

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 14.05.2022
Подписано к печати 20.05.2022
Опубликовано 27.05.2022

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. № 2. 1–116.

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 № 2 · 2022

Апрель–Июнь

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 14.05.2022
Signed for publication on 20.05.2022
Published on 27.05.2022

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

ISSN 0031-2991

Pat Fiziol Eksp Ter
2022. Volume 66. No 2. 1-116.

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 № 2 · 2022

April–June

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

- Давыдова Т.В., Ветрилэ Л.А., Захарова И.А.** Влияние антител к глутамату на активность каспазы-3 в структурах головного мозга мышей с возрастными изменениями памяти 4
- Кабеева Е.Н., Ершов А.В., Литвицкий П.Ф., Тушова К.А., Ноздрюхина Н.В.** Особенности механизма развития и течения острого инсульта у пациентов с COVID-19 10
- Авдеев Д.Б.** Сравнительная морфометрическая характеристика проявлений отёка-набухания миндалевидного тела половозрелых белых крыс после 20-, 30-, 40-минутной окклюзии общих сонных артерий 18
- Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Ляпина Л.А., Шубина Т.А.** Функциональное состояние системы гемостаза при действии хитозана в условиях нарушения жирового обмена у крыс 28
- Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И.** Новые возможности диагностики и исследования патогенеза различных видов воспаления 34
- Мануилов А.С., Бельских А.Н., Бардаков С.Н., Жекалов А.Н., Тишко В.В., Никитин В.Ю., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К.** Особенности Т-клеточного иммунитета у больных ревматоидным артритом на фоне комплексной адаптивной иммунотерапии 43
- Четверяков А.В., Цепелев В.Л.** Уровень белка TIM-3 и его лиганда Galectin-9 у больных колоректальным раком 52
- Успенская М.С., Мурашев В.В., Ляпина М.Г., Майстренко Е.С., Ляпина Л.А.** Синергетические антикоагулянтные и фибриндеполимеризационные свойства гепариноидов из экстрактов гибридных сортов пионов («Куинджи», «Академик Садовничий», «Коралл») и древовидного пиона (*P. suffruticosa*) в сравнительном аспекте 59
- Волчков В.А., Титова О.Н., Рукавишников С.А., Ахмедов Т.А., Пушкин А.С., Сагинбаев У.Р., Давыдова Е.П.** Иммунопрофилактика COVID-19 в аспектах разных возрастных групп 66

ОБЗОРЫ

- Литвицкий П.Ф., Галимов К.Ш., Громенко Ю.Ю., Галимова С.Ш., Гилязова И.Р., Галимова Э.Ф., Павлов В.Н.** Роль митохондрий сперматозоидов в возникновении и развитии мужского бесплодия 72
- Луговая А.В., Эмануэль В.С., Иванов А.М., Артемова А.В., Семенова Е.В., Семенова В.В.** Современные представления о роли митофагии в патогенезе острого ишемического инсульта 80
- Власова Т.И., Арсентьева Е.В., Спирина М.А., Белова Л.А.** Сигнальные пути и молекулярные маркеры эпидермальных стволовых клеток в процессе регенерации кожи 91
- Хохлова А.В., Бойченко П.К., Востриков А.А., Магомедов М.У.** Роль белков теплового шока в патогенезе ряда компонентов метаболического синдрома 102

ВОПРОСЫ ПРЕПОДАВАНИЯ

- Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Шарпань Ю.В.** Патофизиология биоритмов (Лекция) 108

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Davydova T.V., Vetrile L.A., Zakharova I.A.** Effect of antibodies to glutamate on caspase-3 activity in brain structures of mice with age-related memory changes 4
- Kabaeva E.N., Ershov A.V., Litvitskiy P.F., Tushova K.A., Nozdryukhina N.V.** Features of the mechanism of development and course of acute stroke in patients with COVID-19 10
- Avdeev D.B.** Comparative morphometric characteristics of edema-swelling manifestations in the amygdala of adult white rats after 20-, 30-, and 40-min common carotid artery occlusion 18
- Griгорьева M.E., Obergan T.Yu., Lyapina L.A., Shubina T.A.** Functional state of the haemostasis system under the action of chitosan in conditions of impaired fat 28
- Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I.** New opportunities for diagnosis and investigation of the pathogenesis of various types of inflammation 34
- Manuilov A.S., Belskikh A.N., Bardakov S.N., Zhekalov A.N., Tishko V.V., Nikitin V.Yu., Kudryavtsev I.V., Serebryakova M.K.** Properties of T-cell immunity in patients with rheumatoid arthritis during complex adaptive immunotherapy 43
- Chetveryakov A.V., Tsepelev V.L.** Concentrations of TIM-3 protein and its ligand Galectin-9 in patients 52
- Uspenskaya M.S., Murashev V.V., Lyapina M.G., Maistrenko E.S., Lyapina L.A.** Comparison of synergistic anticoagulant and fibrin depolymerizing properties of heparinoid extracts from hybrid varieties of peonies («Kuindzhi», «Academician Sadovnichiy», «Coral») and tree peony *P. suffruticosa* 59
- Volchkov V.A., Titova O.N., Rukavishnikova S.A., Akhmedov T.A., Pushkin A.S., Saginbaev U.R., Davydova E.P.** Immunoprophylaxis COVID-19 in aspects of different age groups 66

REVEIWS

- Litvitskiy P.F., Galimov K.Sh., Gromenko J.Yu., Galimova S.Sh., Gilyazova I.R., Galimova E.F., Pavlov V.N.** The role of sperm mitochondria in the occurrence and development of male infertility 72
- Lugovaya A.V., Emanuel V.S., Ivanov A.M., Artemova A.V., Semenova E.V., Semenova V.V.** Current views on the role of autophagy in the pathogenesis of acute ischemic stroke 80
- Vlasova T.I., Arsenteva E.V., Spirina M.A., Belova L.A.** Signaling pathways and molecular markers of epidermal stem cells during regeneration 91
- Khokhlova A.V., Boichenko P.K., Vostrikov A.A., Magomedov M.U.** The role of heat shock proteins in the pathogenesis of some components of metabolic syndrome 102

TEACHING ISSUES

- Poryadin G.V., Salmasi J.M., Sharpan Yu.V.** Pathophysiology of biorhythms 108

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Давыдова Т.В., Ветрилэ Л.А., Захарова И.А.

Влияние антител к глутамату на активность каспазы-3 в структурах головного мозга мышей с возрастными изменениями памяти

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

Цель исследования. Цель исследования – изучение влияния антител к глутамату (АТ-ГЛ) на активность каспазы-3 в структурах гиппокампа и префронтальной коры у мышей C57Bl/6 с возрастными изменениями памяти.

Методика. Эксперименты выполнены на 30 мышах самцах линии C57Bl/6 (средняя масса $31,2 \pm 1,7$ г) в возрасте 12 мес. Животные были разделены на 2 группы. Опытная группа мышей ($n=20$) получала интраназально поочередно в каждую ноздрю растворенные в физиологическом растворе очищенные антитела к глутамату (250 мкг/кг, 4 мкл) в течение 14 сут. Контрольным животным ($n=10$) аналогично в течение 14 сут ежедневно вводили интраназально 4 мкл физиологического раствора. Через 24 ч после завершающего введения растворов у животных обеих групп проводили оценку процессов памяти в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) по стандартной методике. Часть животных декапитировали сразу после окончания поведенческого эксперимента, другую часть через 7 сут после отмены введения АТ-ГЛ. После извлечения мозга при $t - 4$ °С выделяли гиппокамп и префронтальную кору, материал сохраняли при -85 °С. Активность каспазы-3 выявляли, инкубируя при 37 °С аликвоты супернатанта в присутствии инкубационного буфера, содержащего субстрат каспазы-3 – ацетил-асп-глу-вал-асп-р-нитроанилида. Высвобождение в реакционную смесь р-нитроанилина оценивали через 30 мин спектрофотометрически при длине волны 405 нм. Активность каспазы-3 рассчитывали по скорости высвобождения р-нитроанилина в нмоль/мин на 1 мг белка и выражали в процентах, принимая за 100% активность фермента у контрольных животных. Для подтверждения специфичности гидролиза ацетил-асп-глу-вал-асп-р-нитроанилида каспазой-3 опытные пробы дополнительно инкубировали в присутствии ингибитора каспазы-3 Ac-DEVD-CHO. В качестве отрицательных контролей отдельно инкубировали аликвоты супернатантов без добавления субстрата для каспазы.

Результаты. В поведенческих экспериментах выявлено улучшение выработки УРПИ на 15-е сут от начала интраназального введения АТ-ГЛ. В результате проведенного нейрохимического исследования структур головного мозга установлено, что у мышей после 14-суточного интраназального введения наблюдалось увеличение активации каспазы-3 в префронтальной коре, а через 7 сут после отмены антител активность каспазы-3 не отличалась от ее активности в контрольной группе животных. В гиппокампе через 24 ч после 14-суточного введения антител изменений активности каспазы-3 выявлено не было. Однако через 7 сут после отмены введения антител в опытной группе мышей по сравнению с контролем отмечено увеличение активности каспазы-3.

Заключение. Изменения активности каспазы-3 в структурах мозга у стареющих мышей после введения антител к глутамату могут рассматриваться в качестве развития стадийного процесса улучшения функций памяти при старении.

Ключевые слова: память; антитела к глутамату; каспаза-3; префронтальная кора; гиппокамп; мыши; старение

Для цитирования: Давыдова Т.В., Ветрилэ Л.А., Захарова И.А. Влияние антител к глутамату на активность каспазы-3 в структурах головного мозга стареющих мышей с возрастными изменениями памяти. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 2022; 66(2): 4-9.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.4-9

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Давыдова Т.В.; сбор и обработка материала – Ветрилэ Л.А., Захарова И.А.; статистическая обработка результатов – Давыдова Т.В., Ветрилэ Л.А.; написание текста – Давыдова Т.В.; редактирование – Ветрилэ Л.А., Захарова И.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

Для корреспонденции: Давыдова Татьяна Викторовна, e-mail: dav-ta@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена по госзаданию.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.02.2022

Принята к печати 31.03.2022

Опубликована 27.05.2022

Davydova T.V., Vetrile L.A., Zakharova I.A.

Effect of antibodies to glutamate on caspase-3 activity in brain structures of mice with age-related memory changesResearch Institute of General Pathology and Pathophysiology,
125315, Moscow, 8 Baltiyskaya str.

The aim of the study was to investigate the effect of antibodies to glutamate (AT-GL) on caspase-3 activity in hippocampal and prefrontal cortex structures in C57Bl/6 mice with age-related memory change.

Methods. Experiments were performed on 30 male C57Bl/6 mice (mean weight 31.2 ± 1.7 g) at the age of 12 months. The animals were divided into 2 groups. The experimental group of mice ($n=20$) received purified antibodies to glutamate (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 4 μl) dissolved in saline intranasally into each nostril for 14 days. Control animals ($n=10$) were similarly injected daily intranasally with 4 μl of physiological solution for 14 days. Twenty-four hours after the final administration of the solutions, animals from both groups were evaluated in the passive avoidance reflex test (PSRT) according to the standard technique. One part of the animals was decapitated immediately after the end of the behavioral experiment, the other part 7 days after withdrawal of AT-GL administration. After brain extraction at -4°C , the hippocampus and prefrontal cortex were isolated, and the material was preserved at -85°C . Caspase-3 activity was detected by incubating aliquots of supernatant at 37°C in the presence of incubation buffer containing the caspase-3 substrate acetyl-asp-glu-val-asp-p-nitroanilide. The release of p-nitroaniline into the reaction mixture was assessed after 30 min spectrophotometrically at 405 nm. The activity of caspase-3 was calculated by the rate of p-nitroaniline release in nmol/min per 1 mg of protein and expressed as a percentage, taking the activity of the enzyme in control animals as 100%. To confirm the specificity of acetyl-asp-glu-val-asp-p-nitroanilide hydrolysis by caspase-3, experimental samples were additionally incubated in the presence of the caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CHO. As negative controls, aliquots of supernatants without added caspase substrate were incubated separately.

Results. Behavioral experiments revealed an improvement in the production of the PSRT on day 15 from the start of intranasal administration of AT-GL. As a result of neurochemical study of the brain structures, an increase in caspase-3 activation in the prefrontal cortex was observed in mice after 14 days of intranasal administration, and 7 days after the abolition of antibodies, the activity of caspase-3 did not differ from its activity in the control group of animals. No changes in caspase-3 activity were detected in the hippocampus 24 h after 14-day antibody injection. However, 7 days after cancellation of antibody injection, an increase in caspase-3 activity was observed in the experimental group of mice compared to the control.

Conclusion. Changes in caspase-3 activity in brain structures in aging mice after administration of antibodies to glutamate can be considered as the development of a staged process of memory function improvement during aging.

Keywords: memory; antibodies to glutamate; caspase-3; prefrontal cortex; hippocampus; mice; aging

For citation: Davydova T.V., Vetrile L.A., Zakharova I.A. Effect of antibodies to glutamate on caspase-3 activity in brain structures of mice with age-related memory changes. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya [Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal]* 2022; 66(2): 4-9. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.4-9

Author's contribution: concept and design of the study – Davydova T.V.; collection of material – Vetrile L.A., Zakharova I.A.; statistical data processing – Davydova T.V., Vetrile L.A.; writing of the text – Davydova T.V.; editing of the text – Vetrile L.A., Zakharova I.A. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Tatyana V. Davydova*, Chief Researcher of the Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, e-mail: dav-ta@yandex.ru

Financing. The work was carried out according to the state task.

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

Information about the authors:Davydova T.V., <https://orcid.org/0000-0002-3176-1035>Vetrile L.A., <https://orcid.org/0000-0001-9783-4711>Zakharova I.A., <https://orcid.org/0000-0002-5648-4214>

Received 11.02.2022

Accepted 31.03.2022

Published 27.05.2022

Нейроиммунологические подходы в коррекции возрастных когнитивных нарушений представляют несомненный интерес в качестве перспективного направления профилактики и лечения заболеваний, связанных со старением головного мозга. В настоящее время антитела к нейромедиаторам могут выступать как эндо-

генные протективные вещества, участвующие в сано-генетических механизмах при различных нарушениях ЦНС [1]. Ранее на экспериментальных моделях нейродегенеративной патологии головного мозга и при старении у животных были показаны антиамнестические свойства поликлональных моноспецифических анти-

тел к глутамату (АТ-ГЛ). На модели болезни Альцгеймера при введении в ядро Мейнерта мозга половозрелых крыс Вистар нейротоксического фрагмента Ab_{25-35} , вызывающего нарушение выработки условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ), однократное интраназальное введение АТ-ГЛ в дозе 250 мкг/кг, снижало выраженность нарушения памяти [2]. Антиамнестическое действие АТ-ГЛ было также показано в экспериментах с амилоидогенными структурами провоспалительного белка S100A9, вовлеченного в амилоидный каскад при болезни Альцгеймера [3]. Показано, что введение АТ-ГЛ совместно с фибриллярными или олигомерными формами белка S100A9 не приводило к нарушению памяти у стареющих животных [4, 5]. Эффект улучшения выработки УРПИ также наблюдался у стареющих мышей C57Bl/6 после 14 дневного интраназального введения АТ-ГЛ в дозе 250 мкг/кг и сохранялся у них в течение 7 дней после отмены антител [6, 7]. При этом в гиппокампе мозга мышей, получавших АТ-ГЛ, было отмечено снижение содержания дофамина и повышение концентрации его метаболитов, но не обнаружено их влияния на обмен нейромедиаторных аминокислот. В префронтальной коре АТ-ГЛ не влияли на обмен нейромедиаторов, вызывая повышение уровня как возбуждающих, так и тормозных аминокислот, не изменяя их соотношения [6]. Через 7 дней после отмены АТ-ГЛ в гиппокампе мозга животных было выявлено повышение содержания дофамина и его метаболитов, а также повышение уровня аспарагиновой кислоты и таурина. В префронтальной коре антитела к глутамату не влияли на обмен нейромедиаторов, вызывая при этом повышение уровня глутамата [7]. Полученные факты свидетельствуют об антиамнестических эффектах АТ-ГЛ при когнитивном дефиците, однако, необходимо отметить, что механизмы действия АТ-ГЛ в настоящее время изучены недостаточно.

В последнее время особое внимание уделяется изучению роли каспазозависимых процессов апоптоза в механизмах развития нейродегенеративной патологии головного мозга, в частности при болезни Альцгеймера. Получены свидетельства, что увеличение активности каспазы-3 — ключевого фермента апоптоза является причиной гибели нейронов и способствует формированию сенильных бляшек при болезни Альцгеймера [8]. В экспериментах на крысах было показано, что нейродегенеративное повреждение мозга, развивающееся при введении нейротоксического фрагмента бета-амилоидного белка Ab_{25-35} в базальные ганглии, вызывает активацию каспазы-3 в префронтальной коре головного мозга и гиппокампе на 3 сутки после повреждения. Ин-

траназальное введение антител к глутамату 300 мкг/кг через час после повреждения приводит к снижению активности фермента в этих структурах у крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера [9].

В связи с этим целью настоящего исследования было изучение влияния АТ-ГЛ на особенности активности каспазы-3 в структурах мозга (гиппокамп, префронтальная кора) у мышей с возрастными изменениями памяти.

Методика

Эксперименты выполнены на 30 мышах самцах линии C57Bl/6 (средняя масса $31,2 \pm 1,7$ г) в возрасте 12 мес. Животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде и 12-часовом световом режиме. Исследование проводилось в соответствии с этическими принципами и Директивами Европарламента и Совета европейского союза (2010/63/EU), регламентирующими использование животных в научных целях, а также “Правилами надлежащей лабораторной практики”, утвержденными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБНУ “НИИОПП”.

Поликлональные моноспецифические антитела к глутамату (АТ-ГЛ) получали при иммунизации по стандартной схеме самцов кроликов Шиншилла конъюгатом глутамата с белком носителем — бычьим сывороточным альбумином (БСА), синтезированным с помощью глутаральдегида по описанному ранее протоколу [5]. Выделенные антитела очищали с помощью аффинной хроматографии с использованием синтезированного сорбента на основе BcCN-активированной селфарозе-4В и иммобилизованного на ней БСА по стандартной методике. Титр АТ-ГЛ составлял $1:1024 \pm 1:16$.

Мыши C57Bl/6 были разделены на 2 группы. Опытная группа мышей ($n=20$) получала интраназально поочередно в каждую ноздрю растворенные в физиологическом растворе очищенные антитела к глутамату (250 мкг/кг, 4 мкл) в течение 14 сут. Контрольным животным ($n=10$) аналогично интраназально ежедневно вводили 4 мкл физиологического раствора в течение 14 сут. Через 24 ч после завершающего введения растворов у животных обеих групп проводили оценку процессов памяти в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) по методике, описанной ранее [6]. У мышей регистрировали время перехода в темный отсек в первые сутки эксперимента (ЛП₁ с) и на вторые сутки фиксировали время перехода в темную камеру (ЛП₂ с). Период наблюдения за каждым животным составлял 300 с (с момента открытия дверцы в дни

обучения и тестирования). Выраженность степени запоминания животными действия электрошока определяли по разности латентных периодов перехода животного в темную камеру при выработке УРПИ и через 24 ч после обучения в день тестирования (ДЛП, с). По окончании поведенческого эксперимента одну часть животных декапитировали сразу, другую часть – через 7 сут после отмены АТ-ГЛ. После извлечения мозга при $t - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ выделяли гиппокамп и префронтальную кору, материал сохраняли при $- 85\text{ }^{\circ}\text{C}$

Структуры головного мозга на холоду при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ гомогенизировали в охлажденном лизирующем буфере (рН 8,0) (150 мМ NaCl, 1% ТритонХ-100, 0,5% дезоксихолат натрия, 50мМ Трис, 5мМ дитиотриетол, 2мМ ЭДТА) в соотношении ткань-буфер 1:20 (=10 мг белка на 1 мл супернатанта) на гомогенизаторе Heidolph DIAX 100 (Germany) при 5000 об/мин в течение 15 с. Гомогенат центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 мин на центрифуге Sorval 5B (Du Pont, США) [10]. Супернатант использовали для определения концентрации белка и активности каспазы-3.

Концентрацию белка определяли на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Scitntific, USA) при длине волны 280 нм.

Активность каспазы-3 выявляли, инкубируя при $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ аликвоты супернатанта (300 мкг белка) в присутствии 250 мкл инкубационного буфера, содержащего 200 мкМ субстрата каспазы-3 – ацетил-асп-глу-вал-асп-р-нитроанилида (Ac-DEVD-p-nitroanilide) (A-2559, Sigma- Aldrich, USA). Состав буфера для инкубации включал 20мМ HEPES (рН 7,5), 5 мМ дитиотриетол, 2мМ ЭДТА [10]. Высвобождение в реакционную смесь р-нитроанилина оценивали через 30 мин спектрофотометрически на Microplate Reader “ImmunoChem-2100” (США) при длине волны 405 нм. Активность каспазы-3 рассчитывали по скорости высвобождения р-нитроанилина в нмоль/мин на 1 мг белка и выражали в процентах, принимая за 100% активность фермента у контрольных животных. Для подтверждения специфичности гидролиза ацетил-асп-глу-вал-асп-р-нитроанилида каспазой-3 опытные пробы дополнительно инкубировали в присутствии 20 мкМ ингибитора каспазы-3 – Ac-DEVD-CHO (A-0835, Sigma-Aldrich, США). В качестве отрицательных контролей отдельно инкубировали аликвоты супернатантов без добавления субстрата для каспазы.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 7.0 (“StatSoft”, США) с использованием однофакторного непараметрического дисперсионного анализа по методу Крускала–Уолли-

са (Н-критерий) с последующим post-hoc анализом по U-критерию Манна–Уитни. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принимались равными 0,05.

Результаты и обсуждение

Эффективность воздействия АТ-ГЛ на нарушения памяти оценивали в поведенческом эксперименте. Было показано улучшение выработки УРПИ на 15-е сут от начала интраназального введения антител. Результаты эксперимента представлены на **рис. 1**. Как видно из рисунка степень запоминания у мышей, получавших АТ-ГЛ улучшилась в 2,3 раза, величина ДЛП составила $242,9 \pm 34,3$ с по сравнению с животными контрольной группы, у которых ДЛП составляла $105,8 \pm 67,0$ с ($p < 0,05$).

В нейрохимических исследованиях активность каспазы-3 у опытных и контрольных мышей C57Bl/6 в исследованных структурах мозга (префронтальной коре и гиппокампе) выявлялась в следующих диапазонах: 3,1–5,2 и 2,1–3,6 пмоль/мин/мг белка соответственно. Исследование активности каспазы-3 после 14-сут интраназального введения АТ-ГЛ в структурах головного мозга стареющих мышей C57Bl/6 выявило разницу между обследованными группами: в префронтальной коре Н ($2N=26$) =8,2; $p < 0,0166$, в гиппокампе Н ($2N=24$) = 6,076; $p < 0,0479$. Результаты межгрупповых различий активности каспазы-3 в префронтальной коре и гиппокампе головного мозга мышей после 14-сут введения АТ-ГЛ и через 7 сут после их отмены представлены на **рис. 2**. Как видно из рисунка у мышей после 14-сут интраназального введения АТ-ГЛ наблюдалось повышение активности каспазы-3 в префронтальной коре головного мозга, а через 7 сут после отмены антител активность каспазы-3 не отличалась от таковой в контрольной группе животных. В гиппокампе после 14 сут введения АТ-ГЛ изменений активности каспазы-3 выявлено не было. Однако через 7 сут после отмены антител в опытной группе мышей отмечалось увеличение активности каспазы-3.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов было показано, что курсовое 14-суточное интраназальное введение АТ-ГЛ стареющим мышам приводит к увеличению активности проапоптозной эффекторной каспазы-3 в префронтальной коре головного мозга. Через 7 суток после отмены антител наблюдали снижение активности каспазы-3 до уровня у контрольных животных, получавших интраназально физиологический раствор. В гиппокампе, напротив, активность каспазы-3 не отличалась от контроля после 14 сут введения АТ-ГЛ, в то время как через 7 сут после отмены антител она существенно возрастала.

Полученные результаты о разнонаправленном влиянии курсового интраназального введения АТ-ГЛ на активность каспазы-3 в структурах головного мозга

(префронтальной коре и гиппокампе), по всей вероятности, следует рассматривать в связи с ее плейотропным действием. Каспаза-3 принимает участие не толь-

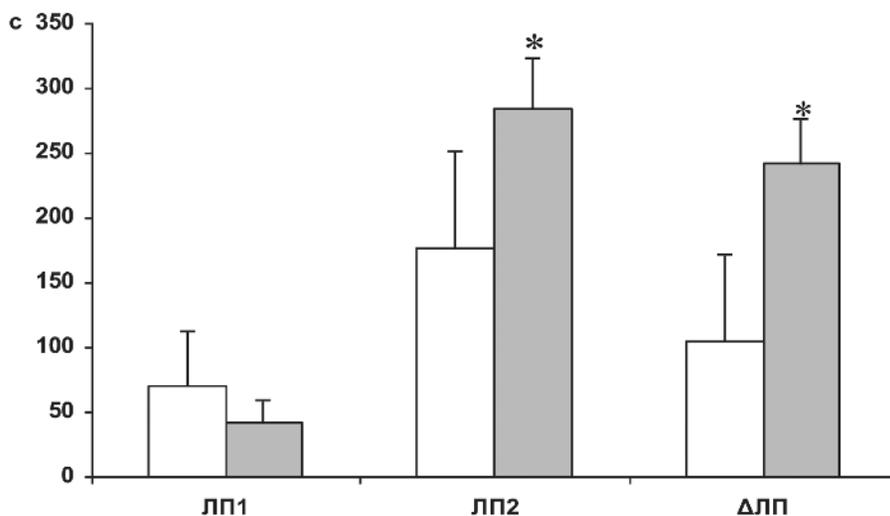


Рис. 1. Антиамнестические эффекты антител к глутамату после 14 сут интраназального введения стареющим мышам C57Bl/6. По горизонтали: светлые столбики – контроль, темные — опыт. ЛП₁ – латентный период 1, ЛП₂ – латентный период 2, ΔЛП=ЛП₂ – ЛП₁. По вертикали – время нахождения в светлом отсеке камеры (с); * $p < 0,05$.

Fig. 1. Antiamnestic effects of antibodies to glutamate after 14 days of intranasal administration to aging C57Bl/6 mice. Horizontally: light columns – control, dark – experience. LP₁ – latent period 1, LP₂ – latent period 2, ΔLP=LP₂ – LP₁; vertically: the time spent in the light compartment of the camera (s); * $p < 0,05$.

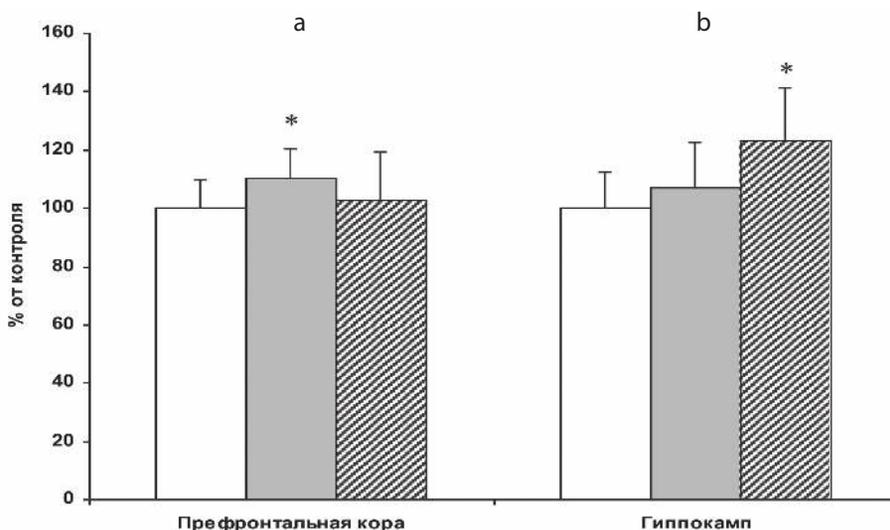


Рис. 2. Влияние антител к глутамату на активность каспазы-3 в префронтальной коре и гиппокампе головного мозга стареющих мышей C57Bl/6. По вертикали: активность каспазы-3 в процентах к контролю. По горизонтали: а – префронтальная кора, б – гиппокамп: светлые столбики – контроль, темные – 14 сут введения интраназально АТ-ГЛ, заштрихованные – через 7 сут после отмены введения антител; * - $p < 0,05$.

Fig. 2. Effect of antibodies to glutamate on caspase-3 activity in the prefrontal cortex and hippocampus of aging C57Bl/6 mice. Vertical: caspase-3 activity as a percentage of control. Horizontally: а – prefrontal cortex, б – hippocampus: light bars – control, dark bars – 14 days of intranasally administered AT-GL, shaded bars – 7 days after withdrawal of antibody administration; * - $p < 0,05$.

ко в обеспечении процессов программируемой гибели нейронов, но и в нейропластичности. Множество эффектов данной цистеиновой протеазы связано с большим количеством расщепляемых ею субстратов [11]. Повышение активности каспазы-3 наблюдается также при снижении эффективности межнейронных воздействий [12]. Взаимосвязь улучшения мнестических функций у стареющих мышей, получавших интраназально АТ-ГЛ, с увеличением активности каспазы-3 через 14 сут после их введения в префронтальной коре и через 7 сут после их отмены в гиппокампе следует, возможно, рассматривать как проявление нейропластических процессов, а не как проявление апоптоза клеток головного мозга.

Литература

1. Евсеев В.А. *Антитела к нейромедиаторам в механизмах нейроиммунопатологии*. М.: 2007, Изд. РАМН.
2. Горбатов В.Ю., Трекова Н.А., Фомина В.Г., Давыдова Т.В. Антиамнестическое действие антител к глутамату при экспериментальной болезни Альцгеймера. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2010; 150(1): 28–30.
4. Грудень М.А., Давыдова Т.В., Фомина В.Г., Ветрилэ Л.А., Морозова-Roche L.A., Sewell R.D.E. Антиамнестические эффекты антител к глутамату при действии фибриллярных структур провоспалительного белка S100A9 у старых мышей линии C57Bl/6. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2016; 162(10): 422–5.
5. Грудень М.А., Давыдова Т.В., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Ветрилэ Л.А., Морозова-Roche L.M.A. и др. Нейропротекторные эффекты антител к глутамату при нарушениях памяти, индуцированных олигомерами провоспалительного белка S100A9 у стареющих животных. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2017; 61(4): 25–32.
9. Колобов В.В., Захарова И.А., Фомина В.Г., Горбатов В.Ю., Давыдова Т.В. Влияние антител к глутамату на активность каспазы-3 в структурах головного мозга крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера. *Бюл. exper. биол. и мед.* 2012; 154(10): 417–20.
10. Шерстнёв В.В., Юрасов В.В., Грудень М.А., Яковлева Н.Е., Сторожева З.И., Прошин А.Т. и др. Биохимические маркеры апоптоза в мозге “интактных” крыс и при центральном действии белка S100b. *Нейрохимия*. 2004; 21(2): 126–30.
11. Яковлев А.А., Гуляева Н.В. Плеiotропные функции протеиназ мозга: методические подходы к исследованию и поиск субстратов каспазы. *Биохимия*. 2011; 76(10): 1325–34.
12. Кудряшова И.В., Онуфриев М.В., Кудряшов И.Е., Гуляева Н.В. Активность каспазы-3 в срезах гиппокампа отражает изменения синаптической пластичности. *Рос. физиол. журн.* 2008; 94(1): 3–14.

Сведения об авторах:

Давыдова Татьяна Викторовна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП, e-mail: dav-ta@yandex.ru;

Ветрилэ Лучия Александровна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП;

Захарова Ирина Александровна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ НИИОПП.

