-fibrogenic activity of HSCs with constant exposure to an aggressive agent. The HSC autophagy also contributes to hepatic fibrogenesis. Under the influence of molecular stimuli, HSCs enter the cell cycle and undergo phases of initial and then perpetual activation. At this time, there are numerous changes in the transcription of genes of type I collagen, α -smooth muscle actin (α -SMA), transforming growth factor (TGF)- β 1 and its receptors, matrix metalloproteinase (MMP)-2, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2. This is facilitated by transcription factors that are absent in quiescent HSCs, such as Ets-1, Mef2, CREB, Egr-1, JunD, vitamin D receptor, CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP- β), etc. Understanding the pathophysiological mechanisms of HSC activation is extremely important for the development of targeted antifibrotic therapy. Its introduction into clinical practice will improve the prognosis for chronic liver diseases and enhance the quality of life of such patients.

Keywords: liver fibrosis; pathogenesis; hepatic stellate cells; activation

For citation: Garbuzenko D.V. Molecular stimuli of fibrogenic activation in hepatic stellate cells. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(1): 112–119. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.112-119

Author's contribution: concept and design of the study, collection and analysis of material, preparation of illustrative material, writing text – Garbuzenko D.V.

For correspondence: **Garbuzenko D.V.**, Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Faculty Surgery of South Ural State Medical University, e-mail: garb@inbox.ru

Financing. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Information about the authors:

Garbuzenko D.V., <https://orcid.org/0000-0001-9809-8015>

Received 09.09.2021

Accepted 20.01.2022

Published 15.03.2022

Список сокращений:

ФП – фиброз печени
 ЗКП – звёздчатые клетки печени
 СЭК – синусоидальные эндотелиальные клетки
 α -SMA – α -гладкомышечный актин
 TGF – трансформирующий фактор роста
 HGF – гепатоцитарный фактор роста
 PDGF – тромбоцитарный фактор роста
 TNF – фактор некроза опухолей
 IL – интерлейкин
 ВКМ – внеклеточный матрикс
 ММП – матриксные металлопротеиназы
 ТИМП – тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ
 PPARs – рецепторы, активируемый пероксисомными пролифераторами
 RARs/RXR – рецепторы ретиноидной кислоты
 PXR – прегнан-х-рецептор
 KLFs – Круппель-подобные факторы
 GIV/Girdin – G α -взаимодействующий везикул-ассоциированный белок
 MeCP2 – метил-СрG-связывающий белок 2
 DNMT – ДНК-метилтрансферазы
 miRNAs – микроРНК
 lncRNAs – длинные некодирующие РНК
 NO – оксид азота

Ежегодно хронические заболевания печени (ХЗП) являются причиной смерти более двух миллионов человек во всём мире, что вместе с тяжёлым бременем инвалидности и обращаемости за медицинской помощью, делает проблему чрезвычайно актуальной. Неблагоприятным исходом ХЗП служит фиброз печени (ФП), завершающийся при прогрессировании процесса циррозом, тяжесть клинических проявлений которого обусловлена, прежде всего, печёночной недостаточностью, портальной гипертензией и развитием осложнений, сопровождающихся высокой летальностью [1]. Звёздчатые клетки печени (ЗКП) в физиологических условиях находятся в неподвижном состоянии и служат местом хранения эфиров ретинола. При ХЗП генерируется и приобретение ими фиброгенных и провоспалительных свойств [2].

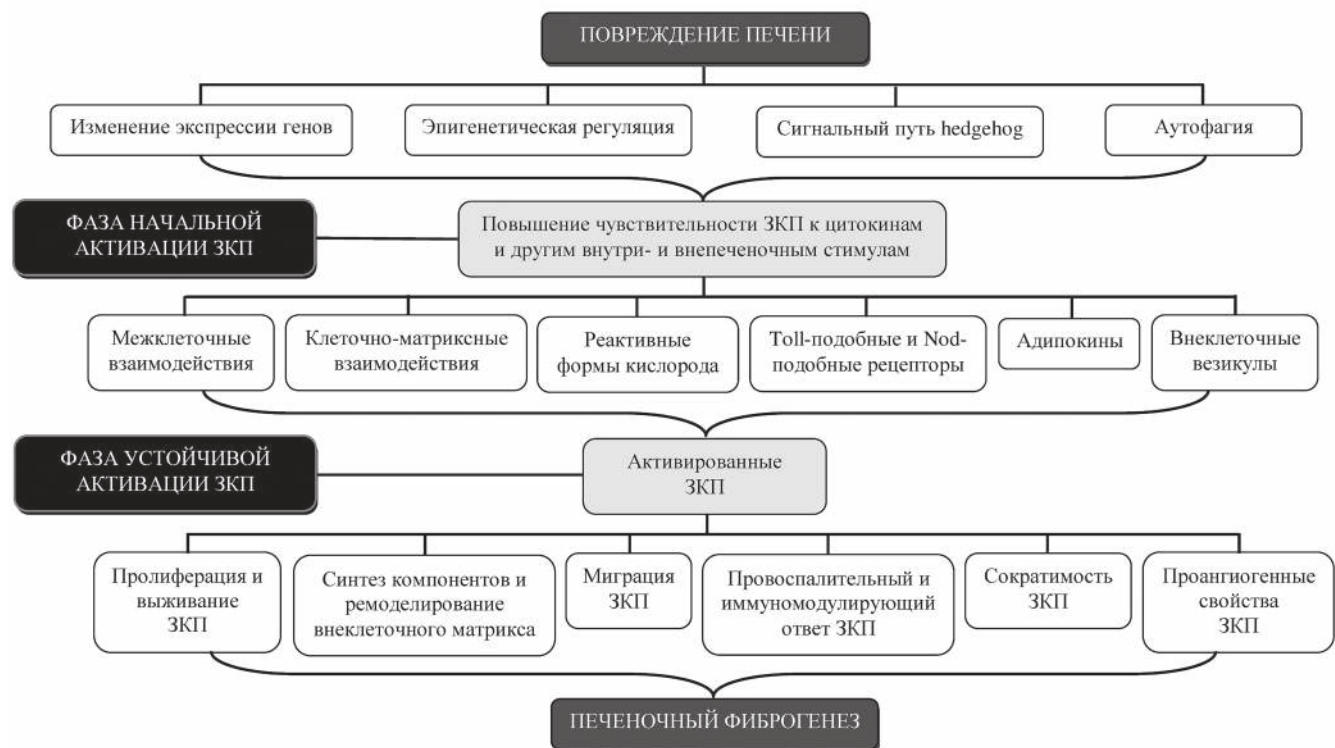
Цель обзора — ознакомление с молекулярными стимулами фиброгенной активации ЗКП, играющими важную роль в печёночном фиброгенезе. Под их влиянием ЗКП вступают в клеточный цикл и проходят фазу начальной, а затем устойчивой активации (**рисунок**). В это время происходят многочисленные изменения в транскрипции генов коллагена I типа, α -гладкомышечного актина (α -SMA), трансформирующего фактора роста (TGF)- β 1 и его рецепторов, матриксной металлопротеиназы (ММП)-2, тканевых ингибиторов матриксных металлопротеи-

наз (ТИМП)-1 и 2, чему способствуют отсутствующие в неподвижных ЗКП транскрипционные факторы, такие как Ets-1, Mef2, CREB, Egr-1, JunD, рецептор витамина D, ССААТ/энхансер-связывающий белок β (С/ЕВР-β) и др. [3].

Изменение экспрессии генов. Преобразование неподвижных ЗКП в активированный миофибробластоподобный фенотип требует изменения экспрессии нескольких сотен различных генов. Часть транскрипционных факторов, к которым относятся рецептор, активируемый пероксисомными пролифераторами (PPAR)γ, рецепторы ретиноидной кислоты (RXRs и RARs), прегнан-х-рецептор (PXR) и ген Lhx2 контролируют фенотип покоя ЗКП. Напротив, Круппель-подобный фактор 6 (KLF6), Gα-взаимодействующий везикул-ассоциированный белок (GIV/Girdin, от англ. Gα-interacting, vesicle-associated protein/Girdin), сигнальный белок рилин и метил-СрG-связывающий белок 2 (MeCP2) способствуют трансформации ЗКП в миофибробласты.

PPARs принадлежат к суперсемейству ядерных гормональных рецепторов и являются специализирован-

ными транскрипционными факторами, которые связывают ДНК и регулируют транскрипцию лиганд-зависимым образом. Они управляют экспрессией генов после связывания с RXR в качестве гетеродимерного партнера со специфическими элементами последовательности ДНК, называемыми элементами ответа пролифератора пероксисом. Известны 3 основных изоформа PPARs: PPARα, PPARβ/δ и PPARγ, каждый из которых имеет отчетливый тканеспецифический паттерн экспрессии. Результаты многочисленных исследований показали важную роль PPARγ в регуляции неподвижных и инактивированных фенотипов ЗКП [4]. Они позитивно влияют на гепатоцитарный фактор роста (HGF), который в результате нарушения TGF-β1 сигнализации уменьшает активацию ЗКП и снижает секрецию коллагена, а также может способствовать восстановлению печени после повреждения [5]. При этом, PPARγ стимулируют активность промотора HGF и увеличивают мРНК HGF в фибробластах. Отмечалось, что экспрессия PPARγ в ЗКП отрицательно контролируется через MeCP2- и EZH2-зависимую репрессию транскрипции промотора PPARγ, а сигналь-



Фазы фиброгенной активации звездчатых клеток печени (ЗКП).

Phases of fibrogenic activation in hepatic stellate cells (HSCs).

ный путь ETS1/PPAR γ положительно регулирует экспрессию PPAR γ в неподвижных ЗКП [6].

RARs и близкие им по структуре RXRs включают в себя 3 подтипа, а именно α , β и γ . Все подтипы RARs/RXRs, за исключением RXR γ , хорошо выражены в неподвижных ЗКП, при активации которых их экспрессия снижается. Механизм этого пока не установлен, более того, результаты различных исследований не редко противоречат друг другу [7]. Транскрипционный фактор PXR является орфанным ядерным рецептором (NR1I2), активность которого в большинстве случаев модулируется стероидными лигандами. Он транскрипционно функционирует в ЗКП человека и способен связывать свои активаторы: прегнан, желчные кислоты, а также лекарственные лиганды, такие как рифампицин, гиперфорин, ловастатин, клотримазол и метирапон, в результате чего ингибирует их трансдифференцировку и пролиферацию. Кроме того, активация PXR подавляет профиброгенный эффект TGF- β 1 [8].

LIM-домен признан одним из ключевых компонентов регуляторной системы клетки, при этом ген 2 гомеобокса LIM (Lhx2) функционирует в ЗКП для сохранения их покоящегося фенотипа. Было показано, что повышенная экспрессия Lhx2 снижала уровни коллагена I типа и α -SMA, а его отсутствие блокировало продукцию тромбоцитарного фактора роста (PDGF), MMP-2 и 3, TIMP-1 и 2, а также и пролил-4-гидроксилазы [9].

KLFs представляют собой семейство факторов транскрипции, содержащих цинковые пальцы, которые регулируют пролиферацию, дифференцировку, развитие, регенерацию и запрограммированную гибель клеток. Индукция KLF6 заметно усиливается с началом активации ЗКП, что сопровождается транскрипцией коллагена I типа, TGF- β 1 и стимулирует некоторые другие компоненты этого пути, включая рецепторы TGF- β I и II типов и активатор плазминогена урокиназного типа [10].

Ключевым регулятором активации ЗКП также может быть GIV/Girdin – мультидоменная сигнальная молекула, усиливающая сигнальный путь PI3K-Akt связанных с G-белком и факторами роста рецепторов. GIV/Girdin находится в точке конвергенции нескольких регулирующих печёночный фиброгенез внутриклеточных сигнальных путей, включая PI3K-Akt- FOXO1, TGF β 1-SMAD и cAMP-PKA-pCREB [11].

Известно, что расположенный на хромосоме 7q22 ген RELN кодирует сигнальный белок рилин, который играет ключевую роль в миграции нескольких типов нейрональных клеток и в развитии нейронных связей. За пределами центральной нервной системы важ-

ным источником рилина является печень, а его участие в печёночном фиброгенезе было подтверждено в ряде исследований [12]. Предполагается, что рилин модулирует воспалительный ответ, опосредованный резидентными и проникшими в печень иммунными клетками. Кроме того, он регулирует фиброгенную активацию ЗКП посредством аутокринных и паракринных сигнальных путей, в результате которых рилин вызывает изменения в самих ЗКП и перекрестные помехи с нерезидентными клетками печени (например, рекрутированными макрофагами и тромбоцитами). Однако лежащие в их основе клеточные и биохимические механизмы до настоящего времени окончательно не установлены [13].

Экспрессируемый ЗКП MeCP2 вместе с MBD1, MBD2, MBD3 и MBD4 относится к семейству ядерных белков, которых объединяет наличие метил-CpG-связывающего домена. Для регуляции транскрипции он связывается с метилированными участками ДНК и участвует в печёночном фиброгенезе. MeCP2 изменяет ландшафт длинных некодирующих РНК (lncRNAs), способствуя превращению неподвижных ЗКП в миофибробласты, и необходим для работы генов, которые отвечают за прогрессирование репликации ДНК в ЗКП [14].