References

1. Evseev V.A. *Antibodies to neurotransmitters in the mechanisms of neuroimmunopathology. [Antitela k neyromediatoram v mekhanizmaxh neyroimmunopatologii]*. Moscow; 2007, Izd. RAMN; 2007. (in Russian)
2. Gorbatov V.Yu., Trekova N.A., Fomina V.G., Davydova T.V. Antiamnestic effect of antibodies to glutamate in experimental Alzheimer's disease. *Byul. eksper. Biol.* 2010; 150(1): 28–30. (in Russian)
3. Gruden M.A., Davydova T.V., Wang C., Narkevich V.B., Fomina V.G., Kudrin V.S., et al. The misfolded pro-inflammatory protein S100A9 disrupts memory via neurochemical remodelling instigating an Alzheimer's disease-like cognitive deficit. *Behav. Brain Res.* 2016; (306): 106–16. DOI: 10.1016/j.bbr
4. Gruden M.A., Davydova T.V., Fomina V.G., Vetrila L.A., Morozova-Roche L.A., Sewell R.D.E. Antiamnestic effects of antibodies to glutamate under the action of fibrillar structures of the pro-inflammatory protein S100A9 in old mice of the C57Bl/6. *Bull. expert biol. and med.* 2016; 162(10): 422–5. (in Russian)
5. Gruden M.A., Davydova T.V., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Vetrile L.A., Morozova-Roche L.M.A., et al. Neuroprotective effects of antibodies to glutamate in memory disorders induced by oligomers of the proinflammatory protein S100A9 in aging animals. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2017; 61(4): 25–32. (in Russian)
6. Davydova T. V., Gruden M. A., Kudrin V. S., Narkevich V. B., Vetrile L. A., Zakharova I. A., et al. Effect of antibodies to glutamate on age-Related memory changes in C57Bl/6 mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2019; 166(3): 326–9. DOI 10.1007/s10517-019-04343-7
7. Davydova T.V., Gruden M.A., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Vetrile L.A., Zakharova I.A., Sewel R.D.E. Delayed behavioral and neurochemical effects of anti-glutamate antibodies in aging C57BL/6 mice. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2021; 171(1): 19–22.
8. Su J.H., Zhao M., Anderson A.J., Srinivasan A., Cotman C.W. Activated caspase-3 expression in Alzheimer's and aged control brain: correlation with Alzheimer pathology. *Brain Res.* 2001; 898(2): 350–7.
9. Kolobov V.V., Zakharova I.A., Fomina V.G., Gorbatov V.Yu., Davydova T.V. Influence of antibodies to glutamate on the activity of caspase-3 in the brain structures of rats with experimental Alzheimer's disease. *Bull. exper. biol. and med.* 2012; 154(10): 417–20. (in Russian)
10. Sherstnev V.V., Yurasov V.V., Gruden M.A., Yakovleva N.E., Storozheva Z.I., Proshin A.T., Puzyrev A.V. Biochemical markers of apoptosis in the brain of “intact” rats and under the central action of protein S100b. *Neyrokimiya*. 2004; 21(2): 126–30. (in Russian)
11. Yakovlev A.A., Gulyaeva N.V. Pleiotropic functions of brain proteinases: methodological approaches to the study and search for caspase substrates. *Biokhimiya*. 2011; 76(10): 1325–34. (in Russian)
12. Kudryashova I.V., Onufriev M.V., Kudryashov I.E., Gulyaeva N.V. Caspase-3 activity in hippocampal slices reflects changes in synaptic plasticity. *Ros. fiziol. Zhurnal*. 2008; 94(1): 3–14. (in Russian)

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616.89

Кабаева Е.Н.¹, Ершов А.В.^{2,3}, Литвицкий П.Ф.², Тушова К.А.¹, Ноздрихина Н.В.¹

Особенности механизма развития и течения острого инсульта у пациентов с COVID-19

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,

117198, Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 8;

² ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет), Минздрава России

119435, Москва, Россия, ул. Большая Пироговская, д. 2, стр. 4;

³ НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского, Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, 107031, Москва, Россия, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

COVID-19 остается на пике актуальных медико-социальных проблем во всех странах Мира. Постоянно дополняются данные о развитии у пациентов с новой коронавирусной инфекцией различных осложнений, среди которых острый инсульт является весьма распространенной и нередко фатальной формой патологии. **Цель исследования** – изучение закономерности, особенностей возникновения и механизмов развития и течения ишемического инсульта у пациентов с новой коронавирусной инфекцией.

Методика. В исследование включено 60 пациентов с COVID-19 (основная группа: с развитием ишемического инсульта (ИИ) на фоне COVID-19, $n=20$; группа сравнения: больные COVID-19 без ИИ, $n=40$) и контрольная группа здоровых добровольцев ($n=20$). У всех обследованных проводился комплексный клинико-лабораторный мониторинг. В сыворотке крови иммунохимическим методом (ИФА) определяли содержание цитокинов, а также С-реактивного белка (СРБ) и активности матриксных металлопротеиназ-2 (ММП-2).

Результаты. Инсульт у больных с COVID-19 развивался, как правило, к исходу 2-й нед после дебюта инфекции. При этом, основным фактором риска неблагоприятного течения инсульта, часто с развитием синдрома полиорганной недостаточности (СПОН), была высокая сердечно-сосудистая коморбидность. У большинства пациентов с инсультом и развивающимся впоследствии с СПОН уже в 1-е сут после поступления в стационар закономерно и статистически значимо изменялись клинико-лабораторные показатели: существенно повышались в крови уровни ИЛ-10, ФНО- α , СРБ, активность металлопротеиназы-2 (ММП-2), а также развивались тахикардия, тахипное, лихорадка, лейкоцитоз, гипергликемия.

Заключение. Значимое повышение в крови активности ММП-2, уровней цитокинов с провоспалительным действием (ИЛ-10 и ФНО- α), СРБ в сочетании с совокупностью изменений клинических и лабораторных показателей (тахикардия, тахипное, лихорадка, лейкоцитоз, гипергликемия) являются закономерными ранними предикторами развития острого СПОН и респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) у пациентов с инсультом на фоне COVID-19. Это свидетельствует об общности и взаимоопотенцировании у таких пациентов ключевых звеньев патогенеза: цитокинового шторма, ОРДС и СПОН уже в остром периоде ИИ. Для пациентов с острым инсультом, развивающимся на фоне COVID-19, характерно увеличение частоты летальных исходов, которым более чем в 50% случаев предшествует развитие цитокинового шторма, ОРДС и СПОН. COVID-19 и высокая сердечно-сосудистая коморбидность представляют собой 2 существенных фактора риска – как возникновения и неблагоприятного течения ишемического инсульта, так и его исходов.

Ключевые слова: острый инсульт; коронавирусная инфекция; факторы риска

Для цитирования: Кабаева Е.Н., Ершов А.В., Литвицкий П.Ф., Тушова К.А., Ноздрихина Н.В. Особенности механизма развития и течения острого инсульта у пациентов с COVID-19 *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 2022; 66(2): 10-17.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.10-17

Для корреспонденции: Кабаева Екатерина Николаевна, e-mail: katkab@list.ru

Участие авторов: концепция и дизайн работы – Кабаева Е.Н., Ершов А.В.; сбор данных – Кабаева Е.Н., Ершов А.В., Тушова К.А.; анализ и интерпретация данных – Ноздрихина Н.В.; написание статьи – Кабаева Е.Н.; редактирование статьи – Литвицкий П.Ф. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60352.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.03.2022

Принята в печать 31.03.2022

Опубликована 27.05.2022

Kabaeva E.N.¹, Ershov A.V.^{2,3}, Litvitskiy P.F.², Tushova K.A.¹, Nozdryukhina N.V.¹

Features of the mechanism of development and course of acute stroke in patients with COVID-19

¹ Peoples' Friendship University of Russia,

8 Miklukho-Maclaya Str., 117198 Moscow, Russian Federation;

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),

2 Bolshaya Pirogovskaya Str., Build.4., 119435, Moscow, Russian Federation;

³ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation,

25 Petrovka Str., Bldg. 2, 107031, Moscow, Russian Federation

COVID-19 remains at the peak of urgent medical and social problems worldwide. Information has been continuously supplemented about the development of various complications in patients with the new coronavirus infection, including acute stroke that is a very common and often fatal pathology. **Aim.** To study the pattern of occurrence and mechanisms of development of ischemic stroke associated with COVID-19.

Methods. The study included 60 patients with COVID-19. The main group consisted of 20 patients with ischemic stroke (IS) associated with COVID-19; the comparison group consisted of 40 patients with COVID-19 without IS; and the control group included 20 healthy volunteers. A comprehensive clinical and laboratory monitoring was performed for all patients. Concentrations of proinflammatory cytokines and C-reactive protein (CRP) and activities of matrix metalloproteinases 2 (MMP-2) were measured in the serum by the immunochemical assay.

Results. IS developed in 70% (n=14) of patients in the main group, generally between days 12 and 14 after the onset of infection. Twelve patients (57%) had an unfavorable course of stroke associated with COVID-19, often followed by multiple organ dysfunction syndrome (MODS). All 12 patients (100%) had various cardiovascular comorbidities. In the majority of patients with stroke followed by MODS significant changes in many clinical and laboratory indexes developed already during the first day of admission to the hospital. These changes included arterial hypertension (100% of patients), tachycardia (80% of patients), and significant increases in blood D-dimer (83% of patients), von Willebrand factor (75% of patients), interleukin-10 (92% of patients), tumor necrosis factor α (92% of patients), CRP (100% of patients), and the activity of matrix metalloproteinase-2 (100% of patients). Also, patients developed tachypnea, fever, leukocytosis, and hyperglycemia.

Conclusion. COVID-19 and high cardiovascular comorbidity are significant risk factors for the development, adverse course, and unfavorable outcome of IS. A significant increase in proinflammatory cytokines (IL-10 and TNF- α), CRP and MMP-2 activity together with a combination of changes in clinical and laboratory parameters (tachycardia, tachypnea, fever, leukocytosis, hyperglycemia) are natural early predictors of acute MODS in IS patients with COVID-19. This indicates a similarity and mutual potentiation of key pathogenetic components: cytokine storm, acute respiratory distress syndrome, and MODS already in the acute period of IS.

Keywords: acute stroke; coronavirus infection; risk factor

For citation: Kabaeva E.N., Ershov A.V., Litvitskiy P.F., Tushova K.A., Nozdryukhina N.V. Features of the mechanism of development and course of acute stroke in patients with COVID-19. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(2): 10-17. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.10-17

Author's contribution: research concept and design – Kabaeva E.N., Ershov A.V.; material collecting and processing – Kabaeva E.N., Ershov A.V., Tushova K.A.; statistical processing – Kabaeva E.N., Nozdryukhina N.V.; writing text: Kabaeva E.N.; text editing – Litvitskiy P.F. Approval of the final version of the article – all co-authors.

Financing. The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research Department of Humanities and Social Sciences Grant № 20-04-60352.

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

Information about the authors:

Kabaeva E.N., <https://orcid.org/0000-0002-7941-2010>

Ershov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-5758-8552>

Litvitskiy P.F., <https://orcid.org/0000-0003-0151-9114>

Tushova K.A., <https://orcid.org/0000-0002-4563-5718>

Nozdryukhina N.V., <https://orcid.org/0000-0003-3032-6768>

Received 21.03.2022

Accepted 31.03.2022

Published 27.05.2022

Введение

Несмотря на достижения современной науки и практической медицины COVID-19 остается на пи-

ке актуальных медико-социальной проблемой во всех странах Мира [1]. Уровни заболеваемости и смертности остаются высокими, появляются новые штаммы

вируса, поражающие различные органы и системы пациента. Постоянно расширяются данные об увеличении числа кардиоваскулярных и нейрогенных осложнений, среди которых наиболее тяжелой формой является инсульт [2-4]. Частота развития острого инсульта на фоне коронавирусной инфекции достигает 10% и более [5-7].

Учитывая существенные патогенетические особенности развития острого инсульта в условиях COVID-19, сочетание этих двух форм патологии создает предпосылки к тяжелому течению как самой инфекции, так и острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) с формированием глубокого неврологического дефицита [8-10].

При коронавирусной инфекции нередко наблюдается также декомпенсация уже имеющихся у пациента хронических форм патологии с доминированием расстройств в системе кровообращения. Для этих пациентов характерно более тяжелое течение COVID-19, высокий риск развития синдрома полиорганной недостаточности (СПОН), низкий реабилитационный потенциал и высокая частота летальных исходов. В связи с этим они требуют своевременного принятия адекватных профилактических мер по снижению риска неблагоприятных исходов заболеваний [11-14].

Цель работы: выявление закономерности и особенности возникновения, механизмов развития и течения ишемического инсульта у пациентов с новой коронавирусной инфекцией.

Методика

В проспективное клиничко-лабораторное и инструментальное исследование включено 60 пациентов с новой коронавирусной инфекцией (средний возраст 62 ± 10 года; 30 мужчин и 30 женщин), госпитализированных в профильный стационар по лечению новой коронавирусной инфекции при ГКБ им. В.В. Виноградова. Пациенты были разделены на две группы: 1) основная: больные с развитием острой недостаточности мозгового кровотока (ОНМК) с последующим исходом в ишемический инсульт (ИИ) на фоне COVID-19 ($n=20$); 2) группа сравнения: пациенты с COVID-19 без развития ОНМК ($n=40$). Контрольную группу составляли 20 здоровых добровольцев. 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.

Диагноз COVID-19 устанавливали на основании положительного результата ПЦР и данных мультиспи-

ральной компьютерной томографии (МСКТ) легких. Диагноз ОНМК верифицировали с помощью спиральной компьютерной томографии (СКТ) головного мозга. Тяжесть неврологической симптоматики при инсульте оценивали по шкале NIHSS (National Institutes of Health Stroke Scale – Шкала инсульта Национального института здоровья). У обследованных пациентов она находилась в диапазоне 6-12 баллов ($Me=11,5$), что свидетельствовало о средней тяжести течения заболевания. По результатам МСКТ у всех пациентов с COVID-19 обнаружено двустороннее поражение легких различной площади. В основной группе у 10% выявлена степень КТ1, у 65% – КТ2, у 25% – КТ3. Случаев КТ4 при поступлении не отмечалось. У пациентов без инсульта степень поражения КТ1 отмечена у 2%, у 40% – КТ2, у 42,5% – КТ3, КТ4- 15% случаев.

У 78,3% пациентов с развитием ИИ на фоне COVID-19 диагностированы также и другие формы патологии: артериальная гипертензия (АГ) у 95%, из них тяжелая ее степень у 31,7%; сахарный диабет (СД) 2 типа у 26,7%; ожирение различной степени у 70%; ишемическая болезнь сердца (ИБС) у 65%; постинфарктный кардиосклероз (ПИКС) у 25%; эпизоды фибрилляции предсердий (ФП) у 40%. Всем пациентам проводилось лечение согласно рекомендациям Минздрава РФ по оказанию медицинской помощи больным с COVID-19. Пациентов с инсультом лечили с учетом рекомендаций стандартов лечения острых cerebrovascularных заболеваний. У всех обследованных проводился комплексный клиничко-лабораторный мониторинг, включавший общий осмотр, оценку неврологического и функционального статусов, МСКТ головного мозга (последнее – у пациентов с ИИ), МСКТ органов грудной клетки. В сыворотке крови определяли уровни цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО-а, а также СРБ и ММП-2.

Статистический анализ фактических данных проводили с использованием программного обеспечения SPSS 20.0. Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Описательная статистика непрерывных количественных данных представлена в виде среднего значения (M) и стандартного отклонения ($\pm SD$) при нормальном распределении, а также в виде медианы (Me), значений 25-го и 75-го процентилей (25, 75) при ненормальном распределении, установленном в большинстве случаев. Для сравнения двух независимых непараметрических выборок использовали критерий Манна–Уитни, для множественного сравнения – Краскелла–Уоллиса. Для сравнения двух зависимых непараметрических выборок использовали критерий Уилкоксона, для множественного сравнения – Фридмана.

Качественные переменные сравнивались с помощью теста χ^2 (таблицы сопряженности).

Результаты и обсуждение

Более чем у половины пациентов (53%) с COVID-19 имелись 2 и более форм патологии сердечно-сосудистой системы: АГ (у 80%, из них с тяжелым течением – у 32,2% больных), ИБС (у 48,3%), ФП (у 18,3%), СД (у 26,7%). В 58% случаев отмечалось ожирение различной степени, среди них 25% имели метаболический синдром с фармакорезистентной АГ.

Наиболее тяжелые формы COVID-19 развивались преимущественно у пациентов с высокой степенью коморбидности с формами патологии системы кровообращения (АГ, ангиопатии при СД, ИБС, ФП). Согласно данным компьютерной томографии, у 71,4% больных объем поражения легких составил более 50%, что было в 3,5 раза чаще чем при наличии одного или двух заболеваний системы кровообращения ($p < 0,001$).

В группе с ОНМК (основная группа) сочетание более чем 2 форм патологии системы кровообращения выявлено у 75% пациентов. Частота тяжелой степени АГ с уровнем систолического АД 180 мм. рт. ст и более была в 2,1 раза выше, чем в группе сравнения (у больных с COVID-19 без ИИ), ФП регистрировалась чаще в 5 раз и ИБС в 1,6 раз ($p < 0,05$). У пациентов основной группы с наличием высокой степени коморбидности с различными формами патологии системы кровообра-

щения (АГ, ангиопатии при СД, ИБС, ФП). Согласно данным компьютерной томографии, у 71,4% больных объем поражения легких составил более 50%, что было в 3,5 раза чаще чем при наличии одного или двух заболеваний системы кровообращения ($p < 0,001$).

Таблица 1/ Table 1

Характеристика включенных в исследование групп пациентов с COVID-19 и контрольной группы

Characteristics of the groups of patients with COVID-19 and control group

ПОКАЗАТЕЛИ INDICATORS	Пациенты с COVID-19 (n=40) Patients with COVID-19 (n=40)	Пациенты с ОНМК и COVID-19 Patients with ОНМК and COVID-19 (n=20)	p	Все пациенты n=60 All patients (n=60)	Контрольная группа (здоровые добровольцы) Control group (healthy people) (n=20)
Пол, %: Мужчины / Женщины Gender, %: Men / Women	55/45	40/60	0,2**	50 / 50	50 / 50
Возраст, годы, (M ± m) Age, years (M ± m)	61 ± 8,6	64 ± 10	0,067**	62,0 ± 13,2	47 ± 9
ИБС n (%) coronary heart disease (n %)	16 (40%)	13 (65%)	0,068*	29 (48,3%)	-
АГ n (%) arterial hypertension(% ,n)	12 (70%)	20 (100%)	0,004*	48 (80%)	-
ФП n (%) (atrial fibrillation%,n)	3 (7,5%)	8 (40%)	0,003*	11 (18,3%)	-
СД n (%) (diabetes mellitus%,n)	9 (22,5%)	7 (35%)	0,2*	16 (26,7%)	-
Ожирение n (%) (obesity%,n)	22 (55%)	13 (65%)	0,1*	35 (58,3%)	-
Поражение легких –10-25% (КТ-1) Lung injury – 10-25% (КТ-1)	1 (2,5%)	2 (10%)	0,062*	3 (5%)	
Поражение легких –25-50% (КТ-2) Lung injury – 25%-50% (КТ-2)	16 (40%)	13 (65%)		29 (48,3%)	
Поражение легких –50-75% (КТ-3) Lung injury – 50-75% (КТ-3)	17 (42,5%)	5 (25%)		22 (36,7%)	
Поражение легких >75% (КТ-4) Lung injury >75% (КТ-4)	6 (15%)	0 (0%)		6 (10%)	
С-реактивный белок мг/л C-reactive protein mg/l	88 (54,0 – 104,0)	107 (84,0 – 124,0)	0,007**	94 (66,0 – 110,0)	1,5 (1,0 – 1,9)

Примечание. (M ± SD) – среднее значение (M) и стандартное отклонения (±SD); первая строка: медиана (Me), вторая строка: 25 и 75 процентиля (P75/P25). $p < 0,05$ – статистически значимое различие показателей, хи-квадрат/критерий Манна–Уитни; ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения.

Note. (M ± SD) – mean value (M) and standard deviation (±SD); first line: median (Me), second line: 25th and 75th percentiles (P75/P25). $p < 0,05$ – statistically significant difference in scores, chi-square/Mann–Whitney. ОНМК – acute cerebrovascular accident.

шения, выявлена также высокая частота тяжелого течения COVID-19. Она составила 66,7%, что было в 2,5 раза чаще ($p < 0,001$), чем при наличии одной или двух форм патологий (АГ, АГ и СД; АГ и ФП; АГ и ИБС; АГ и ПИКС (постинфарктный кардиосклероз)).

На госпитальном этапе умерло 55% пациентов основной группы. Фатальных случаев в группе сравнения не было. У всех умерших основной группы зарегистрированы признаки СПОН. Эти факты свидетельствуют о значимой роли заболеваний системы кровообращения как ключевого фактора риска возникновения, тяжелого течения COVID-19 и развития ОНМК на его фоне.

Приведенные данные дают основание считать, что прогрессирующее развитие недостаточности адаптивных механизмов в условиях утраты корковых регуляторных влияний у пациентов с инсультом на фоне COVID-19, приводит у них к потенцированию таких звеньев патогенеза как цитокиновый дисбаланс, усугубление расстройств церебрального кровотока, гипоксии и метаболизма. Это, в свою очередь, является патогенетической основой формирования СПОН. Указанный синдром наблюдался у 57% пациентов основной группы.

Развитие СПОН при инсульте значительно ухудшало состояние пациентов, повышая вероятность неблагоприятного прогноза течения заболевания и летального исхода. Помимо этого, СПОН инициировал

и/или приводил к доминированию в картине инсульта таких тяжелых форм патологии как острый респираторный дистресс синдром (ОРДС) у 83% пациентов, повторные церебральные нарушения кровообращения – у 50%, венозные тромбозы и тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА) – у 35%, острый коронарный синдром – у 33,3%, острые эрозии и язвы желудочно-кишечного тракта – у 25% (рис. 1). В 91,7% случаев инсульта на фоне новой коронавирусной инфекции с развитием СПОН они закончились фатально.

Одним из тяжелых осложнений у пациентов с инсультом на фоне коронавирусной инфекции было также повторное развитие нарушений церебрального кровотока. На госпитальном этапе они выявлены у 40% больных, как правило, на 7–10-е сут после их поступления в стационар. У 35% пациентов с ИИ на фоне COVID-19 развивались тромбогеморрагические осложнения. Они включали желудочно-кишечные кровотечения в связи с формированием острых эрозий и язв у 42% больных, а также – тромбоэмболические осложнения: венозные тромбозы и ТЭЛА у 58% пациентов. У 85% из них ($p < 0,05$) острое развитие указанных осложнений завершилось летальным исходом.

У всех пациентов с COVID-19 уже на 3-и сут болезни выявлено превышение, по сравнению с контрольной группой (Me(P25/P75), содержания в крови цитокинов с провоспалительным действием: ИЛ-6 более чем в 200 раз – 415 (301/677) пг/мл, ИЛ-10

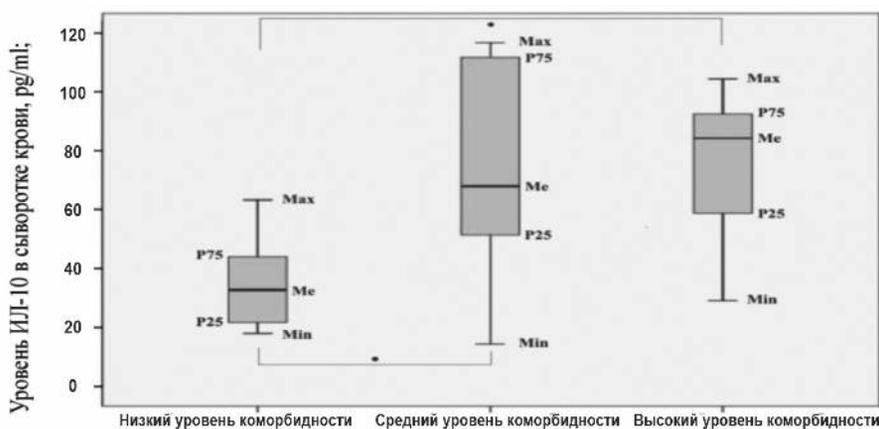


Рис. 1. Содержание ИЛ-10 в крови у пациентов с инсультом, развившимся на фоне COVID-19 и разной степенью коморбидности с формами патологии системы кровообращения.

* – статистически значимое различие между группами ($p < 0,001$). По вертикали – уровень ИЛ-10 в сыворотке крови (пг/мл); по горизонтали – степени коморбидности с формами патологии системы кровообращения (низкий, средний и высокий уровень коморбидности).

Fig. 1. The content of IL-10 in the blood of patients with stroke associated with COVID-19 and varying degrees of comorbidity with forms of pathology of the circulatory system. * – statistically significant difference between groups ($p < 0,001$). Vertically – the level of IL-10 in blood serum (pg/ml); horizontally – the degree of comorbidity with forms of pathology of the circulatory system (low, medium and high levels of comorbidity).

более чем в 30 раз – 240(86/521)пг/мл, ФНО- α в 7 раз – 27(18,5/64)пг/мл. Одновременно с этим в крови нарастало содержание СРБ в 60 раз -- 94(67/110)мг/мл, что свидетельствовало об остром развитии воспаления (табл. 2).

Для пациентов с клинической картиной ОНМК, ранее уже зараженных COVID–19, характерным был более высокий, чем в контрольной группе, уровень СРБ в крови (более чем в 70 раз и в среднем в 1,3 выше, чем в группе сравнения). Это позволяет говорить о включении у таких больных воспалительного компонента патогенеза, а также о нарастании у них степени повреждения ткани мозга. Учитывая, что активность ММП-2 у этих пациентов была в 4 раза выше, чем в группе сравнения, приведенные данные свидетельствуют о значительном нарастании потенциала разрушения коллагенов соединительной ткани, в т.ч. головного мозга при ишемическом инсульте на фоне COVID-19.

Важно также, что уровни цитокинов с провоспалительным действием (ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- α) у пациентов основной группы были ниже в 1,6, 1,6, 7,5 и в 2 раза, соответственно, в сравнении с пациентами с COVID–19, но без ОНМК ($p < 0,001$) (табл. 2).

Этот факт позволяет допускать, что в условиях ИИ нарушается формирование адаптивных механизмов процесса воспаления, как ответа на повреждение.

У пациентов с инсультом, в условиях его высокой коморбидности с формами патологии системы кровообращения, уровень ИЛ-10 был в 2,5 раза выше ($p < 0,05$), чем при низкой степени коморбидности и в 1,2 выше ($p < 0,05$), чем при средней ее степени (сочетание

АГ с одной или двумя формами патологии: ИБС, ФП, СД, ПИКС (постинфарктный кардиосклероз)) (рис. 1). Содержание СРБ у пациентов с 3-й стадией АГ, в сравнении с пациентами с АГ 1-й и 2-й стадией, было в 1,3 раза выше к исходу первых суток и в 2 раза – на 5–7-е сут заболевания ($p < 0,001$).

Полученные данные являются доказательством существенной роли коморбидности ИИ с формами патологии системы кровообращения не только как значимого фактора риска инициации инсульта, но и нарастания степени патогенности механизмов его развития и исходов. У умерших пациентов с инсультом, развившимся на фоне COVID–19, содержание цитокина с провоспалительным действием ИЛ-10 превышало норму в 4 раза ($p < 0,05$). Это дает основание для заключения, что уровень ИЛ-10 адекватно отражает не только факт повреждения тканей и развитие острого воспаления, но и степень его выраженности уже в острейшем периоде ИИ.

У больных с инсультом, возникшим на фоне COVID–19 и с последующим (на 5–7-е сут госпитализации) развитием СПОН, уже к концу 1-х сут госпитализации зарегистрировано закономерное увеличение содержания в крови ИЛ-10 в 12,8 раз – 82 (30/96)пг/мл; ФНО- α в 6,4 раза – 24(14/25)пг/мл, а также СРБ более чем в 75 раз – 13 (99/130)мг/мл и активности ММП2 в 1,6 раза – 782(684/849)нг/мл по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы.

Одновременно с этим, у 58,7% пациентов с развитием СПОН на фоне COVID–19 выявлен лейкоцитоз

Таблица 2/Table 2

Содержание цитокинов с провоспалительным действием в крови у больных COVID-19 и группе контроля

The content of cytokines level in groups patients with COVID-19 and control group

ПОКАЗАТЕЛИ INDICATORS	Пациенты с COVID-19 n=40 Patients with covid-19 (n=40)	Пациенты с ОНМК и COVID-19 (n=20) Patients with ОНМК and covid-19 (n=20)	Контрольная группа (здоровые добровольцы) Control group (healthy volunteers) (n=20)
ИЛ-6, (<7) пг/мл IL-6, (<7) pg/ml	546* 449/593	353* 291/467	1,4 0,3/2,1
ИЛ-8, (<62) пг/мл IL-8, (<62) pg/ml	501* 415/556	73* 62/92	7,3 4,9/10
ИЛ-10 (<9.1) пг/мл IL-10 (<9.1) pg/ml	483* 389/527	64* 49/79	6,4 4,2/8,5
ФНО (0-8.2), пг/мл TNF (0-8.2), pg/m	48* 51/56	19* 16/21	3,8 2,1/6,2

Примечание. Первая строка – медиана (Me), вторая строка – 25 и 75 процентиля (P75/P25). * $p < 0,05$ – статистически значимое отличие показателя от контрольной группы (критерий Манна – Уитни). ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения.

Note. The first line is the median (Me), the second line is the 25th and 75th percentiles (P75/P25). * $p < 0.05$ – statistically significant difference between the indicator and the control group (Mann-Whitney test). ОНМК – acute cerebrovascular accident.

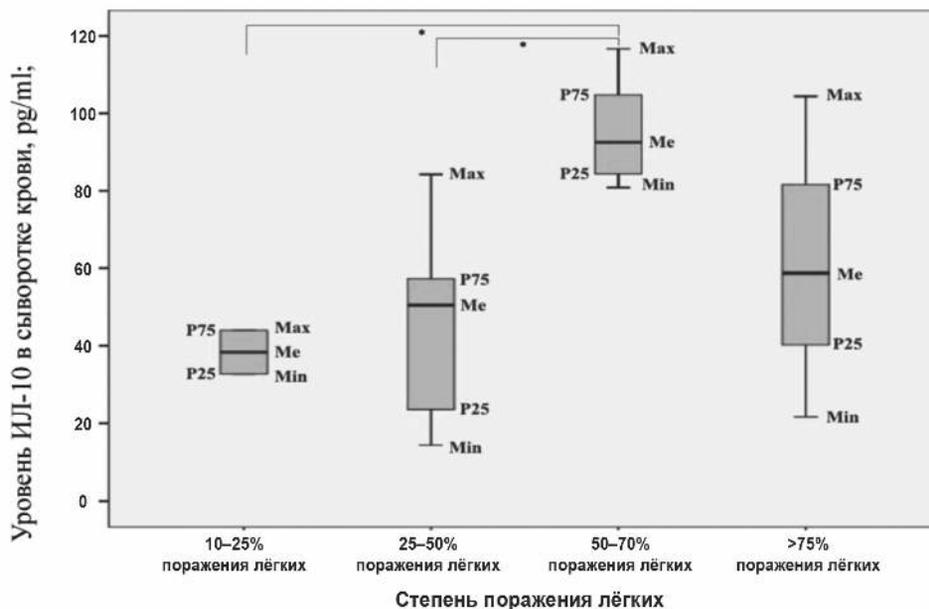


Рис. 2. Содержание ИЛ-10 в крови у пациентов с инсультом, развившимся на фоне COVID 19 при разной степени поражения легких (данные мультиспиральной компьютерной томографии). * – статистически значимое различие между группами ($p < 0,05$). По вертикали – уровень ИЛ10 в сыворотке крови (пг/мл); по горизонтали – степень поражения легких (10–25%; 25–50%; 50–75%; >75%).

Fig. 2. The content of IL-10 in the blood of patients with stroke associated with COVID-19 with different degrees of lung damage (multispiral computed tomography data). * – statistically significant difference between groups ($p < 0.05$). Vertically, the level of IL-10 in blood serum (pg/ml); Horizontally – the degree of lung damage (10–25%; 25–50%; 50–75%; >75%).

более $12 \cdot 10^9$ /л, что в 2 раза чаще, чем в группе больных без СПОН; у 57% – тахипное свыше 20 в мин; у 80% – тахикардия (что в 3 раза чаще, чем в группе сравнения, $p < 0,05$). Уровень глюкозы плазмы крови более 7 ммоль/л (без учета пациентов с СД) был у 73% больных (что в 2,5 раза чаще, чем без развития СПОН).

В целом, эти факты дают основание сделать заключение об общности и взаимопотенцировании у пациентов с инсультом, возникшим на фоне COVID–19, таких ключевых звеньев патогенеза как цитокиновый шторм, ОРДС и СПОН уже в остром периоде ишемического инсульта.

Заключение

COVID-19 и высокая сердечно-сосудистая коморбидность представляют собой 2 существенных фактора риска как возникновения и неблагоприятного течения ишемического инсульта, так и его исходов.

Значимое повышение в крови уровней цитокинов с провоспалительным действием (ИЛ-10 и ФНО- α), СРБ и активности ММП-2 в сочетании с совокупностью изменений клиническо-лабораторных показателей (тахикардия, тахипное, лихорадка, лейкоцитоз, гипергликемия) являются закономерными ранними пре-

дикторами развития острого СПОН и респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) у пациентов с инсультом на фоне COVID-19. Это свидетельствуют об общности и взаимопотенцировании у таких пациентов ключевых звеньев патогенеза: цитокинового шторма, ОРДС и СПОН уже в остром периоде ИИ.

Для пациентов с острым инсультом, развивающимся на фоне COVID-19, характерно увеличение частоты летальных исходов, которым более чем в 50% случаев предшествует развитие цитокинового шторма, ОРДС и СПОН.