Эпигенетическая регуляция. В настоящее время известно, что эпигенетические механизмы, включая метилирование ДНК, модификации гистонов и некодирующие РНК управляют многими аспектами печёночного фиброгенеза [15].

В частности, aberrантные паттерны метилирования ДНК ассоциируются с неподходящей репрессией генов и развитием ФП. ЗКП во время трансдифференцировки начинают экспрессировать MeCP2, который способен подавлять транскрипцию с промоторов метилированных генов, опосредуя эпигенетическое молчание гена PPAR γ . При участии гистоновых метилтрансфераз EZH2 и ASH1 MeCP2 функционирует как ключевой эпигенетический регулятор трансдифференцировки ЗКП. EZH2 индуцируется на уровне белка в её начальной стадии и рекрутируется в ген PPAR γ , вызывая накопление репрессивной сигнатуры H3K27me3 хроматина. Это необходимо для перепрограммирования неактивного транскрипта ЗКП в фенотип миофибробластов. Параллельно с этим ASH1 рекрутируется в промоторные области генов α -SMA, коллагена I типа (α 1), TIMP-1 и TGF- β 1, способствуя активному состоянию транскрипции [16]. Кроме того, трансдифференцировка ЗКП сопровождается изменением экспрессии регулирующих метилирование и гидроксиметилирование ДНК ферментов. Так, наличие ФП было

связано с увеличением поддерживающей ДНК-метилтрансферазы (DNMT)1 и *de novo* DNMT3a и DNMT3b, уменьшением регуляторных ферментов семейства TET (от англ. ten-eleven translocation), а также TET-регулируемым превращением 5-метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин, что может приводить к активации транскрипции или увеличению её элонгации [17].

Ряд исследований выявили регуляторную роль модификаций гистонов при повреждении печени, причём большинство из них связаны с изменениями ацетилирования гистонов в результате фармакологического применения ингибиторов гистондеацетилазы (HDAC), например, класса I и II. При этом, механизм влияния HDAC-1 на миофибробласты может быть, в частности, объяснён противовоспалительным и антифиброгенным действием вследствие взаимодействия HDAC-1 с гистонами таких генов, как *Ccl2*, *Sxcl10*, *Gm-csf* и ММП-13 [18]. Другим способом регуляции ацетилирования гистонов является ингибирование бромодомена. Было показано, что целевое подавление бромодоменсодержащего белка 4 (BRD4) препаратом JQ1 блокировало активацию и способность ЗКП к пролиферации [19].

Эпигенетический ландшафт при ФП также контролируют многочисленные некодирующие РНК, которые являются функциональными транскриптами РНК, регулирующими экспрессию генов на уровне транскрипции, процессинга и посттранскрипции. Они не участвуют в кодировании белков, но взаимодействуют в экспрессии генов [20].

Одной из наиболее изученных групп некодирующих РНК являются микроРНК (miRNAs). В частности, miR-21, вызывает активацию ЗКП путем связывания нескольких транскриптов, включая PDCD4, SMAD7 и PTEN. Таргетирование PDCD4 в этом случае приводит к порочному кругу, когда усиленная продукция miR-21 в ЗКП ингибирует экспрессию антифибротических генов SMAD7, PTEN, SPRY2 и NHF4A, что в свою очередь способствует активации ЗКП. Многочисленные miRNAs, в том числе miR-33a, 34a, 34c, 130a и 130b, регулируют функцию PPAR γ в активированных ЗКП. Специфически нацеленные на 3'-UTR мРНК PPAR γ miR-130a и 130b способствуют снижению их выраженности, а впоследствии к повышению экспрессии профибротических генов ACTA2, COL1A1 и ТИМП-1. Несколько miRNAs непосредственно отвечают за стабильность генов, которые кодируют белки внеклеточного матрикса (ВКМ) и ВКМ-процессирующих ферментов. Например, miR-29a и miR-29b дестабилизируют мРНК COL1A1, а miR-29b вдобавок ингибирует созревание коллагена пу-

тем связывания мРНК белка теплового шока HSP47 и лизилоксидазы с дальнейшей опосредованной подавлением SMAD3 активацией ЗКП. miR-122 влияет на участвующий в процессинге коллагена фермент P4HA, а также ингибируя сывороточный фактор ответа – транскрипционный фактор, который контролирует активацию фиброгенных клеток, блокирует экспрессию COL1A1 и ACTA2 [21].

В ряде исследований была изучена роль lncRNAs в активации ЗКП. Так, ген lncRNA PVT1 способствует этому путем конкурентного связывания ингибирующей miR-152. Напротив, lncRNA p21, экспрессия которой уменьшается при циррозе печени, подавляет пролиферацию ЗКП, выраженность ACTA2 и COL1A1 посредством конкурентного связывания регулирующей экспрессию белка p27 и PTEN miR-181b. Тем временем, ген lncRNA GAS5 подавляет фиброгенез в результате конкурентного связывания miR-222, а ген lncRNA MEG3, экспрессия которой снижается при ФП, негативно регулирует выраженность ACTA2 и COL1A1 и блокирует пролиферацию ЗКП [22]. Экспрессия lncRNA HOTAIR (от англ. *Ho*x transcript antisense intergenic RNA) – некодирующий транскрипт HOX антисмысловый межгенной РНК значительно повышается у мышей с СС14-индуцированным ФП, при ФП у людей и активированных ЗКП при стимуляции TGF- β 1 [23]. Экспрессия lncRNA NEAT1 (от англ. *nuclear paraspeckle assembly transcript 1*) значительно повышается у мышей с СС14-индуцированным ФП и активированных ЗКП. Её утрата подавляет ФП *in vivo* и *in vitro*, тогда как сверхэкспрессия, при участии оси miR-122-KLF6, усиливает активацию ЗКП, способствуя повышению их пролиферации и продукции коллагена. Кроме того, выявлена положительная корреляция увеличенного уровня NEAT1 с маркерами ФП у страдающих им пациентов [24].

Таким образом, повышенные уровни DNMT, белка TET3 семейства TET и MeCP2 способствуют активации и трансдифференцировке ЗКП. Гистоновая метилтрансфераза ASH1 индуцирует экспрессию фиброгенных генов, включая COL1A1, ACTA2 (α -SMA) и ТИМП-1, что приводит к накоплению ВКМ. Существенную роль в эпигенетическом ландшафте при ФП также играют регулирующие работу генов некодирующие РНК, в частности, miRNAs и lncRNAs.

Сигнальный путь hedgehog. Сигнальный путь hedgehog (Hh) регулирует пролиферацию, апоптоз, миграцию и дифференцировку клеток. Помимо важной роли в морфогенезе тканей во время развития плода, он модулирует восстановительные реакции, например,

при хронических заболеваниях печени, когда большинство популяций клеток, включая гепатоциты, холангиоциты, синусоидальные эндотелиальные клетки (СЭК), ЗКП и НКТ-клетки (от англ. natural killer T cells), под воздействием цитотоксического или проапоптотического стресса экспрессируют лиганды Нн [25]. Это происходит одновременно с подавлением активированными ЗКП и СЭК выраженности Нн-взаимодействующих белков, что обеспечивает лиганд-рецепторную связь и стимулирует сигнальный путь Нн в Нн-чувствительных клетках, таких как НКТ клетки, холангиоциты, овальные клетки и неподвижные ЗКП. Повышенная экспрессия лигандов Нн в печени возникает параллельно с увеличением числа Нн-чувствительных клеток и зависит от степени её повреждения и выраженности ФП.

Существует несколько механизмов, в результате которых паракринная стимуляция сигнального пути Нн в ЗКП способствует и/или поддерживает печёночный фиброгенез. Например, лиганды Нн могут активировать и привести к трансдифференцировке ЗКП, содействовать их пролиферации и способности синтезировать и высвобождать компоненты внеклеточного матрикса. Экспансия ЗКП вызывает увеличение критических профиброгенных факторов, вырабатываемых ими в аутокринно-паракринной петле (в основном PDGF и TGF- β 1), что также может усугубить связанные с сигнальным путем Нн события и стимулировать дальнейшую продукцию лигандов Нн.

Таким образом, если временная активация сигнального пути Нн в некоторой степени необходима для восстановления печени после её острого повреждения, то устойчивое увеличение сигнальной трансдукции Нн при постоянном воздействии агрессивного агента может сохранять экспансию и профиброгенную активность критических типов клеток, главным образом, ЗКП/миофибробластов [26].

Аутофагия. В настоящее время аутофагия рассматривается как система динамического рециклинга, которая необходима для обновления клеток и гомеостаза, а полученные продукты деградации могут быть использованы для синтеза нового белка, выработки энергии и глюконеогенеза. Она играет важную роль в жизнедеятельности клеток, как в норме, так и при различных патологических состояниях, в частности, печёночном фиброгенезе, где её функция клеточно-специфична [27].

Во время активации ЗКП аутофагия является строго регулируемым процессом, который сохраняет их энергетический гомеостаз посредством гидролиза сложных эфиров ретинола с образованием жирных

кислот. Она может быть частью более широкой реакции метаболического репрограммирования, при этом способствуют ей сигнальный путь Нн, X рецептор печени (LXR), член семейства ядерных рецепторов Rev-ErbA Rev- $\text{er}\beta$, который наряду с PPAR γ особенно важен для сохранения адипогенного фенотипа ЗКП [28]. Энергообеспечение активированных ЗКП осуществляется аутофагической деградацией хранящихся в них липидных капель, что, возможно, связано с повышенной экспрессией альфа-субъединицы гуанин нуклеотид-связывающего G-белка 12 (G α 12) [29]. Важный для аутофагии белок p 62 подавляет фиброгенный ответ ЗКП, вызывая образование гетеродимеров между рецептором витамина D и RXR α [30]. Регулировать аутофагию в активированных ЗКП могут гипоксия-индуцибельный фактор (HIF)-1 α [31], TGF- β 1 [32], а также негистоновый ядерный белок HMGB1 (от англ. High Mobility Group Box Protein 1) [33].

В отличие от ЗКП, в печёночных макрофагах аутофагия выполняет антифибротическую функцию. Например, предотвращая высвобождение из них воспалительных цитокинов, в частности интерлейкин (IL)-1, она снижает активацию ЗКП. Кроме того, аутофагия в печёночных макрофагах противодействует ферменту моноацилглицерол-липазе, который метаболизирует 2-арахидоноилглицерин в арахидоновую кислоту для их активации. Аутофагия также важна для поддержания эндотелиального гомеостаза во время хронического повреждения печени. Её утрата усугубляет фиброз печени за счет снижения внутрипеченочного оксида азота (NO) и измененного ответа на окислительный стресс [34]. В гепатоцитах аутофагия необходима для сохранения гомеостаза печени, связанного с белками, липидами и органеллами, а нарушение её регуляции приводит к повреждению, воспалению, фибро- и онкогенезу [35]. Y. Shen Y. и соавт. [36] обнаружили, что при сниженной аутофагии, IL-1 β в присутствии фактора некроза опухоли (TNF)- α становится цитотоксическим и провоспалительным для гепатоцитов. Гепатотоксичность IL-1 β была связана не с апоптозом, а скорее некрозом гепатоцитов вследствие одновременного наличия TNF- α . Как и IL-1 β , TNF- α сам по себе для нормальных гепатоцитов не токсичен, а их IL-1 β /TNF- α обусловленная смерть, является результатом дефекта энергетического гомеостаза, возникающего только в гепатоцитах с нарушенной аутофагией. Это объясняется отсутствием необходимых для него субстратов, что приводит к истощению АТФ, запускает лизосомальную проницаемость и высвобождение вызывающих некроз катепсинов. Авторы также показали, что

помимо сенсibilизированной к ИЛ-1 β цитотоксичности, снижение аутофагии способствует воспалению в результате секреции ассоциированных с повреждением молекулярных паттернов.

Селективная потеря способности СЭК к аутофагии приводит к клеточной дисфункции и снижению внутрипеченочного NO. В то же время, чрезмерная её активация может вызывать деградацию кавеолина-1, тем самым ухудшать дефенестрацию СЭК и в конечном итоге индуцировать фиброгенез. Следовательно, любое нарушение регуляции аутофагии в СЭК может способствовать развитию фиброза печени [37]. Гистологические исследования с использованием методов иммунофлюоресцентной микроскопии показали, что в цирротически изменённой печени человека реактивные протоковые клетки, которые были охарактеризованы как положительные по цитокератину 19 холангиоцит-подобные эпителиальные клетки, с хорошо выраженной аутофагией имеют повышенную экспрессию TGF- β 1 и фибробласт-специфического белка 1 [38].

Таким образом, роль аутофагии в печёночном фиброгенезе является сложной, и конечный результат зависит от типа вовлеченной популяции клеток. В частности, аутофагия в ЗКП и реактивных протоковых клетках оказывает профиброгенное влияние, тогда как аутофагия в гепатоцитах, макрофагах и СЭК ему противодействуют.

Заключение

Очевидно, что печёночный фиброгенез является сложным патологическим процессом, управляемым множеством клеток, медиаторов и сигнальных путей, существенную роль в котором играют звездчатые клетки печени. При хронических заболеваниях печени под влиянием различных молекулярных стимулов они подвергаются драматической фенотипической активации с приобретением фиброгенных свойств. Участвующие в этом регуляторные вещества могут быть перспективными мишенями для таргетной антифибротической терапии. Внедрение её в клиническую практику позволит улучшить прогноз при хронических заболеваниях печени и повысить качество жизни страдающих ими пациентов.