Литература/References

1. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 2020; 395(10224): 565–74. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
2. Atzrodt C.L., Maknoja I., McCarthy R.D.P., Oldfield T.M., Po J., Ta K.T.L., et al. A guide to Covid-19: A global pandemic caused by the novel coronavirus sars-cov-2. *The FEBS Journal*. 2020; 287(17): 3633–50. doi: <https://doi.org/10.1111/febs.15375>. PMID: 32446285.
3. Pollard C.A., Morran M.P., Nestor-Kalinowski A.L. The COVID-19 pandemic: A global health crisis. *Physiological Geno-*

- mics*. 2020; 52(11): 549–57. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00089.2020>. PMID: 32991251.
4. Mao L., Jin H., Wang M., Hu Y., Chen S., He Q., et al. Neurologic manifestations of hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurology*. 2020; 77(6): 683. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1127>. PMID: 32275288.
 5. Romero-Sánchez C.M., Díaz-Maroto I., Fernández-Díaz E., Sánchez-Larsen Á., Layos-Romero A., García-García J., et al. Gracia- Neurologic manifestations in hospitalized patients with covid-19. *Neurology*. 2020; 95(8). <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000009937>. PMID: 32482845.
 6. Carod-Artal F.J. Neurological complications of coronavirus and COVID-19. *Revista de Neurología*. 2020; 70(9): 311–22. <https://doi.org/10.33588/rn.7009.2020179>. PMID: 32329044.
 7. Vogrig A., Gigli G.L., Bnà C., Morassi M. Stroke in patients with COVID-19: Clinical and neuroimaging characteristics. *Neuroscience Letters*. 2021; 743: 135564. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135564>. PMID: 33352277
 8. Chen R., Liang W., Jiang M., Guan W., Zhan C., Wang T., et al. *Medical Treatment Expert Group for COVID-19*. Risk factors of fatal outcome in hospitalized subjects with coronavirus disease 2019 from a nationwide analysis in China. *Chest*. 2020; 158(1): 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2020.04.010>. PMID: 32304772.
 9. Spence J.D., de Freitas G.R., Pettigrew L.C., Ay H., Liebeskind D.S., Kase C.S., et al. Mechanisms of stroke in COVID-19. *Cerebrovascular Diseases*. 2020; 49(4): 451–8. <https://doi.org/10.1159/000509581>. PMID: 32690850.
 10. Trejo-Gabriel-Galán J.M. Stroke as a complication and prognostic factor of COVID-19. *Neurologia (Engl Ed)*. 2020; 35(5): 318–22. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2020.04.015>. PMID: 32493597. *Luo XH*,
 11. Zhu Y., Mao J., Du R.C. T cell immunobiology and cytokine storm of Covid-19. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2020; 93(3). <https://doi.org/10.1111/sji.12989>. PMID: 33113222.
 12. Qin W., Zhang X., Yang S., Li Y., Yuan J., Yang L., et al. Risk factors for multiple organ dysfunction syndrome in severe stroke patients. *PLOS ONE*. 2016; 11(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167189>. PMID: 27893797.
 13. Azevedo R.B., Botelho B.G., Hollanda J.V.G., Ferreira L.V.L., Junqueira de Andrade L.Z., et al. Covid-19 and the cardiovascular system: A comprehensive review. *Journal of Human Hypertension*. 2020; 35(1): 4–11. <https://doi.org/10.1038/s41371-020-0387-4>. PMID: 32719447.
 14. Clerkin K.J., Fried J.A., Raikhelkar J., Sayer G., Griffin J.M., Masoumi A., et al. Covid-19 and cardiovascular disease. *Circulation*. 2020; 141(20): 1648–55. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.046941. PMID: 32200663.

Сведения об авторах:

Кабеева Екатерина Николаевна, канд. мед. наук, доцент каф. нервных болезней и нейрохирургии им. проф. Ю.С. Мартынова Медицинского института РУДН, e-mail: katkab@list.ru;

Ершов Антон Валерьевич, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии Института биодизайна и моделирования сложных систем Сеченовского Университета, вед. науч. сотр., «НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского» ФНКЦ РР;

Литвицкий Пётр Францевич, доктор мед. наук, член-корр. РАН, зав. каф. патофизиологии Института биодизайна и моделирования сложных систем Сеченовского Университета;

Тушова Кристина Андреевна, ассистент каф. нервных болезней и нейрохирургии им. проф. Ю.С. Мартынова Медицинского института РУДН;

Ноздрюхина Наталия Васильевна, канд. мед. наук, доцент каф. нервных болезней и нейрохирургии им. проф. Ю.С. Мартынова Медицинского института РУДН.

© Авдеев Д.Б., 2022

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

Авдеев Д.Б.

Сравнительная морфометрическая характеристика проявлений отёка-набухания миндалевидного тела половозрелых белых крыс после 20-, 30-, 40-минутной окклюзии общих сонных артерий

ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, 644099, Омск, Москва, Россия, ул. Ленина, д. 12

Цель – изучение изменений и морфометрическая характеристика проявлений отёка-набухания структур миндалевидного тела белых крыс после 20-, 30- и 40-минутной окклюзии общих сонных артерий (ООСА).

Методика. Острую ишемию моделировали на белых взрослых крысах Wistar путём 20- (группа I), 30- (группа II) и 40-минутной (группа III) ООСА. Использовали гистологические (окраска гематоксилином-эозином, по Нисслю), иммуногистохимические (MAP-2, GFAP) и морфометрические методы исследования. Морфометрический анализ осуществляли на препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, с помощью плагинов программы ImageJ 1.53 (*Find Maxima*, *Find Foci*).

Результаты. В миндалевидном теле головного мозга белых крыс после 20-, 30- и 40-минутной ООСА выявлялись признаки цитотоксического отёка-набухания, развивались адаптивные и очаговые деструктивные изменения нейронов и астроглии. Проявления отёка-набухания в разной степени сохранялись на протяжении 7 сут наблюдения. Статистически значимо увеличивалась относительная площадь, количество зон отёка-набухания и степень их гидратации (яркость пикселей). Через 1 и 3 сут после ООСА часть отростков астроцитов миндалевидного тела разрушалась. После односторонней 30-минутной и двусторонней 20-минутной ООСА развивались слабые и умеренные, а после двусторонней 40-минутной ООСА – умеренные и выраженные мелкоочаговые структурно-функциональные изменения с появлением зон просветления «пористого» нейропиля, выраженного периваскулярного и перинейронального отёка отростков астроцитов. Последнее сочеталось с умеренной редукцией общей численной плотности нейронов. В сравнении с контролем в 1-й группе общая численная плотность нейронов уменьшалась на 10,2% ($p=0,03$), в группе 2-й – на 11,4% ($p=0,03$) и в 3-й группе – на 12,9% ($p=0,01$).

Заключение. После окклюзии общих сонных артерий в миндалевидном теле на фоне дистрофических и некробиотических изменений нейронов и активации нейроглиальных клеток появлялись признаки отёка-набухания. В большей степени это проявлялось через 3 сут после двусторонней 40-минутной окклюзии. При односторонней окклюзии изменения выявлялись и в полушарии на ипсилатеральной стороне.

Ключевые слова: отёк-набухание; острая ишемия; миндалевидное тело; нейроны; астроглия; морфометрия; крысы Wistar

Для цитирования: Авдеев Д.Б. Сравнительная морфометрическая характеристика проявлений отёка-набухания миндалевидного тела половозрелых белых крыс после 20-, 30-, 40-минутной окклюзии общих сонных артерий. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(2): 18-27.
DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.18-27

Участие автора: Авдеев Д.Б. – эксперимент, уход за животными, забор материала, приготовление препаратов, фотографирование препаратов, иллюстративный материал, морфометрический и информационно-математический анализ, обсуждение результатов исследования, написание текста, создание базы данных.

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 от 24.11.2017 г.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.01.2022

Принята к печати 31.03.2022

Опубликована 27.05.2022

Avdeev D.B.

Comparative morphometric characteristics of edema-swelling manifestations in the amygdala of adult white rats after 20-, 30-, and 40-min common carotid artery occlusion

Omsk State Medical University,
Lenina St. 12, Omsk, 644099, Russian Federation

Aim. To study structural changes and to present a morphometric description of edema-swelling manifestations in the amygdala of rats after 20-, 30-, and 40-min common carotid artery occlusion (CCAO).

Methods. Acute ischemia was modeled in white adult Wistar rats by 20- (group I), 30- (group II) and 40-minute (group III) CCAO. Histological (hematoxylin-eosin staining, Nissl staining), immunohistochemical (MAP-2, GFAP) and morphometric methods were used. A morphometric analysis was performed on preparations stained with hematoxylin-eosin using ImageJ 1.53 plug-ins (Find Maxima, Find Foci). Statistical hypotheses were tested (nonparametric tests) with the Statistica 8.0 software.

Results. After 20-, 30- and 40-min CCAO, signs of cytotoxic edema-swelling appeared, and focal destructive and adaptive changes in neurons and astroglia were observed in the amygdala. The manifestations of edema-swelling persisted to varying degrees throughout 7 days of observation. The relative area, the number of edema-swelling zones, and the degree of their hydration (pixel brightness) were significantly increased. One and 3 days after CCAO, a part of astrocyte processes in the amygdala was destroyed. After a unilateral 30-min and bilateral 20-min CCAO, mild and moderate, and after a bilateral 40-min CCAO, moderate and pronounced small-focal structural and functional changes developed. These changes were associated with emergence of enlightened zones in the "porous" neuropil and of pronounced perivascular and perineuronal edema of astrocyte processes. Perineuronal edema was associated with a moderate reduction of the overall numerical density of neurons (ONDN). Compared to the control, ODN in group I decreased by 10.2% ($p=0.03$), in group II, by 11.4% ($p=0.03$), and in group III, by 12.9% (Mann-Whitney U-test, $p=0.01$). **Conclusion.** In the amygdala after CCAO, signs of edema-swelling appear on the background of dystrophic and necrobiotic changes in neurons and of the activation of neuroglial cells. These signs were most pronounced 3 days after bilateral 40-min occlusion. With unilateral occlusion, these changes were observed also in the hemisphere on the ipsilateral side.

Keywords: edema-swelling; acute ischemia; amygdala; neurons; astroglia; morphometry; Wistar rats

For citation: Avdeev D.B. Comparative morphometric characteristics of manifestations of edema-swelling of the amygdala in adult white rats after 20-, 30-, 40-minute occlusion of the common carotid arteries. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(2): 18-27. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.18-27

Author's contribution: Avdeev D.B. – experiment, animal care, sampling of material, preparation of preparations, photographing preparations, illustrative material, morphometric and information-mathematical analysis, discussion of research results, text writing, creating a database.

For correspondence: *Dmitry B. Avdeev*, candidate of veterinary science, senior lecturer of the department of histology, cytology and embryology, «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 Fund for innovation promotion under the program "UMNIK" №14 from 15.12.2017 and the internal grant of The Omsk state medical University №574 from 24.11.2017.

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

Information about the authors:

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

Received 14.01.2022

Accepted 31.03.2022

Published 27.05.2022

Введение

Миндалевидный комплекс мозга (миндалины, миндалевидное тело, амигдала, — одна из важных структур центральной нервной системы древней коры (архикортекс) головного мозга у млекопитающих [1–3].

Миндалины принимают афферентные импульсы от обонятельного бугорка, перегородки, пириформной коры, височного полюса, височных извилин, орбитальной коры, передней части островка, интралиминарных ядер таламуса, передней части гипоталамуса и ретикулярной формации, имеет связи с гиппокам-

пом [4]. Этот отдел мозга играет важную роль в регуляции вегетативных и моторных реакций, оказывает влияние на эндокринную систему организма, на эмоциональный фон, высшую нервную деятельность, память и сенсорное восприятие [5–7].

Отек-набухание является ответом нервной ткани головного мозга практически на любое патогенное воздействие. Механизмы развития гидропической дистрофии хорошо изучены. Основными причинами отека-набухания в поврежденной нервной ткани являются

ся энергетический дефицит, дисфункция механизмов ионного гомеостаза, нарушение функции астроцитов и микрососудов [8–12].

Установлено, что при ишемии превалирует цитотоксический отёк-набухание головного мозга. Набухание нейронов сопровождается увеличением их размеров, растворением нуклеопротеиновых комплексов, гиперхромией и смещением ядра нейрона. Отёк сопровождается просветлением цитоплазмы, появлением светлых пространств и вакуолей. При необратимой гидропической дистрофии сохраняются ядра, но полностью разрушаются цитоплазматические органеллы [13–15]. Некоторые авторы склонны видеть в процессе отёка-набухания мозга проявления естественного защитного механизма и санации нервной ткани по типу лимфатического дренажа отростками астроцитов. Отёк-набухание мозга, по существу, является частично обратимой плеiotропной реакцией на фоне незначительных повреждений структур и необратимой при тяжёлых изменениях нервной ткани (например, пикноморфные гомогенизированные нейроны, клетки тени) [12, 16].

Однако неизвестно, как на развитие отёка-набухания в миндалевидном ядре влияет продолжительность периода неполной ишемии и при каких гидропических изменениях начинаются нейродегенеративные процессы – патогенетический компонент, а при каких имеет место преимущественно защита нервной ткани – саногенетический компонент. Для углубленного изучения процесса отёка-набухания в этом аспекте необходимо сравнительное экспериментальное гистологическое и морфометрическое исследование его проявлений после острой ишемии разной продолжительности и тяжести (например, односторонней или двухсторонней 20-, 30- и 40-мин). Для этого целесообразно использовать модели неполной ишемии – окклюзия общих сонных артерий (ООСА) [17, 18]. В настоящем исследовании акцент будет сделан на изучении проявлений отёка-набухания в миндалевидном теле (МТ). **Цель** – изучение изменений и морфометрическая характеристика проявлений отёка-набухания структур миндалевидного тела мозга у крыс после 20-, 30- и 40-минутной окклюзии общих сонных артерий (ООСА).

Методика

Экспериментальное морфометрическое исследование выполнено в ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, одобрена локальным этическим комитетом вуза (протокол № 83 от 14 октября 2016 г.; протокол № 112 от 26 сентября 2019 г.). Использовали аутбредных половозрелых крыс Wistar (самцы масса 270–350 г)

Животных содержали в стандартных лабораторных условиях в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными европейским научным фондом и Хельсинкской декларацией о гуманном отношении к животным и соблюдением директив Европарламента и Совета европейского союза (2010/63/EU), регламентирующих использование животных в научных целях.

Выбор моделей был основан на подборе неравноценных по продолжительности и тяжести неполной ишемии головного мозга. Использовали одно-, двухстороннюю окклюзию (ООСА) общих сонных артерий. ООСА проводили в течение 30 (группа I, $n=30$, односторонняя), 20 (группа II, $n=30$, двухсторонняя) и 40 мин (группа III, $n=30$, двухсторонняя). Таким образом, использованный подход позволил провести оценку влияния роли продолжительности неполной ишемии на ее исход. Контролем служили интактные животные без манипуляций на общих сонных артериях ($n=6$).

Эксперимент проводили под наркозом: Zoletil 100 (10 мг/кг, 5–7 единиц). С целью фиксации исследуемый мозг перфузировали, вводя последовательно 100–125 мл раствора 0,9% NaCl + 5000 единиц Фрагмина и 30 мл 4% раствора параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,2–7,4). Через 1,5 ч головной мозг перенесли в такой же фиксатр при $t +4$ °C. После стандартной проводки материал с помощью автомата «STP 120» заключали в гомогенизированный парафин (HISTOMIX®). Серийные фронтальные срезы (толщина 4 мкм) готовили с помощью микротомы HM 450 (Thermo) на уровне миндалевидного тела (МТ) [19].

Изучение структурно-функционального состояния нейронов и глиальных клеток МТ головного мозга белых крыс проводили на гистологических препаратах, окрашенных классическими методами (гематоксилин-эозин, по Нисслю), а также при помощи иммуногистохимических реакций на ассоциированный с микротрубочками белок (*MAP-2*) и кислый фибриллярный белок астроцитов (*GFAP*). *MAP-2* участвует в формировании цитоскелета тел, аксонов и дендритов, а также их пространственной физиологической и патологической реорганизации. *GFAP* локализован главным образом в звездчатых астроцитах, принимает участие практически во всех функциях этих клеток [20].

Для иммуногистохимического исследования использовали поли- и моноклональные антитела. *MAP-2* (ab32454) – кроличьи поликлональные антитела, разведение 1 мкг/мл (Abcam, США). *GFAP* (PA0026) – мышьи моноклональные антитела, клон GA5, готовые к применению (Bond Ready-to-Use Primary Antibody);

Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания). Иммуногистохимическую реакцию проводили на срезах, помещённых на полилизинные предметные стекла. После реакции с первичными антителами срезы инкубировали с соответствующими вторичными антителами, хромогеном DAB (3,3'-диаминобензидин), докрасивали гематоксилином, заключали в полистирол. Для визуализации использовали мультимерный набор Novolink™ (DAB) Polymer Detection System (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания).

Препараты фотографировали на микроскопе Nikon eclipse e200 (объектив $\times 4$, $\times 10$, $\times 40$, $\times 100$). Использовали камеру для микроскопа ADF STD16. Характеристики данной камеры: разрешение 16.1 Мп, размер матрицы 1/2.2», количество кадров в секунду: 33@2320x1740, интерфейс подключения: USB 3.0, поддержка RAW, а также профессиональное ПО – функции измерения размеров объекта, настройка изображения, запись фото/видео, сшивка полей зрения, мультифокальные изображения, настройка баланса белого и прочие. Изображение сохраняли в файлах с расширением tiff (4632x3488 пикселей).

На полях зрения произвольных участков МТ выделяли области интереса (ROI) – фрагменты молекулярного слоя размером 20×20 мкм, формировали стеки (100–120 ROI), рассчитывали среднее значение для каждого поля зрения и животного. Далее формировали и сравнивали вариационные ряды по 30 значений на срок. Дальнейшее морфометрическое исследование осуществляли с использованием программы ImageJ 1.52 s.

Для морфометрии пиков максимальной яркости (зоны отёка-набухания) на цветных изображениях использовали плагин-фильтр «Find Maxima» M.Schmid из программы ImageJ 1.53 с (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/menus/process.html#find-maxima>). Предварительно ROI (только нейропилль) подвергалась обработке алгоритмом плагина «Morphological Filters» из пакета «MorphoLibJ» (Radius 1 pix). Это позволяло провести морфологическую сегментацию объекта изучения и стандартизовать изображения. Окончательную оценку пиков поля зрения нейропиля амигдалы в группах I, II и III проводили с помощью плагина Find Foci (набор программ GDSC ImageJ анализа изображений для микроскопии). Метод позволил распределить все пики по размерам и степени яркости путём вычисления, в частности, интегрального показателя «общая интенсивность пикселей в пике» – произведение размера пика в пикселях на яркость пикселей [21].

Для получения статистически значимых результатов в ходе гистологического исследования достаточно 6–8 животных в группе, 5–6 серийных срезов

и 5–10 случайных полей зрения амигдалы (зоны интереса) на каждом срезе [22, 23]. В настоящем исследовании мы сравнивали по 30 рандомизированных полей зрения амигдалы на срок, что достаточно для решения поставленных задач. Проверку характера распределения и статистических гипотез при сравнении групп исследования осуществляли непараметрическими критериями (Shapiro–Wilk test, Mann–Whitney U-test, ANOVA Kruskal–Wallis) 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). Проблема множественного сравнения решалась путём использования ANOVA Kruskal–Wallis [24].

Результаты и обсуждение

Миндалевидное тело (МТ) является сложным многоядерным центром головного мозга, расположенным под височной корой. МТ состоит из различных мелко-, средне- и крупноклеточных ядер. Крупноклеточные ядра МТ сформированы нормохромными нейронами, а мелкоклеточные – кариохромными и светлыми нейронами. Крупные мультиполярные нейроны имели богатое эухроматином клеточное ядро, упорядоченное расположение элементов гранулярной эндоплазматической сети, выраженный цитоскелет (рис. 1, а, 2, а). Общая численная плотность нейронов (ОЧПН) в средноклеточных ядрах варьировалась (Q2; Q1–Q3) в пределах 490,5 (445,3–534,5), а в крупноклеточных ядрах – 246,5 (203,2–253,2) на 1 мм^2 поля зрения. Для МТ в целом – 368 (224–512). Далее, для унификации, сравнения между группами проводились с показателем Q2 – медиана для всех ядер.

В МТ контрольной группы животных встречались отдельные гиперхромные нейроны, а также очень яркие неокрашенные зоны – просветы пустых сосудов, немногочисленные проявления перичеселлюлярного (ПЦО) и периваскулярного (ПВО) отёка. При этом нейропилль МТ был представлен однородным эозинфильным материалом без признаков набухания составляющих его элементов (дендриты, отростки астроцитов) (рис. 1, а, 2, а, в). Общая интенсивность пикселей зон (пиков) максимальной яркости нейропиля в контроле составляла всего 230 000 (140 000–280 000), что примерно в 10 раз меньше (критерий Манна–Уитни, $p < 0,0001$), чем после ООСА (рис. 3, 4).

После ООСА в ядрах МТ всех групп животных появлялись в основном единичные вакуолизованные нейроны, редко клетки тени, ишемические несморщенные и сморщенные (пикноморфные гомогенизированные и негомогенизированные) тёмные ней-

роны (рис. 1, в, г) Через 1 сут среди изменённых превалировали нейроны с признаками гидропической дистрофии, одиночные клетки-тени и несморщенные тёмные. Через 3 и 7 сут увеличивалось содержание сморщенных тёмных нейронов (в очагах их скопления до 50–60%) и нейронов в состоянии фагоцитоза, увеличивалось количество свободных и сателлитарных нейроглиоцитов (рис. 1, г). По данным иммуногистохимической реакции на *GFAP* астроциты и их отростки гипертрофировались. Особенно это было характерно для зон с большим количеством гиперхромных нейронов (рис. 2, в, г). Основная часть поврежденных нейронов, вероятно, подвергалась фагоцитозу в течении 7 сут после острой ишемии. В сравнение с контролем общая численная плотность нейронов (ОЧПН)

в группе I уменьшалась на 10,2% ($p=0,03$), в группе II – на 11,4% ($p=0,03$), а группе III – на 12,9% (Mann–Whitney U-test, $p=0,01$). Дефицит общей численной плотности нейронов (ОЧПН) сопровождался увеличением нейроглиального индекса (НГИ) от 2,0 (контроль) до 2,8 (Mann–Whitney U-test, $p=0,01$) (через 7 сут).

С помощью плагина «Find Foci» верифицированы пики (участки изображения, отличающиеся от соседних средними значениями интенсивности пикселей). В контроле, на чёрном фоне, преобладали пики небольших размеров с различными оттенками серого, яркие светлые участки немногочисленны. Не было экстремальных выбросов значений их характеристик (размеры, средняя интенсивность, общая интенсивность пикселей в пике) (рис. 3).

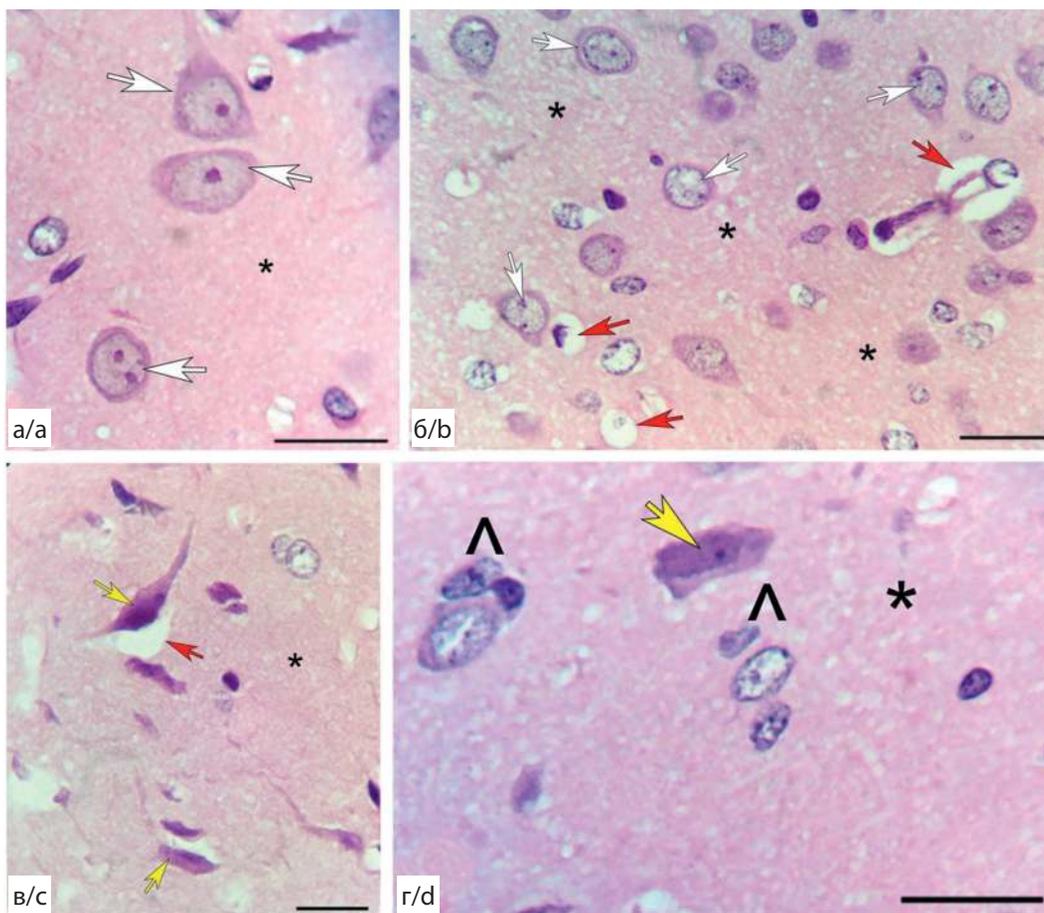


Рис. 1. Поля зрения миндалевидного тела контрольных животных (а), через 1 сут (б, г) и 7 (в) сут после ООСА: визуальные качественные различия реакции нейронов и проявлений отёка-набухания нейропила (*). Жёлтые стрелки – гиперхромные, белые стрелки – нормохромные нейроны. Красные стрелки – периваскулярный и перичеллюлярный отёк. Окраска гематоксилином и эозином, Об. $\times 100$, масштабный отрезок – 20 мкм.

Fig. 1. Fields of view of the amygdala of control animals (a), 1 (b, d) and 7 (c) days after CCAO: visible qualitative differences in neuron responses and signs of edema-swelling of the neuropil (*). Yellow arrows, hyperchromic neurons; white arrows, normochromic neurons; red arrows, perivascular and pericellular edema. Hematoxylin and eosin staining; lens, $\times 100$; scale bar, 20 μm .

После ООСА количество ярких пиков существенно увеличивалось (в 10–15 раз). Именно по количеству, размерам и яркости этих пиков проводилось сравнение между экспериментальными группами (интегральный показатель – «общая интенсивность пикселей в пиках»).

При сравнении МТ правого и левого полушария незначительные статистически значимые различия по общей интенсивности пикселей максимально ярких пиков выявлены через 1 сут после ООСА в группе II (односторонняя 30 мин ООСА). На сторо-

не окклюзии проявления отёка-набухания были более выражены. Через 3 и 7 сут асимметрии по данной переменной различий не выявляли (рис. 4). Вероятно, это свидетельствовало о восстановлении кровотока в эти сроки.

ООСА, вероятно, приводила к существенному перераспределению воды в МТ. Так, в остром периоде (1 и 3 сут) появлялись поля зрения МТ со структурными проявлениями перипеллюлярного (ПЦО) и периваскулярного (ПВО) отёка астроцитов. В боль-

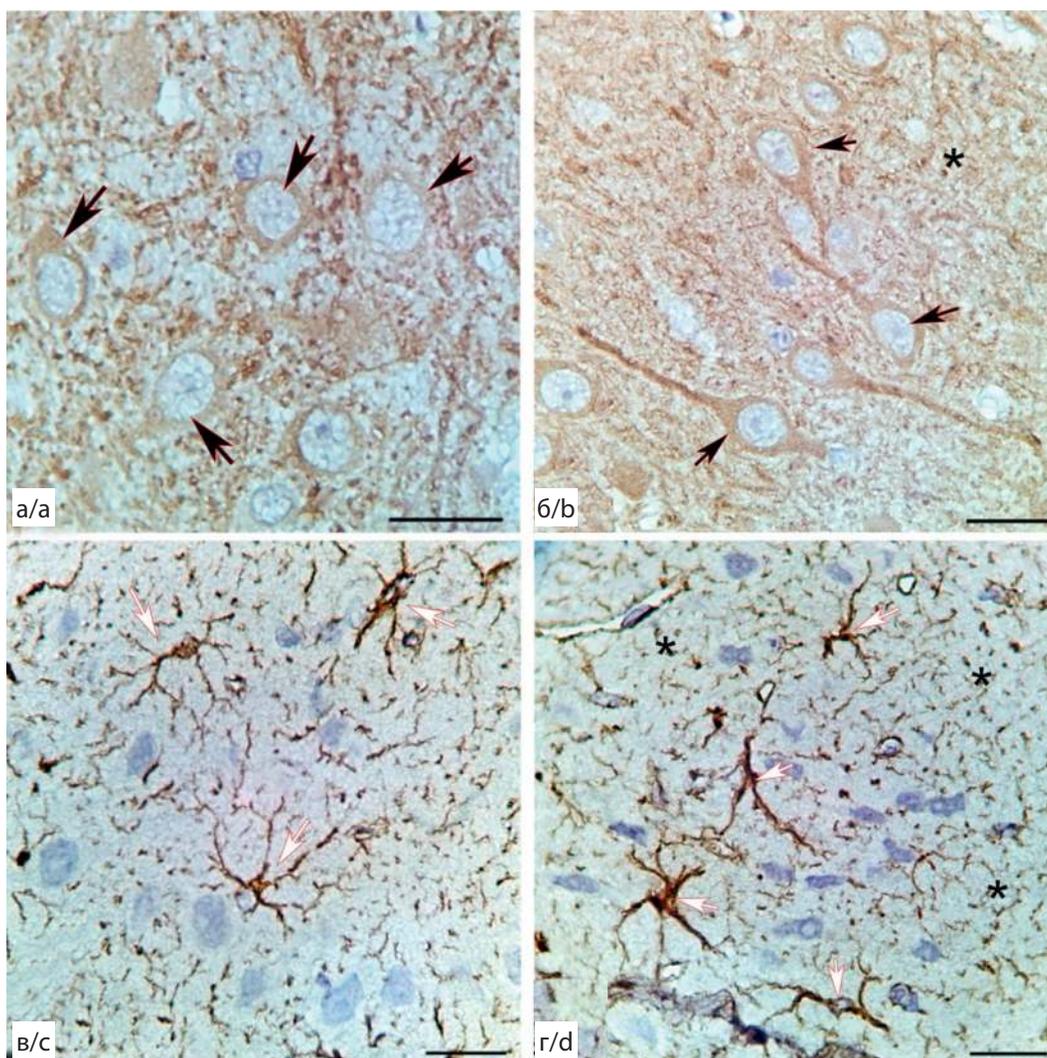


Рис. 2. Поля зрения миндалевидного тела контрольных животных (а, в) и через 3 (б, г) сут после ООСА: после ишемии цитоскелет нейронов прокрашивается более интенсивно, увеличивается количество гипертрофированных астроцитов. * – нейропилль, черные стрелки – нейроны, белые стрелки – астроциты. Окраска: иммуногистохимическая реакция на MAP-2 (а, б) и GFAP (в, г) докраска гематоксилином. Об. $\times 100$, масштабный отрезок – 20 мкм.

Fig. 2. Fields of view of the amygdala of control animals (a, c) and 3 (b, d) days after CCAO. After ischemia, the cytoskeleton of neurons was stained more intensively, the number of hypertrophic astrocytes increased. *, neuropil; black arrows, neurons; white arrows, astrocytes. Staining: immunohistochemical reaction for MAP-2 (a, b) and GFAP (c, d) followed by hematoxylin staining; lens, $\times 100$; scale bar, 20 μm .

шей степени это было характерно для микрососудов и пикноморфных нейронов животных группы II и III (рис. 1, б, в), как раз там, где располагается основная масса отростков астроцитов. В более отдалённом периоде (7 сут после ООСА) в группах I и II отмечена

незначительная редукция проявлений отёка набухания. Гидропические изменения астроцитов сочетались с появлением тёмных сморщенных и несморщенных нейронов на протяжении всего периода наблюдения (рис. 1, б, в, г; рис. 5).