Литература

(п.п. 1-4; 6-38 см. References)

- Гарбузенко Д.В. Механизмы компенсации структуры и функции печени при её повреждении и их практическое значение. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2008; 18(6): 14-21.

References

- Moon A.M., Singal A.G., Tapper E.B. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020; 18(12): 2650-66. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.07.060>
- Wang S., Friedman S.L. Hepatic fibrosis: A convergent response to liver injury that is reversible. *J Hepatol*. 2020; 73(1): 210-1. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.03.011>
- Gandhi C.R. Hepatic stellate cell activation and pro-fibrogenic signals. *J Hepatol*. 2017; 67(5): 1104-5. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.06.001>
- Pu S., Zhou H., Liu Y., Liu J., Guo Y., Zhou H. Roles of nuclear receptors in hepatic stellate cells. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021; 15(8): 879-90. <https://doi.org/10.1080/17474124.2021.1949288>
- Garbuzenko D.V. Mechanisms of compensation of structure and function of the liver at its damage and their practical significance. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii gepatologii, koloproktologii*. 2008; 18(6): 14-21. (in Russian)
- Liu X., Xu J., Rosenthal S., Zhang L.J., McCubbin R., Meshgin N., et al. Identification of Lineage-Specific Transcription Factors That Prevent Activation of Hepatic Stellate Cells and Promote Fibrosis Resolution. *Gastroenterology*. 2020; 158(6): 1728-44. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.01.027>
- Blaner W.S. Hepatic Stellate Cells and Retinoids: Toward A Much More Defined Relationship. *Hepatology*. 2019; 69(2): 484-6. <https://doi.org/10.1002/hep.30293>
- Wright M.C. The impact of pregnane X receptor activation on liver fibrosis. *Biochem. Soc. Trans.* 2006; 34(Pt 6): 1119-23. <https://doi.org/10.1042/BST0341119>
- Wandzioch E., Kolterud A., Jacobsson M., Friedman S.L., Carlsson L. Lhx2-/- mice develop liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(47): 16549-54. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404678101>
- Narla G., Friedman S.L. Krüppel-like Factors and the Liver. In: *The Biology of Krüppel-like Factors*. Nagai R., Friedman S.L., Kasuga M. (eds). Tokyo, Japan: Springer; 2009; p.: 141-50. https://doi.org/10.1007/978-4-431-87775-2_11
- Lopez-Sanchez I., Dunkel Y., Roh Y.S., Mittal Y., De Minicis S., Muranyi A., et al. GIV/Girdin is a central hub for profibrogenic signalling networks during liver fibrosis. *Nat. Commun*. 2014; 5: 4451. <https://doi.org/10.1038/ncomms5451>
- Sturm L., Roth L., Zoldan K., Schultheiss M., Boettler T., Huber J.P., et al. Blood reelin in the progression of chronic liver disease. *Adv. Med. Sci.* 2021; 66(1): 148-54. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2021.01.006>
- Kordes C., Bock H.H., Reichert D., May P., Häussinger D. Hepatic stellate cells: current state and open questions. *Biol. Chem*. 2021; 402(9): 1021-32. <https://doi.org/10.1515/hsz-2021-0180>
- Moran-Salvador E., Garcia-Macia M., Sivaharan A., Sabater L., Zaki M.Y.W., Oakley F., et al. Fibrogenic Activity of MECP2 Is Regulated by Phosphorylation in Hepatic Stellate Cells. *Gastroenterol*. 2019; 157(5): 1398-412. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.07.029>
- Moran-Salvador E., Mann J. Epigenetics and Liver Fibrosis. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol*. 2017; 4(1): 125-34. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2017.04.007>
- Mann J., Chu D.C., Maxwell A., Oakley F., Zhu N.L., Tsukamoto H., et al. MeCP2 controls an epigenetic pathway that promotes myofibro-

- blast transdifferentiation and fibrosis. *Gastroenterol.* 2010; 138(2): 705-14. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.10.002>
17. Page A., Paoli P., Moran Salvador E., White S., French J., Mann J. Hepatic stellate cell transdifferentiation involves genome-wide remodeling of the DNA methylation landscape. *J. Hepatol.* 2016; 64(3): 661-73. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.024>
 18. Elsharkawy A.M., Oakley F., Lin F., Packham G., Mann D.A., Mann J. The NF-kappaB p50:p50:HDAC-1 repressor complex orchestrates transcriptional inhibition of multiple pro-inflammatory genes. *J Hepatol.* 2010; 53(3): 519-27. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.03.025>
 19. Ding N., Hah N., Yu R.T., Sherman M.H., Benner C., Leblanc M., et al. BRD4 is a novel therapeutic target for liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(51): 15713-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522163112>
 20. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* 2011; 12(12): 861-74. <https://doi.org/10.1038/nrg3074>
 21. Szabo G., Bala S. MicroRNAs in liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2013; 10(9): 542-52. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.87>
 22. Massey V., Cabezas J., Bataller R. Epigenetics in Liver Fibrosis. *Semin. Liver Dis.* 2017; 37(3): 219-30. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1605371>
 23. Bian E.B., Wang Y.Y., Yang Y., Wu B.M., Xu T., Meng X.M., et al. Hotair facilitates hepatic stellate cells activation and fibrogenesis in the liver. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2017; 1863(3): 674-86. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.12.009>
 24. Yu F., Jiang Z., Chen B., Dong P., Zheng J. NEAT1 accelerates the progression of liver fibrosis via regulation of microRNA-122 and Kruppel-like factor 6. *J Mol. Med.* 2017; 95: 1191-202. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1586-5>
 25. Machado M.V., Diehl A.M. Hedgehog signalling in liver pathophysiology. *J Hepatol.* 2018; 68(3): 550-62. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.10.017>
 26. Omenetti A., Choi S., Michelotti G., Diehl A.M. Hedgehog signaling in the liver. *J Hepatol.* 2011; 54(2): 366-73. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.10.003>
 27. Hung T.M., Hsiao C.C., Lin C.W., Lee P.H. Complex Cell Type-Specific Roles of Autophagy in Liver Fibrosis and Cirrhosis. *Pathogens.* 2020; 9(3): 225. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030225>
 28. Weiskirchen R., Tacke F. Relevance of Autophagy in Parenchymal and Non-Parenchymal Liver Cells for Health and Disease. *Cells.* 2019; 8(1): 16. <https://doi.org/10.3390/cells8010016>
 29. Kim K.M., Han C.Y., Kim J.Y., Cho S.S., Kim Y.S., Koo J.H., et al. Gα12 overexpression induced by miR-16 dysregulation contributes to liver fibrosis by promoting autophagy in hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 2018; 68(3): 493-504. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.10.011>
 30. Duran A., Hernandez E.D., Reina-Campos M., Castilla E.A., Subramaniam S., Raghunandan S., et al. p62/SQSTM1 by Binding to Vitamin D Receptor Inhibits Hepatic Stellate Cell Activity, Fibrosis, and Liver Cancer. *Cancer Cell.* 2016; 30(4): 595-609. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.004>
 31. Deng J., Huang Q., Wang Y., Shen P., Guan F., Li J., et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates autophagy to activate hepatic stellate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014; 454(2): 328-34. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.076>
 32. Fu M.Y., He Y.J., Lv X., Liu Z.H., Shen Y., Ye G.R., et al. Transforming growth factor-β1 reduces apoptosis via autophagy activation in hepatic stellate cells. *Mol. Med. Rep.* 2014; 10(3): 1282-8. DOI: 10.3892/mmr.2014.2383
 33. Li J., Zeng C., Zheng B., Liu C., Tang M., Jiang Y., et al. HMGB1-induced autophagy facilitates hepatic stellate cells activation: a new pathway in liver fibrosis. *Clin. Sci. (Lond).* 2018; 132(15): 1645-67. <https://doi.org/10.1042/CS20180177>
 34. Allaire M., Rautou P.E., Codogno P., Lotersztajn S. Autophagy in liver diseases: Time for translation? *J Hepatol.* 2019; 70(5): 985-98. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.01.026>
 35. Francis H., Wu N., Alpini G., Meng F. Hepatocyte Autophagy: Maintaining a Toxic-Free Environment. *Hepatology.* 2020; 72(2): 371-4. <https://doi.org/10.1002/hep.31219>
 36. Shen Y., Malik S.A., Amir M., Kumar P., Cingolani F., Wen J., et al. Decreased Hepatocyte Autophagy Leads to Synergistic IL-1β and TNF Mouse Liver Injury and Inflammation. *Hepatology.* 2020; 72(2): 595-608. <https://doi.org/10.1002/hep.31209>
 37. Boteon Y.L., Laing R., Mergental H., Reynolds G.M., Mirza D.F., Afford S.C., et al. Mechanisms of autophagy activation in endothelial cell and their targeting during normothermic machine liver perfusion. *World J. Gastroenterol.* 2017; 23(48): 8443-51. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i48.8443>
 38. Hung T.M., Huang Y.J., Lin Y.C., Chen Y.H., Wu Y.M., Lee P.H. A critical role of autophagy in regulating the mesenchymal transition of ductular cells in liver cirrhosis. *Sci. Rep.* 2019; 9: 10673. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46764-x>

Сведения об авторе:

Гарбузенко Дмитрий Викторович, доктор мед. наук, проф. каф. факультетской хирургии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: garb@inbox.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Пальцын А.А.^{1,2}, Свиридкина Н.Б.¹

Шипики дендритов

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России,

123993, Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

Мозг осуществляет постоянное и чаще достаточно успешное приспособление организма к меняющимся условиям среды. Важнейшим структурно-функциональным проявлением этой приспособительной реакции мозга является адекватное ситуационное изменение числа, внешней формы, внутреннего строения, скорости структурных перестроек, химического состава воспринимающих сигнал элементов синапсов – дендритных шипиков. При болезни Альцгеймера патология шипиков обнаруживается раньше клинических проявлений. Первым ученым, понявшим роль шипиков был Рамон Кахаль.

Ключевые слова: шипики; синапсы; дендриты; цитоскелет; пластичность мозга

Для цитирования: Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б. Шипики дендритов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(1): 120–126.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.120-126

Участие авторов: концепция и дизайн обзора, написание текста, сбор и обработка материала, редактирование и обсуждение окончательной версии обзора – Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б.

Для корреспонденции: Пальцын Александр Александрович, e-mail: lrrp@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.12.2021

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.03.2022

Paltsyn A.A.^{1,2}, Sviridkina N.B.¹

Spines of dendrites

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology,

Moscow 125315, Russian Federation;

²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education,

Moscow 125993, Russian Federation

The brain performs constant and often quite successful adaptation to changing environmental conditions. The most important structural and functional manifestation of this adaptive reaction of the brain is an adequate change in the number, external shape, internal structure, speed of structural rearrangements, and the chemical composition of dendritic spines, the elements of synapses that perceive the signal. In Alzheimer's disease, the pathology of spines is detected earlier than the clinical manifestations. The first scientist who understood the role of the dendritic spines was Ramon Cajal.

Keywords: dendritic spines; synapses; dendrites; cytoskeleton; plasticity of the brain

For citation: Paltsyn A.A., Sviridkina N.B. Spines of dendrites. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2022; 66(1): 120–126. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.120-126

Author's contribution: review concept and design, text writing, material collection and processing, editing, discussion of the review, final version – Paltsyn A.A., Sviridkina N.B.

For correspondens: Aleksandr A. Paltsyn, doctor of biol. Sciences, Prof., Laureate of the State Prize of the USSR, Ch. scientific collaborator Institute of General Pathology and Pathophysiology, prof. cafe general pathology and pathophysiology Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, e-mail: lrrp@mail.ru

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 10.12.2021

Accepted 20.01.2022

Published 15.03.2022

Мозг превращает тело в организм связывая, согласовывая, гармонизируя структуры и функции всех частей тела для выполнения единой для всех систем, органов и даже клеток задачи: жить. На субклеточном уровне организации связь осуществляется через расположенные на шипиках дендритов синапсы. Точнее — постсинапсы, поскольку передающая часть синапса расположена на аксоне. Этим объясняется интерес к механизмам формирования, изменения в процессе функции и элиминации шипиков в различных ситуациях нормальной и нарушенной патологическим процессом работы мозга.

Открыл существование шипиков, ввел в научный словарь это слово (а также слово — синапс), понял значение шипиков в работе мозга и принцип связи нейронов через них — барселонский профессор гистологии и патологической анатомии Сантьяго Рамон-и-Кахаль. За это мы называем его автором нейронной теории [1]. Подобно тому, как это было во многих научных открытиях, важное значение для успеха имела новая техника. Это была окраска нервной ткани нитратом серебра по Гольджи. «Восхитительная», как позже выразится Кахаль, однако, не привлекавшая внимания исследователей более 15 лет после опубликования этой методики (1873). Научная «мода» тех времен не одобряла использование чужих методик. Метод Гольджи до сих пор по непонятной причине удивительно благосклонен к исследователям. Этим методом окрашиваются не все, а лишь часть нейронов в кусочке ткани. Окрашенный нейрон контрастно выделяется на фоне не окрашенных соседей, что способствует отчетливому видению деталей его строения: клеточного тела, аксона, дендритов и шипиков на них.

В конце 19 века наряду с фотографией ещё очень распространенным приемом научной документации были зарисовки учеными увиденного. Интересно, что в рисунках препаратов коры, сделанных в одно и то же время и одинаково окрашенных по Гольджи, сам Гольджи рисовал гладкие дендриты, а Кахаль — бугристые (с шипиками). И даже, как выяснилось когда рисунки дополнились фотографиями, с преувеличенным размером «бугорков» [2].

Интересный психологический момент. Два лауреата Нобелевской премии позволяли себе, хотя и разнонаправленно, но одинаково субъективно, «подправлять» объективные документы экспериментов (видимые в микроскопе картины) соответственно своим умозрительным представлениям об экспериментальном материале. Гольджи считал шипики артефактом [3] и не изображал их в рисунках (в упор не видел). Кахаль, поняв большое значение шипиков (постсинапти-

ческой части синапса, расширяющей поверхность, принимающую сигнал аксона) преувеличивал, может быть, подсознательно, размер этих структур.

Импульс проходит через соприкосновение отростков нейронов (аксонов и дендритов) без их предметной связи. По Кахалю каждый нейрон абсолютно автономная по структуре и физиологии территория. Аксоны и дендриты соседних нейронов не соединены, но протекание импульсов не затруднено в такой многократно прерываемой, фрагментированной нервной системе. Как могут течь такие токи? Ответ может быть только один: почти так же, как электрический ток проходит через соединение между двумя проводами. Переходит не материал, а заряд. В воспринимающем нейроне не появляется ничего вещественно нового. Меняется расположение, конфигурация того, что содержалось и до импульса.

В конце 19-го века утвердилась нейронная теория. Однако Гольджи, — автор метода окраски, выявляющей принципиально важный, четко структурно оформленный элемент устройства нервной системы: шипики (краеугольный камень нейронной теории) — считал их артефактом собственной методики. Это мнение было поддержано Мейером, красившим мозг метиленовым синим и тоже не обнаружившим шипиков. Но Кахаль, имевший по теме — мозг опыт работы, больший, чем суммарный опыт предыдущих двух исследователей, (и, что не менее важно, талант к размышлениям) показал, что шипики постоянно выявляются обоими методами. Окраска метиленовым синим была им модифицирована. Препараты Кахаля демонстрировали одинаковый вид и локализацию шипиков при любом методе окраски. Этим он окончательно доказал реальное существование шипиков, ныне подтвержденное всем материалом современной нейробиологии.

По общепринятому сегодня мнению, шипики — главный инструмент передачи возбуждения в двигательной активности, а также процессах сознания, обучения и памяти. Шипики — сложные структуры, состоящие из плотной сети цитоскелета, содержащего актин, трансмембранных каркасных молекул, многочисленных рецепторов на поверхности. Дендритные шипики гетерогенны по размеру и форме. Наиболее многочисленные по форме называют дельтаобразными. В них различают 3 зоны. Широкое основание, связанное актиновыми волокнами с сетью микротрубочек в дендрите. Узкую шейку с актиновыми волокнами в центре. И, как пишут луковицеобразную, на наш взгляд, скорее грибообразную головку, контактирующую с аксоном и содержащую плотную сеть актиновых волокон. В зависимости от размера и формы головки

и длины шейки дендритные шипики можно разделить на грибовидные, тонкие, разветвленные и короткие (пенькообразные).

Долговременная потенциация, долговременная депрессия, полярность клеток, обучение, тренировки, запоминание, память и забывание — все эти процессы выражаются изменениями структуры шипиков [4].

Ключевым регулятором синаптической пластичности, влияющим на ниже расположенные в регуляторных цепях молекулы и перестройки актинового цитоскелета считают Rho — семейство малых глутамил-трансфераз (ГТФ-аз) [5]. Убеждение возникло когда выяснилось, что эти белки — ремодуляторы актинового цитоскелета регулируют наиболее известные и обсуждаемые формы синаптической пластичности: долговременную потенциацию (LTP) и долговременную депрессию (LTD) в гиппокампе. Они играют главную роль в образовании и морфологии шипиков, перемещении рецепторов в головке шипика [5]. Полагают, что изучение механизмов Rho-сигналинга позволит понять как нарушается память и даже восстанавливать её.

Укрепилось представление что грибовидные шипики с большим диаметром головки и тонкой ножкой — результат развития (созревания) тонких шипиков с отсутствующей или малой головкой. J. Bourne и К.М. Harris озаглавили свою статью антропоморфично, но по сути происходящих событий, выразительно и точно, а именно так: «Обучаются ли тонкие шипики, чтобы стать грибовидными шипиками, которые помнят?» [6]. Авторы положительно отвечают на вынесенный в заглавие статьи вопрос, сообщая, что долговременная потенциация превращает тонкие шипики в грибовидные.

Долговременная потенциация, а также обучение и тренировки, приобретение новых навыков индуцируют увеличение размера головок шипиков, а также формирование и стабилизацию новых шипиков. Долговременная депрессия — уменьшает размер головок и число шипиков [4, 7]. Поскольку синаптические связи, сформированные грибовидными шипиками, часто бывают долгоживущими -- такие шипики считают зрелыми «шипиками памяти», хранителями долговременной памяти [6]. Тонкие шипики более динамичны в структурных изменениях, они могут принимать и грибовидную форму, но с маленькой головкой. Их называют «обучающимися шипиками» [6]. Короткие шипики обычно имеют малозаметную шейку и особо многочисленны на ранней стадии постнатального развития. Разветвленные или чашеобразные шипики имеют несколько головок, отходящих от одной шейки. Важно отметить, что такая классифика-

ция шипиков по форме маскирует их пластичность, т. е. часто (наверно, более подходит слово постоянно) совершающиеся изменения формы шипика с течением времени [5].

В недавно опубликованной статье [7] авторы сообщают, что по теме «шипики» опубликовано более 10 000 сообщений и всё же многие молекулярные, клеточные, функциональные характеристики шипиков остаются неизвестными. Например: единый или разные молекулярные механизмы образования и функции разных шипиков? Пока не известно отражается ли на структуре шипиков забывание. Зная как меняются шипики в процессе запоминания, можно предположить, что противоположной направленности изменения будут происходить при забывании. Но фактической информации это не заменяет. Имеющихся сегодня знаний достаточно, чтобы понять, что шипики участвуют во всех событиях совершающихся в мозге, и настал черед конкретизации этого положения в различных условиях жизни и состояниях здоровья. Оказалось, например, что при болезни Альцгеймера сморщивание и исчезновение дендритных шипиков в гиппокампе и коре обнаруживаются до появления таких клинических признаков болезни, как снижение когнитивной способности и памяти [8]. У погибших от болезни Альцгеймера постоянно обнаруживают снижение количества шипиков в гиппокампе и коре [4, 8]. Относительно структурно-функциональных связей шипиков есть сообщения, что самые многочисленные в мозге грибовидные шипики — это поздняя стадия их жизненного цикла.

Связанные с возрастом изменения шипиков исследовали [9] в пирамидах 5-го слоя коры методом световой микроскопии окрашенных по Гольджи препаратов, полученных от крыс в возрасте от 3 до 29.5 мес. Во всех исследованных зонах находили связанную с возрастом прогрессивную утрату от 24 до 40% шипиков. Но отдельные клетки с густым «молодежным» расположением шипиков наблюдали в любом возрасте.

Сегодня многие вопросы, касающиеся молекулярных, клеточных и функциональных свойств шипиков, остаются нерешенными. Например, единым или разными молекулярными механизмами осуществляется образование и функция разных по структуре шипиков? Существуют ли структурные различия шипиков, обеспечивающих разные виды памяти, например: эпизодической, семантической, краткосрочной, долгосрочной? Как структурно выражается забывание? Можно ли улучшить память, изменив структуру нейронов? И какую структуру следует изменить? Эти и многие другие вопросы остаются открытыми. Относительно шипиков наука пока находится на старте пути от морфологии к физио-

логии и патологии. Поразительная морфологическая неоднородность соседних шипиков на одной и той же дендритной ветви и их крошечный размер затрудняют анализ структурно-функциональных перестроек шипиков. Прямым доказательством динамики морфологических изменений являются наблюдения быстрого формирования и элиминации шипиков в культуре нейронов гиппокампа

По сути, интуитивное мнение (озарение) Кахалья о том, что шипик — это постсинаптический участок возбуждающего синапса в мозге млекопитающего, подтвердила электронная микроскопия. Возрастное уменьшение плотности расположения шипиков указывало на вероятность существования предельного числа, прошедших по цепи нейронов возбуждений, а также на вероятность существования онтогенетической динамики их образования-разрушения в мозге взрослых млекопитающих.

Синаптические белки — молекулы клеточной адгезии такие как кадгеринины, нейролигины и нейрексины, выравнивают и смыкают пресинаптическую мембрану аксона с постсинаптической мембраной дендрита. Динамика образования, прочность этой связи, её сохранение и распад — клеточный уровень событий, которые «наверху», на уровне организма, воплощаются в обучение, сознание, память и её утрату.

Поскольку грибовидные синапсы наиболее долго-временно существующая форма, их называют «зрелыми» или «синапсами памяти» [6]. Следует напомнить, что формы шипиков разнообразны, быстро и значительно изменчивы, динамичны с плавными переходами одних в другие [10], поэтому словесная классификация по форме маскирует реальное разнообразие форм. Образование, созревание и пластичность шипиков в высокой степени зависят от ремоделирования актинового цитоскелета.

Структурно-функциональный анализ шипиков осложняется непостоянством их размера и формы, морфологической гетерогенностью рядом расположенных шипиков на одной и той же дендритной ветви [7].

Прямое доказательство упомянутой динамики нашли М. Fischer и соавт. наблюдая (и снимая фильм), быстрое формирование и элиминацию шипиков в культуре нейронов гиппокампа [11]. Такая динамика обуславливает образование, стабилизацию и разрушение шипиков, модулируемые нейрональной активностью и стадией развития организма [12]. Содержание актина в шипиках указывает на возможность их движений. В фильме М. Fischer и соавт. было показано как быстро (секунды!) двигаются шипики, окрашенные зеленым флуоресцентным белком.

В последние годы появилась замечательная возможность исследовать динамику развития (жизненный

цикл и физиологию) шипиков в организме млекопитающего, прижизненно с помощью двухфотонного лазерного микроскопа. Можно продолжительно наблюдать живые шипики, стадии их развития, включающие появление, стабилизацию и исчезновение, модулируемые возрастом животного, «возрастом» шипика и активностью мозга. В работе сотрудников Марсельского университета [12] продолжительным наблюдением на живых нейронах была убедительно показана быстрая динамика образования, стабилизации и исчезновения одних и тех же шипиков. Видится перспектива исследования преобразований шипиков при перестройках нервных цепей, связанных с обучением и нервно-психическими расстройствами [11].

Kalen P. Berry и Elly Nedivi описали динамику «возрастных» преобразований шипиков [13]. Она, по сути, не отличается от описаний Кахалья, только гениальность понимания природы классиком сменилась технологическим совершенством современной науки. Ранние шипики — тонкие, длинные выпячивания клеточной мембраны дендрита со сроком жизни не более нескольких часов. Таких в мозге взрослого млекопитающего 2-3%. Затем, до двухдневного «возраста» шипика, толщина его увеличивается сначала равномерно, а потом, преимущественно в верхней части, формируется головка. Головка расширяется, ножка истончается, шипик приобретает грибовидную форму и остается таким неопределенно долго — известно, что больше года. Их, в мозге взрослого 70-80%. Видя в молодых организмах более высокую плотность расположения шипиков чем во взрослых, Кахаль предположил, что это динамичная (появляющаяся и исчезающая с возрастом) структура, а затем пошел дальше: допустил, что появление и исчезновение отражают не только возраст, но также обучение и память. Современная техника двухфотонной лазерной микроскопии с наблюдениями *in vivo* доказала синаптическую пластичность коры взрослых млекопитающих [14].

Связанная с возрастом когнитивная недостаточность, в частности, нарушение пространственной памяти, выражается деструкцией шипиков в областях CA1 и зубчатой извилине гиппокампа. При сравнении препаратов мышей C57/Bl6 взрослых (возраст 6-7 мес) и старых (21-22 мес) обнаружено значительное уменьшение числа и размера шипиков в гиппокампе старых животных. Структурные изменения сочетались с гиппокамповозависимой когнитивной недостаточностью по испытанию в водном лабиринте Морриса [15]. Отчетливо определилась важность понимания того, как на различных этапах жизни регулируется динамика преобразований шипиков: формирование, созревание,

пластичность, соответствующая синопситу состоянию среды. В списке регуляторов важная роль принадлежит BDNF, его сигналингу через рецепторы-антагонисты: TrkB и p75NTR. BDNF увеличивает плотность расположения шипиков на дендритах в культуре пирамидальных нейронов гиппокампа и клеток Пуркинье мозжечка и ускоряет «взросление» культуры – повышает содержание грибовидных шипиков. Регулирует стадии развития: формирование дендритных шипиков, созревание, пластические изменения форм [16]. Снижение уровня BDNF уменьшает плотность расположения шипиков в гиппокампе, замедляет нейрогенез, способствует развитию депрессии [17].