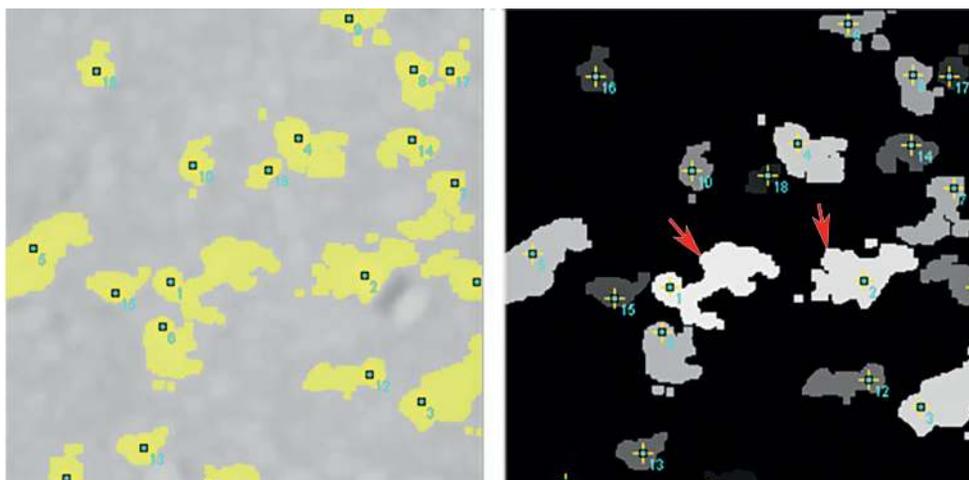


Рис. 3. Участки (ROI=20×20 мкм; 32 бит, градации серого) нейропиля миндалевидного тела у крысы группы III: все пики (отмечено жёлтым) отличались формой и размерами, на чёрном фоне отмечены пики с разной яркостью, наиболее яркие светлые пики (отмечено красными стрелками) соответствуют небольшим очагам отёка-набухания. Окраска гематоксилин-эозином, трансформация изображений с помощью плагина «Find Foci». Объектив ×100.

Fig. 3. Areas (ROI = 20×20 μm; 32 bits, grayscale) of the amygdala neuropil in a group III rat: all peaks (marked in yellow) differed in shape and size, peaks with different brightness are marked on a black background, the brightest light peaks (marked in red arrows) correspond to small foci of edema-swelling. Hematoxylin-eosin staining, image transformation using the “Find Foci” plugin. Lens ×100.

Общая интенсивность пикселей (правое и левое полушария)

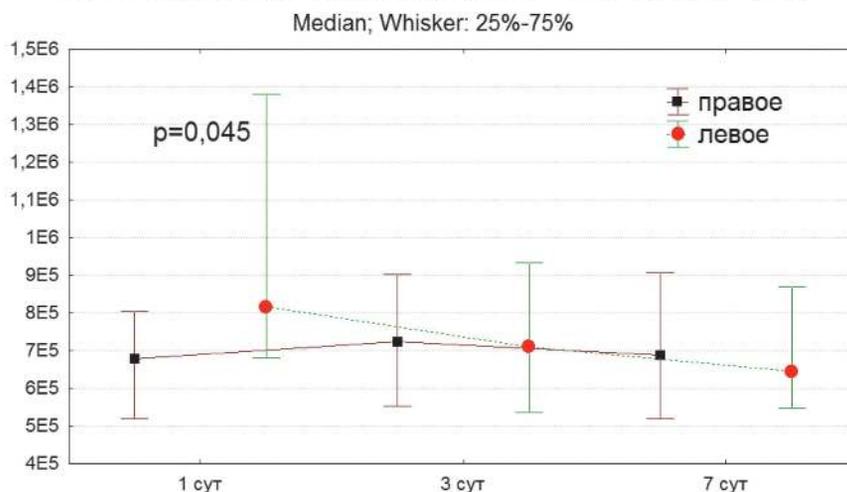


Рис. 4. Общая интенсивность пикселей (ось ординат, миллионы) в пиках полей зрения (ROI=90000 пикселей, n=25) миндалевидного тела у животных групп II в динамике после ООСА в правом и левом полушарии головного мозга. Данные представлены как Q2 (Q1-Q3). Статистически значимые различия в сравнении с 1 сут (Mann-Whitney U-test) при p<0,05.

Fig. 4. Total intensity of pixels (y-axis, millions) in the peaks of the visual fields (ROI=90000 pixels, n=25) of the amygdala in animals of groups II in dynamics after OSA in the right and left hemispheres of the brain. Data are presented as Q2 (Q1-Q3). Statistically significant differences compared to 1 day (Mann-Whitney U-test) at p<0.05.

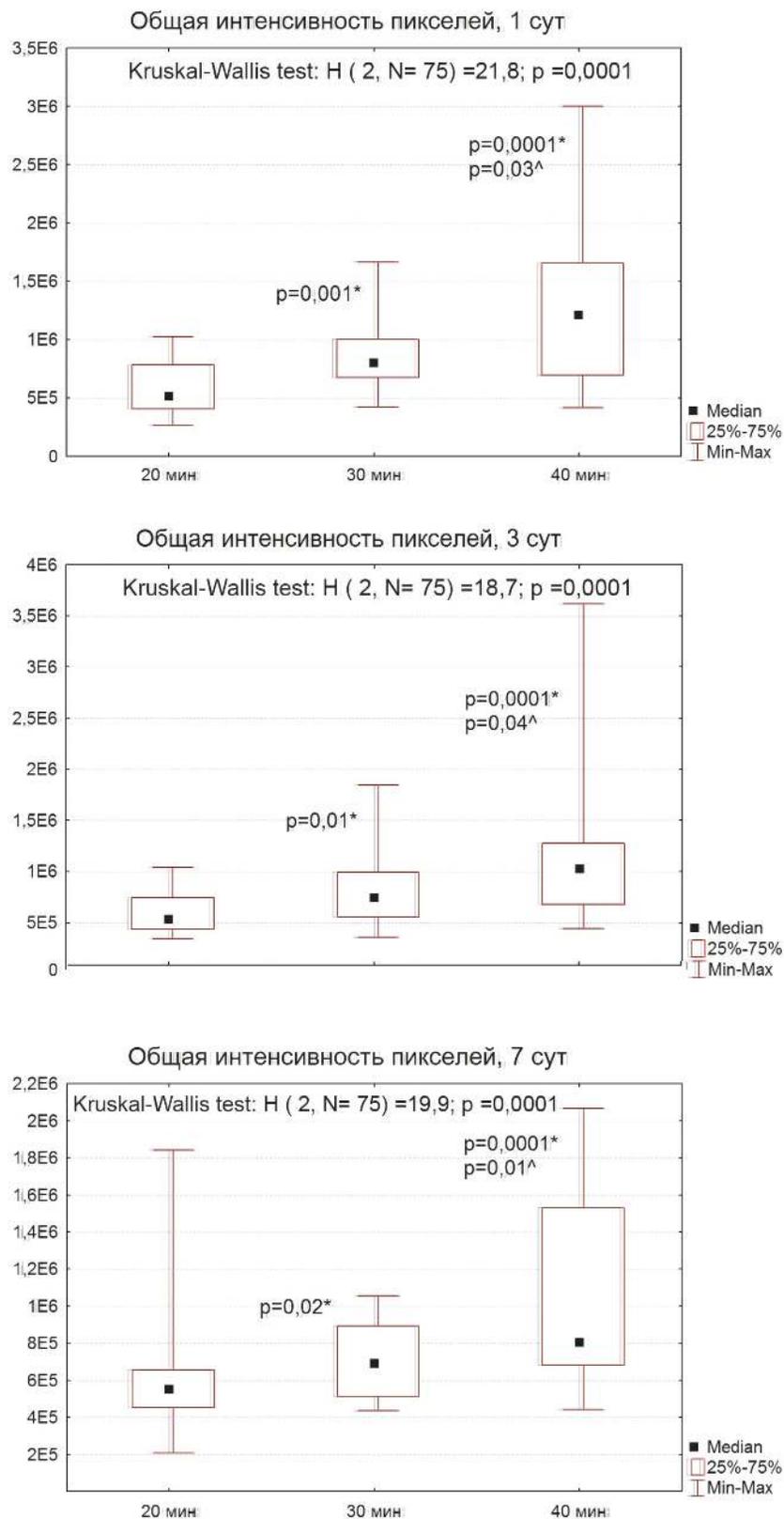


Рис. 5. Общая интенсивность пикселей (ось ординат, миллионы) в пиках полей зрения (ROI=20×20 мкм, n=25) миндалин у животных групп I, II и III в динамике после ООСА. Данные представлены как Q2 (Q1-Q3) и диапазон без выбросов (усы). При множественном сравнении переменной по группам выявлены статистически значимые различия (ANOVA Kruskal–Wallis; $p < 0,001$) между группами по всем срокам. * – статистически значимые различия в сравнении с группой I, ^ – с группой II (Mann–Whitney U-test) при $p < 0,05$.

Fig. 5. The total intensity of pixels (y-axis, millions) in the peaks of the visual fields (ROI=20×20 micrometers, n=25) of the amygdala in animals of groups I, II and III in dynamics after OSA. Data are presented as Q2 (Q1-Q3) and non-outlier range (whiskers). Multiple comparisons of the variable across groups revealed statistically significant differences (ANOVA Kruskal–Wallis; $p < 0,001$) between groups across all terms. * – statistically significant differences in comparison with group I, ^ – with group II (Mann–Whitney U-test) at $p < 0,05$.

Таким образом, в МТ, как в сенсомоторной коре [25] и гиппокампе [26] после ООСА выявлены слабые, умеренные и сильные структурные проявления отёка-набухания.

Проведённые сравнения показали существование дозозависимых, от продолжительности ишемии, переходов от незначительных изменений нейронов и астроцитов МТ по типу набухания (через 1 сут после двусторонней 20-мин и односторонней 30-мин ООСА) до выраженных очаговых проявлений отёка-набухания (через 3 сут после двусторонней 40-мин ООСА). Это можно трактовать как последовательный сбалансированный процесс обмена жидкости между клетками МТ. После односторонней 30-мин и двусторонней 20-мин ООСА отмечалась в основном гипергидратация нейронального компартмента. После 40-мин ООСА выявлялись выраженные признаки гипергидратации астроцитарного компартмента и дегидратации нейронов (пикноморфные нейроны). При этом во всех группах, вероятно, сохранялись потенциальные возможности структурно-функционального восстановления большей части тёмных несморщенных нейронов и отёчной астроглии. Однако в наиболее повреждённых участках МТ после 40-мин ООСА происходил срыв механизмов оттока жидкости по астроцитам, формировались периваскулярные и перинейрональные зоны со свободной жидкостью. В таких зонах, вероятно, сочетались дисфункция ионных насосов нейронов, астроцитов и эндотелиальных клеток микрососудов и, как следствие, происходила необратимая дегидратация и сморщивание нейронов (с последующим их фагоцитозом) на фоне отёка конечных отделов отростков астроцитов. По данным литературы, после острой ишемии наблюдалось повреждение и отрыв отростков астроцитов с образованием полостей, прогрессированием отёка-набухания и неизбежной гибелью нейронов [13, 14, 23, 27].

Следовательно, использование плагина *Find Foci* [21] для количественной оценки гидратации нервной ткани миндалевидного тела путем определения структуры пикселей изображения по степени их яркости и размера светлых зон позволило разделить физиологические и патофизиологические проявления – набухание и отек. Идеология и методическая основа подобного подхода для оценки степени гидратации нервной ткани более подробно представлены нами ранее при изучении сенсомоторной коры и гиппокампа белых крыс [17, 20, 25]. Стандартизация процесса получения количественных данных позволяет выявлять особенности разных отделов головного мозга при развитии отека-набухания и оценить его динамику. Это

важно при интерполяции и экстраполяции характеристик структурно-функциональных изменений.

Заключение

Таким образом, после 40-мин, в отличие от 20- и 30-мин ООСА, необратимо повреждается система естественной защиты и восстановления ишемически изменённых нейронов МТ и, вероятно, микродренажная функция астроцитов. Это неизбежно приводит к необратимым повреждениям и гибели части нейронов МТ по механизмам вторичной ишемии. Поэтому мы полагаем, что проявления де- и гипергидратации гиппокампа после 20- и 30-мин ООСА можно рассматривать преимущественно как обратимые защитные, а после 40-мин ООСА – как признак прижизненных дегенеративных изменений нейронов (сморщивание) и астроцитов (отёк). Аналогичные представления найдены и в работах других авторов [13, 17, 23, 28].

Следовательно, в настоящей работе получены новые сведения о морфофункциональных особенностях реакции МТ крыс линии Wistar на ООСА. Дана количественная оценка структурным проявлениям отёка-набухания, что способствует большему пониманию патологических и адаптивных процессов в нервной ткани.

Литература

(п.п. 1–3; 6–16; 19; 21–23; 27; 28 см. References)

- Костюк П. Г. *Частная физиология нервной системы*. Л.: Наука, 1983.
- Мгалоблишвили М.М. Влияние повреждения миндалевидного комплекса на условно-рефлекторную активность и краткосрочную память животных. *Сообщ. АН Груз. ССР*. 1971; 62(3): 685.
- Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Горбунова А.В., Степанов С.С., Шоронова А.Ю., Макарьева Л.М. и др. Отёк-набухание как стандартная дозозависимая реакция зубчатой извилины гиппокампальной формации на острую ишемию. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2021; 10(3): 15–26. DOI:10.18499/2225-7357-2021-10-3-15-26
- 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.
- 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 *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(1): 17–27. DOI: <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.01.17-27>
- Боровиков В. *Statistica. Искусство анализа данных на компьютере*. 2-е изд. Изд-во: СПб: Питер, 2003; 688 с. ISBN: 5-272-00078-1.
- Степанов С.С., Авдеев Д.Б., Акулинин В.А., Шоронова А.Ю., Макарьева Л.М., Коржук М.С. Сравнительная морфометрическая характеристика проявлений отека-набухания сенсомоторной коры большого мозга половозрелых белых крыс после 20, 30-, 40-минутной окклюзии общих сонных артерий.

- Общая реаниматология.* 2021; 17(5): 111-28. DOI: 10.15360/1813-9779-2021-5-111-128
26. Горбунова А.В., Акулинин В.А., Степанов С.С., Авдеев Д.Б., Шоронова А.Ю., Макарьева Л.М. Закономерности реорганизации нейроглиальных взаимоотношений в гиппокампальной формации белых крыс после кратковременной окклюзии общих сонных артерий: *Национальный конгресс с международным участием «Здоровые дети — будущее страны»*. С.-П., 26-28 мая 2021 г.
- ### References
1. Burwell R.D., Amaral D.G. Perirhinal and postrhinal cortices in the rat: Interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *J. Comp. Neurol.* 1998; 391: 293–321.
 2. Chandler H.C., King V., Corwin J.V., Reep R.L. Chandler, H. C. Thalamocortical connections of rat posterior parietal cortex. *Neurosci. Lett.* 1992; 143: 237–42.
 3. Wu T., Nagaya Y., Hanada T. Pharmacodynamic and pharmacokinetic interactions of perampanel and other antiepileptic drugs in a rat amygdala kindling model. *Seizure.* 2014; 23(9): 732-9. DOI: 10.1016/j.seizure.2014.06.001
 4. Kostyuk P.G. *Private physiology of the nervous system. [Chastnaya fiziologiya nervnoy sistemy]*. Leningrad: Nauka, 1983. (in Russian)
 5. Mgaloblishvili M.M. The effect of damage to the amygdala complex on conditioned reflex activity and short-term memory of animals. *Soobshcheniya AN Gruz. SSR.* 1971; 62(3): 685. (in Russian)
 6. Morrison S.E., Salzman C. D. Re-valuing the amygdala. *Current opinion in neurobiology.* 2010; 20(2): 221-30. DOI: 10.1016/j.conb.2010.02.007
 7. Bazyan A.S., Van Luijtelaaar G. Neurochemical and behavioral features in genetic absence epilepsy and in acutely induced absence seizures. *Neurology.* 2013; 875834. DOI: 10.1155/2013/875834
 8. 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
 9. Bai J., Lyden P.D. Revisiting cerebral posts ischemic reperfusion injury: new insights in understanding reperfusion failure, hemorrhage, and edema. *Int J Stroke.* 2015 Feb 10(2): 143-52. DOI: 10.1111/ijss.12434
 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. 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 May 15; 134: 189-207. DOI: 10.1016/j.neuropharm. 2017.09.027
 12. Belov Kirdajova D., Kriska J., Tureckova J., Anderova M. Ischemia-triggered glutamate excitotoxicity from the perspective of glial cells. *Front Cell Neurosci.* 2020 Mar 19; 14: 51. DOI: 10.3389/fn-cel.2020.00051
 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 Jun 40(6): 2173–81. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.534990
 14. Von Kummer R., Dzialowski I. Imaging of cerebral ischemic edema and neuronal death. *Neuroradiol.* 2017 Jun 59(6): 545-53. DOI: 10.1007/s00234-017-1847-6
 15. Wang Y.F., Parpura V. Astroglial modulation of hydromineral balance and cerebral edema. *Front Mol Neurosci.* 2018 Jun 12; 11: 204. DOI:10.3389/fnmol.2018.00204
 16. Kim Y.K., Leem J.G., Shin J.W., Joung K.W. Ischemic post-conditioning may not influence early brain injury induced by focal cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Korean J Anesthesiol.* 2010 Feb; 58(2): 176-83. DOI:10.4097/kjae.2010.58.2.176
 17. Avdeev D.B., Akulinin V.A., Gorbunova A.V., Stepanov S.S., Shorono A.Yu., Makar'eva L.M., et al. Edema-Swelling as a Standard Dose-Dependent Response of the Dentate Gyrus of the Hippocampal Formation to Acute Ischemia. *Zhurnal anatomii i gistopatologii.* 2021; 10(3): 15–26. (in Russian). DOI: 10.18499/2225-7357-2021-10-3-15-26
 18. 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)
 19. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
 20. Makarieva L.M., Avdeev D.B., Akulinin V.A., Stepanov S.S., Korzhuk M.S., Shorono 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.* 2022; 66(1): 17–27. (in Russian). <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.01.17-27>
 21. Herbert A.D., Carr A.M., Hoffmann E. FindFoci: 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
 22. Bolon B., Garman R., Jensen K., et al. Best practices approach to neuropathologic assessment in developmental neurotoxicity testing. *Toxicol. Pathol.* 2006; 34: 296–313.
 23. Ooigawa H., Nawashiro H., Fukui S., Naoki O., Atsushi O., Terushige T., Katsuji S. The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate. *Acta Neuropathol.* 2006; 112(4): 471–81. DOI: 10.1007/s00401-006-0108-2
 24. Borovikov V. *Statistica. The art of analyzing data on a computer.* 2nd ed. Izdatel'stvo Piter; 2003. (in Russian)
 25. Stepanov S.S., Avdeev D.B., Akulinin V.A., Shorono A.Yu., Makar'eva L.M., Korzhuk M.S. Relation between the severity of the sensorimotor cortical edema with cell swelling and the duration of common carotid artery occlusion in rats (morphometric study). *Obshchaya reanimatologiya.* 2021; 17(5): 111-28. (in Russian). DOI: 10.15360/1813-9779-2021-5-111-128
 26. Gorbunova A.V., Akulinin V.A., Stepanov S.S., Avdeev D.B., Shorono A.Yu., Makar'eva L.M. *Patterns of reorganization of neuroglial relationships in the hippocampal formation of white rats after short-term occlusion of the common carotid arteries: National congress with international participation "Healthy children are the future of the country"*. [Zakonernosti reorganizatsii neyroglial'nykh vzaimootnosheniy v gippokampal'noy formatsii belykh krysv posle kratkovremennoy okklyuzii obshchikh sonnykh arteriy: Natsional'nyy kongress s mezhdunarodnym uchastiem «Zdorovyete deti — budushchee strany»]. *Sankt-Peterburg, 26-28 maya 2021 gya reanimatologiya: «Zdorovyete deti — budushchee strany»*. Saint Petersburg, may 26-28, 2021. (in Russian)
 27. Pekny M., Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev.* 2014; 94(4): 1077–98. DOI: 10.1152/physrev.00041.2013
 28. Ahmadpour S., Behrad A., Fernández-Vega I. Dark neurons: A protective mechanism or a mode of death. *J. Med. Histolog.* 2019; 3(2): 125–31. DOI: 10.21608/JMH.2020.40221.1081

Сведения об авторе:

Авдеев Дмитрий Борисович, канд. вет. наук, доцент каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, Омский государственный медицинский университет, e-mail: avdeev86@inbox.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 612.115.3-612.115.064

Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Ляпина Л.А., Шубина Т.А.

Функциональное состояние системы гемостаза при действии хитозана в условиях нарушения жирового обмена у крыс

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,
119234, Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

В настоящее время продолжают исследования, направленные на повышение эффективности кровоостанавливающего препарата хитозана, одновременно влияющего на жировой обмен. Вместе с тем, недостаточно изучено действие хитозана на полимеризацию фибрина, состояние первичного и плазменного гемостаза при нарушениях обмена веществ. **Цель** исследования – изучение влияния хитозана на функциональное состояние системы гемостаза при многократном пероральном его применении у крыс в условиях нарушения жирового обмена.

Методика. В экспериментах использовано 45 крыс-самцов (масса 250–280 г) с уже развившимися метаболическими нарушениями. Все животные в течение всего периода эксперимента продолжали получать высококалорийную диету (ВКД). 1-й группе (опыт, $n = 15$) хитозан (водорастворимый сукцинил хитозана) вводили крысам перорально ежедневно (100 мг/кг) в течение 14 сут, 2-й группе (контроль, $n = 15$) – аналогично вводили 0.85%-й NaCl. Здоровые животные (норма, $n = 15$) содержались на стандартном гранулированном комбикорме и не получали никаких препаратов. Взятие крови осуществляли из яремной вены (*vena jugularis*) через 20 ч после завершающего введения препаратов крысам, а также через 7 сут после отмены применения препаратов. Использовали стандартные коагулологические методы.

Результаты. Через 20 ч после 14-го введения хитозана у крыс с нарушением жирового обмена установлено повышение свертываемости крови: снижение фибринолитического потенциала, активности плазмينا и увеличение степени полимеризации фибрина, что сохранялось и через 7 сут после прекращения введения препарата на фоне ВКД.

Заключение. Впервые у животных с метаболическими нарушениями установлена способность хитозана значительно снижать активность плазмينا и фибринолитического потенциала, повышать полимеризацию фибрина, сопровождающуюся повышением активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Обсуждаются возможные механизмы действия производного хитозана на процессы гемостаза и фибринолиза.

Ключевые слова: хитозан; система гемостаза; полимеризация фибрина; фибринолиз; АЧТВ; агрегация тромбоцитов

Для цитирования: Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Ляпина Л.А., Шубина Т.А. Функциональное состояние системы гемостаза при действии хитозана в условиях нарушения жирового обмена у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(2): 28-33.

DOI:10.25557/0031-2991.2022.02.28-33

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Григорьева М.Е.; написание текста – Григорьева М.Е., Ляпина Л.А.; редактирование – Оберган Т.Ю.; определение параметров – Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Ляпина Л.А., Шубина Т.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Григорьева Марина Евгеньевна, e-mail: mgrigorjeva@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена по теме госбюджетного НИОКР.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.03.2022

Принята к печати 31.03.2022

Опубликована 27.05.2022

Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Lyapina L.A., Shubina T.A.

Functioning of the hemostasis system under the action of chitosan in the conditions of impaired fat metabolism in rats

Lomonosov Moscow State University,
Moscow, 119234, Russian Federation, Leninskie Gory 1, Bldg. 12

Ongoing studies are aimed at improving the effectiveness of the hemostatic drug chitosan that simultaneously affects fat metabolism. However, the effect of chitosan on fibrin polymerization and the state of primary and plasma hemostasis in metabolic disorders has not been sufficiently studied. **The aim** of the study was to investigate the effect of repeated oral chitosan administration on functioning of the hemostasis system in rats with impaired fat metabolism.

Methods. In experiments conducted in compliance with ethical rules, 50 male Wistar rats weighing 250-280 g with predeveloped metabolic disorders were injected orally with water-soluble chitosan (succinyl chitosan). The animals continued receiving a high-calorie diet throughout the entire experimental period. The first group (Experiment) was administered chitosan orally at a daily dose of 100 mg/kg for 14 days; the second group (Control) was similarly administered 0.85% NaCl. Untreated animals (Normal) were kept on a standard commercial rat food and did not receive any drugs. Blood was collected from the jugular vein 20 h after the last, 14th administration of drugs and 7 days after the drug withdrawal. Standard coagulometric methods were used.

Results. At 20 h after the 14th administration of chitosan to rats with impaired fat metabolism, an increase in blood clotting was found, which included decreases in the fibrinolytic potential and the plasmin activity, and an increase in the fibrin polymerization. These changes remained also at 7 days after the drug was discontinued while the high-calorie diet was continued.

Conclusion. For the first time, this study showed that chitosan was able to decrease significantly the plasmin activity and the fibrinolytic potential, and to increase the fibrin polymerization associated with an increase in activated partial thromboplastin time (APTT) in rats with metabolic disorders. Possible mechanisms of the effect of the chitosan derivative on hemostatic and fibrinolytic processes are discussed.

Keywords: chitosan; hemostasis system; fibrin polymerization; fibrinolysis; APTT; platelet aggregation

For citation: Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Lyapina L.A., Shubina T.A. Functional state of the haemostasis system under the action of chitosan in conditions of impaired fat metabolism in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(2): 28-33. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.28-33

Author's contribution: concept and design of the research – Grigorjeva M.E.; writing the text – Grigorjeva M.E., Lyapina L.A.; editing – Obergan T.Y.; parameter definitions – Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Lyapina L.A., Shubina T.A. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Grigorjeva M.E., e-mail: mgrigorjeva@mail.ru

Funding. The work was carried out on the topic of state budget.

Conflict of interest. The authors declare that there are no conflicts of interest.

Information about the authors:

Grigorjeva M.E., <https://orcid.org/0000-0003-0469-3943>

Obergan T.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-3760-3943>

Lyapina L.A., <https://orcid.org/0000-0002-8983-652X>

Shubina T.A., <https://orcid.org/0000-0003-1092-8382>

Received 14.03.2022

Accepted 31.03.2022

Published 27.05.2022

Введение

Природный полисахарид хитозан – уникальный биополимер, получаемый дезацетилированием хитина, благодаря чему он приобретает антимикробные ранозаживляющие и кровоостанавливающие свойства, обеспечивающие его использование в клинике. Отмечено сочетание ценных свойств у хитозана, включая высокую биологическую совместимость, биodeградируемость, устойчивость, способность к волокну- и пленкообразованию, что обуславливает его широкое применение [1, 2]. Ранозаживляющий эф-

фект усиливается при добавлении к хитозану фибриногенового каркаса [3]. Установлено незначительное влияние хитозана на свертывание крови, а именно, на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) [4].

Для биомедицинских исследований был синтезирован растворимый в воде сукцинил-хитозан с определенной степенью замещения сульфатных групп. Показано возрастание антикоагулянтных свойств сульфата хитозана при увеличении степени сульфатирования

[5], тогда как снижение степени сульфатирования способствует усилению его прокоагулянтного эффекта [6].

Также установлено, что хитозан способен снижать уровень преатерогенного холестерина и препятствовать процессам ожирения. Выявлено, что хитозан абсорбирует и связывает пищевые жиры, что способствует снижению веса, блокирует образование холестерина липопротеинов низкой плотности. Хитозан применяют при ожирении или избыточной массе тела, сахарном диабете, нарушениях жирового обмена, сердечно-сосудистых заболеваниях и атеросклерозе [7]. **Цель исследования** – изучение влияния хитозана на функциональное состояние системы гемостаза при многократном пероральном его применении у крыс в условиях нарушения жирового обмена.

Методика

В работе использован хитозан водорастворимый (сукцинил хитозана), полученный по запатентованной методике из панцирей красноногих крабов в соответствии с ТУ 9284-027-11734126-08 (ООО «Био-прогресс», Россия). В экспериментах, проведенных с соблюдением этических правил, принятых Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 15.06.2006), было использовано 45 крыс-самцов Wistar массой тела 250–280 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария (искусственное освещение день/ночь – 12 ч/12 ч, принудительная вентиляция, температура 22–26 °С, относительная влажность 50–70%). Для моделирования нарушений жирового обмена применяли разработанную нами методику [8]. Для исследования использовали животных с уже развившимися метаболическими нарушениями. Крыс в течение всего периода эксперимента содержали на высококалорийной диете (ВКД), энергетическая ценность которой составляла не менее 3500 ккал/кг. В качестве питья животные получали 10%-ный раствор глюкозы. Животные были разделены на 2 группы: 1-й группе (Опыт, $n = 15$) хитозан, растворенный в физиологическом растворе, вводили перорально в ежедневной дозе 100 мг/кг в течение 14 сут, 2-й группе (Контроль, $n = 15$) – аналогичным способом вместо раствора хитозана вводили 0.85%-ый NaCl (физиологический раствор). Дополнительно в экспериментах использовали здоровых животных (Норма, $n = 15$), которые содержались на стандартном гранулированном комбикорме (калорийность 2950 ккал/кг) и не получали никаких препаратов.

Кровь у животных брали из яремной вены (*vena jugularis*) с использованием в качестве консерванта 3.8%-й цитрат натрия в соотношении 9 : 1. Взятие

крови производили через 20 ч после 14-го введения и затем через 7 сут после прекращения введения исследуемых препаратов.

Исследовали фибринолитическую активность по тестам суммарного (СФА) и ферментативного фибринолиза (ФФ), фибриндеполимеризационную активность (ФДПА), активность плазмينا, тканевого активатора плазминогена (ТАП) и время лизиса эритроцитарного сгустка (ВЛЭС) в бедной тромбоцитами плазме крови согласно стандартным методам. Свертываемость крови изучали по тесту активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) на анализаторе свертывания крови АСКа 2-02-Астра (Россия). Агрегацию тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме крови определяли на агрегометре АЛАТ2 ЛА 220 («Биола», Россия) по методу Борна с использованием в качестве индуктора агрегации АДФ в конечной концентрации 10^{-6} М по инструкции к прибору [9].

Статистика. Статистический анализ данных осуществляли, используя пакет статистических программ Statistica 8 (StatSoft Inc., США), а также графических программ Microsoft Excel. Эмпирические распределения проводили с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для полярного сравнения независимых групп применяли непараметрический критерий Манна Уитни. Полученные данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Для исследования использовали животных с уже развившимися метаболическими нарушениями. Критерием включения животных в эксперимент было развитие ожирения (избыточная масса тела), повышенный уровень общего холестерина (120–130%) и триглицеридов (150–200%) от нормы.

Было показано, что через 20 ч после последнего 14-го введения хитозана крысам при одновременном соблюдении ВКД (ежедневная доза 100 мг/кг массы тела) у животных группы «Опыт» увеличивалась свертываемость крови. Об этом свидетельствовало подавление всех видов фибринолиза – СФА, ФФ и ФДПА, которые статистически значимо снижались на 13.5%, 10% и 17.4% соответственно, активность плазмينا резко падала на 88% по сравнению с контрольными значениями. Следует отметить, что в этот период времени агрегация тромбоцитов не изменялась, а АЧТВ увеличилось на 42% относительно контроля (табл. 1).

Через 7 сут после отмены введения хитозана в плазме крови крыс группы «Опыт» все виды фибриноли-

за соответствовали контрольным значениям, однако, активность плазмينا была значительно повышена при одновременной тенденции к снижению активности ТАП. В этот период агрегация тромбоцитов подавлялась на 14%, а показатель АЧТВ приближался к контрольным значениям (табл. 2).

Анализ полученных данных показал, что пероральное введение хитозана животным с метаболическими нарушениями, постоянно потребляющих ВКД, в основном влияет на плазменный гемостаз, подавляя фибринолиз крови и активность плазмينا через 20 ч после 14-го введения. Спустя 7 сут после отмены хитозана показатели фибринолиза в присутствии ингибиторов ФФ приближаются к контрольным значениям, но остаются ниже уровня нормы на 22-36%. Следует отметить, что поскольку ФДПА плазмы после введения хитозана значительно подавлялась в начальные сроки наблюдения и сохраняла эту тенденцию, хотя и в меньшей степени, и через 7 сут после отмены введения препарата, то можно говорить об усилении процессов полимеризации фибрина под влиянием хитозана. Это указывает на долговременное действие хитозана в организме крыс с метаболическими нарушениями.

Обращает на себя внимание, что в эуглобулиновой фракции плазмы крови, не содержащей ингибиторы ФФ (показатель ВЛЭС), наблюдается некоторое повышение этого вида фибринолиза, тогда как в плазме крови, которая содержит ингибитор ТАП, фибринолиз подавляется [8]. Этот феномен мы и наблюдали в организме крыс с метаболическими нарушениями. Что касается АЧТВ, которое характеризует внутренний механизм свертывания крови, по данным литературы [4], подтвержденным нашим исследованием, не установлено статистически значимого влияния хитозана на этот показатель гемостаза. Это же можно сказать и об изменении агрегации тромбоцитов в данных условиях эксперимента.

На основании результатов, полученных нами, следует, что хитозан оказывает влияние на активность фибринолитической системы крови, включающей ферментативное и неферментативное (фибриндеполимеризационное) звенья. Особое значение придается хитозану, как веществу, участвующему в процессах полимеризации фибрина. Это объясняется его взаимосвязью и контактом непосредственно с фибрином и фибриногеном, вследствие чего образуется их комплекс, главным образом за счет электростатического притяжения и изменения конформации фибриногена [10, 11].

Таблица 1

Параметры гемостаза через 20 ч после 14-кратного перорального введения хитозана (в ежедневной дозе 100 мкг/кг массы тела) крысам с нарушениями жирового обмена, ($M \pm m$)

Hemostasis parameters 20 h after 14-fold oral administration of chitosan (at a daily dose of 100 mcg/kg body weight) to rats with impaired fat metabolism, ($M \pm m$)

Условия опыта Experience conditions	СФА (мм ²) TFA (mm ²)	ФДПА (мм ²) FDPA (mm ²)	ФФ (мм ²) EF(mm ²)	ВЛЭС (мин) ECLT (min)	ТАП (мм ²) TPA (mm ²)	АП (мм ²) PA (mm ²)	АЧТВ (с) APTT (sec)	АТ (индекс) РА (index)
ВКД (контроль) $n = 15$ HCD (control)	22.8 ± 1.3 (100%)	14.1 ± 0.9 (100%)	8.6 ± 0.7 (100%)	101.4 ± 13.5 (100%)	50.9 ± 13.3 (100%)	24.3 ± 4.5 (100%)	29.3 ± 1.8 (100%)	1.3 ± 0.1 (100%)
ВКД + хитозан (опыт) $n = 15$ HCD + chitosan (experiment)	19.7 ± 1.1 (87%)	12.8 ± 0.2 (90%)	7.1 ± 0.7 (83%)	63.8 ± 5.8 (63%)*	52.6 ± 6.5 (103%)	3.0 ± 1.06 (12%)**	36.3 ± 1.6 (124%)	1.33 ± 0.1 (102%)
Норма (здоровые крысы) $n = 15$ Norma (healthy rats)	33.0 ± 0.5 (144%)**	20.6 ± 0.9 (146%)**	11.3 ± 0.5 (135%)**	68.3 ± 5.8 (67%)*	72.3 ± 15.3 (142%)**	21.7 ± 2.9 (89%)	35.3 ± 3.1 (120%)*	1.2 ± 0.1 (92%)

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ по сравнению с группой ВКД (контроль). ВКД – высококалорийная диета, СФА – суммарная фибринолитическая активность, ФДПА – фибриндеполимеризационная активность, ФФ – ферментативная фибринолитическая активность, ВЛЭС – время лизиса эуглобулинового сгустка, ТАП – активность тканевого активатора плазминогена, АП – активность плазмينا, АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, АТ – агрегация тромбоцитов, n – количество животных в группе. **Note.** Here and in Table. 2: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ compared to the HCD group (control). HCD is a high-calorie diet, TFA – total fibrinolytic activity, FDPA – fibrin-depolymerization activity, EF – enzymatic fibrinolytic activity, ECLT – euglobulin clot lysis time, TPA – tissue plasminogen activator activity, PA – plasmin activity, APTT – activated partial thromboplastin time, PA – platelet aggregation, n – number of animals in the group.

Таблица 2

Параметры гемостаза через 7 суток после отмены перорального введения хитозана (в ежедневной дозе 100 мкг/кг массы тела) крысам с нарушениями жирового обмена, (M ± m)

Hemostasis parameters 7 days after discontinuation of oral chitosan administration (at a daily dose of 100 mcg/kg body weight) to rats with impaired fat metabolism, (M ± m)

Условия опыта Experience conditions	СФА (мм ²) TFA (mm ²)	ФДПА (мм ²) FDPA (mm ²)	ФФ (мм ²) EF(mm ²)	ВЛЭС (мин) ECLT (min)	ТАП (мм ²) TPA (mm ²)	АП (мм ²) PA (mm ²)	АЧТВ (с) APTT (sec)	АТ (индекс) РА (index)
ВКД (контроль) n = 15 HCD (control)	23.7 ± 1.1 (100%)	16.0 ± 1.0 (100%)	8.7 ± 0.8 (100%)	56.7 ± 9.3 (100%)	54.2 ± 7.0 (100%)	6.3 ± 1.0 (100%)	23.9 ± 0.5 (100%)	2.1 ± 0.2 (100%)
ВКД + хитозан (опыт) n = 15 HCD + chitosan (experiment)	25.8 ± 0.8 (104%)	17.0 ± 0.2 (106%)	8.6 ± 0.5 (99%)	50.0 ± 3.5 (88%)	41.8 ± 3.9 (77%)	35.3 ± 5.2 (565%)**	30.8 ± 2.4 (129%)**	1.8 ± 0.1 (86%)
Норма (здоровые крысы) n = 15 Norma (healthy rats)	33.0 ± 0.9 (140%)**	22.6 ± 0.5 (141%)**	10.6 ± 0.5 (122%)*	71.3 ± 1.2 (126%)*	69.0 ± 3.6 (127%)*	18.6 ± 2.3 (295%)**	21.5 ± 0.5 (105%)	1.6 ± 0.3 (76%)*

Согласно данным литературы хитозан является эффективным индуктором адгезии и агрегации тромбоцитов и механизмы его агрегационного действия с мобилизацией Ca⁽²⁺⁾ и активацией интегринов IIb/IIIa на поверхностях мембран тромбоцитов, причем эти эффекты зависят от используемых доз [12]. Возможно, полученные нами данные по влиянию хитозана на первичный гемостаз объясняются выбранными нами дозами препарата, что требует в дальнейшем изучения дозозависимости эффектов хитозана.

Таким образом, на основании проведенного исследования следует, что хитозан при непосредственном попадании в кровоток создает в организме крыс с метаболическими нарушениями коагулянтный фон как за счет выявленного нами взаимодействия с фибриногеном и фибрином путем усиления степени фибринполимеризационных процессов, так и вследствие значительного снижения фибринолитического потенциала крови. Продемонстрированные нами разнонаправленные эффекты хитозана (снижение фибринолиза при одновременном повышении АЧТВ и неизменной агрегации тромбоцитов) в условиях гемостатической дисфункции организма обеспечивают его защитную реакцию в ответ на кровоостанавливающие свойства хитозана.

Выводы:

1. Установлена способность хитозана проявлять в крови крыс с метаболическими нарушениями одновременное значительное снижение активности плаз-

мина и суммарной фибринолитической активности, обусловленной ферментативным и неферментативным фибринолизом.

2. Показано участие хитозана в процессах усиления полимеризации фибрина в присутствии ингибиторов ферментативного фибринолиза в крови крыс с нарушениями жирового обмена, вызванными высококалорийной диетой.

3. Установлено сохранение свертывающих свойств хитозана через 7 сут после отмены его применения, что свидетельствует о долговременном действии исследованного препарата на процессы свертывания крови в условиях гемостатической дисфункции организма, обусловленной метаболическими изменениями в жировом обмене.

4. У животных с метаболическими нарушениями выявлены разнонаправленные изменения в системе гемостаза (снижение фибринолиза и активности плазмина в присутствии ингибиторов фибринолиза при одновременном повышении АЧТВ и неизменной агрегации тромбоцитов), что свидетельствует о защитной реакции организма в ответ на кровоостанавливающие свойства хитозана.

Литература

(п.п. 1; 3; 4; 6; 10; 11 см. References)

2. Варламов В.П., Ильина А.В., Шагдарова Б.Ц., Луньков А.П., Мысякин И.С. Хитин/хитозан и его производные: фундаментальные и прикладные аспекты. *Успехи биологической химии*. 2020; 60: 317-68.

5. Камская В.Е. Хитозан: структура, свойства и использование. *Биол. науки*. 2016; 6: 36-42.
7. Киваева И.Ф., Головачева В.Д., Яцкова М.А., Добряков Е.Ю., Крыжановский С.П., Музалева О.Ю. и др. *Биологически активная добавка «Хитозан приморский» в комплексной терапии язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки (методические рекомендации)*. Владивосток; 2008.
8. Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е. Исследование параметров гемостаза, липидного и углеводного обмена у крыс с модифицированной моделью экспериментального метаболического синдрома. *Современные технологии в медицине*. 2016; 8(4): 303-5.
9. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. М.; Аванс-ед Солюшнз; 2012.
12. Кузник Б.И. *Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии*. Чита; Экспресс издательство; 2010.
5. Kamskaya V.E. Chitosan: structure, properties and use. *Biologicheskie nauki*. 2016; 6: 36-42. (In Russian)
6. Lestari W., Yusry W., Haris M.S., Jaswir I., Idrus E. A glimpse on the function of chitosan as a dental hemostatic agent. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 2020; 56(1): 147-54. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2020.09.001>
7. Kivaeva I.F., Golovacheva V.D., Yatskova M.A., Dobryakov E.Yu., Kryzhanovsky S.P., Muzaleva O.Yu., et al. *Biologically active additive "Chitosan primorskiy" in the complex therapy of peptic ulcer of the stomach and duodenum (guidelines)*. [*Biologicheski aktivnaya dobavka "Hitozan primorskiy" v kompleksnoy terapii yazvennoy bolezni zheludka i dvenadtsatiperstnoy kishki (metodicheskie rekomendatsii)*]. Vladivostok; 2008. (In Russian)
8. Obergan T.Y., Grigorjeva M.E. Evaluation of hemostasis, lipid and carbohydrate metabolism parameters in rats with modified model of experimental metabolic syndrome. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2016; 8(4): 303-5. (In Russian)
9. Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A. *Theoretical and practical issues of studying the functional state of the blood anticoagulation system*. [*Teoreticheskie i prakticheskie voprosy izucheniya funktsional'nogo sostoyaniya protivosvertvyayushchey sistemy krovi*]. Moscow; Advanced Solutions; 2012. (In Russian)
10. Torres A.L., Santos S.G., Oliveira M.I., Barbosa M.A. Fibrinogen promotes resorption of chitosan by human osteoclasts. *Acta Biomater.* 2013; 9(5): 6553-62. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.01.015>
11. Zhang W., Zhong D., Liu Q., Zhang Y., Li N., Wang Q., et al. Effect of chitosan and carboxymethyl chitosan on fibrinogen structure and blood coagulation. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2013; 24(13): 1549-63. <https://doi.org/10.1080/09205063.2013.777229>
12. Kuznik B.I. *Cellular and molecular mechanisms of hemostatic system regulation in norm and pathology*. [*Kletochnye i molekulyarnye mekhanizmy regulyatsii sistemy gemostaza v norme i patologii*]. Chita; Express publishing; 2010. (In Russian)

References

1. Hu Z., Lu S., Cheng Y., Kong S., Li S., Li C., et al. Investigation of the effects of molecular parameters on the hemostatic properties of chitosan. *Molecules*. 2018; 23(12): 3147. <https://doi.org/10.3390/molecules23123147>. PMID: 30513622
2. Varlamov V.P., Pyina A.V., Shagdarova B.Ts., Lunkov A.P., Mysyakin I.S. Chitin/Chitosan and its derivatives: fundamental and applied aspects. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2020; 60: 317-68. (In Russian)
3. Laidmäe I., Ērglis K., Cēbers A., Janmey P.A., Uibo R. Salmon fibrinogen and chitosan scaffold for tissue engineering: in vitro and in vivo evaluation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2018; 29(12): 182. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6192-8>
4. Cassano M., Di Gioia M.L., Mellace S., Picci N., Trombino S. Hemostatic gauze based on chitosan and hydroquinone: preparation, characterization and blood coagulation evaluation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2017; 28(12): 190. <https://doi.org/10.1007/s10856-017-6000-x>

Сведения об авторах:

Григорьева Марина Евгеньевна, вед. науч. сотр., канд. биол. наук, лаб. защитных систем крови им. проф.

Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, e-mail: mgrigorjeva@mail.ru;

Оберган Тамара Юрьевна, ст. науч. сотр., канд. биол. наук, лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, e-mail: tobergan@mail.ru;

Ляпина Людмила Анисимовна, проф., доктор биол. наук, гл. науч. сотр., зав. лаб. защитных систем крови им.

проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, e-mail: lyapinal@mail.ru;

Шубина Татьяна Александровна, ст. науч. сотр., канд. биол. наук, лаб. защитных систем крови им. проф.

Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, e-mail: shubina.74@mail.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-002-008.953-092

Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И.

Новые возможности диагностики и исследования патогенеза различных видов воспаления

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1

Нейтрофильные экстраклеточные ловушки (НЭЛ) возникают в результате высвобождения гранулярного и ядерного содержимого нейтрофилов во внеклеточное пространство в ответ на различные классы микроорганизмов, растворимые факторы и собственные модифицированные антигены организма. Во многих исследованиях продемонстрировано, что образование НЭЛ является эффективным механизмом борьбы с внедряющимися микроорганизмами, поскольку недостаточность формирования НЭЛ или гидролиз основной нуклеотидной цепи НЭЛ бактериальными ДНКазами делает организм человека восприимчивым к инфекциям. Основная роль НЭЛ – предотвращение распространения микроорганизмов в организме. Принято считать, что образование нейтрофильных экстраклеточных ловушек должно строго регулироваться, чтобы избежать повреждения тканей и избыточной гемокоагуляции. **Цель исследования** – морфологическая характеристика основных типов структур нейтрофильных экстраклеточных ловушек в зависимости от вида воспалительного процесса.

Методика. В исследование были включены 18 больных с различными видами воспаления (абсцесс брюшной полости, аппендицит, панкреонекроз, калькулезный холецистит) в острый период заболевания с высокими показателями лейкоцитоза (10-12 тыс/мкл). Для визуализации и подсчета нейтрофильных экстраклеточных ловушек использовали метод флуоресцентной микроскопии. Окрашивание НЭЛ проводили с помощью флуоресцентного красителя для двухцепочечной ДНК SYBR Green (Evrogen).

Результаты. Показано, что при благоприятном течении острого инфекционного процесса нейтрофилы выбрасывают одну или несколько нитей с ДНК, которые затем ветвятся и формируют структуру сети. В дальнейшем происходит ретракция волокон сети с захватом микроорганизмов. При постнекротическом воспалении сеть не формируется, а вместо неё возникает вуалеобразная структура, состоящая из тонких нитей с ДНК. Асептическое воспаление характеризуется особой морфологической формой – нитевидной. Нейтрофил, при этом виде воспаления, выбрасывает значительной длины одиночную нить с ДНК.

Заключение. Предложенный нами метод визуализации нативных нейтрофильных экстраклеточных ловушек показал высокую диагностическую эффективность. Он позволяет выявлять различия в структурах нейтрофильных экстраклеточных ловушек при разных типах воспаления.

Ключевые слова: нейтрофильные экстраклеточные ловушки; инфекционное воспаление; некротическое воспаление; асептическое воспаление; патогенез

Для цитирования: Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Панина М.И. Новые возможности диагностики и исследования патогенеза различных видов воспаления. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(2): 34-42.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.34-42

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Порядин Г.В.; сбор и обработка материала, подготовка иллюстративного материала, написание текста – Казимирский А.Н.; статистическая обработка материала – Панина М.И.; редактирование – Салмаси Ж.М. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Казимирский Александр Николаевич, alnica10@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 31.01.2022

Принята к печати 31.03.2022

Опубликована 27.05.2022

Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I.

New opportunities for diagnosis and investigation of the pathogenesis of various types of inflammation

N.I. Pirogov Russian National Research Medical University,
Ostrovityanova St. 1, Moscow, 117997, Russian Federation

Neutrophil extracellular traps (NETs) arise as a result of the release of granular and nuclear contents of neutrophils into the extracellular space in response to various classes of microorganisms, soluble factors and own modified antigens. Many studies have demonstrated that the formation of NETs is an effective mechanism for combating invading microorganisms, since insufficient release of NETs or hydrolysis of the main nucleotide chain of NET by bacterial DNases increases susceptibility to infections. The main role of NET is to prevent the spread of microorganisms. It is generally believed that the formation of NETs should be strictly regulated to avoid tissue damage and excessive hemocoagulation.

The aim of the study was to identify the main morphological structures of NETs depending on the type of inflammatory process.

Methods. The study included 18 patients with various types of inflammation (abdominal abscess, appendicitis, pancreatic necrosis, calculous cholecystitis) in the acute period of the disease with high rates of leukocytosis ($10-12 \cdot 10^3/\mu\text{l}$). NETs were stained with a fluorescent dye for double-stranded DNA, SYBR Green (Evrogen), and visualized and counted using fluorescence microscopy.

Results. The study showed that, with a benign course of an acute infectious process, neutrophils emit one or more DNA strands, which then branch and form the network structure. In the future, the fibers of the network retract, capturing microorganisms. With necrotic inflammation, the network is not formed, but instead a veil-like structure consisting of thin strands of DNA appears. Aseptic inflammation is characterized by a special morphological form, i.e., a threadlike form. Neutrophils, with this type of inflammation, emit a single strand with DNA of considerable length.

Conclusion. Thus, our proposed method of visualization of native NETs has shown high efficiency. It allowed us to identify different structures of NETs in various types of inflammation (infectious, necrotic and aseptic), which seems relevant and opens up a new direction in pathophysiology of inflammation.

Keywords: neutrophil extracellular traps; infectious inflammation; necrotic inflammation; aseptic inflammation; pathogenesis

For citation: Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Panina M.I. New opportunities for diagnosis and investigation of the pathogenesis of various types of inflammation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(2): 34-42. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.34-42

Author's contribution: research concept and design of the study – Poryadin G.V.; collection and processing of material, preparation of illustrative material, writing the text – Kazimirskii A.N.; statistical processing of the material – Panina M.I.; editing – Salmasi J.M. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

For correspondence: Alexander N. Kazimirskii, Doctor of Biological Sciences, Associate Prof., Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation, e-mail: alnica10@mail.ru

Information about the authors:

Kazimirskii A.N., <https://orcid.org/0000-0002-3079-4089>

Salmasi J.M., <https://orcid.org/0000-0001-8524-0019>

Poryadin G.V., <https://orcid.org/0000-0003-2010-3296>

Panina M.I., <https://orcid.org/0000-0002-7651-0037>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 31.03.2022

Accepted 31.03.2022.

Published 27.05.2022

Введение

Нейтрофильные экстраклеточные ловушки (НЭЛ) – форма реагирования активированных нейтрофилов на контактные взаимодействия с патогенами и клетками, находящимися в состоянии апоптоза. НЭЛ формируются в результате освобождения гранулярного и ядерного содержимого нейтрофилов во внеклеточное пространство в ответ на различные классы

микроорганизмов, растворимые факторы и собственные модифицированные антигены организма. НЭЛ состоят из деконденсированных волокон хроматина, покрытых антимикробными гранулярными и цитоплазматическими белками, такими как миелопероксидаза, эластаза нейтрофилов (NE) и α -дефенсина. Центральным внутриклеточным событием образова-

ния НЭЛ является удаление гистонов пептидиларгининдезаминазой 4 (PAD4) [1, 2]. Во многих исследованиях продемонстрировано, что образование НЭЛ является эффективным механизмом борьбы с вторгающимися микроорганизмами, поскольку недостаточность высвобождения НЭЛ или гидролиз основной нуклеотидной цепи НЭЛ бактериальными ДНКазами делает организм человека восприимчивым к инфекциям. Основная роль НЭЛ – предотвращение распространения микроорганизмов в организме. Избыток образования НЭЛ имеет и обратную сторону. Патогенная роль избыточного образования НЭЛ была описана для многих воспалительных заболеваний человека, как инфекционного, так и неинфекционного происхождения. Негативный эффект чрезмерного образования НЭЛ особенно важен при заболеваниях легких, поскольку НЭЛ могут легче формироваться в легочных альвеолах, вызывая повреждение. Более того, НЭЛ и связанные с ними молекулы способны напрямую вызывать гибель эпителиальных и эндотелиальных клеток. Массивное образование НЭЛ было зарегистрировано при целом ряде легочных заболеваний, включая бронхиальную астму, хроническую обструктивную болезнь легких, муковисцидоз, респираторно-синцитиальный вирусный бронхолит, грипп, бактериальную пневмонию и туберкулез. В настоящее время общепринятым считается мнение о том, что образование нейтрофильных экстраклеточных ловушек должно строго регулироваться, чтобы избежать повреждения тканей и избыточной гемокоагуляции [1].

Однако обследование больных с воспалительными заболеваниями различного генеза показывают, что помимо изменений общей численности нейтрофильных экстраклеточных ловушек, существенно изменяется и их морфологическая структура. Эти наблюдения заставили углубленно подойти к корректной оценке численности НЭЛ и потребовали разработки метода, позволяющего визуализировать и регистрировать нативные нейтрофильные экстраклеточные ловушки.

Цель исследования – выявление и характеристика основных морфологических типов нейтрофильных экстраклеточных ловушек при воспалении.

Методика

Больные. В работе использовали периферическую кровь 18 больных, все исследования выполнялись по международным правилам работы с биоматериалом людей. Все больные находились на лечении в хирургическом отделении 31 ГКБ г. Москвы с воспалительными заболеваниями (абсцесс брюшной полости, аппендицит, панкреонекроз, калькулезный холеци-

стит). В исследование включались пациенты в острый период заболевания с высокими показателями лейкоцитоза (10–12 тыс/мкл). Все процедуры выполнялись в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного информированного согласия всех пациентов. Работа одобрена этическим комитетом университета.

Препараты. Для модулирования формирования нейтрофильных экстраклеточных ловушек использовали микробную культуру *Klebsiella pneumoniae*, Sigma (LPS) в конечной концентрации 50 мкг/мл при культивировании с нейтрофилами 3 здоровых доноров.

Получение клеточных фракций. В исследовании использовали клеточные фракции нейтрофилов. Венозную кровь (10 мл) больных для предотвращения свертывания помещали в силиконизированную пробирку с ЭДТА. Для выделения нейтрофилов кровь разводили в 2 раза натрий-фосфатным буферным раствором (рН 7,4) и наслаивали на двойной градиент плотности стерильных растворов фикола-верографина. Плотность верхнего слоя градиента составляет 1,077, нижнего – 1,190. После центрифугирования (1600 об/мин, 30 мин) на границе между градиентами появляется кольцо гранулоцитов с чистотой 98–100%, эритроциты при этом осаждаются на дно пробирки. Кольцо нейтрофильных гранулоцитов отбирали, переносили в пробирки для центрифугирования, дважды отмывали от примесей фикола буферным раствором, используя центрифугирование для осаждения клеток (1200 об/мин, 15 мин). Стерильно выделенные нейтрофилы переносили в среду RPMI-1640 и использовали в экспериментах по культивированию. Жизнеспособность выделенных нейтрофилов (тест с 0,1% раствором трипанового синего) составляла не менее 90%.

Культивирование клеток крови с LPS. К стерильно выделенным нейтрофилам добавляли LPS и проводили инкубацию с клетками в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. В пробе (объем 200 мкл), приготовленной на среде RPMI-1640, содержались нейтрофилы и препарат LPS. Конечная концентрация клеток в среде культивирования составляла 2*10⁵ клеток/мл.

Иммунофлуоресцентное окрашивание нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Для обнаружения и подсчета нейтрофильных экстраклеточных ловушек использовали флуоресцентную микроскопию. Для этого нейтрофилы после окончания инкубации помещали в лунки на предметном стекле, образованные наплавлением пленки Parafilm (Sigma) на стекло. Диаметр лунки 5 мм. Стекло в лунках предварительно обрабатывали 0,1% поли-L-лизинном для увеличения адгезии

клеток. Затем в каждую лунку вносили 10 мкл суспензии нейтрофилов. Для адгезирования нейтрофилов предметные стекла с нанесенной суспензией нейтрофилов помещали во влажную камеру и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. После окончания процедуры адгезии в лунки добавляли 10 мкл флуоресцентного красителя SYBR Green (Evrogen) и выдерживали окрашенные пробы в течение 10 мин в темноте при 37 °С. Для удаления излишков красителя предметные стекла с адгезированными нейтрофилами промывали в натрий фосфатном буферном растворе в течение 2 мин и микроскопировали под иммерсией. Среди 100 нейтрофилов подсчитывали количество НЭЛ. Результаты выражали в процентах как отношение количества НЭЛ к общему количеству нейтрофилов.

Статистическая обработка. Статистическую обработку полученных результатов проводили при большой выборке с помощью критерия t Стьюдента, при малой выборке с ненормальным распределением, а также при сравнении попарно связанных вариант – с при-

менением непараметрических критериев Вилкоксона и Манна–Уитни

Результаты и обсуждение

В исследовании проводили определение количества НЭЛ у больных с различными видами воспаления, а также анализировали результаты экспериментов по формированию НЭЛ нейтрофилами здоровых доноров под влиянием LPS (*Klebsiella pneumoniae*). Данные представлены на **рис. 1** и в **таблице**.

Полученные результаты демонстрируют способность LPS активировать нейтрофилы, очевидно, действуя через TLR-рецепторы (рецепторы врожденного иммунитета), и индуцировать формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Морфология LPS-индуцированных НЭЛ во всех экспериментах имела характерную сетевидную форму.

В следующем разделе работы изучали морфологические варианты нейтрофильных экстраклеточных ловушек у больных. Было выявлено несколько типов

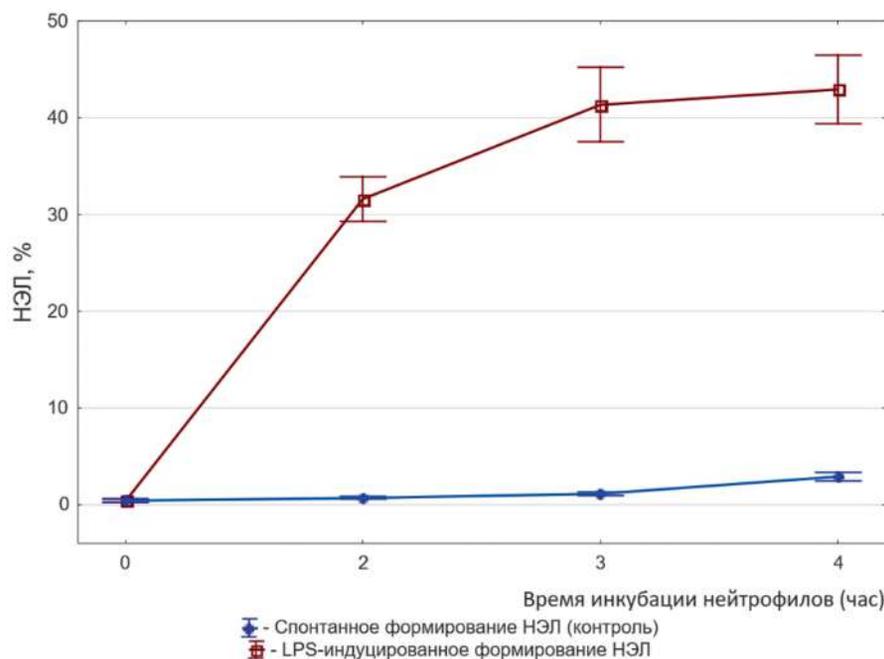


Рис. 1. Спонтанное и LPS-индуцированное формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ) в условиях инкубации с нейтрофилами здоровых доноров под влиянием LPS (*Klebsiella pneumoniae*, Sigma).

По горизонтальной оси – время инкубации LPS с нейтрофилами (ч), по вертикальной оси – количество нейтрофильных экстраклеточных ловушек в %.

Fig. 1. Spontaneous and LPS-induced formation of neutrophil extracellular traps (NELs) under conditions of incubation with neutrophils of healthy donors under the influence of LPS (*Klebsiella pneumoniae*, Sigma).

The horizontal axis – the incubation time of LPS with neutrophils (h), the vertical axis – the number of neutrophil extracellular traps in %.

морфологически различающихся структур в зависимости от характера воспалительного процесса. Этапы формирования нейтрофильных экстраклеточных ловушек при благоприятном течении острого инфекционного воспалительного процесса приведены на рисунках 2–5.

Начальные этапы формирования НЭЛ состоят в выбросе одной или нескольких нитей (чаще всего двух) с двухцепочечной ДНК, которые вытягиваются на значительное расстояние в несколько клеточных диаметров (рис. 2).

Дальнейшие наблюдения показывают, что при формировании нейтрофильных экстраклеточных ловушек наблюдается определенная этапность процесса

(рис. 3, 4). На следующем этапе происходит утолщение волокон с ДНК, которое вызвано скольжением новых волокон с ДНК вдоль первоначально образованных.

При достижении определенной толщины волокна происходит его ветвление (рис. 4). Затем на следующем этапе волокна нейтрофильной ловушки пересекаются, взаимодействуют между собой, формируют сеть и захватывают патогены или остатки апоптозирующих клеток.

На последнем этапе формирования нейтрофильных экстраклеточных ловушек развивается ретракция волокон с ДНК, и патогены или гибнущие клетки организма прочно удерживаются структурой сети (рис. 5, 6).

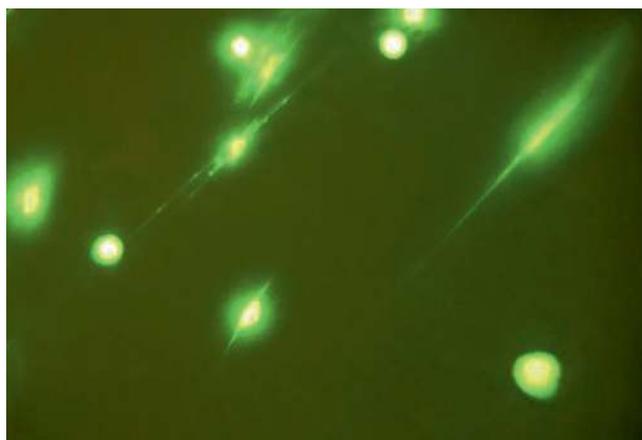


Рис. 2. Ранняя стадия формирования нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Выброс нитей с ДНК из клеточного ядра. Время инкубации 1 ч. Инфекционное воспаление.

Fig. 2. The early stage of the formation of neutrophil extracellular traps. Release of DNA strands from the cell nucleus. Incubation time 1 h. Infectious inflammation.

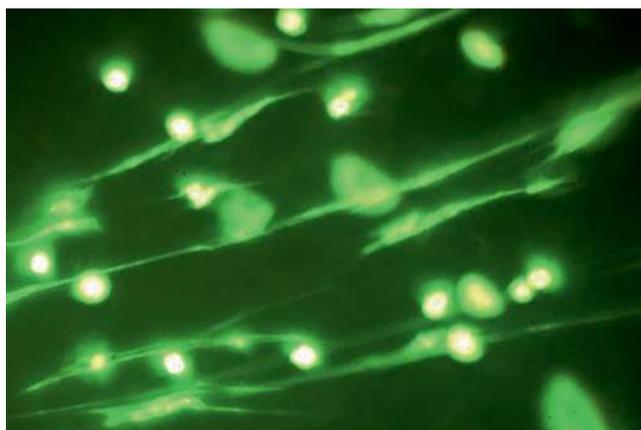


Рис. 3. Продолжение формирования нейтрофильных экстраклеточных ловушек.

Время инкубации 2 ч. Инфекционное воспаление.

Fig. 3. Continued formation of neutrophil extracellular traps. Incubation time 2 h. Infectious inflammation.

Таблица / Table

Формирование НЭЛ в условиях инкубации с нейтрофилами здоровых доноров
NEL formation under incubation conditions with neutrophils from healthy donors

НЭЛ, % (NET, %)	Время инкубации нейтрофилов (ч) Neutrophil incubation time (h)			
	0	2	3	4
Спонтанное формирование НЭЛ, контроль Spontaneous formation of NET (control)	0,41±0,17	0,74±0,12	1,14±0,20	2,93±0,45
LPS-индуцированное формирование НЭЛ LPS-induced formation NET	0,41±0,17	31,59±2,32*	41,38±3,83*	42,93±3,56*

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; НЭЛ – нейтрофильные экстраклеточные ловушки.

Note. * $p < 0.05$ compared to the control; NET – neutrophils extracellular traps.

Рис. 2–6 отражают один процесс — раскрытие нейтрофильных экстраклеточных ловушек в организме больного, успешно преодолевающего инфекцию (благоприятное течение воспалительного процесса).

Неинфекционный (постнекротический) воспалительный процесс в организме больных (например, панкреонекроз) сопровождается совершенно иной морфологией ловушек (**рис. 7**).

Как видно из данных, представленных на рисунке **7 a, b, c** неинфекционный (постнекротический) воспалительный процесс характеризуется значительными нарушениями структуры нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Структура сети из волокон с ДНК при этом не образуется. Такие морфологические образования, очевидно, не способны захватывать гибну-

щие клетки и патогены с их последующим фагоцитозом. Необходимо отметить, что исследования морфологии нейтрофильных экстраклеточных ловушек при заболеваниях у людей практически отсутствуют. Не определялась также связь между видом воспалительного процесса и морфологией нейтрофильных ловушек.