Сегодня есть основания утверждать, что пластичность шипиков обеспечивает нормальное развитие, функцию и старение мозга, но будучи нарушенной, превращается в механизм возникновения нервно-психических и нейродегенеративных расстройств.

Вероятно самое сложное явление природы – жизнь, сложно и на многих уровнях регулируется. Шипиковый, ультраструктурный, внутриклеточный уровень регуляции дополняется (корректируется) тоже внутриклеточным, но относящимся к более крупным структурам – уровнем синапсов. Это события, протекающие в клетках – в нейронах. Следующий уровень регуляции – межклеточные взаимодействия. На этом уровне микроглия вмешивается в регуляцию тем, что удаляет менее активные синапсы [18].

Прошло более полувека после электронно-микроскопического подтверждения представлений Кахала о шипиках дендритов как постсинаптических структурах мозга млекопитающих. Обнаружено возрастное снижение численности синапсов. Около 10 лет назад образование, стабилизация и исчезновение шипиков, модулируемые активностью и возрастом животного было доказано методом двухфотонной микроскопии и повторным исследованием одной группы шипиков [12].

Электронно-микроскопическим исследованием биопсий коры (поле Бродмана 9) восьми пациентов с болезнью Альцгеймера обнаружили значительное уменьшение числа синапсов сравнительно с посмертными 9 образцами того же участка коры, соответствующего по возрасту контроля (умершие от других болезней) [19]. По таким результатам нельзя определить причиной или следствием болезни Альцгеймера является уменьшение числа синапсов, но стоит признать заслуживающими внимания факт исследования прироста увеличения синаптической пластичности у людей. Вышесказанное дает основания заключить, что динамика изменений шипиков есть следствие условий

жизни и стимул к изменению этих условий в благоприятном для здоровья направлении. Наиболее эффективным образом действий видится создание, так называемой обогащенной среды, включающей адекватные состоянию человека разумно дозированные физические и ментальные нагрузки, режим жизни и питания.

В Нидерландах создан пищевой продукт для лечения болезни Альцгеймера – Fortasyn Connect (FC) [20]. Препарат представляет интерес для нашей темы, поскольку, по мнению авторов, механизм действия FC – сохранение и восстановление нейрональных мембран – синапсов, разрушаемых болезнью Альцгеймера. Содержащаяся в FC комбинация нутриентов и кофакторов (сообщаемый авторами список не полный) включает: уридин, докозагексаеновую кислоту, эйкозапентаеновую кислоту, холин, фосфолипиды, фолевую кислоту, витамины: B₁₂, B₆, C, E, селен – продукты, рекомендуемые для питания на ранних стадиях болезни Альцгеймера. Была выдвинута гипотеза, что FC противодействует потере синапсов и уменьшает патологию, связанную с мембранами при болезни Альцгеймера, обеспечивая организм пищевыми предшественниками и кофакторами, которые, будучи объединенными в комплекс, поддерживают формирование и функцию нейронных мембран. Доклинические исследования легли в основу этой гипотезы, которая проверяется в рамках широкой программы клинических исследований, изучающих потенциал этой комбинации питательных веществ при болезни Альцгеймера. Дисфункция памяти – одно из ключевых ранних проявлений болезни Альцгеймера, связанное с потерей синапсов. Клинические исследования, проведенные до настоящего времени, показывают, что пища, содержащая FC, улучшает память и сохраняет когнитивную способность при легкой степени болезни Альцгеймера по сравнению с контролем не принимавшим FC. Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что FC противодействует синаптической дисфункции. Авторы представили обзор фундаментальных научных исследований, которые привели к созданию FC, и обнаружили его действие в различных доклинических моделях.

В 2019 г. опубликованы результаты двухлетних клинических испытаний действия FC [21]. Автор сообщил о положительном эффекте действия FC на когнитивные функции на ранних стадиях болезни Альцгеймера, отсутствии побочных эффектов и хорошем сочетании с другими лекарствами.

В целом, эти исследования подчеркивают текущее направление основных усилий во всем мире по попыткам понять роль дендритных шипиков, крохотных, но чрезвычайно важных нейрональных органелл,

в регуляции функций мозга. С годами и трудами выяснилось, что эта крошечная система является чрезвычайно сложной органеллой, где более 500 различных типов молекул сочетаются и взаимодействуют, регулируя ее структуру и функции. Остаются многие проблемы, включая огромную неоднородность соседних шипиков на одном и том же дендрите, высокую скорость оборота шипиков в разных поведенческих состояниях и кардинальный вопрос о том, является ли данный шипик локусом памяти. Эти и многие другие вопросы должны быть рассмотрены в будущих исследованиях с использованием более совершенных молекулярных инструментов.

В заключение, об актуальности исследований по теме: шипики дендритов. По современным представлениям патологией с главным деструктивным фактором — нарушением динамики развития шипиков, является болезнь Альцгеймера. Мозг содержит около 100 триллионов синапсов. Одно из главных патогенетических проявлений болезни Альцгеймера — бета-амилоидные бляшки, которые образуются с наружной стороны клетки и перекрывают шипики, нарушая связи. Аккумуляция избыточно образуемого и неправильно собираемого белка между нейронами и скопления тау-клубков внутри клеток (оба вида патологии белкового обмена) нарушают главную функцию нейронов — связи. Бета-амилоидные бляшки и меньшие скопления бета-амилоида, называемые олигомерами, блокируют передачу импульса между нейронами. Тау-белок блокирует внутри клетки транспорт питательных веществ и других молекул, необходимых для нормального выживания и функции нейрона — образования импульса [22]. Болезнь Альцгеймера распространена во всем мире. Для иллюстрации наносимого человечеству этой болезнью ущерба мы взяли недавние (2021) сведения по США. Число больных среди американцев в возрасте 65 лет и старше — 6,2 млн. Прогноз на 2060 г. — 13,8 млн. Между 2000 и 2019 гг. смертность от инсульта, патологии сердца и ВИЧ-инфекции снижалась, а смертность от болезни Альцгеймера увеличилась на 145%. Она особенно возросла в 2020 г. По мнению авторов -- в связи с пандемией COVID-19. Неоплачиваемый уход за больными в 2020 г. оценивался в 256,7 млрд долларов. Однако в этой оценке не учтен моральный, материальный, эмоциональный и физический ущерб членам семьи с вполне вероятным и реально часто встречающимся у них развитием нервно-психических расстройств. Отчетливо проявляющаяся связь болезни Альцгеймера со старением людей обеспечивает профилактическое значение всех антивозрастных медицинских технологий [23, 24].

Заключение

Дендритные шипики представляют собой небольшие, специализированные образования на дендритах нейронов. Они содержат сеть каркасных молекул цитоскелета и многочисленные поверхностные рецепторы. В процессе синаптической активности количество и форма дендритных шипиков существенно изменяются. Индукция долговременной потенциации способствует увеличению головок шипиков, а также формированию и стабилизации новых шипиков. Длительная депрессия приводит к уменьшению размера головок, сморщиванию и ретракции шипиков. Прямым доказательством динамики морфологических изменений являются наблюдения быстрого формирования и элиминации шипиков в культуре нейронов гиппокампа.

Понимание того, что мозг — главный орган приспособления к среде сформировалось всем материалом старой и современной биологии. Оно очень важно, но, подобно многим великим идеям, не имеет автора. Это — результат работы многих ученых. А открытие того факта, что обеспечивающая возможность жить приспособляемость мозга к среде, создается пластическими перестроениями шипиков на дендритах имеет единственного и бесспорного автора. Его имя: Сантьяго Рамон-и-Кахаль.

Литература

(п.п. 1-22 см. References)

23. Яковлев М.Ю. Кишечный эндотоксин: иммунитет — воспаление — старение, как звенья одной цепи. *Патогенез*. 2020; 18(1): 82–94.
24. Соловьева Н.В, Чаусова С.В., Кичук И.В., Макарова Е.В. Влияние кальциевой сигнализации на развитие расстройств аутистического спектра. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(4): 106–117.

References

1. Javier DeFelipe. The dendritic spine story: an intriguing process of discovery. *Front Neuroanat*. 2015; 9: 14.
2. Garcia-Lopez Pablo, Garcia-Marin Virginia, Freire Miguel The histological slides and drawings of cajal. *Front Neuroanat*. 2010; Mar 10; 4: 9.
3. Yuste Rafael. The discovery of dendritic spines by Cajal. *Front Neuroanat*. 2015; 9: 18.
4. Saravana Babu Chidambaram, A.G. Rathiprya et al Dendritic spines: Revisiting the physiological role. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019; Jun 8; 92: 161–93.
5. Zhang Haorui, Youssif Ben Zablah, et al. Rho Signaling in Synaptic Plasticity, Memory, and Brain Disorders. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9: 729076.

6. Bourne J, Harris K.M. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol.* 2007; Jun; 17(3): 381–6.
7. Martine Ammassari-Teule, Carlo Sala, Menahem Segal. Editorial: Dendritic Spines: From Biophysics to Neuropathology. *Front Synaptic Neurosci.* 2021; 13: 652117.
8. Boros B.D., Greathouse K.M., et al. Dendritic spines provide cognitive resilience against Alzheimer’s disease. *Ann. Neurol.* 2017; 82: 602–14.
9. Feldman M.L., Dowd C. Loss of dendritic spines in aging cerebral cortex. *Anat Embryol (Berl).* 1975; Dec 31; 148(3): 279–301.
10. Pchitskaya E, Bezprozvanny I. Dendritic Spines Shape Analysis-Classification or Clusterization? Perspective. *Front Synaptic Neurosci.* 2020; 30(12): 31.
11. Fischer M, Kaech S et al. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron.* 1998; May; 20(5): 847–54.
12. Runge Karen, Cardoso Carlos, et al. Dendritic Spine Plasticity: Function and Mechanisms. *Front Synaptic Neurosci.* 2020; 12: 36.
13. Kalen P. Berry, Elly Nediv. Spine dynamics: Are they all the same? *Neuron.* 2017; Sep 27; 96(1): 43–55.
14. Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, et al. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature.* 2002; Dec 19–26; 20(6917): 788–94.
15. O von Bohlen und Halbach, C Zacher, et al. Age-related alterations in hippocampal spines and deficiencies in spatial memory in mice. *J Neurosci Res.* 2006; Mar; 83(4): 525–31.
16. Zagrebelsky M, Korte M. Form follows function: BDNF and its involvement in sculpting the function and structure of synapses. *Neuropharmacology.* 2014; Jan; 76 Pt C: 628–38.
17. Zagrebelsky Marta, Charlotte Tacke, Martin Korte. BDNF signaling during the lifetime of dendritic spines. *Cell Tissue Res.* 2020; Oct; 382(1): 185–99.
18. Phi T Nguyen, Leah C Dorman, et al. Microglial remodeling of the extracellular matrix promotes synapse plasticity. *Cell.* 2020; 182: 388–403.
19. DeKosky Steven, Scheff Stephen. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer’s disease: Correlation with cognitive severity. *Ann Neurol.* 1990; May; 27(5): 457–64.
20. Nick van Wijk, Laus M Broersen et.al. Targeting synaptic dysfunction in Alzheimer’s disease by administering a specific nutrient combination. *J Alzheimers Dis.* 2014; 38(3): 459–79.
21. Jill Rasmussen. The LipiDiDiet trial: what does it add to the current evidence for Fortasyn Connect in early Alzheimer’s disease? *Clin Interv Aging.* 2019; 14: 1481–92.
22. Alzheimer’s disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2021; Mar; 17(3): 327–406.
23. Yakovlev M.Y. Intestinal endotoxin: immunity – inflammation – aging, as links of one chain. *Pathogenesis.* 2020; 18(1): 82–94.
24. Solovyova N.V., Chaova S.V., Kichuk I.V., Makarova E.V. The effect of calcium signaling on the development of autism spectrum disorders. *Pathologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 2020; 64(4): 106–17.

Сведения об авторах:

Пальцын Александр Александрович, доктор биол. наук, проф., лауреат Государственной премии СССР, гл. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, проф. каф. общей патологии и патофизиологии РМАНПО;
Свиридкина Надежда Борисовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Щербаков В.И.¹, Поздняков И.М.², Ширинская А.В.³, Волков М.В.⁴

Стерильное воспаление при преэклампсии и угрозе преждевременных родов

¹ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»,

630117, Новосибирск, Россия, ул. Тимакова, д. 2;

²ФГБУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России,

630091, Новосибирск, Россия, Красный проспект, д. 52;

³ФГБУЗ НСО «Новосибирский городской клинический перинатальный центр»,

630089, Новосибирск, Россия, ул. А. Лежена, д. 32;

⁴ФГБУЗ НСО «Клинический родильный дом № 6»,

630048, Новосибирск, Россия, ул. Вертковская, д. 5

В обзоре обсуждаются новые данные о роли стерильного воспаления при таких ключевых осложнениях беременности, как преэклампсия и преждевременные роды. Рассмотрены молекулярные паттерны, связанные с повреждением с позиций сигналов опасности как активаторы врожденной иммунной системы. Проведен анализ недавно открытых структур инфламмосом при беременности и их возможной роли в индукции и поддержании стерильного воспаления, играющего важную роль в нарушении нормального течения беременности, и, как следствие этого, изменения вектора развития плода. Приведены данные, доказывающие участие некоторых аларминов в индукции воспаления как при преэклампсии, так и при преждевременных родах. Подобная универсальность не исключает специфики воспаления, которая до конца пока не ясна. Обсуждаются новые подходы к терапии стерильного воспаления при рассматриваемой патологии.

Ключевые слова: преэклампсия; преждевременные роды; алармины; стерильное воспаление**Для цитирования:** Щербаков В.И., Поздняков И.М., Ширинская А.В., Волков М.В. Стерильное воспаление при преэклампсии и угрозе преждевременных родов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(1): 127–134. DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.127-134**Для корреспонденции:** Волков Михаил Валентинович, e-mail: michaelis67@mail.ru**Участие авторов:** Щербаков В.И. – концепция и дизайн исследования; Поздняков И.М. – анализ и интерпретация данных; Ширинская А.В. – составление, доработка статьи; Волков М.В. – сбор данных.**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.02.2021

Принята к печати 20.01.2022

Опубликована 15.02.2022

Scherbakov V.I.¹, Pozdnyakov I.M.², Shirinskaya A.V.³, Volkov M.V.⁴

Sterile inflammation in preeclampsia and preterm birth

¹ National Research Center of Basic and Translational Medicine,

Timakova St. 2, Novosibirsk 630117, Russian Federation;

² Novosibirsk State Medical University,

Krasny Prospekt 52, Novosibirsk 630091, Russian Federation;

³ Novosibirsk Municipal Clinical Perinatal Center,

Lezhena St. 32, Novosibirsk 630089, Russian Federation;

⁴ Maternity Clinical Hospital № 6,

Vertkovskaya St. 5, Novosibirsk 630048, Russian Federation

This review presents new data demonstrating the importance of sterile inflammation in major complications of pregnancy, such as preeclampsia and preterm delivery. We analyzed molecular patterns related to defects with regard to danger signals, such as activators of the innate immune system. We analyzed recently discovered structures, i.e., inflammasomes, during pregnancy and their possible role in inducing and maintaining sterile inflammation. Sterile inflammation plays an important role in distorting normal pregnancy and, as a consequence, changes the direction of fetal development. Our data demonstrate that some alarmins participate in inducing inflammation, both in preeclampsia and in preterm delivery. Such universality does not exclude certain specifics of inflammation, which are still not completely clear. We discussed new ways of evaluation and treatment of sterile inflammation in such pathologies.

Keywords: preeclampsia; preterm birth; alarmins; sterile inflammation

For citation: Shcherbakov V.I., Pozdnyakov I.M., Shirinskaya A.V., Volkov M.V. Sterile inflammation in preeclampsia and preterm birth. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(1): 127–134. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.01.127-134

For correspondence: Volkov Mikhail Valentinovich, obstetrician-gynecologist. State Budgetary healthcare Institution of the Novosibirsk region, "Clinical Maternity Hospital No. 6", women's consultation. e-mail: michaelis67@mail.ru

Autors' contribution: Scherbakov V.I. – research concept and design; Pozdnyakov I.M. – drafting or revising the article; Shirinskaya A.V. – analysis and interpretation of data; Volkov M.V. – data collection.

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

Financing. The study had no sponsorship.

Information about the authors:

Shcherbakov V.I., <https://orcid.org/0000-0002-0261-970X>

Pozdnyakov I.M., <https://orcid.org/0000-0001-7942-9579>

Shirinskaya A.V., <https://orcid.org/0000-0002-2470-7882>

Volkov M.V., <https://orcid.org/0000-0001-8811-4042>

Received 20.02.2021

Accepted 20.01.2022

Published 15.03.2022

Список используемых аббревиатур

ПЭ – преэклампсия

УПР – угроза преждевременных родов

PRRs – паттерн-распознающие рецепторы (pattern – recognition receptors)

ТПР – толл-подобные рецепторы (toll-like receptors, TLR)

NLR – NOD-подобные рецепторы (nucleotid-binding and oligomerization domain-like receptors)

PAMP – экзогенные молекулярные паттерны связанные с патогенами (pathogen-associated molecular patterns)

DAMP – эндогенные молекулярные паттерны, связанные с повреждением (damage-associated molecular patterns)

ВМЗРП – внутриматочная задержка роста плода

АФК – активные формы кислорода

ЛПС – липополисахарид

ФНО- α – фактор некроза опухолей-альфа

HMGB1 – группа высокомолекулярных белков (high-mobility group box1)

МК – мочевая кислота

Введение

Воспаление является необходимым компонентом успешной женской репродукции. К настоящему времени стало совершенно очевидно, что все критические женские события: овуляция, менструация, имплантация, роды, – носят воспалительный характер [1,2]. Этот вид воспаления назван физиологическим воспалением [3], выполняющим определенные виды задач, и четко контролируется по времени организмом. Физиологическим оно названо из-за того, что сопровождается физиологическими процессами. Нельзя же назвать, например ро-

ды патологическим процессом, когда в шейке матки и ее нижнем сегменте количество нейтрофилов повышается в 96 раз, моноцитов/макрофагов в 14 раз. Они разрушают соединительнотканый каркас шейки, и происходит ее размягчение. Если этого не происходит, то диагностируется дискоординация родовой деятельности, что завершается кесаревым сечением. Созвучны с этим данные Н. Sies [4], который дает параметры как патологического окислительного стресса, так и дает параметры физиологического стресса, называемого эустрессом, по уровню перекиси водорода > 100 нм, 1–10 нм соответственно. По своей сути физиологическое воспаление является преимущественно локальным, с элементами системности, поскольку лейкоциты, генерируемые преимущественно костным мозгом, мигрируют в очаг воспаления из крови.

Так, например, при овуляции с помощью локальной воспалительной реакции решается задача разрыва доминантного фолликула, после чего эта реакция сворачивается с развитием регенерации в виде формирования соединительнотканного рубца. При имплантации, под влиянием провоспалительных факторов, секретиремых бластоцистой, в эндометрии экспрессируются молекулы адгезии, обеспечивающие фиксацию эмбриона. Затем эта реакция сворачивается, происходит переключение с T α 1 на T α 2, M1 на M2. В настоящее время эта концепция расширена и представляет собой баланс между T α 1/T α 2/T α 17/T-регул/ γ / δ /T-клетками [5]. Перед родами снова активизируется воспалительная реакция, ответственная за размягчение шейки матки и разрыв плодных мембран. Любое нарушение хода воспаления ведет к патологии беременности, таких как преэклампсия (ПЭ), угрозе преждевременных родов (УПР), задержке роста плода. Преэклампсия и преждевремен-

ные роды являются лидирующими причинами перинатальной заболеваемости и смертности. Несмотря на большое количество работ, демонстрирующих признаки воспаления при ПЭ, тип воспаления при этой патологии до сих пор не установлен. Однозначно одно, что при ПЭ нет клинических проявлений и лабораторных данных за инфекцию. Часто с такой ситуацией сталкиваются и при преждевременных родах. Антибиотики в этих ситуациях не эффективны. Большие надежды связываются с эндогенными лигандами, с помощью которых можно управлять ходом воспаления. Роли воспаления при ПЭ и УПР посвящено много работ [6–9].

Цель обзора – провести анализ роли молекулярных паттернов, связанных с повреждением их рецепторов, инфламасом при стерильном воспалении, сопровождающим преэклампсию и угрозу преждевременных родов.

Стерильное воспаление – лиганды, рецепторы, внутриклеточные сигнальные пути. Основными рецепторами, распознающими как экзогенные, так и эндогенные лиганды, являются паттерн-распознающие рецепторы (pattern – recognition receptors-PRRs). Они включают в себя различные рецепторные структуры. Отметим наиболее изученные толл-подобные рецепторы (ТПР), (Toll-like receptors, TLR) и NOD-подобные рецепторы (nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD-like receptors (NLR)). Эти рецепторы способны распознавать как экзогенные молекулярные паттерны, связанные с патогенами (pathogen-associated molecular patterns – PAMP), так и эндогенные молекулярные паттерны, связанные с повреждением (damage-associated molecular patterns – DAMP) [10]. Условно это можно выразить следующим образом: толл-подобные рецепторы как наиболее изученные из всех классов рецепторов способны лигировать как PAMP, так и DAMP. PRRs, включая толл-подобные рецепторы, NOD-подобные рецепторы экспрессируются в децидуе, плаценте, фетальных мембранах и миометрии при беременности в иммунных и не иммунных клетках [11–13].

Стерильное воспаление запускается, когда DAMPs активируют PRRs или другие специфические для них рецепторы. Освобождающие DAMP, происходящие из стрессированных и гибнущих клеток, являются, по своей сути, сигналами опасности (danger signal), для клеток иммунной системы и других клеток, несущих рецепторы для этих молекул, из-за чего они иногда обозначаются как алармины. Вследствие этого их уровень в периферической крови может быть индикатором тканевого повреждения и, в частности плаценты, фетальных мембран, миометрия. Согласно Nadeau-Vallee M. et al. [14], возможными причинами освобождения

и действия аларминов внутриматочными тканями могут быть: гипоксия/ишемия, сосудистая дисфункция, окислительный стресс, субоптимальная имплантация трофобласта, потребление про-оксидантов (сигаретный дым), алкоголь, нарушенное питание, хронический стресс, травма и иные факторы. Эти индукторы вызывают клеточный стресс и гибель клеток с освобождением DAMP, индуцирующих стерильное воспаление в гестационных тканях и, в частности в плаценте, фетальных мембранах, шейке матки. Исходом этого воспаления может быть разнообразная патология беременности – плацентарная дисфункция, внутриматочная задержка роста плода (ВМЗРП) преэклампсия, преждевременные роды. Освобождающие медиаторы воспаления из плаценты – цитокины, хемокины, микровезикулы, DAMP активируют клетки иммунной системы – нейтрофилы, моноциты, макрофаги, эндотелиальные клетки, их инфламасомы, что ведет к нарушению нормального вектора беременности.

Активация инфламасом, в частности NLRP3, может осуществляться через различные механизмы:

– за счет выхода калия (K⁺) из цитозоля клетки. Это осуществляется при стимуляции P2X7 рецепторов их лигандом внеклеточным АТФ [1]. P2X7 рецепторы, экспрессируемые плацентой [15] и миометрием [16], являются ионными каналами;

– стерильное воспаление, как и нестерильное, связано с генерацией активных форм кислорода (АФК). АФК, генерируемые поврежденными митохондриями, могут быть источником активации NLRP3 [17];

– третий механизм связан с повреждением лизосом кристаллическими структурами, такими как асбест, кремний, адьюванты, кристаллы холестерина, мочевой кислоты. Лизосомальные протеазы, освобождаемые в цитозол, и в частности катепсин-Д, запускают активацию NLRP3 инфламасом [18] с последующей конверсией про-ИЛ-1 β , про-ИЛ-18, в ИЛ-1 β и ИЛ-18, секреция которых индуцирует стерильное воспаление. Важно отметить, что стерильное воспаление можно разделить на каспаза-1 зависимое и каспаза-1 независимое [19]. Во втором случае конверсия про-ИЛ-1 β в ИЛ-1 β осуществляется катепсином-С. Эти формы стерильного воспаления зависят от стимулов, которые структурно различны, а также рецепторов, распознающих эти лиганды.

Инфламасомы при беременности. Открытие инфламасом позволило расширить наши знания о воспалении. Стало возможным объяснение такой патологии, как периодический синдром [20, 21], и, как следствие этого, появление нового вида воспаления – аутовоспаления [22]. Инфламасомы – это мультимерные комплексы, конвертирующие про-ИЛ-1 β , про-

ИЛ-18 в зрелые формы, являющиеся внутриклеточными «сенсорами опасности». Несомненно, что это упрощенное определение, так как их функция во многом еще до конца не определена. Инфламасомы являются ключевыми структурами индукции стерильного воспаления [23].

Уже на ранних этапах беременности – первый триместр, зарегистрирована транскрипция генов NLRP1, NLRP3, NLRP4, каспазы-1 и ИЛ-1 β в цитотрофобласте человека, децидуальных стромальных клетках и децидуальных эндотелиальных клетках, стимулированных липополисахаридом (ЛПС) [24]. Авторы также показали, что в цитотрофобласте и децидуальных стромальных клетках ЛПС повышал экспрессию мРНК, каспазы-1 и ИЛ-1 β специфически положительно регулировал NLRP3. ЛПС повышал секрецию ИЛ-1 β из клеток цитотрофобласта первого триместра и децидуальных стромальных, но не эндотелиальных клеток. Эти данные позволяют говорить, что клетки цитотрофобласта и децидуальные стромальные клетки участвуют как в иммунной защите, так и в продукции цитокинов. Известно также, что именно под влиянием ИЛ-1 β эпителиальные клетки матки экспрессируют интегрины и другие молекулы адгезии, что обеспечивает первичную фиксацию бластоцисты [2]. С современных позиций можно говорить о том, что подобные события могут быть индуцированы эндогенными лигандами TLR-4, на который лигируется ЛПС. На этом пути становится понятной роль стерильного воспаления, обеспечивающего нормальное течение беременности, связанных с инфекцией спонтанных аборт, выкидышей, преждевременных родов. Несомненно и то, что ход стерильного воспаления также может быть нарушен и проявляться повышением уровня воспаления, изменением спектра секретлируемых продуктов, что характерно как для преэклампсии, так и преждевременных родов.