Большинство исследований выполнено на нейтрофилах здоровых доноров при стимуляции клеток ФМА [3, 4], и в доступной для изучения литературе нет указаний на то, что морфология нейтрофильных экстраклеточных ловушек определяется видом воспаления.

В рамках настоящего исследования была проанализирована морфология нейтрофильных экстраклеточных ловушек при асептическом воспалении.

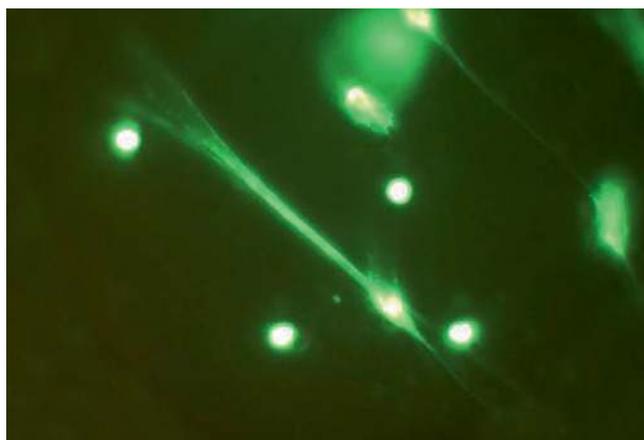


Рис. 4. Начало ветвления волокна нейтрофильной экстраклеточной ловушки.

Fig. 4. Initiation of branching of the neutrophil extracellular trap fiber.

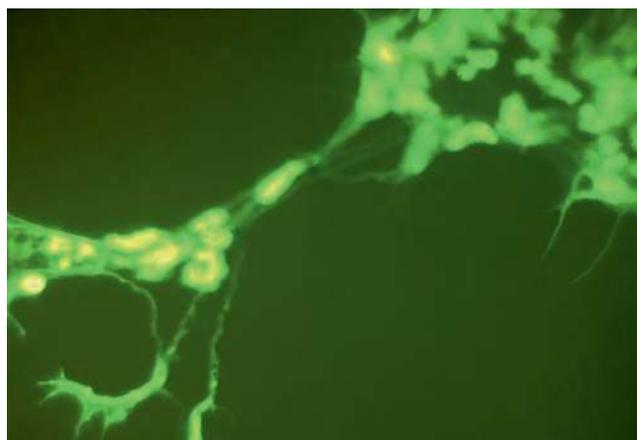


Рис. 5. Инфекционное воспаление (4 ч). Стадия ретракции нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Укорочение нитей ДНК вместе с захваченными ловушкой другими клетками.

Fig. 5. Infectious inflammation (4 h.). Retraction stage of neutrophil extracellular traps. Shortening of DNA strands together with other cells trapped by the trap.

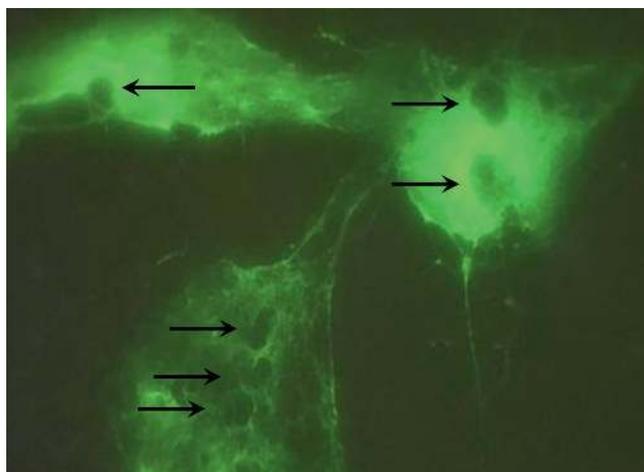


Рис. 6. Инфекционное воспаление (4 ч). Инкубация активированных нейтрофилов с *Staphylococcus Aureus*. Иллюстрация функционального теста на захватывающую способность нейтрофильными ловушками патогенов. Стадия ретракции нейтрофильных экстраклеточных ловушек вместе с захваченными ловушкой бактериями (отмечены стрелками).

Fig. 6. Infectious inflammation (4 hours). Incubation of activated neutrophils with *Staphylococcus Aureus*. Illustration of a functional test for neutrophil trapping capacity of pathogens. Retraction stage of neutrophil extracellular traps along with trapped bacteria (marked by arrows).

Асептический воспалительный процесс (больные с калькулёзным холециститом) также характеризуется значительными изменениями в морфологии НЭЛ. Эта форма воспаления приводит к формированию нейтрофильных экстраклеточных ловушек в виде **одиночных** волокон с ДНК, которые, видимо, не способны захватывать гибнущие клетки и не способны к ретракции с последующим фагоцитозом (**рис. 8, 9**).

Представленные результаты (**рис. 8, 9**) показывают, что асептический воспалительный процесс характеризуется особой нитевидной формой НЭЛ, и обнаружение таких структур перспективно в плане диагностики и лучшего понимания патогенеза.

Обсуждение

Актуальность проведенного исследования определяется ролью нейтрофильных экстраклеточных ловушек в организме человека. С их помощью реализуется важная противовирусная и антибактериальная

функция защитных систем организма [5–10]. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки являются факторами сопряжения врожденного и адаптивного иммунитета, благодаря секреции аргиназы в межклеточное пространство [7–10], подавляющей адаптивный иммунитет на ранних этапах воспаления. Правильная, последовательная активация двух частей иммунной системы при контакте организма человека с патогеном дает возможность сформировать адекватный иммунный ответ. А нарушение этапов активации иммунной системы вызывает ослабление синтеза противомикробных иммуноглобулинов, создает условия для тканевого повреждения и гемокоагуляции [7]. Избыточную реактивность нейтрофилов в отношении раскрытия нейтрофильных экстраклеточных ловушек необходимо не только ограничивать, но и разрабатывать.

Таким образом, исследование различных видов воспаления выявило выраженное нарушение структуры нейтрофильных ловушек. Сетевидная форма, способ-

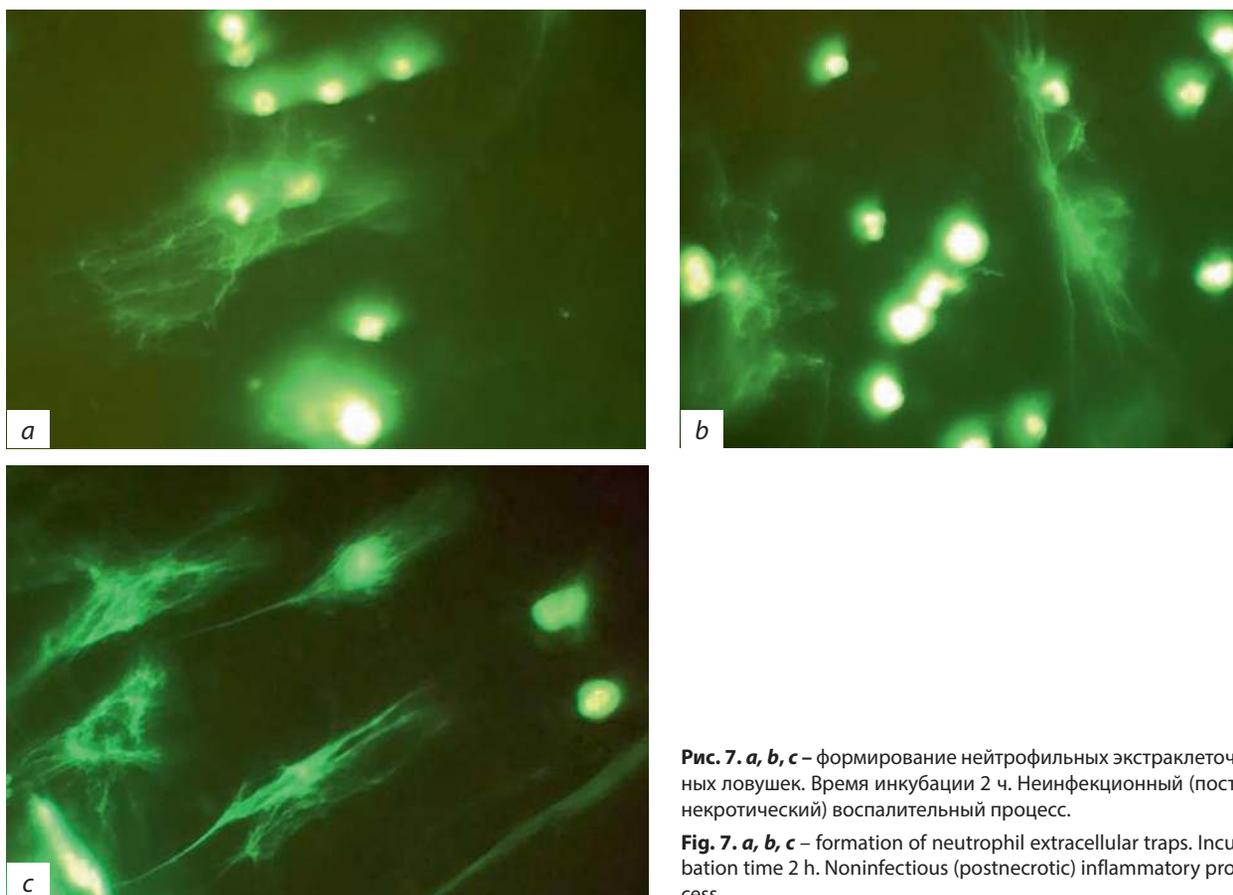


Рис. 7. a, b, c – формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Время инкубации 2 ч. Неинфекционный (постнекротический) воспалительный процесс.
Fig. 7. a, b, c – formation of neutrophil extracellular traps. Incubation time 2 h. Noninfectious (postnecrotic) inflammatory process.

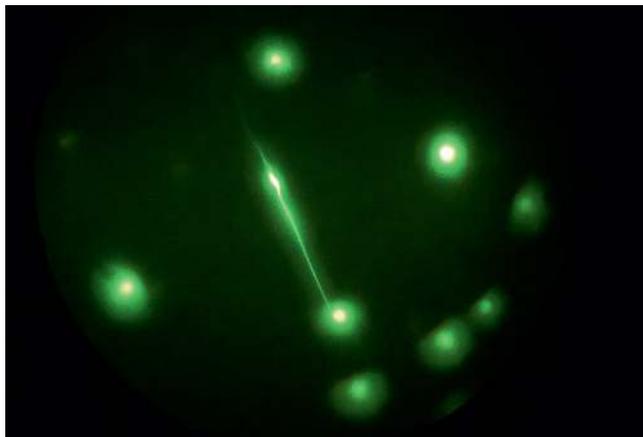


Рис. 8. Нитевидная форма нейтрофильных экстраклеточных ловушек у больных с асептическим воспалением (калькулезный холецистит).

Fig. 8. Thread-shaped neutrophilic extracellular traps in patients with aseptic inflammation (calculous cholecystitis).



Рис. 9. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки у больных с асептическим воспалением (калькулезный холецистит) в нитевидной форме.

Fig. 9. Neutrophil extracellular traps in patients with aseptic inflammation (calculous cholecystitis) in filamentous form.

ная к захвату патогенов и погибающих клеток организма, выявлена нами при остром воспалительном процессе с благоприятным течением. Способность такой структуры к ретракции важна в отношении последующего фагоцитоза моноцитами/макрофагами, развивающимися впоследствии процессы антигенной презентации.

Нейтрофильные экстраклеточные ловушки в виде неорганизованного пучка тонких нитей с ДНК обнаружены нами у больных с некротическими процессами в организме. Можно обоснованно предположить, что в дальнейшем эти тонкие нити будут испытывать ферментативную деградацию за счет ДНК-аз, локализованных на самом хроматине, которые активируются при снижении степени спирализации хроматина. Процесс ферментативного гидролиза нитей с ДНК приводит к образованию большого количества нуклеотидов во внеклеточном пространстве. Ферменты деградации нуклеотидов CD39 и CD73 могут высвобождать азотистые основания, которые, обладая выраженной липофильностью, способны присоединяться к поверхности клеток и дополнительно индуцировать повреждения, то есть являться факторами вторичной алтерации. Поэтому перспективной и актуальной задачей является поиск средств коррекции нарушенной морфологии нейтрофильных экстраклеточных ловушек. В настоящее время эта задача тем более актуальна, так как, по-видимому, этот механизм присутствует в патогенезе нового, недавно выявленного постковидного синдрома.

Нейтрофильные экстраклеточные ловушки у больных с асептическим воспалением представлены в ви-

де одиночных нитей с ДНК и по своей морфологии значительно отличаются от таковых при благоприятном развитии инфекционного воспалительного процесса. Можно обоснованно предполагать, что в случае асептического воспаления возможна индукция дополнительного тканевого повреждения за счет токсического действия внеклеточных азотистых оснований.

Заключение

В настоящем исследовании предложен новый метод визуализации нейтрофильных экстраклеточных ловушек, позволяющий наблюдать динамику процесса. Предложенный метод визуализации нативных нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ) показал высокую эффективность. Он позволил выявить различную структуру нейтрофильных экстраклеточных ловушек при различных видах воспаления (инфекционном, постнекротическом и асептическом), что представляется актуальным и открывающим новое направление патофизиологии воспаления.

Литература

(п.п. 1; 2; 9 см. References)

3. Воробьева Н.В., Пинегин Б.В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, роль в норме и при патологии. *Биохимия*. 2014; 79(12): 1580-91.
4. Пинегин Б.В., Дагиль Ю.А., Воробьева Н.В., Пашенков М.В. Влияние азоксимера бромиды на формирование внеклеточных нейтрофильных ловушек. *РМЖ*. 2019; 1(II): 42–6.
5. Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н. Механизм действия бензидамина на локальное инфекционное воспаление. *Фарматека*. 2018; 13(366): 76-83.

6. Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Антонова Е.А., Порядин Г.В. Влияние препаратов местной антимикробной терапии на свойства клеток врожденного и адаптивного иммунитета. *Медицинский совет*. 2019; 8: 76-82. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-8-76-82>
7. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В. Антивирусная система врожденного иммунитета: патогенез и лечение Covid-19. *Вестник РГМУ*. 2020; 5: 5-14. <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2020.000>
8. Казимирский А.Н., Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Семенова Л.Ю. Эндogenous регуляторы иммунной системы (sCD100, малоновый диальдегид, аргиназа). *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 164(11): 652-60. <https://doi.org/10.24075/brsmu.2020.054>
10. Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки — регуляторы формирования врожденного и адаптивного иммунитета. *РМЖ. Медицинское обозрение*. 2020; 1:3 8-41. <https://doi.org/10.32364/2587-6821-2020-4-1-38-41>
3. Vorobjeva N.V., Pinegin B.V. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease. *Biochemistry (Moscow)*. 2014; 79(12): 1286-96.
4. Pinegin B.V., Dagil Yu.A., Vorobieva N.V., Pashchenkov M.V. Azoximer bromide effect on the neutrophil extracellular traps formation. *RMJ*. 2019; 1(II): 42–6. (in Russian)
5. Poryadin G.V., Salmasi J.M., Kazimirskii A.N. Mechanism of benzidamine action on local infectious inflammation. *Farmateka*. 2018; 13(366): 76-83. (in Russian)
6. Salmasi J.M., Kazimirskiy A.N., Antonova E.A., Poryadin G.V. Evaluation of influence several drugs with local antimicrobial activity against local immunity cells. *Meditinskiy sovet*. 2019; (8): 76-82. (in Russian). <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-8-76-82>
7. Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V. Antiviral system of innate immunity: COVID-19 pathogenesis and treatment. *Bulletin of RSMU*. 2020; (5): 5–13. (in Russian). <https://doi.org/10.24075/brsmu.2020.054>
8. Kazimirskii A.N., Poryadin G.V., Salmasi J.M., Semenova L.Y. Endogenous regulators of the immune system (sCD100, malonic dialdehyde, and arginase). *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018; 164(5): 693-700. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4061-6>
9. Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V. Coordination of Innate and Adaptive Immunity Depending on Neutrophilic Extracellular Traps Formation. *Austin J Clin Immunol*. 2019; 6(1): 1037.
10. Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V. Neutrophil extracellular traps regulate the development of innate and adaptive immune system. *RMZH. Meditsinskoe obozrenie*. 2020; 4(1): 38–41. (in Russian). <https://doi.org/10.32364/2587-6821-2020-4-1-38-41>

References

1. Porto B.N., Stein R.T. Neutrophil Extracellular Traps in Pulmonary Diseases: Too Much of a Good Thing? *Front Immunol*. 2016; 7: 311. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00311>
2. Ting Liu I, Fa-Ping Wang I, Geng Wang I, Hui Mao I. Role of Neutrophil Extracellular Traps in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chin Med J (Engl)*. 2017; 130(6): 730-6. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.201608>

Сведения об авторах:

Казимирский Александр Николаевич, доктор биол. наук, доцент, вед. науч. сотр. отдела молекулярных технологий, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова», alnica10@mail.ru;

Салмаси Жан Мустафаевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова», profjms@yandex.ru;

Порядин Геннадий Васильевич, чл.-корр. РАН, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова», poryadin_GV@rsmu.ru;

Панина Марина Ивановна, доктор мед. наук, проф., каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова», pan-mar@list.ru

УДК 616.72-002.772

Мануилов А.С.¹, Бельских А.Н.¹, Бардаков С.Н.¹, Жекалов А.Н.¹, Тишко В.В.¹, Никитин В.Ю.¹,
Кудрявцев И.В.², Серебрякова М.К.²

Особенности Т-клеточного иммунитета у больных ревматоидным артритом на фоне комплексной адаптивной иммунотерапии

¹ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ,

194044, Санкт-Петербург, Россия, ул. Академика Лебедева д. 6;

²ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,

197376, Санкт-Петербург, Россия, ул. Академика Павлова, д. 12

Введение. Тяжелые побочные явления лекарственных средств и возникающая фармакологическая резистентность к базисной противоревматической терапии у пациентов с ревматоидным артритом (РА) способствуют поиску новых методов лечения. Одним из перспективных направлений современной эфферентной терапии являются методики экстракорпоральной гемокоррекции, селективно воздействующие на патологические механизмы систем иммунитета и гомеостаза, в частности метод экстракорпорального фотофереза (ЭКФ), основанный на селективной экстракорпоральной фотохимической обработке мононуклеарных клеток периферической крови. В статье изложены результаты и обсуждается влияние комплексной адаптивной иммунотерапии на субпопуляционный состав лимфоцитов и Т-регуляторные клетки у пациентов с РА.

Цель исследования – изучение особенностей Т-клеточного иммунитета у больных ревматоидным артритом на фоне комплексной адаптивной иммунотерапии.

Методика. Обследовано 100 пациентов с верифицированным диагнозом РА, согласно критериям Американской коллегии ревматологов / Европейской антиревматической лиги (ACR/EULAR, 2010). Всех пациентов разделили на основную и контрольную группу. В основную были включены 50 пациентов, получающих базисные противовоспалительные препараты в сочетании с ЭКФ в программном режиме (две процедуры в 2,5–3 мес в течение 24 мес), в контрольную группу вошли 50 пациентов, получающих только стандартную базисную монотерапию.

Результаты. Установлено, что применение ЭКФ снижает функциональную активность NK-клеток и Т-лимфоцитов, экспрессирующих α-цепь рецептора ИЛ-2, за счет увеличения в периферической крови уровня Т-регуляторных клеток у большинства исследуемых пациентов с РА.

Заключение. Включение ЭКФ, как компонента комплексной противоревматической терапии у пациентов с РА, усиливает иммуномодуляторный эффект за счет увеличения в периферической крови уровня Т-регуляторных клеток и снижения функциональной активности Т-активированных лимфоцитов, что в свою очередь восстанавливает дисбаланс в Т-клеточной популяции и сохраняет периферическую иммуноотолерантность к собственным антигенам.

Ключевые слова: адаптивная иммунотерапия; экстракорпоральный фотоферез; ревматоидный артрит; клеточный иммунитет; иммунный ответ

Для цитирования: Мануилов А.С., Бельских А.Н., Бардаков С.Н., Жекалов А.Н., Тишко В.В., Никитин В.Ю., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К. Особенности Т-клеточного иммунитета у больных ревматоидным артритом на фоне комплексной адаптивной иммунотерапии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(2): 43-51.

DOI:10.25557/0031-2991.2022.02.43-51

Участие авторов: Мануилов А.С. – существенный вклад в концепцию и дизайн исследования, анализ данных; Бельских А.Н. – вклад в анализ и интерпретацию данных, Бардаков С.Н. – статистическая обработка результатов; Жекалов А.Н., Тишко В.В. – участие в переработке первого варианта статьи на предмет актуального аналитического содержания; Никитин В.Ю., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К. – получение данных с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Мануилов Андрей Сергеевич, e-mail: andre.manuilov@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 21.03.2022

Принята к печати 31.03.2022.

Опубликована 27.05.2022

Manuilov A.S.¹, Belskikh A.N.¹, Bardakov S.N.¹, Zhekalov A.N.¹, Tishko V.V.¹, Nikitin V.Yu.¹, Kudryavtsev I.V.², Serebryakova M.K.²

Properties of T-cell immunity in patients with rheumatoid arthritis during complex adaptive immunotherapy

¹Kirov Military Medical Academy,
Academika Lebedeva St. 6, St. Petersburg, 194044, Russian Federation;

²Institute of Experimental Medicine,
Academika Pavlova St. 12, St. Petersburg, 194044, Russian Federation

Introduction. Severe side effects of drugs and emerging pharmacological resistance to basic antirheumatic therapy in patients with rheumatoid arthritis (RA) warrant the search for new methods of treatment based on selective extracorporeal photochemical processing of peripheral blood mononuclear cells. This article presents the results and discusses the impact of complex adaptive immunotherapy on the subpopulation composition of lymphocytes and T-regulatory cells in patients with RA. **The aim** was to study the properties of T-cell immunity in patients with RA during complex adaptive immunotherapy.

Methods. We examined 100 patients with a verified diagnosis of RA, according to the criteria of the American College of Rheumatology/European Antirheumatic League (ACR/EULAR, 2010). The patients were divided into a main and a control group. The main group included 50 patients that received basic anti-inflammatory drugs in combination with extracorporeal photopheresis (ECP) in a program mode (two procedures every 2.5-3 mos. for 24 mos.). The control group included 50 patients that received only standard, basic monotherapy.

Results. ECP reduced the functional activity of NK cells and T-lymphocytes that expressed the α -chain of the IL-2 receptor due to an increase in T-regulatory cells in the peripheral blood in most treated patients with RA.

Conclusion. The inclusion of ECP as a component of complex antirheumatic therapy in patients with RA enhances the immunomodulatory effect. This is due to an increase in the content of T-regulatory cells in the peripheral blood and a decrease in the functional activity of T-activated lymphocytes, which, in turn, restores the imbalance in the T-cell population and preserves the peripheral immunotolerance to self-antigens.

Keywords: adaptive immunotherapy; extracorporeal photopheresis; rheumatoid arthritis; cellular immunity; immune response

For citation: Manuilov A.S., Belskikh A.N., Bardakov S.N., Zhekalov A.N., Tishko V.V., Nikitin V.Yu., Kudryavtsev I.V., Serebryakova M.K. Properties of T-cell immunity in patients with rheumatoid arthritis during complex adaptive immunotherapy. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(2): 43-51. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.43-51

Author's contribution: Manuilov A.S. – significant contribution to the concept and design of the study, data analysis; Belskikh A.N. – contribution to data analysis and interpretation; Bardakov S.N. – statistical processing of results; Zhekalov A.N., Tishko V.V. – participation in the revision of the first version of the article for relevant analytical content; Nikitin V.Yu., Kudryavtsev I.V., Serebryakova M.K. – acquisition of data using the method of flow cytometry; Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Andrey S. Manuilov*, e-mail: andre.manuilov@yandex.ru

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

Financing. The study was not sponsored.

Information about the authors:

Manuilov A.S., <https://orcid.org/0000-0003-4627-4974>

Belskikh A.N., <https://orcid.org/0000-0002-0421-3797>

Bardakov S.N., <https://orcid.org/0000-0002-3804-6245>

Tishko V.V., <https://orcid.org/0000-0003-4696-3569>

Kudryavtsev I.V., <https://orcid.org/0000-0001-7204-7850>

Serebryakova M.K., <https://orcid.org/0000-0003-2596-4220>

Received 21.03.2022

Accepted 31.03.2022

Published 27.05.2022

Введение

Ревматоидный артрит (РА) является хроническим аутоиммунным заболеванием, которое характеризуется синовитом и воспалением в окружающих тканях, преимущественно периферических суставов, с прогрессиру-

ющим разрушением хряща и подлежащей кости с формированием стойких нарушений в опорно-двигательной системе [1]. РА считается, преимущественно, Т-клеточным заболеванием. Убедительные данные подтвер-

ждают вывод о том, что Т-хелперы (CD4+ Т-клетки) и истинные натуральные киллеры (NK-клетки) могут инициировать хронический аутоиммунный ответ [2, 3]. CD4+ Т-хелперные (Th) клетки могут играть ведущую роль в возникновении РА, а NK-клетки повышают их пролиферацию и дифференцировку [4]. Хорошо известно, что в разных условиях CD4+ Т-клетки могут дифференцироваться по меньшей мере в 4 различных типа (клетки Th1, Th2, Th17 и Т-регуляторные клетки (ТРК) [5]. Ряд исследований показал, что NK-клетки могут влиять на дифференцировку Т-клеток, включая Th1, Th2, Th17 и ТРК посредством выработки цитокинов [6]. Th1 и Th17-лимфоциты были описаны как «провоспалительные» клетки, а Th2 и ТРК считаются «противовоспалительными» (иммуномодулирующими) факторами у пациентов с РА [7]. ТРК могут избирательно подавлять различные аспекты функции Т-эффекторов, такие как пролиферация, производство цитокинов, экспрессия хемокиновых рецепторов или цитолитическая функция [8]. Точные механизмы, лежащие в основе подавления, опосредованного ТРК, являются спорными. Возможно, что ТРК подавляют иммунологические реакции несколькими способами, которые могут включать контакт-зависимые процессы, с прямым контактом между ними и Т-эффекторными клетками, или могут включать Т-регуляторные взаимодействия с антиген презентующими клетками (АПК), которые затем подавляют Т-эффекторы [9]. Другие механизмы могут включать цитотоксическое уничтожение клеток-мишеней ТРК, производство супрессивных цитокинов или индукцию других регуляторных клеток. Был проведен ряд исследований для оценки роли клеток ТРК в патогенезе РА. Существуют разные мнения относительно их количества в периферической крови пациентов с РА. Исследования показали, что CD4+CD25+ Т-клетки пациентов с РА обладают дефектной способностью подавлять выработку фактора некроза опухоли- α и интерферона- γ Т-клетками или моноцитами, даже если они могут подавлять пролиферацию Т-эффекторных клеток [10].

Одним из перспективных направлений современной эфферентной терапии являются методы экстракорпоральной гемокоррекции, селективно воздействующие на патологические механизмы систем иммунитета и гомеостаза [11]. Недостаточная эффективность лекарственных средств, выраженные побочные действия и формирующаяся фармакорезистентность у пациентов побуждают к поиску новых подходов к лечению, в том числе основанных на экстракорпоральной фотохимической обработке клеток периферической крови – экстракорпоральный фотоферез (ЭКФ) [12]. ЭКФ уменьшает реактивность иммунной системы,

способствуя развитию иммунологической толерантности к собственным клеткам и тканям [13]. Процедура ЭКФ включает сепарацию мононуклеарных клеток из сосудистого русла, экстракорпоральное облучение их ультрафиолетовыми лучами в присутствии фотосенсибилизирующего агента (8-метоксопсоралена) и реинфузию обработанных клеток [14]. Известно, что активированный 8-метоксопсорален образует необратимые ковалентные связи с пиримидиновыми основаниями дезоксирибонуклеиновой кислоты, ингибируя пролиферацию мононуклеаров и индуцирует апоптоз лимфоидных клеток, особенно, естественных киллеров и активированных Т-лимфоцитов [15]. R. Knobler и коллеги разработали клинические рекомендации для применения ЭКФ в комплексном лечении аутоиммунных синдромов и заболеваний, в патогенезе которых ведущую роль играют реактивно измененные клоны Т-лимфоцитов [16]. Хотя данная методика используется в комплексной терапии многих заболеваний и синдромов с нарушением иммунореактивности в течение более двух десятилетий, механизм его лечебного действия крайне сложен и остается не до конца изученным [17]. Научных публикаций о лечебных механизмах ЭКФ в терапии аутоиммунных заболеваний опубликовано значительное количество, однако их данные противоречивы, а исследования при РА ограничены лишь единичными публикациями. Все это определяет актуальность данного исследования.

Цель исследования – изучение особенностей Т-клеточного иммунитета у больных ревматоидным артритом на фоне комплексной адаптивной иммунотерапии.

Методика

Обследовано 100 пациентов (**табл. 1**) с верифицированным диагнозом РА согласно критериям Американской коллегии ревматологов/Европейской антиревматической лиги (ACR/EULAR, 2010) [18]. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных и медицинских исследований с участием человека», утвержденными приказом № 200н Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 г. и письменного добровольного информированного согласия всех пациентов. Работа одобрена независимым этическим комитетом Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (протокол № 217 от 25.12.2018 г.). Критериями включения в исследование являлись: возраст от 18 до 76 лет, высокая и средняя активность РА ($DAS_{28_{ср6}} > 3,2$), выраженные побочные эффекты стандартной базисной проти-

вовоспалительной терапии (цитопения, цитолиз, инфекционные осложнения и др.) требующие отмены или уменьшения дозы препарата. Критериями исключения были: возраст моложе 18 и старше 75 лет, РА без признаков активности, наличие острых инфекционных и паразитарных заболеваний, сопутствующие онкологические заболевания, беременность и лактация.

Обследование пациентов включало: изучение анамнеза, клинический осмотр, лабораторные тесты и специальные исследования. Определялся клинико-лабораторный индекс активности болезни по DAS 28_{срб}.

Концентрацию С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови определяли высокочувствительным иммунонефелометрическим методом с латексным усилением на анализаторе BN ProSpec (Siemens, Германия); нормальный уровень показателя 0–5 мг/л).

Ревматоидный фактор (РФ) определяли в сыворотке крови иммунотурбидиметрическим методом на биохимическом анализаторе «Cobas Integra» фирмы «Ro-sh» (Швейцария); за положительный результат принимали значение РФ > 20 МЕ/мл.

Концентрацию антител к циклическому цитруллинсодержащему пептиду (АЦЦП) в периферической крови определяли в соответствии с иммуноферментной методикой с помощью реактивов фирмы «Axis Shield Diagnostics» (Великобритания), а также методом лазерной нефелометрии на анализаторе «BN-100» фир-

мы «Dade Behring» (Германия). За положительный результат принимали значение более 20 ед/мл.

Определение субпопуляционного состава лимфоцитов и Т-регуляторных клеток (CD3⁺CD25^{bright}CD45⁺) в периферической крови проводили на проточном цитометре «Cytomics FC 500» фирмы «Beckman Coulter», США с использованием 4–5-ти цветных комбинаций прямых моноклональных антител и изотипических контролей; bright – яркая степень экспрессии антигена.

Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием комплекта программ «Statistica 10.0 for Windows StatSoft» (США). Для сравнения 2 зависимых или независимых выборок с нормальным распределением использовался t-критерий Стьюдента. Также использовались непараметрические статистические методы для сопоставления выборочных данных из совокупностей, отличающихся от нормального распределения. Для оценки различий между двумя несвязанными группами применялся критерий Манна-Уитни. Рассчитанные количественные признаки определены как M±SD (где M – среднее значение; SD – стандартная ошибка среднего); для непараметрического распределения – медиана (Me) и интерквартильный размах (Q25%–Q75%).

Всем пациентам проводилось соответствующее международным рекомендациям лечение базисными противовоспалительными препаратами (БПВП): «пер-

Таблица 1 / Table 1

Клиническая характеристика обследуемых пациентов с РА

Clinical characteristics of examined patients with RA

Показатель (Indicator)	ОГ (n=50) (Experiment)	КГ (n=50) (Control)	p ¹
Возраст, лет (Age, years)	59,8±7,9	57,3±12,2	0,4
DAS 28 _{срб} , балл (DAS 28srb, score deployed)	5,5±1,1	5,3±0,9	0,7
Клиническая стадия (Clinical stage):			
- развернутая (advanced)	20 (40)	15 (25)	0,2
- поздняя (late)	30 (60)	35 (75)	0,2
Серопозитивность по РФ (Seropositivity for RF)	34 (68)	38 (76)	0,3
Серопозитивность по АЦЦП (Seropositivity for Anti-CCP)	42 (84)	44 (88)	0,7
Внесуставные проявления (Extra-articular manifestations)	32 (64)	29 (58)	0,8
Продолжительность терапии МТ, мес. (Duration of methotrexate therapy, months.)	34 (3; 60)	26 (3; 50)	0,1
Средняя доза МТ, мг/нед. (Average methotrexate therapy dose, mg/week.)	25 (20; 30)	20 (15; 20)	0,06
Продолжительность терапии ЛФН, мес. (Duration of therapy with leflunomide, months.)	27 (9; 60)	22 (12; 50)	0,07
Средняя доза ЛФН, мг/сут. (Average dose of leflunomide, mg/day.)	20 (20; 20)	20 (20; 20)	0,99
Прием ГКС (Glucocorticosteroid intake)	37 (74)	33 (66)	0,09
Прием НПВП (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs intake)	48 (96)	45 (90)	0,6

Примечание. Статистическая значимость различий между группами пациентов по χ^2 -критерию Пирсона и для попарно не связанных выборок по Манну–Уитни при $p < 0,05$; ГКС – глюкокортикостероиды; НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты.