Роль стерильного воспаления при некоторых осложнениях беременности. Преэклампсия. Необходимым компонентом преэклампсии (ПЭ) является воспаление. Однако его тип и характер до сих пор не установлены. Введение понятия стерильного воспаления во многом расширяет наши знания в отношении формы воспаления при данном осложнении беременности. Преэклампсия, в особенности ранняя форма, связана с дефицитом утеро-плацентарного кровотока, связанного с нарушенной инвазией фетального трофобласта в спиральные артерии, недостаточного их ремоделирования и, как следствие этого, уменьшенной плацентарной перфузии и появления гипоксии/ишемии в утеро-плацентарном пространстве. Локальная депривация (недо-

статочность) кислорода и нутриентов связана с повышенной гибелью клеток трофобласта [25, 26]. Освобождающиеся при этом медиаторы воспаления индуцируют активацию эндотелиальных клеток и системное материнское воспаление, характеризующееся повышенным уровнем таких провоспалительных цитокинов, как ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, фактор некроза опухолей-альфа (ФНО- α) [27, 28]. Поскольку воспаление протекает в условиях отсутствия микробной инфекции, оно характеризуется как стерильное воспаление [14].

Трофобласт содержит многочисленные алармины, включая АТФ, мочевую кислоту, протеин из группы высокоподвижных белков [high-mobility group box 1, HMGB1], интерлейкин-1 α , фетальную ДНК, которые могут индуцировать стерильный воспалительный ответ [29]. Эти алармины, освобождаясь в материнскую циркуляцию как свободные медиаторы при гибели трофобласта или как часть синцитиотрофобластных микровезикул, поглощаются фагоцитами, индуцируя воспалительный ответ, характеризующийся повышенной адгезией моноцитов к эндотелиальным клеткам [30]. Форма гибели синцитиотрофобласта также важна для индукции активации: иммунной системы, эндотелиальных клеток. Так гипоксия запускает преимущественно некроз и в меньшей степени апоптоз в плацентарном синцитиотрофобласте [31]. Пироптоз, а также ферроптоз, также зарегистрированы в плаценте при ПЭ. Эти данные позволяют предполагать, что патологический некроз трофобласта, наблюдаемый при ПЭ, индуцирует воспалительные механизмы, отличные от тех, которые наблюдаются при нормальной беременности. В подтверждение этого можно привести данные A.S. Aly и соавт. [32], показавших, что синцитиотрофобластные микровезикулы при ПЭ индуцируют большее количество супероксид радикала в нейтрофилах, чем в контроле. Нами ранее было показано, что плацентарные экстракты при нормальной беременности тормозят генерацию супероксид радикала в нейтрофилах.

Индукторы стерильного воспаления при преэклампсии. Изучение индукторов стерильного воспаления при ПЭ показало, что их экспрессия/секреция, содержание в сыворотке крови повышены при данной патологии. Так, например, повышенный уровень внеклеточной фетальной ДНК коррелирует со степенью ухудшения плацентарной перфузии [33]. Фетальная ДНК, в том числе митохондриальная, запускает воспаление через толл-подобный рецептор 9 (TLR-9) [34]. Мочевая кислота (МК) при нормальных концентрациях, являясь классическим антиоксидантом, при повышенной концентрации > 260–360 мкмоль/л, входя в клетки через уратные транспортеры, начина-

ет оказывать прооксидантное действие. Мочевая кислота, действуя через ТПП-4, способна активировать инфламасомы и, в частности NLRP3 [35]. Активация инфламасом снижает уровень аутофагии – процесса деградации поврежденных органелл и рециклинга клеточного метаболизма. Это реализуется через следующие механизмы: снижение продукции АФК, удаления поврежденных митохондрий, деградации ASC агрегатов и секвестрации про-ИЛ-1 β [36]. С другой стороны, блокада аутофагии усиливает активацию инфламасом через аккумуляцию АФК-генерирующих митохондрий [17]. Другими словами, между инфламасомами и аутофагией существуют сложные взаимосвязи, обеспечивающие внутриклеточный гомеостаз, так необходимый для нормального течения беременности. Здесь мы отметим, что при ПЭ аутофагия ингибируется [37]. Гиперурикемия оказывает неблагоприятное действие на все звенья, повреждаемые при ПЭ: плаценту, снижая плацентарную активность эндотелиальной NO синтазы, периферические сосуды, оказывая вазоконстрикторный эффект, почки [38]. Более того, проникая через плаценту к плоду, может оказывать неблагоприятное действие и на плод в результате ее длительного воздействия, поскольку ее повышение при ПЭ наблюдается уже в первом триместре [39].

Важным индуктором стерильного воспаления, функции которого интенсивно изучаются при различной патологии, и в частности при ПЭ, является протеин-1 из группы высокоподвижных белков [high-mobility group box1, HMGB1]. Протеин-1 является 25кДа негистонным протеином с цитокин-подобной активностью вне клетки. Внутри ядра он участвует в репликации ДНК, транскрипции и хромосомной стабилизации [40]. Освобождение протеина-1 во внеклеточное пространство осуществляется активно (секреция) и пассивно при повреждении клеток, в том числе гипоксией, что приводит к развитию стерильного воспаления. Его уровень при ПЭ в плазме крови повышен [41]. Он действует как сигнал опасности через ТПП-2, 4 и 9, экспрессируемые плацентой. Являясь алармином, участвует в индукции стерильного воспаления при плацентарной гипоксии через следующие механизмы [14]:

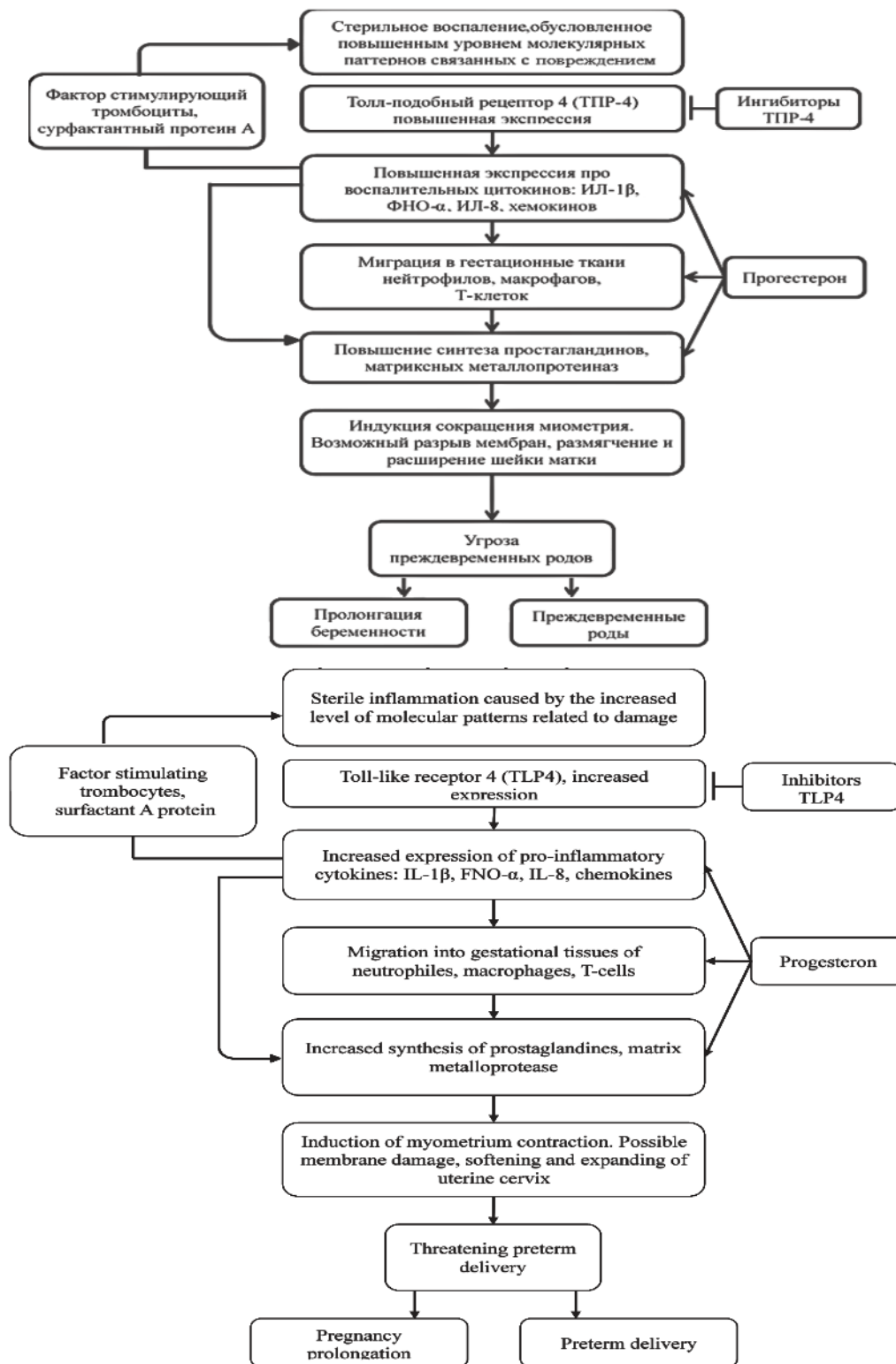
- освобождается в материнскую циркуляцию как результат гибели трофобласта;
- повышаясь системно и локально в плаценте при ПЭ;
- способен индуцировать воспалительный процесс через паттерны, распознающие рецепторы (pattern – recognition receptors – PRPs), обильно представленные в утероплацентарном компартменте при ПЭ.

Преждевременные роды. Роды являются кульминацией воспалительного каскада во время беременно-

сти, когда лейкоциты, мигрировавшие в шейку матки, плодные оболочки продуцируют широкий спектр утеро-трофинов, цитокинов, хемокинов, матриксных металлопротеиназ, ведущих к размягчению шейки матки, разрыву плодных мембран, интенсификации сокращения миометрия. Патологическое воспаление запускает пути, ведущие к преждевременным родам, независимо от инфекции [42]. Алармины являются важными кандидатами, способными запускать стерильное воспаление, триггера преждевременных родов. По данным R. Romero [43], стерильное интра-амниотическое воспаление наблюдается значительно чаще, чем интра-амниотическое, связанное с микробами у женщин с преждевременными родами и интактными мембранами. У женщин с угрозой преждевременных родов в сыворотке и гестационных тканях повышается содержание-экспрессия таких аларминов, как фетальная ДНК [44], HMGB1 [45], интерлейкин-1 [46]. Это повышение различных аларминов, возможно, является связью между различными причинами преждевременных родов, тканевым повреждением и гибелью клеток, инициирующих провоспалительный и про-родовой ответ. Эти причины включают плацентарное старение, нарушение толерантности к плоду, шеечную недостаточность, кровотечения, гипоксию/ишемию.

Стерильные триггеры преждевременных родов.

При преждевременных родах (ПР) эндогенные лиганды в данной статье рассматриваются на примере лигандов ТПП-4 как наиболее изученных. Они экспрессируются и секретируются гестационными тканями. Так, например, фетальные мембраны (амнион и хорион), экспрессирующие ТПП-4, являются источником таких DAMP, как HMGB1, белок теплового шока 70, что ведет к активации ТПП-4, ЯФкВ, секреции провоспалительных цитокинов, хемокинов, матриксных металлопротеиназ, способных запускать разрыв фетальных мембран [47]. Фетальные мембраны секретируют DAMP в околоплодные воды, туда же из легких плода попадают фактор активизирующий тромбоциты и сурфактантный протеин-А, способные активировать ТПП-4. В матке (децидуа и миометрий) DAMP активируют ТПП-4, что приводит к миграции в эти компартменты лейкоцитов, секреции цитокинов, простагландинов, матриксных металлопротеиназ и, как следствие этого, сокращение миометрия. В шейке матки фактор, активизирующий тромбоциты (platelet-activating factor) активирует ТПП-4, что ведет к миграции в этот компартмент лейкоцитов-нейтрофилов, макрофагов, Т-клеток, что приводит к секреции провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-6, хемокина ИЛ-8, матриксных металлопротеиназ, что ведет к размягчению и расширению шейки матки. Другими словами, в выше-



Механизм индукции преждевременных родов при стерильном воспалении.
 The mechanism threatening preterm delivery induction during sterile inflammation.

перечисленных маточных компартаментах при ПР возникает воспаление. Можно высказать предположение, что при локализации воспаления в плаценте индуцируется ПЭ, в то время как в фетальных мембранах и миометрии развиваются ПР. Косвенным доказательством этого могут служить данные, указывающие на то, что микробный миметик ЛПС способен индуцировать у беременных мышей как ПЭ, так и преждевременные роды. Отметим два важных обстоятельства: время введения и доза введения ЛПС. S.A. Robertson и соавт. [47] отмечают, что лиганды ТПР-4 могут переходить из околоплодных вод в миометрий, шейку матки, тем самым усиливая сокращение матки, дилатацию шейки и индукцию родов. В пользу стерильного воспаления говорит также повседневная практика, когда при угрозе преждевременных родов на фоне сокращающейся матки, но с интактными мембранами, лечение без антибиотиков в основной массе ведет к пролонгации беременности. Прямым доказательством роли стерильного воспаления в индукции преждевременных родов являются данные N. Gomez-Lopez и соавт. [48], показавших, что внутри амниотическое введение алармина HMGB1 индуцирует спонтанные преждевременные роды. Суммируя вышеприведенные данные, можно следующим образом представить роль стерильного воспаления в индукции преждевременных родов (см. рис.).