Note. Statistical significance differences between group by Pearson’s χ^2 criterion and: for pairwise unrelated samples according to Mann–Whitney, at $p < 0,05$.

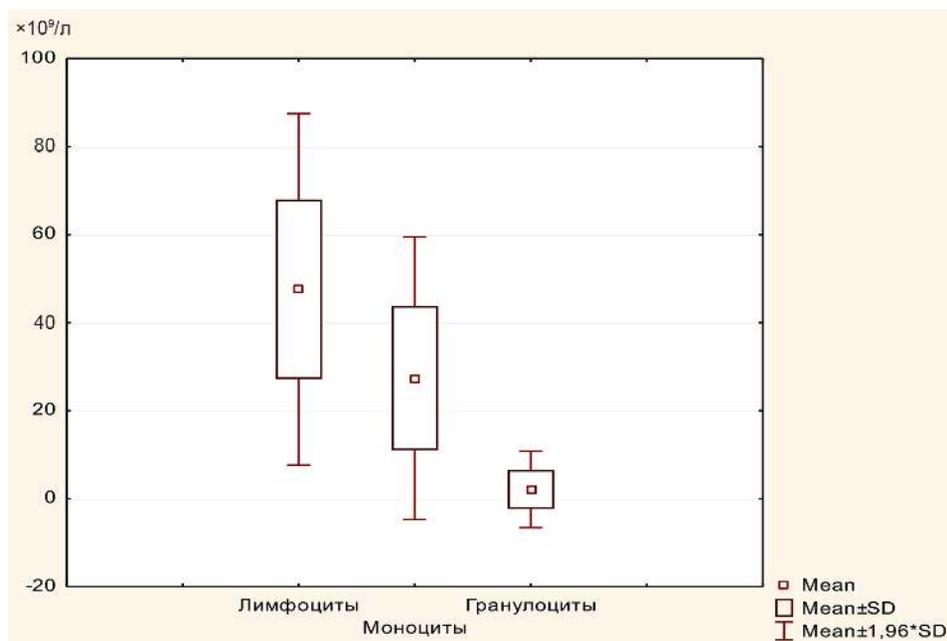


Рис. 1. Состав полученной клеточной массы. По горизонтали – левый столбик — лимфоциты, средний – моноциты, правый – гранулоциты.

Fig. 1. The composition of the resulting cell mass. Horizontal : left column – lymphocytes, middle – monocytes, right – granulocytes.

вой линии» — метотрексатом (МТ) в дозе 20–30 мг/нед или «второй линии» — лефлюномидом (ЛФН) 20 мг/сут.

Всех пациентов разделили на основную (экспериментальную, ОГ) и контрольную группу (КГ) (табл.1). В ОГ были включены 50 пациентов с РА, получающих БПВП в сочетании с ЭКФ в программном режиме (2 процедуры в 2,5–3 мес в течение 24 мес). В КГ вошли 50 пациентов с РА, получающих только БПВП.

Каждые 3 мес проводилась оценка эффективности лечения на основании динамики клинико-лабораторного индекса DAS 28_{срб}. В случае достижения хорошего или удовлетворительного ответа схема терапии сохранялась, при отсутствии ответа (динамика клинико-лабораторного индекса DAS 28_{срб} < 0,6 баллов) пациентов переводили на генно-инженерную терапию (ГИБТ) и эти пациенты исключались из исследования.

Методика проведения ЭКФ. Для выделения лейкоцитов из периферической крови применяли клеточный сепаратор «Spectra Optia» фирмы «Teguto ВСТ» (США) по утвержденному протоколу с контролем клинического анализа крови перед выполнением процедуры. За одну процедуру получали от 110 до 150 мл клеточного концентрата, к которому добавляли 0,9 %-ый раствор натрия хлорида, доводя общий объем полученной суспензии до 300 мл. В качестве фотосенсибилизатора использовали раствор 8-метоксипсоралена (200 нг/кг), добавляя его к полученной клеточной массе, нахо-

дящейся в специализированном герметичном пакете, проницаемом для ультрафиолетовых лучей, с экспозицией 15–20 мин в темном помещении. Затем обработанную фотосенсибилизатором клеточную массу облучали на аппарате для фотофереза «Masogenic G2» фирмы «Masopharma» (Франция). Время облучения составляло от 10 до 15 мин (рассчитывалось аппаратом индивидуально для каждой процедуры) при общей дозе экспозиции 2 Дж/см². Далее проводили реинфузию полученной клеточной взвеси пациенту.

Результаты исследования

В ходе исследования проводился лабораторный контроль полученной сепаратором клеточной взвеси (рис. 1).

Отмечено, что большую часть клеток полученных методикой лейкоцитафереза составляют лимфоциты – $47,57 \pm 20,37 \times 10^9/\text{л}$, среднюю часть – моноциты ($31,5 \pm 18,4 \times 10^9/\text{л}$) и меньшая часть представлена гранулоцитами – $2,11 \pm 0,42 \times 10^9/\text{л}$.

У исследуемых групп пациентов с РА не выявлены статистически значимые различия в субпопуляциях Т-лимфоцитов, при этом общее число лейкоцитов оставалось в пределах нормы: в ОГ – $6,99 \times 10^9/\text{л}$ (5,09; 8,89), в КГ – $6,65 \pm 2,05 \times 10^9/\text{л}$ (4,6; 8,7). Отмечается увеличение количества НК-клеток и активированных Т-лимфоцитов экспрессирующих α -цепь рецептора ИЛ-2 в обеих исследуемых группах пациентов по сравнению с ре-

ференсными значениями. Распределение субпопуляций Т-лимфоцитов представлено в **табл. 2**.

На фоне комплексного лечения с применением программного ЭКФ у ОГ исследуемых пациентов с РА через 3 мес отмечается статистически значимое при ($p=0,05$) снижение активированных Т-лимфоцитов экспрессирующих α -цепь рецептора ИЛ-2 с нарастанием данного эффекта в течение 24 мес наблюдения и нормализации данных Т-клеток до уровня нормы (3,5-12,5%) в течение 1 года терапии в сравнении с КГ пациентов получавших монотерапию БПВП (**рис. 2**).

На фоне лечения у исследуемых пациентов с РА через 3 и 6 мес отмечается снижение НК-клеток (CD3-CD16+CD56+), но статистически значимое ($p<0,05$) снижение их содержания (на фоне нарастания эффекта в течение 24 мес наблюдения отмечено у пациентов ОГ получавших комплексное лечение с применением программного ЭКФ. Нормализация НК-клеток (CD3-CD16+CD56+) до уровня нормы (8–18%) отмечена в течение 12 мес лечения у пациентов ОГ в сравнении с пациентами КГ получавших монотерапию БПВП (**рис. 3**).

На фоне комплексного лечения с применением программного ЭКФ у ОГ исследуемых пациентов с РА через 3 мес отмечается статистически значимое ($p=0,03$) повышение уровня Т-регуляторных клеток с фенотипом

(CD3-CD25^{bright}CD45+) с нарастанием данного эффекта в течение 12 мес наблюдения в сравнение с пациентами КГ получавших монотерапию БПВП (**рис. 4**).

Обсуждение результатов

Особыми механизмами, обеспечивающими поддержание периферической иммунологической толерантности к собственным антигенам, обладают популяции ТРК, очевидно, что они играют особо важную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний, в частности РА [19]. Полученные нами данные доказывают, что применение программного ЭКФ в составе комплексного лечения РА, позволяет восстанавливать баланс Т-клеточного звена иммунитета, посредством иммуномодуляции ТРК, НК-клеток и Т-лимфоцитов, экспрессирующих α -цепь рецептора ИЛ-2.

Так Sakaguchi и коллеги в экспериментальных исследованиях показали, что удаление ТРК приводит к экспансии Т-эффекторов с последующими иммунными нарушениями в системе иммунитета [20]. Полученные нами данные сопоставимы с результатами опубликованными С. Sorraud и др., которые установили, что применение ЭКФ в комплексном лечении РА уменьшает содержание активированных Т-лимфоцитов, увеличивает количество ТРК в периферической крови и значимо снижает

Таблица 2 / Table 2

Параметры субпопуляционного состава лимфоцитов у исследуемых групп пациентов
Parameters of subpopulation composition of lymphocytes in the studied groups of patients

Показатель, $\times 10^9/л$ (Indicator, $\times 10^9/l$)	Норма (Norma)	ОГ (Experiment)	КГ (Control)	p^1
Т-лимфоциты (CD3+) T-lymphocytes (CD3+)	0,8-2,2	3,14 \pm 0,18	3,05 \pm 0,15	0,09
Т-хелперы (CD3+CD4+) T-helpers (CD3+CD4+)	0,5-1,2	0,57 \pm 0,08	0,59 \pm 0,03	0,1
Цитотоксические лимфоциты (CD3+CD8+) Cytotoxic lymphocytes (CD3+CD8+)	0,3-0,9	0,34 \pm 0,05	0,37 \pm 0,06	0,05
Т-киллеры (CD3+CD16+CD56+) T-killers (CD3+CD16+CD56+)	0,03-0,25	0,15 \pm 0,0003	0,01 \pm 0,004	0,25
НК-клетки (CD3-CD16+CD56+)	0,12-0,4	0,54 \pm 0,03	0,49 \pm 0,04	0,09
НК-клетки, экспрессирующие α -цепь антигена CD8 (CD3-CD8+) NK cells expressing the α -chain of CD8 antigen (CD3-CD8+)	0,06-0,28	0,27 \pm 0,02	0,16 \pm 0,03	0,18
Активированные Т-лимфоциты CD3+HLA-DR+ Activated T-lymphocytes CD3+HLA-DR+	0,02-0,3	0,17 \pm 0,04	0,13 \pm 0,06	0,12
Активированные Т-лимфоциты, экспрессирующие α -цепь рецептора ИЛ-2 (CD3+CD25+) Activated T-lymphocytes expressing the α -chain of the IL-2 receptor (CD3+CD25+)	0,06 \pm 0,35	0,47 \pm 0,04	0,5 \pm 0,07	0,3

Примечание. Различия между группами статистически значимы для попарно не связанных выборок по Манну–Уитни при $p<0,05$.
Note. Differences between groups are significant for pairwise unrelated samples according to Mann-Whitney, at $p<0,05$

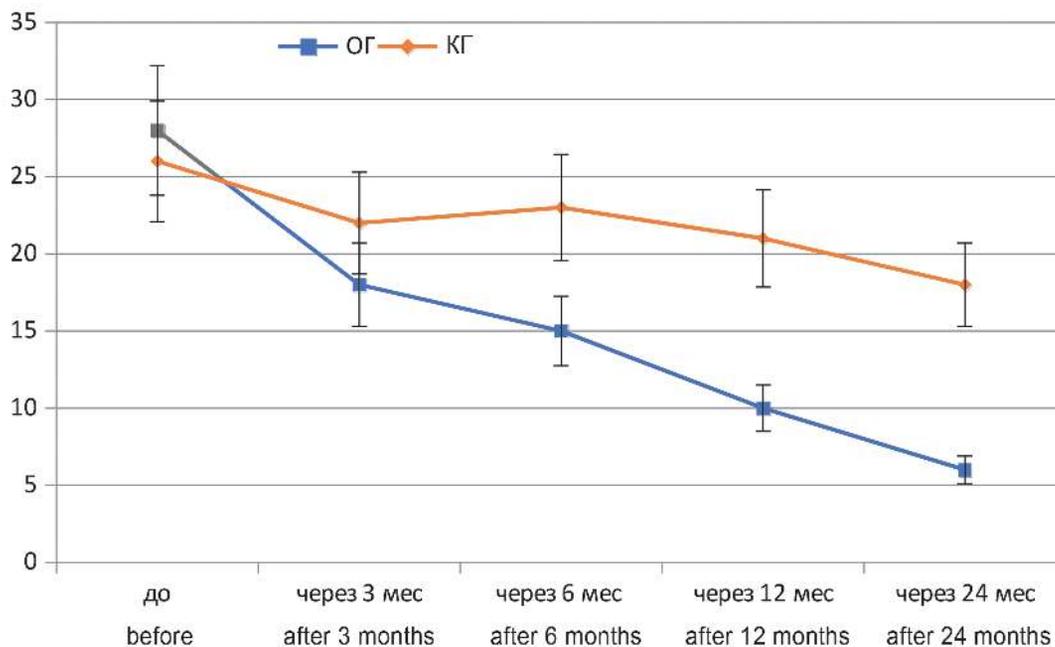


Рис. 2. Динамика активированных Т-лимфоцитов экспрессирующих α-цепь рецептора ИЛ-2 (CD3+CD25+) на фоне лечения.

Fig. 2. Dynamics of activated T-lymphocytes expressing the α-chain of the IL-2 receptor (CD3+CD25+) during treatment. Horizontally – before treatment, after 3, 6, 12, 24 months.

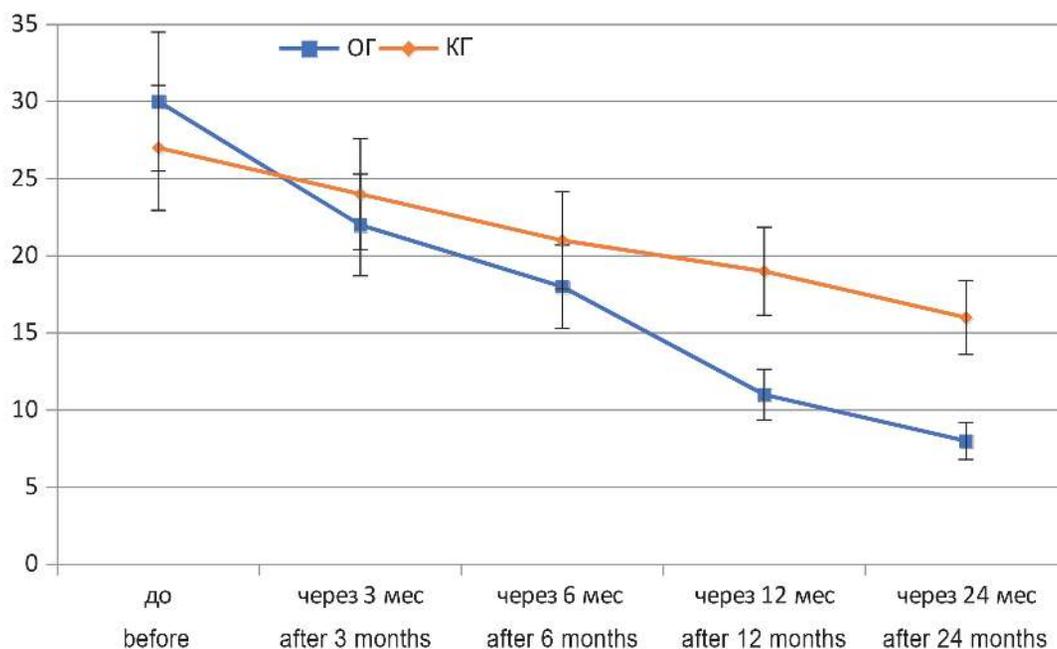


Рис. 3. Динамика NK-клеток (истинные натуральные киллеры) на фоне лечения.

Fig. 3. Dynamics of NK cells (true natural killers) during treatment.

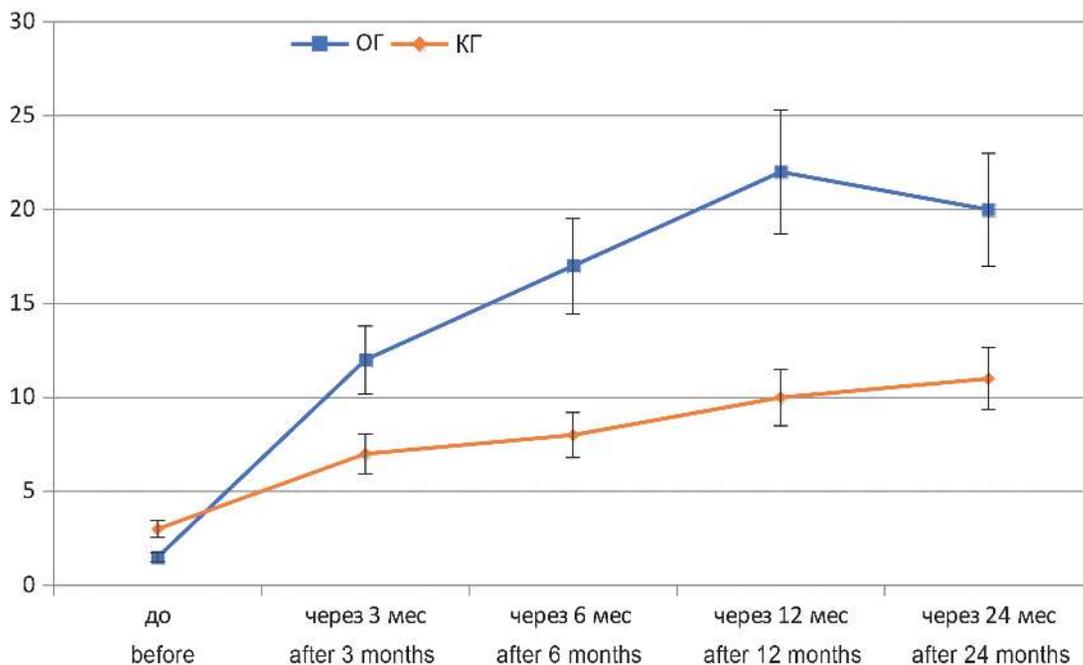


Рис. 4. Динамика Т-регуляторных клеток (CD3-CD25^{bright} CD45+), % от всех Т-хелперов на фоне лечения.

Fig. 4. Dynamics of T-regulatory cells (CD3-CD25^{bright} CD45+), % of all T-helper cells during treatment.

клинико-лабораторную активность заболевания [21, 22]. Активация «провоспалительных» Т-хелперов у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, которым выполнялась процедура ЭКФ в присутствии поляризирующих цитокинов, синтезируемых дендритными клетками и фагоцитами, ведет к усиленной дифференцировке и пролиферации ТРК, определяющих ведущую роль в восстановлении и поддержании периферической толерантности [23].

Выводы

1. Включение программного ЭКФ, как компонента комплексного лечения РА, позволяет не только регулировать, но и купировать иммунные нарушения на уровне Т-клеточного звена иммунитета, посредством уменьшения количества и, следовательно, функциональной активности НК-клеток и Т-лимфоцитов экспрессирующих α-цепь рецептора ИЛ-2, которые обладают выраженным «провоспалительным» потенциалом.

2. Применение ЭКФ в составе комплексной противоревматической терапии пациентов с РА оказывает иммуномодуляторный эффект за счет усиления негативной регуляции всех Т-хелперов, посредством увеличения в периферической крови уровня Т-регуляторных клеток с фенотипом (CD3-CD25^{bright}CD45+), что в свою очередь восстанавливает дисбаланс в Т-клеточ-

ной популяции и сохраняет периферическую иммуно-толерантность к собственным антигенам.

Литература (п.п. 1-19 см. References)

14. Мануилов А., Кудрявцев И., Серебрякова М., Трулев А., Бардаков С., Апчел А. и др. Возможности биологического контроля экстракорпоральной фотохимиотерапии. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2018; 64 (4): 123–30.
19. Москалев А., Гумилевский Б., Апчел А., Цыган В.Н. Т-лимфоциты – «цензорные» клетки иммунной системы. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2019; 66 (2): 191–7.
22. Мануилов А., Бельских А., Бардаков С., Апчел А., Тишко В., Захаров М. и др. Возможности экстракорпорального фотофереза в комплексном лечении ревматоидного артрита. *Вестник Российской Военно-медицинской академии*. 2019; 65 (1): 91–5.
23. Кильдюшевский А., Молочков В., Митина Т., Мойсюк Я., Молочков А. Экстракорпоральный фотоферез –неспецифический метод иммунотерапии аутоиммунных заболеваний и Т-клеточной лимфомы кожи (обзор литературы и собственные исследования). *Альманах клинической медицины*. 2019; 47 (5): 419–34.

References

1. Smolen J., Aletaha D., Barton A., Burmester G., Emery P., Firestein G. et al. Rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2018. № 18001. DOI:10.1038/nrdp.2018.1
2. Harris E. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N. Engl. J. Med.* 1990; 322: 1277–89. DOI: 10.1056/NEJM199005033221805

3. Taniguchi M., Harada M., Kojo S., Nakayama T., Wakao H. The regulatory role of Valpha 14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Ann. Rev. Immunol.* 2003; 21: 483–513. DOI:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141057
4. Jimeno R., Gomariz R., Garin M., Gutierrez-Canas I., Gonzalez-Alvaro I., Juarranz Y. The pathogenic Th profile of human activated memory Th cells in early rheumatoid arthritis can be modulated by VIP. *J. Mol. Med. (Berl)*. 2015; 93: 457–67. DOI:10.1007/s00109-014-1232-4
5. Wang W., Shao S., Jiao Z., Guo M., Xu H., Wang S. The Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 2012; 32: 887–93. DOI:10.1007/s00296-010-1710-0
6. Koguchi Y., Buenafe A., Thauland T., Gardell J., Bivins-Smith E., Jacoby D. et al. Preformed CD40L is stored in Th1, Th2, Th17, and T follicular helper cells as well as CD4+ CD8- thymocytes and invariant NKT cells but not in Treg cells. *PLoS ONE*. 2012; 7: e31296. DOI:10.1371/journal.pone.0031296
7. Dardalhon V., Korn T., Kuchroo V., Anderson A. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J. Autoimmun.* 2008; 31: 252–6. DOI:10.1016/j.jaut.2008.04.017
8. Guggino G., Giardina A., Ferrante A., Giardina G., Schinocca C., Sireci G. et al. The in vitro addition of methotrexate and/or methylprednisolone determines peripheral reduction in Th17 and expansion of conventional Treg and of IL-10 producing Th17 lymphocytes in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 2015; 35: 171–5. DOI:10.1007/s00296-014-3030-2
9. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.* 2007; 13: 139–45. DOI:10.1038/nm1551
10. Valencia X., Stephens G., Goldbach-Mansky R., Wilson M., Shevach E., Lipsky P. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25^{high} T-regulatory cells. *Blood*. 2006; 108: 253–61. DOI:10.1182/blood-2005-11-4567
11. Padmanabhan A., Connelly-Smith L., Aqui N., Balogun R., Klingel R., Meyer E. et al. Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice—evidence-based approach from the writing Committee of the American society for apheresis: the Eighth special issue. *J. Clin. Apher.* 2019; 34: 171–354. DOI:10.1002/jca.21705
12. Kuzmina Z., Stroncek D., Pavletic S. Extracorporeal photopheresis as a therapy for autoimmune diseases. *J. Clin. Apher.* 2015; 30 (4): 224–37. DOI:10.1002/jca.21367
13. Ward M. Extracorporeal Photopheresis: How, When, and Why. *J. Clin. Apher.* 2011; 26 (5): 276–85. DOI:10.1002/jca.20300
14. Manuilov A., Kudryavtsev I., Serebryakova M., Trulev A., Bardakov S., Apchel A. et al. Possibilities of biological control of extracorporeal photochemotherapy. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2018; 64(4): 123–30. (In Russian)
15. Voss C., Fry T., Coppes M., Blajchman M. Extending the horizon for cell-based immunotherapy by understanding the mechanisms of action of photopheresis. *Transfus. Med. Rev.* 2010; 24 (1): 22–32. DOI:10.1016/j.tmr.2009.09.008
16. Knobler R, Arenberger P, Arun A., Assaf C, Bagot M., Berlin G. et al. European dermatology forum – updated guidelines on the use of extracorporeal photopheresis 2020 – part 1. *JEADV*. 2020; 34 (1): 2693–716. DOI:10.1111/jdv.16890
17. Heshmati F. Mechanisms of action of extracorporeal photochemotherapy. *Transfus. Apher.* 2003; 29: 61–70. DOI:10.1016/S1473-0502(03)00103-4
18. Felson D. American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism provisional definition of remission in rheumatoid arthritis for clinical trials. *Ann. Rheum. Dis.* 2011; 70 (3): 404–13. DOI:10.1136/ок.2011.149765
19. Moskalev A., Gumilevsky B., Apchel A., Tsygan V. T-lymphocytes are the “censor” cells of the immune system. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2019; 66(2): 191–7. (In Russian)
20. Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C., Hafler D. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10 (7): 490–500. DOI: 10.1038/nri2785
21. Coppard C., Bonnefoy F., Hannani D. Photopheresis efficacy in the treatment of rheumatoid arthritis: a pre-clinical proof of concept. *J. Transl. Med.* 2019; 17 (1): 312. DOI:10.1186/s12967-019-2066-1
22. Manuilov A., Belskikh A., Bardakov S., Apchel A., Tishko V.V., Zakharov M.V. Possibilities of extracorporeal photopheresis in the complex treatment of rheumatoid arthritis. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2019; 65(1): 91–5. (In Russian)
23. Kil'dyushevskiy A., Molochkov V., Mitina T., Moysyuk Ya., Molochkov A. Extracorporeal photopheresis as a non-specific immune therapy of autoimmune diseases and skin T-cell lymphoma (a review of the literature and own studies). *Almanac of Clinical Medicine*. 2019; 47 (5): 419–34. DOI:10.18786/2072-0505-2019-47-061. (In Russian)

Сведения об авторах:

Мануилов Андрей Сергеевич, старший ординатор клиники нефрологии и эфферентной терапии ФГБОУ ВО «ВМА им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург;

Бельских Андрей Николаевич, доктор мед. наук, профессор, член-корр. РАН, зав. кафедрой нефрологии и эфферентной терапии ФГБОУ ВО «ВМА им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург;

Бардаков Сергей Николаевич, канд. мед. наук, преподаватель кафедры нефрологии и эфферентной терапии ФГБОУ ВО «ВМА им. С.М. Кирова» С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург;

Жекалов Андрей Николаевич, доктор мед. наук, ст. науч. сотр. НИЛ (клеточных технологий) НИО (медико-биологических исследований) НИЦ ФГБОУ ВО «ВМА им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург;

Тишко Валерий Владимирович, доктор мед. наук, доцент, зам. начальника кафедры факультетской терапии ФГБОУ ВО «ВМА им. С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург;

Никитин Владимир Юрьевич, доктор мед. наук, заведующий иммунологической лабораторией ФГБОУ ВО «ВМА им. С.М. Кирова» С.М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург;

Кудрявцев Игорь Владимирович, канд. биол. наук, зав. лаб. клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург;

Серебрякова Мария Константиновна, науч. сотр. отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092.9

Четверяков А.В., Цепелев В.Л.

Уровень белка TIM-3 и его лиганда Galectin-9 у больных колоректальным раком

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, 672000, Чита, Россия, ул. Горького, д. 39а

Введение. Исследования последних лет демонстрируют, что мембранный белок TIM-3 и его лиганд Galectin-9 играют важную роль в «ускользании» опухолевых клеток от иммунного надзора и прогрессировании злокачественного процесса.

Цель – оценка уровня TIM-3 и Galectin-9 в сыворотке крови, ткани опухоли и лимфатических узлов у пациентов с новообразованиями толстого кишечника.

Методика. В исследование были включены 44 пациента с колоректальным раком, 25 больных с доброкачественными опухолями толстого кишечника. Контрольную группу составили 25 пациентов, оперированных в плановом порядке (пластика колостомы). Концентрацию TIM-3 и Galectin-9 определяли в сыворотке крови, а также в супернатанте ткани опухоли и лимфатических узлов с помощью метода проточной цитофлуориметрии на анализаторе CytoFlex LX (Beckman Coulter, США), используя набор для мультиплексного анализа LEGENDplex™ HU (Immune Checkpoint, США). Статистическую значимость различий определяли с помощью непараметрического метода Манна-Уитни.

Результаты. Установлено, что у больных с раком толстой кишки в сыворотке крови уровень TIM-3 увеличивается в 11,7 раза в сравнении с группой контроля ($p < 0,001$). Концентрация TIM-3 в сыворотке крови больных с колоректальным раком превышала данный показатель у больных с доброкачественными опухолями в 7,1 ($p < 0,001$). Уровень TIM-3 в опухолевой ткани в группе пациентов с колоректальным раком была выше в 43,6 раза по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$) и в 11,4 раза превышала данный показатель в группе больных с доброкачественными новообразованиями толстого кишечника ($p < 0,001$). Уровень Galectin-9 в сыворотке крови у пациентов с КРР превышал данный показатель группы контроля в 33,3 раза ($p < 0,001$). Также показано, что концентрация Galectin-9 в сыворотке крови у больных с КРР была выше в 4,4 раза в сравнении с группой больных доброкачественной опухолью толстого кишечника ($p < 0,001$). Более выраженная динамика увеличения данного белка отмечена в ткани новообразования. Уровень TIM-3 в ткани лимфатических узлов у пациентов с КРР составил 8447,5 пг/мл, концентрация Galectin-9 – 9289,7 пг/мл.

Заключение. Полученные данные демонстрируют выраженное увеличение уровня TIM-3 и его лиганда Galectin-9 в сыворотке крови и ткани опухоли у пациентов с колоректальным раком, а также их прямую корреляционную связь с друг другом, что позволяет предположить роль этих белков в патогенезе «ускользания» опухолевых клеток от иммунного надзора при раке толстого кишечника.

Ключевые слова: колоректальный рак; иммунные контрольные точки; TIM-3; galectin-9

Для цитирования: Четверяков А.В., Цепелев В.Л. Уровень белка TIM-3 и его лиганда Galectin-9 у больных колоректальным раком. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(2): 52-58.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.52-58

Участие авторов: концепция и дизайна исследования – Цепелев В.Л., Четверяков А.В.; сбор материала, анализ и интерпретация данных – Четверяков А.В., Цепелев В.Л.; статистическая обработка данных, подготовка иллюстративного материала, написание текста – Четверяков А.В.; редактирование текста – Цепелев В.Л. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Четверяков Андрей Валерьевич, e-mail: yasnogorsk94@gmail.com.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.03.2022

Принята к печати 31.03.2022

Опубликована 27.05.2022

Chetveryakov V.L. Tsepelev A.V.**Concentrations of TIM-3 protein and its ligand Galectin-9 in patients with colorectal cancer**

Chita State Medical Academy,
39a Gorky St. 39a, Chita 672000, Russian Federation

Background. Recent studies have demonstrated that the membrane protein TIM-3 and its ligand Galectin-9 play an important role in the escape of tumor cells from immune surveillance and in the progression of the malignant process.

Aim. To assess the concentrations of TIM-3 and Galectin-9 in blood serum, tumor tissue, and in lymph nodes of patients with colon neoplasms.

Methods. The study included 44 patients with colorectal cancer (CRC) and 25 patients with benign colon tumors. The control group consisted of 25 patients who had had a scheduled surgery (plastic colostomy). The concentrations of TIM-3 and Galectin-9 were determined in serum, as well as in the supernatant of tumour and lymph node homogenates by flow cytometry using a CytoFlex LX (Beckman Coulter, USA) analyzer with LEGENDplex™ HU (Immune Checkpoint, USA) kits for multiplex assays. The non-parametric Mann-Whitney test was used to determine statistical significance of differences.

Results. The serum concentration of TIM-3 was 11.7 times higher in patients with CRC than in the control group ($p < 0.001$) and 7.1 times higher than in patients with benign tumors ($p < 0.001$). The concentration of TIM-3 in tumor tissue in the CRC patients was 43.6 times higher than in the control group ($p < 0.001$) and 11.4 times higher than in patients with benign tumors of the colon ($p < 0.001$). The serum concentration of Galectin-9 in patients with CRC was 33.3 times higher than in the control group ($p < 0.001$) and 4.4 times higher than in the group with benign tumors ($p < 0.001$). More pronounced changes in this protein's increase were noted in the tumor tissue. The concentration of TIM-3 in lymph node tissue in patients with CRC was 8447.5 pg/ml, the Galectin-9 concentration was 9289.7 pg/ml.

Conclusion. The data obtained demonstrate a marked increase in the level of TIM-3 and its Galectin-9 ligand in blood serum and tumor tissue in patients with CRC, as well as their direct correlation with each other. This suggests that these proteins contribute to the pathogenesis of tumor cell escape from immune surveillance in CRC.