Существующие фармакологические стратегии лечения преждевременных родов направлены на ингибирование про-воспалительных медиаторов и использование токолитических агентов, супрессирующих сокращение матки. Здесь же представлено новое направление в лечении, направленное на блокаду начального узла воспалительного каскада в виде антагониста ТПР-4. В качестве такого антагониста в настоящее время испытывается налоксон или его аналоги [49]. Разрабатываются и другие лечебные подходы, где в качестве мишени используются алармины, а именно: укороченный N-терминальный домен HMGB1-10кД, нейтрализующие анти HMGB1 моноклональные антитела, вазоактивный интестинальный пептид и урокортин как ингибитор секреции этого белка, уриказу – специфический фермент, для снижения МК, анакинру-рекомбинантный антагонист ИЛ-1 рецептора, синтетические олигонуклеотиды для конкурентного связывания ТПР-9 и другие [14].

Выводы

Стерильное воспаление играет важную роль при таких патологиях беременности, как преэклампсия и угроза преждевременных родов.

Представлены новые звенья патогенеза обеих патологий беременности, включающих эндогенные мо-

лекулярные паттерны, связанные с повреждением, их рецепторами и сигнальными путями.

Индукторы микробного и немикробного воспаления представлены как экзогенные и эндогенные стимуляторы, действующие через одни и те же рецепторы.

Представленные данные способствуют появлению новой формы стерильного воспаления, обусловленного аларминами.

Литература

(п.п. 1–27; 28–49 см. References)

28. Щербаков В.И., Поздняков И.М., Ширинская А.В., Волков М.В. Роль провоспалительных цитокинов в патогенезе преждевременных родов и преэклампсии. *Росс. вестник акуш. гинекол.* 2020; 20 (2): 15-21. doi: org/10.17116/rosakush20202002.115.

References

1. Khan R.N., Hay D.P. A clear and presents danger inflammasomes DAMPing down disorders of pregnancy. *Hum. Reprod. Update.* 2015; 21(3): 388-405.
2. Dominguez F., Yanez-Mo M., Sanchez-Madrid F., Simon C. Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players? *Faseb J.* 2005; 19 (9): 1056-60.
3. Shynlova O., Lee Y.H, Srihajan K., Lye A.J. Physiology uterine inflammation and labor onset; integration of endocrine and mechanical signals. *Reprod Sci.* 2013; 20 (2): 154-67.
4. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative eustress. *Redox Biol.* 2017; 11: 613-9.
5. Terzieva A., Dimitrova V., Dierov L., Dimitrova P., Zapryanova S., Hristova I., et. al. Early pregnancy human decidua is enriched with activated, fully differentiated and inflammatory gamma/delta T-cells with diverse TCR receptoires. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20 (3): 687.
6. Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med. Princ. Pract.* 2013; 22(1): 8-19.
7. Cornelius D. Preeclampsia: from inflammation to immunoregulation. *Clin Med. Insights.* 2018; (11): 1-6.
8. Ramma W., Ahmed A. Is inflammation the cause of preeclampsia? *Biochem. Soc. Trans.* 2011; 39(6): 1619-27.
9. Murthi P., Pinar A., Dimitriadis E., Samuel C.S. Inflammasomes—a molecular link for altered immunoregulation and inflammation mediated vascular dysfunction in preeclampsia. *Int. J. Mol. Sci.* 2010; 21(4): 1406
10. Xiao L., Liu Y., Wang N. New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2014; 306(3): H317-H325.
11. Koga K., Mor G. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. *Amer. J. Reprod. Immunol.* 2010; 63(6): 587-601.
12. Lappas M. NOD1 and NOD2 regulate proinflammatory and prolabor mediators in human fetal membranes and myometrium via nuclear factor –kappaB. *Biol. Reprod.* 2013; 89(1): 14.
13. Zhang Y.Y., Chen H., Sun C., Wang H.Z., Liu W.L., Nie X.L., et. al. Expression and functional characterization of NOD2 in decidual stromal cells isolated during the first trimester of pregnancy. *Plos. One.* 2014; 9 (6): e 99612.
14. Nadeau-Vallee M., Obari D., Palacios J., Brien M., Duval C., Chemtob S. Sterile inflammation and pregnancy complications: a review. *Repro.* 2016; 152(6): R277-R292.
15. Roberts V.H. J., Greenwood S.L., Elliott A.S., Sibley C.P., Waters H. Purinergic receptors in human placenta: evidence for functionally active P2X4, P2X7, P2Y2, and P2X6. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006; 290(5): R1374-R1386.

16. Mijoshi H., Yamaoka K., Urabe S., Kodama M., Kudo Y. Functional expression of purinergic P2X7 receptors in pregnant rat myometrium. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2010; 298(13): R117-R112.
17. Zhou R., Yazdi A.S., Menu P., Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* 2011; 469(7329): 221-5.
18. Hornung V., Bauernfeind F., Halle A., Samstad E.O., Kono H., Rock K.L., et. al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 2008; 9(8): 847-56.
19. Kono H., Orlowski G.M., Patel Z., Rock K.L. The IL-1 dependent inflammatory response has a substantial caspase-1-independent component that requires cathepsin C. *J. Immunol.* 2012; 128(7): 3734-40.
20. Hoffman H.M., Mueller J.L., Broide D.H., Wanderer A.A., Kolodner R.D. Mutation of a new gene encoding a putative pyrinlike protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat. Genet.* 2001; 29(3): 301-5.
21. Hoffman H.M., Vnderer A.A. Inflammasome and IL-1beta-mediated disorders. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2010; 10(4): 229-35.
22. Doherty T.A., Brydges S.D., Hoffman H.M. Autoinflammation: translating mechanism to therapy. *J. Leukoc. Biol.* 2011; 9(1): 37-47.
23. Chen G.Y., Nunez Winez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10(12): 826-37.
24. Pontillo A., Girardelli M., Agostinis C., Masat E., Bulla R., Crovella S. Bacterial LPS differently modulates inflammasome gene expression and IL-1beta secretion in trophoblast cells, decidual stromal cell, and decidual endothelial cells. *Reprod. Sci.* 2013; 20(5): 563-6.
25. Scherbakov V.I. Apoptosis in the trophoblast and its role in pregnancy complications. *Biol. Bull. Rev.* 2011; 1(4): 325-35. (in Russian)
26. Wu Z.M., Yang H., Li M., Yeh C.C., Schatz F., Lockwood C.J., et. al. Pro-inflammatory cytokine-stimulated first trimester decidual cells enhance macrophage induced apoptosis of extravillous trophoblasts. *Placenta.* 2012; 33(3): 188-94.
27. Harmon A.S., Cornelius D.S., Amaral L.M., Faulkner J.I., Cunningham M.W. J., et. al. The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. *Clin. Sci.* 2016; 130(6): 409-19.
28. Scherbakov V.I., Pozdnykov I.M., Shirinskaya A.V., Volkov M.V. Role of pro-inflammatory cytokines in the pathogenesis of preterm birth and preeclampsia. *Russ. Bull. Obstet. Gynecol.* 2020; 20(2): 15-21. (in Russian). doi: org/10.17116/rosakush20202002.115
29. Tsung A., Tohme S., Billiar T.R. High-mobility group box-1 in sterile inflammation. *J. Intern. Med.* 2014; 276(5): 425-43.
30. Chen Q., Stone P.R., McCowan L.M., Chamley L.W. Phagocytosis of necrotic but not apoptotic trophoblast induces endothelial cell activation. *Hypertension.* 2006; 47(1): 116-27.
31. Huppertz B., Kingdom J., Caniggia I., Desoye G., Black S., Korh H., et. al. Hypoxia favours necrotic versus apoptotic shedding of placental syncytiotrophoblast into the maternal circulation. *Placenta.* 2003; 24(2-3): 181-90.
32. Aly A.S., Khandelwal M., Zhao J., Mehmet A.H., Sammel M.D., Parry S. Neutrophils are stimulated by syncytiotrophoblast microvillous membranes to generate superoxide radicals in women with preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004; 190: 252-8.
33. Vlkova B., Turna J., Celec P. Fetal DNA in maternal plasma in preeclamptic pregnancies. *Hypertension in pregnancy.* 2015; (341): 36-49.
34. Scharfe-Nugent A., Corr S.C., Carpenter S.B., Keogh L., Doyle B., Martin C., et. al. TLR9 provokes inflammation for fetal loss in response to fetal DNA: mechanism for fetal loss in preterm birth and preeclampsia. *J. Immunol.* 2012; 188(11): 5706-12.
35. Zheng Y., Gardner S.E., Clarke M.C.H. Cell death, damage-associated molecular patterns, and sterile inflammation in cardiovascular disease. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 2011; (31)12: 2781-6.
36. Jabir M.S., Ritchie N.D., Li D., Bayes H.K., Tourlomausis P., Puleston D., et. al. Caspase-1 cleavage of the TLK adaptor TRIF inhibits autophagy and beta-interferon production during pseudomonas aeruginosa infection. *Cell Host Microbe.* 2014; 15(2): 214-27.
37. Nakashima A., Tsuda S., Kusabiraki T., Aoki A., Ushiyama A., Shima T., et. al. Current understanding of autophagy in pregnancy. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(9): 23-42.
38. Kang D.H., Finch J., Grander J. Johnson R.J. Uric acid, endothelial dysfunction and pre-eclampsia: searching for a pathogenetic link. *J. Hypertension.* 2004; 22(2): 229-35.
39. Laughon S.K., Catov G., Powers R.W., Roberts J.M., Gandley R.E. First trimester uric acid and adverse pregnancy outcomes. *Amer. J. Hyperten.* 2011; 24(2): 489-95.
40. Stors M. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010; 1799(1-2): 101-13.
41. Pradervand P.A., Clers S., Frantz J., Rotaru C., Bardy D., Waeber B., et. al. High mobility group box 1 protein (HMGB-1): a pathogenic role in pre-eclampsia? *Placenta.* 2014; 35(9): 784-6.
42. Romero R., Espinoza J., Gonsalves L.F., Kusanovic J.P., Friel L.A., Nien L.A. Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Semin. Fetal. Neonatal. Med.* 2006; 11(50): 317-26.
43. Romero R., Miranda J., Chaiworapongsa T., Korzeniewski S.J., Chaensathong P., Gotsch F., et. al. Prevalence and clinical significance of sterile intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Amer. J. Reprod. Immunol.* 2014; 72(5): 458-74.
44. Jakobsen T.R., Clausen F.B., Rode L., Dziegiel M.N., Tabor A. High levels of fetal DNA are associated with increased risk of spontaneous preterm delivery. *Prenatal Diagnosis.* 2012; 32(9): 840-5.
45. Bredeson S., Papraconstantion J., Deford J.H., Kechichian T., Syed T.A., Saade G.R., et. al. HMGB promotes a p38MARK associated non-infections inflammatory response pathway in human fetal membranes. *PLoS ONE.* 2014; 9(12): e113799.
46. Puchner K., Iavazzo C., Gourgiotis D., Boutsikou M., Baka S., Hassiakos D., et. al. Mid-trimester amniotic fluid interleukins (IL-1beta, IL-10 and IL-18) as possible predictors of preterm delivery. *In Vivo.* 2011; 25(1): 141-8.
47. Robertson S.A., Hutchinson M.R., Rice K.S., Chin P., Moldenhane L.M., Stark M.J., et. al. Targeting toll-like receptor-4 to tackle preterm birth and fetal inflammatory injury. *Clin. Transl. Immunol.* 2020; 9(4): e1121.
48. Gomez-Lopez N., Romero P., Plazyo O., et. al. Intra-amniotic administration of HMGB-1 induces spontaneous preterm labor and birth. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2016; 75(1): 3-7.
49. Chin P.Y., Dorian C.L., Hutchinson M.R., et. al. Novel toll-like receptor-4 antagonist (+)-naloxone protect mice from inflammation-induced preterm birth. *Sci Rep.* 2016; (6): 36112.

Сведения об авторах:

Щербakov Владимир Иванович, доктор мед. наук, науч. сотр. исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», e-mail: Shcherbakov_VI@mail.ru;

Поздняков Иван Михайлович, доктор мед. наук, проф. каф. акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава России, гл. врач ГБУЗ НСО «Новосибирский городской клинический перинатальный центр», e-mail: Pozdnyakovivan@gmail.com;

Ширинская Анна Владимировна, канд. мед. наук, врач акушер-гинеколог. ГБУЗ НСО «Новосибирский городской клинический перинатальный центр», женская консультация № 2, e-mail: anncharm2004@mail.ru;

Волков Михаил Валентинович, врач акушер-гинеколог, ГБУЗ НСО «Клинический родильный дом № 6», женская консультация, e-mail: michaelis67@mail.ru