Keywords: colorectal cancer; immune control points; TIM-3; galectin-9

For citation: Chetveryakov A.V., Tsepelev V.L. The level of TIM-3 protein and its ligand Galectin-9 in patients with colorectal cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(2): 52-58. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.52-58

Author's contribution: concept and design of the study – Chetveryakov A.V.; collection of material – Chetveryakov A.V., Tsepelev V.L.; analysis and interpretation of data – Chetveryakov A.V., Tsepelev V.L.; statistical data processing – Chetveryakov A.V.; preparation of illustrative material – Chetveryakov A.V.; writing of the text – Chetveryakov A.V.; editing of the text – Tsepelev V.L., Chetveryakov A.V.; Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: **Chetveryakov V. Andrey**, postgraduate at the department of the hospital surgery Chita State Medical Academy, Doctor at the Surgery Department, Chita Regional Oncological Dispensary, e-mail: yasnogorsk94@gmail.com

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 20.03.2022

Accepted 31.03.2022

Published 27.05.2022

Введение

По данным GCO (Global Cancer Observatory) колоректальный рак (КРР) занимает 3-е место по смертности и 4-е по заболеваемости у онкологических больных [1, 2]. В настоящее время для увеличения продолжительности жизни и периода ремиссии у пациентов со злокачественными новообразованиями применяется иммунотерапия, основанная на блокировании иммунных контрольных точек (ИКТ, immune control points) [3]. Последние регулируют активацию иммунных процессов и предотвращают повреждение собственных клеток и тканей активированными иммунными клет-

ками. ИКТ могут быть использованы опухолевыми клетками для «ускользания» от иммунного ответа. TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain 3) является мембранным белком и иммунной контрольной точкой, участвующей в ингибировании иммунного ответа путем истощения CD8+Т-лимфоцитов [4]. Основным лигандом TIM-3 является Galectin-9, который активно экспрессируется на опухолевых клетках. Взаимодействие TIM-3 и Galectin-9 опосредует повышение концентрации ионов кальция внутри клетки. Концентрация ионов кальция инициирует процессы фосфори-

лирования тирозиновых остатков на внутриклеточной части TIM-3, что приводит к отрыву Bat3 (HLA-b связанный транскрипт 3) с внутриклеточной части TIM-3. Отрыв Bat3 ингибирует TCR-сигналинг и усиливает иммунную супрессию [5, 6]. Высокая экспрессия TIM-3 на Т-клетках определяется у пациентов с меланомой, немелкоклеточным раком легких и В-клеточной неходжкинской лимфомой. Установлено, что экспрессия TIM-3 инициирует процесс дисфункции Т-клеток [7–9].

По данным международного института противоопухолевых исследований (Нью-Джерси, США), опубликованных в 2021 г., высказывается предположение, что рецептор TIM-3 снижает функцию Т-клеток в микроокружении опухоли при КРР, что возможно является патогенетическим звеном роста и прогрессирования рака [10].

Цель – изучение уровня TIM-3 и его лиганда Galectina-9 в сыворотке крови, ткани опухоли и лимфатических узлов у больных с новообразованиями толстой кишки.

Методика

В исследование были включены 44 больных колоректальным раком и 25 пациентов с доброкачественными новообразованиями толстой кишки, проходившие лечение в Краевом онкологическом диспансере в г. Чита в период с 2019 по 2020 гг. В контрольную группу вошли 25 пациентов, поступивших в ГУЗ «Краевая клиническая больница» для планового оперативного вмешательства (пластика колостомы). Все больные были обследованы в соответствии с клиническими рекомендациями, утвержденными Минздравом России [11]. В каждом случае получено информированное добровольное согласие пациента, исследование выполнено согласно требованиям комиссии по этике ФГБОУ ВО Читинской государственной медицинской академии Минздрава России, а также в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации всемирной медицинской ассоциации (2013). Критерии включения: согласие пациента на участие в исследовании, наличие опухоли толстого кишечника. Критерии исключения: пациенты с положительным ВИЧ-статусом; аутоиммунными заболеваниями; вирусными и бактериальными инфекциями; больные, проходившие курс химиотерапевтического или лучевого лечения перед оперативным вмешательством.

При гистологическом исследовании в 39 случаях (88,6%) ткань опухоли была представлена умереннодифференцированной аденокарциномой (G2). В трех случаях (6,8%) – высокодифференцированной адено-

карциномой (G1). В 2-х случаях (4,6%) – низкодифференцированной аденокарциномой (G3). У 6 пациентов диагностирована I стадия процесса, у 24 – II стадия, у 8 – III стадия и у 6 – IV стадия.

Уровень TIM-3 и Galectin-9 определяли в сыворотке крови. Забор осуществлялся в утренние часы, за 2 ч до операции. Накануне перед забором материала пациенты получали стандартную лекарственную предоперационную подготовку. Биоптаты ткани опухоли и ткани лимфатических узлов массой до 1 г гомогенизировали при помощи гомогенизатора Ultra-Turpax T 10 basic (IKA, Германия) в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), далее центрифугировали при 5000 об/мин в течении 10 мин и отбирали супернатант. Концентрацию TIM-3 и Galectin-9 в сыворотке крови и супернатанте тканей определяли методом проточной цитофлуориметрии на анализаторе CytoFlex LX (Beckman Coulter, США), используя набор для мультиплексного анализа LEGENDplex™ HU (Immune Checkpoint, США) в соответствии с инструкциями производителя.

При проведении статистического анализа руководствовались принципами Международного комитета редакторов медицинских журналов (ICMJE) и рекомендациями «Статистический анализ и методы в публикуемой литературе» (SAMPL) [12, 13]. Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение номинальных данных исследования проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона, позволяющего оценить значимость различий между фактическим количеством исходов или качественных характеристик выборки, попадающих в каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы [14]. Нормальность распределения количественных признаков при численности исследуемых групп менее 50 человек оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Учитывая распределение признаков, отличное от нормального во всех исследуемых группах, полученные данные представляли в виде медианы, первого и третьего квартилей: Me [Q1; Q3]. Ранговый анализ вариаций по Краскелу-Уоллису (H) выполняли для сравнения трех независимых групп по одному количественному признаку. Затем, при наличии статистически значимых различий, с учетом поправки Бонферрони, проводили попарное сравнение с помощью критерия Манна-Уитни [15]. Для определения фактической степени параллелизма между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена. Силу связи между исследуемыми параметрами определяли по шкале Чеддока [16]. Статистическую обра-

ботку результатов исследования осуществляли с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics Version 25.0 (International Business Machines Corporation, США).

Результаты исследования

Нами установлено, что у больных с раком толстой кишки в сыворотке крови уровень ТИМ-3 увеличивается в 11,7 [9,12; 15,31] раза в сравнении с группой контроля ($U = 23,0, p < 0,001$). Более того, было показано, что концентрация ТИМ-3 в сыворотке крови больных с колоректальным раком превышала данный показатель у больных с доброкачественными опухолями в 7,1 [4,04; 9,67] раза ($U = 59,0, p < 0,001$) (табл. 1). Полученные данные демонстрируют зависимость уровня ТИМ-3 в сыворотке крови от характера новообразования.

Аналогичная динамика наблюдалась при исследовании данного белка в ткани новообразования. Так, концентрация ТИМ-3 в опухолевой ткани в группе пациентов с колоректальным раком была выше в 43,6 [35,86; 52,42] раза по сравнению с группой контроля ($U=0,0, p < 0,001$) и в 11,4 [7,68; 13,11] раза по отношению к группе боль-

ных с доброкачественными новообразованиями толстого кишечника ($U=12,0, p < 0,001$) (табл. 1).

Уровень Galectin-9 в сыворотке крови у пациентов с КРР превышал данный показатель группы контроля в 33,3 [26,69; 38,29] раза ($U = 0,0, p < 0,001$). Также отмечался рост уровня Galectina-9 у больных с доброкачественной опухолью толстой кишки. Между тем установлено, что концентрация Galectin-9 в сыворотке крови у больных с КРР была выше в 4,4 [3,75; 5,14] раза в сравнении с группой больных с доброкачественной опухолью толстого кишечника ($U = 46,0, p < 0,001$) (табл. 2).

Более выраженная динамика увеличения данного белка отмечена в ткани новообразования. Так, уровень Galectin-9 в ткани опухоли у пациентов с колоректальным раком был выше по сравнению с контрольной группой в 56,7 [48,33; 70,22] раза ($U = 0,0, p < 0,001$). Концентрация Galectin-9 у пациентов с КРР превышала данный показатель в группе больных с доброкачественной опухолью толстого кишечника в 3,4 [2,74; 4,39] раза ($U = 53,0, p < 0,001$) (табл. 2).

Таблица 1/Table 1

Уровень ТИМ-3 у больных с новообразованиями толстого кишечника

ТИМ-3 level in patients with colon tumor

Концентрация ТИМ-3 (пг/мл) ТИМ-3 concentration (pg/ml)	Группы обследуемых пациентов Groups of examined patients			Тестовая статистика df=2 test statistic
	Контрольная группа Control group n = 25	Доброкачественная опухоль benign colon tumor n = 25	Колоректальный рак colorectal cancer n = 44	
Сыворотка крови Blood serum	58,0 [55,8; 72,8]	95,6 [88,3; 164,2]	677,1 [663,8; 854,1]	H = 61,94 p < 0,001
Ткань опухоли Tumor tissue	89,0 [85,1; 97,9]	340,9 [340,2; 457,0]	3884,4 [3510,7; 4460,8]	H = 78,87 p < 0,001

Таблица 2/Table 2

Уровень Galectin-9 у пациентов с новообразованиями толстого кишечника.

Galectin-9 level in patients with colon tumor

Концентрация Concentration Galectin-9, пг/мл (pg/g)	Группы исследуемых пациентов Groups of examined patients			Тестовая статистика test statistic df=2
	Контрольная группа Control group n = 25	Доброкачественная опухоль толстого кишечника benign colon tumor n = 25	Колоректальный рак colorectal cancer n = 44	
Сыворотка крови Blood serum	1789,1 [1742,6; 2091,9]	13527,1 [12988,3; 14902,9]	59528,6 [55839,2; 66722,0]	H = 75,88 p < 0,001
Ткань опухоли Tumor tissue	70,7 [67,1; 77,9]	1193,2 [1074,0; 1317,2]	4006,9 [3609,2; 4711,8]	H = 75,29 p < 0,001

Примечание. Буква p (po) – греческая.

Нами установлено, что уровень TIM-3 в исследуемых группах был выше в опухолевой ткани в сравнении с сывороткой крови. В то же время, концентрация его лиганда – Galectin-9 была существенно выше в сыворотке крови.

У пациентов с КРП определяли концентрацию TIM-3 и Galectin-9 в ткани регионарных лимфатических узлов. Так, уровень TIM-3 в ткани лимфатических узлов у пациентов с КРП составил 8447,5 [8091,1; 11081,2] пг/мл; концентрация Galectin-9 – 9289,7 [9070,0; 2215,8] пг/мл.

Уровень белка TIM-3 сыворотки крови коррелирует не только с его концентрацией в ткани опухоли толстой кишки, но и с уровнем его лиганда Galectin-9 как в сыворотке крови, так и в ткани новообразования (табл. 3). Такая корреляционная связь предсказуема, учитывая характер взаимодействия между TIM-3 и Galectin-9. Между уровнем TIM-3 и Galectin-9 в ткани злокачественного новообразования, определяется умеренная корреляционная связь ($\rho=0,39, p = 0,009$), что в очередной раз подтверждает их патофизиологическую связь «рецептор – лиганд». Также определяется высокая корреляционная связь между уровнем Galectin-9 в сыворотке крови и ткани опухоли.

При анализе данных выявлено, что порогом для определения онкологической патологии является показатель Galectin-9 в сыворотке крови равный 6184 пг/мл и более. Порогом для определения онкологической патологии, также является показатель TIM-3 в сыворотке крови равный 92,1 пг/мл и более. Чувствительность данного заключения составляет 0,84, а специфичность 0,88 (AUC=0,88 95% ДИ 0,82-0,95], $p < 0,001$) (рис. 1).

Обсуждение

Нами установлено, что у больных с раком толстой кишки в сыворотке крови значительно возрастает уро-

вень TIM-3 в сравнении с группой контроля. Показано, что концентрация TIM-3 в сыворотке крови больных с колоректальным раком превышала данный показатель у больных с доброкачественными опухолями. Аналогичная динамика наблюдалась при исследовании данного белка в ткани новообразования.

Аналогичные данные были получены у пациенток с раком шейки матки [17]. В исследовании G. Cheng и соавт. (2015) у пациентов с раком желудка экспрессия TIM-3 на CD4+T-клетках и CD8+T-клетках в ткани опухоли была выше, чем в ткани желудка у больных с хроническим гастритом.

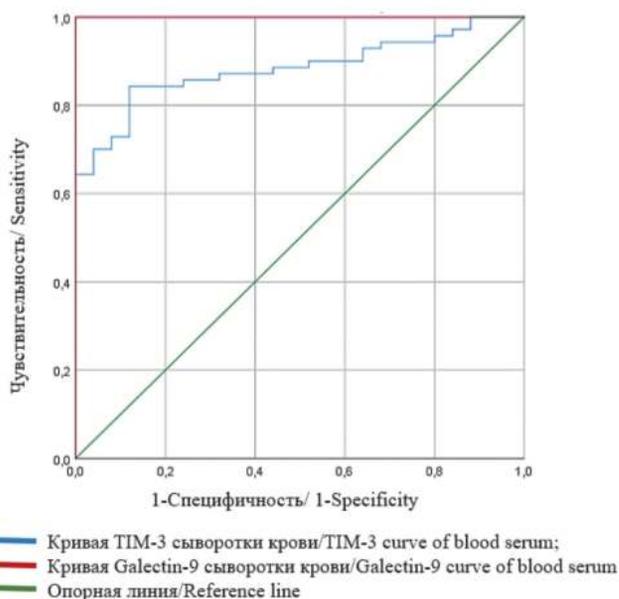


Рис. 1. Диагностическая эффективность TIM-3/Galectin-9.
Fig. 1. Diagnostic effectiveness of TIM-3/Galectin-9.

Таблица 3/Table 3

Корреляционная связь между уровнем TIM-3 сыворотки крови и другими исследуемыми параметрами
Determination of the correlation between the level of TIM-3 blood serum and other studied parameters

Параметры Parameters	Коэффициент корреляции Спирмана, ρ Spearman correlation coefficient, ρ	Сила и направление связи Strength and direction of connection	Статистическая значимость Statistical Significance
TIM-3 в ткани опухоли TIM-3 in tumor tissue	0,75	Высокая, прямая High, direct correlation	$p < 0,001$
Galectin-9 в сыворотке крови Serum Galectin-9	0,68	Заметная, прямая Noticeable, direct correlation	$p < 0,001$
Galectin-9 в ткани опухоли Galectin-9 in tumor tissue	0,69	Заметная, прямая Noticeable, direct correlation	$p < 0,001$

Примечание. Буква ρ (rho)

Особое внимание следует уделить CD8+Т-клеткам, которые в свою очередь включают в себя популяцию цитотоксических лимфоцитов. Цитотоксические лимфоциты участвуют в уничтожении клеток-мишеней, которыми являются клетки рака. К тому же отмечалась статистически значимая корреляция экспрессии TIM-3 на CD4+Т-клетках с клинико-морфологическими особенностями (стадия процесса, размер опухоли, данные о метастазировании процесса в регионарные лимфатические узлы и другие органы) [18]. Повышенная экспрессия TIM-3 на иммунных клетках отмечалась при раке лёгкого, щитовидной железы, молочной железы, эндометрия и раках других локализациях [19–22]. Мембранный белок TIM-3 регулирует иммунный ответ и играет прямую роль в патогенезе роста и прогрессирования злокачественного образования [23].

Негативное регулирование и развитие иммунной супрессии опосредовано взаимодействием TIM-3 и его лиганда Galectin-9 [24]. Нами показано, что у пациентов с колоректальным раком в сыворотке крови значительно возрастает уровень Galectin-9 в сравнении с контрольной группой. Концентрация Galectin-9 в сыворотке крови больных раком толстой кишки превышала данный показатель у больных с доброкачественными опухолями. Аналогичная динамика наблюдалась при исследовании данного белка в ткани опухоли. Поэтому мы считаем, что ось TIM-3/Galectin-9 участвует в патогенезе снижения иммунного ответа в отношении злокачественных клеток.

Заключение

Результаты наших исследований показывают увеличение уровня TIM-3 и его лиганда Galectin-9 в сыворотке крови и ткани опухоли у больных с новообразованием толстого кишечника в сравнении с контрольной группой.

Существенное увеличение уровня TIM-3 и Galectin-9 отмечается у пациентов с колоректальным раком. В случае с TIM-3 увеличение уровня наблюдается в ткани злокачественной опухоли. Однако уровень Galectin-9 демонстрирует существенное увеличение в сыворотке крови. Также уровень TIM-3 в сыворотке крови коррелирует не только с его уровнем в ткани опухоли, но и с уровнем лиганда Galectin-9 как в сыворотке крови, так и в ткани опухоли. На основании полученных данных, определен порог уровня белка TIM-3 и его лиганда Galectin-9 в сыворотке крови для определения онкологической патологии толстого кишечника. Выявление уровня этих биологических маркеров в сыворотке крови возможно при-

менять для скрининговой диагностики в условиях поликлинических подразделений. Это позволит выделить группы риска и оптимизировать тактику их обследования и лечения.

Литература

(п.п. 1–10; 12; 13; 17–24 см. References)

11. *Общероссийский национальный союз. Ассоциация онкологов России. Злокачественные новообразования ободочной кишки и ректосигмоидного отдела. Клинические рекомендации.* М.; 2020.
14. Мудров В.А. Алгоритмы статистического анализа количественных признаков в биомедицинских исследованиях с помощью пакета программ SPSS. *Забайкальский медицинский вестник.* 2020; 1: 140–50.
15. Мудров В.А. Алгоритмы статистического анализа качественных признаков в биомедицинских исследованиях с помощью пакета программ SPSS. *Забайкальский медицинский вестник.* 2020; 1:151–63.
16. Мудров В.А. Алгоритмы корреляционного анализа данных в биомедицинских исследованиях с помощью пакета программ SPSS. *Забайкальский медицинский вестник.* 2020; 2: 169–76.

References

1. Rawla P., Sunkara T., Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz Gastroenterol.* 2019; 14(2): 89-103. doi:10.5114/pg.2018.81072
2. Volonte A., Di Tomaso T., Spinelli M., Todaro M., Sanvito F., Albarello L., et al. Cancer-initiating cells from colorectal cancer patients escape ell-mediated immunosurveillance in vitro through membrane-bound IL-4. *J Immunol.* 2014; 192(1): 523-32. doi:10.4049/jimmunol.1301342
3. Xiao Y., Freeman G.J. The microsatellite instable subset of colorectal cancer is a particularly good candidate for checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Discov.* 2015; 5(1):1 6-8. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-1397
4. Joller N., Kuchroo K. Tim-3, Lag-3, and TIGIT. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017; 410: 127–56. doi:10.1007/82.2017.62
5. Wenwen D., Yang M., et al. TIM-3 as a target for cancer immunotherapy and mechanisms of action. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(3): 645. doi:10.3390/ijms18030645
6. Ana C., Joller N., Vijay K. Lag-3, Tim-3, and TIGIT co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. *Immunity.* 2016; 44(5): 989–1004. doi:10.1016/j.immuni.2016.05.001
7. Li F., Chen Y., et al. Immune checkpoint inhibitors and cellular treatment for lymphoma immunotherapy. *Clinical and Experimental Immunology.* 2021; 205:1-11. doi: 10.1111/cei.13592
8. Lee J.B., et al. Clinical insights into novel immune checkpoint inhibitors. *Pharmacol.* 2021; 12: 681320. doi: 10.3389/fphar.2021.681320
9. Zeidan A. M., Komrokji R. S., Brunner A. M. TIM-3 pathway dysregulation and targeting in cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy.* 2021; 21(5): 523-34. doi: 10.1080/14737140.2021.1865814
10. Neupane P., Mimura K., et al. The expression of immune checkpoint receptors and ligands in the colorectal cancer tumor microenvironment. *Anticancer Research.* 2021; 41 (10) 4895-905. doi:10.21873/anticancer.15303

11. Russian National Union. Association of Oncologists of Russia. Malignant neoplasms of the colon and rectosigmoid department. Clinical Guidelines. [Obshcherossiyskiy natsional'nyy soyuz. Assotsiatsiya onkologov Rossii. Zlokachestvennye novoobrazovaniya obodochnoy kishki i rektosigmoidnogo otdela. Klinicheskie reko-mendatsii]. Moscow; 2020.
12. Alshogran O.Y., Al-Delaimy W.K. Understanding of international committee of medical journal editor's authorship criteria among faculty members of pharmacy and other health sciences in Jordan. *J Empir Res Hum Res Ethics*. 2018; 13(3): 276-84. doi:10.1177/1556264618764575
13. Lang T.A., Altman D.G. Basic statistical reporting for articles published in biomedical journals: Statistical analyses and methods in the published literature or the SAMPL guidelines. *Int J Nurs Stud*. 2015; 52(1): 5-9. doi: 10.1016/j.ijnurstu.2014.09.006
14. Mudrov V.A. Algorithms for statistical analysis of quantitative features in biomedical research using the SPSS software package. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2020; 1: 140-50. (in Russian)
15. Mudrov V.A. Algorithms for statistical analysis of qualitative features in biomedical research using the SPSS software package. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2020; 1: 151-63.
16. Mudrov V.A. Algorithms of correlation analysis of data in biomedical research using the SPSS software package. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2020; 2: 169-76.
17. Kayukova E.V., Sholokhov L.F., Belokrinskaya T.E., Tereshkov P.P. Checkpoint proteins in patients with precancer and cervical cancer. *BioRxiv*. 2021; 02.09.430409. doi:10.1101/2021.02.09.430409
18. Cheng G., Li M., et al. Expression of Tim-3 in gastric cancer tissue and its relationship with prognosis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(8): 9452-7.
19. Zhuang X., Zhang X., et al. TIM-3 in Lung Cancers: a potential independent prognostic factor for patients with NSCLC. *American Journal of Clinical Pathology*. 2012; 978-85. doi:10.1309/AJCP9Q6OVLVSHTMY
20. Wu J., Sun Y., Li J., Ai M., You L., Shi J., et al. Analysis of prognostic alternative splicing reveals the landscape of immune microenvironment in thyroid cancer. *Front Oncol*. 2021; 18:11:763886. doi:10.3389/fonc.2021.763886
21. Ju M.H., Byun K.D., Park E.H., Lee J.H., Han S.H. Association of Galectin 9 expression with immune cell infiltration, programmed cell death ligand-1 expression and patient's clinical outcome in triple-negative breast cancer. *Biomedicines*. 2021; 9(10): 1383. doi:10.3390/biomedicines9101383
22. Cao W., Ma X., Fischer J.V., Sun C., Kong B., Zhang Q. Immunotherapy in endometrial cancer: rationale, practice and perspectives. *Biomark Res*. 2021; 9(1): 49. doi:10.1186/s40364-021-00301-z
23. Gao X., Zhu Y., Li G., Huang H., Zhang G., Wang F., et al. TIM-3 expression characterizes regulatory T-cells in tumor tissues and is associated with lung cancer progression. *PLoS One*. 2012; 7(2): e30676. doi: 10.1371/journal.pone.0030676
24. Tirier S.M., Mallm J.P., Steiger S., Poos A.M., Awwad M.S., Giesen N., et al. Subclone-specific microenvironmental impact and drug response in refractory multiple myeloma revealed by single-cell transcriptomics. *Nat Commun*. 2021; 12(1): 6960. doi:10.1038/s41467-021-26951-z

Сведения об авторах:

Четверяков Андрей Валерьевич, аспирант каф. госпитальной хирургии ФГБОУ ВО ЧГМА, врач-хирург Краевого онкологического диспансера г. Чита, e-mail: yasnogorsk94@gmail.com;

Цепелев Виктор Львович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. госпитальной хирургии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: viktorcepelev@mail.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 612.115.3-612.115.064

Успенская М.С., Мурашев В.В., Ляпина М.Г., Майстренко Е.С., Ляпина Л.А.

Синергетические антикоагулянтные и фибриндеполимеризационные свойства гепариноидов из экстрактов гибридных сортов пионов («Куинджи», «Академик Садовничий», «Коралл») и древовидного пиона (*P. suffruticosa*) в сравнительном аспекте

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,
119234, Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

На современном этапе остро стоит проблема разработки безопасных препаратов для борьбы с тромботическими осложнениями, возникающими при различных функциональных (сердечно-сосудистых, легочных и др.) и вирусных (развитие Covid) заболеваниях. Обычно применяют антикоагулянты гепариновой природы. В древовидных и травянистых пионах обнаружено наличие гепариноподобных веществ.

Цель исследования – изучение антикоагулянтного действия и процессов деполимеризации фибрина гибридных сортов пионов («Куинджи», «Академик Садовничий» и «Коралл») и используемого для их выращивания древовидного (*P. suffruticosa*) в сравнительном аспекте.

Методика. Объектом исследования служили корни гибридных пионов («Куинджи», «Академик Садовничий», «Коралл») и *P. suffruticosa*. Разработаны методы получения экстрактов из корней пионов и выявлена природа действующего начала. Определены антикоагулянтная, фибринолитическая активность и степень полимеризации фибрина после их включения в плазму крови крыс.

Результаты. Экстракты из всех гибридных пионов и древовидного в концентрациях 1 и 10^{-3} мг/мл обладали антикоагулянтной и фибриндеполимеризационной активностью (ФДПА), но в разной степени. В них отмечалось превышение антикоагулянтной активности по тестам АЧТВ на 32–48%, тромбинового времени (ТВ) – на 8–15%, протромбинового времени – на 14–21%, и фибринолиза по тестам суммарной фибринолитической активности (СФА) – на 27–50%, ФДПА – на 49–80%, в то время как в экстракте из древовидного пиона эти активности усиливались в меньшей степени: антикоагулянтная активность повышалась на 23% (АЧТВ), на 7% (ТВ), а фибринолиз на 18–20% (СФА) и на 47% (ФДПА) по сравнению с нормой. Впервые обнаружено наличие гепариноидов в экстрактах из гибридных пионов.

Заключение. Впервые установлена способность экстрактов из корней гибридных пионов проявлять синергетические антикоагулянтные и фибриндеполимеризационные эффекты, превышающие таковые у экстракта из пиона древовидного. На основе полученных данных возникает необходимость исследования гибридных пионов в качестве антитромботических и антиатеросклеротических агентов.

Ключевые слова: экстракт пиона; система гемостаза; тромбоз; антикоагулянт; гепариноид

Для цитирования: Успенская М.С., Мурашев В.В., Ляпина М.Г., Майстренко Е.С., Ляпина Л.А. Синергетические антикоагулянтные и фибриндеполимеризационные свойства гепариноидов из экстрактов гибридных сортов пионов («Куинджи», «Академик Садовничий», «Коралл») и древовидного пиона (*P. suffruticosa*) в сравнительном аспекте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(2): 59–65.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.59-65

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Успенская М.С., написание текста – Ляпина Л.А., Мурашев В.В., редактирование, определение параметров крови – Ляпина М.Г., Майстренко Е.С. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Ляпина Людмила Анисимовна, e-mail: lyapinal@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена по теме госбюджетного НИОКР.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.02.2022

Принята к печати 31.03.2022

Опубликована 27.05.2022

Uspenskaya M.S., Murashev V.V., Lyapina M.G., Maistrenko E.S., Lyapina L.A.

Comparison of synergistic anticoagulant and fibrin depolymerizing properties of heparinoid extracts from hybrid varieties of peonies («*Kuindzhi*», «*Academician Sadovnichy*», «*Coral*») and tree peony *P. suffruticosa*

Lomonosov Moscow State University,
1, Bldg. 12, Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russian Federation

At present, developing safe drugs to combat thrombotic complications arising from various functional (cardiovascular, pulmonary, etc.) and viral (Covid-19) diseases is an acute problem. Usually, heparin-like anticoagulants are used in treatment of these diseases. These substances were found in tree and herbaceous peonies.

The aim of this investigation was to compare the anticoagulant action and processes of fibrin depolymerization of hybrid peonies («*Kuindzhi*», «*Academician Sadovnichy*» and «*Coral*») and tree peonies (*P. suffruticosa*) that are used for heparin production. Roots of hybrid peonies («*Kuindzhi*», «*Academician Sadovnichy*», «*Coral*») and *P. suffruticosa* were the object of research.

Methods. Procedures to prepare peony root extractions were developed, and the nature of the active agent was determined. The anticoagulant, fibrinolytic activity, and the degree of fibrin polymerization were determined after addition to rat plasma.

Results. For the first time, heparin-like substances were detected in extracts from hybrid peonies. At concentrations of 1 and 10^{-3} mg/ml, extracts from all hybrid peonies exhibited anticoagulant and fibrin-depolymerizing activity (FDPA), but to different degrees. Anticoagulant activity (ACTV) increased by 32-48%, thrombin time (TT) by 8-15%, prothrombin time by 14-21%, total fibrinolytic activity (TFA) by 27-50%, and FDPA by 49-80% compared to control. These activities were less in tree peony extract: ACTV increased by 23%, TT by 7%, TFA by 18-20%, and FDPA by 47% compared to control.

Conclusion. For the first time the ability of hybrid peony root extract to show synergistic, anticoagulant and fibrin depolymerization effects exceeding those of extract from tree peony was established. These data demonstrate that hybrid peonies should be studied as sources of antithrombotic and anti-atherosclerotic agents.

Keywords: peony extract; hemostasis system; thrombosis; anticoagulant; heparinoid

For citation: Uspenskaya M.S., Yurashev V.V., Lyapina M.G., Maistrenko E.S., Lyapina L.A. Synergistic anticoagulant and fibrin-depolymerization properties of extracts from hybrid varieties of peonies («*Kuindzhi*», «*Academician Sadovnichy*» and «*Coral*») compared with their component from tree peony (*P. suffruticosa*) in comparative aspect. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(2): 59-65. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.59-65

Author's contribution: concept and design of the study – Uspenskaya M.S., writing of the text – Lyapina L.A., Murashev V.V., determination of blood parameters, editing – Lyapina M.G., Maistrenko E.S. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: **Lyapina Ludmila A.**, leader specialist of the laboratory of protective blood systems named after prof. B.A. Kudryashov kaf. Physiology of humans and Animals of the Faculty of Biology of Moscow State University, e-mail: lyapinal@mail.ru

Information about the authors:

Uspenskaya M.S., <https://orcid.org/0000-0002-5368-4026>

Murashev V.V., <https://orcid.org/0000-0001-5945-4451>

Lyapina M.G., <https://orcid.org/0000-0001-6039-5161>

Lyapina L.A., <https://orcid.org/0000-0002-8983-652X>

Financing. The work was carried out on the topic of state-funded R&D.

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

Received 14.02.2022

Accepted 31.03.2022

Published 27.05.2022

Введение

Нарушение механизмов естественной антикоагуляции вследствие генетических расстройств или тяжелых внешних повреждений может привести к возникновению состояний, осложняющихся тромбозами. Это является одной из основных причин для проявления таких жизнеугрожающих ситуаций, как развитие сердечно-сосудистых заболеваний, инсульта, тромбоза легочной артерии, тромбоза глубоких вен [1]. Растущее число таких инци-

дентов требует альтернативного антикоагулянта или антитромботического средства, которое обладает минимальными побочными эффектами и повышенной эффективностью, что и является одной из основных проблем современной физиологии, медицины и фармакологии. Научная проблема, поднятая в настоящей статье, выражается в новых подходах к созданию высокоэффективных антикоагулянтов растительного происхождения.

Известна универсальность действия природного антикоагулянта животного происхождения — гепарина, направленного на регуляцию реакций многих систем организма [2]. Наш вклад в развитие данной области науки заключается в доказательстве сходства гепариноподобных низкомолекулярных антикоагулянтов растительного происхождения из пионов и низкомолекулярного гепарина животного происхождения, которые не оказывают побочных отрицательных геморагических воздействий на организм.

На протяжении десятилетий известны своей жизненно важной ролью в предотвращении различных тромботических заболеваний гепарины животного и синтетического происхождения, флавоноиды, которые снижают риск гиперактивации тромбоцитов, препятствуют эндотелиальной дисфункции при сердечно-сосудистых заболеваниях и предупреждают процессы развития атеросклероза и атеротромбоза путем блокады тканевого фактора свертывания [3, 4].

В ряде растений содержатся компоненты, являющиеся составной частью гепарина и других гликозаминогликанов [5,6] с положительным воздействием на систему гемостаза как в норме, так и при некоторых патологических состояниях организма [7]. Извлеченные из корней *Paeonia lactiflora* Pall, входящего в состав гибридного пиона «Коралл», общие глюкозиды были использованы в качестве противовоспалительного препарата для лечения ревматоидного артрита в Китае, а также для ослабления развития атеросклеротических заболеваний. Леченый эффект препарата связан с его нормолипидемическим действием и ингибированием экспрессии воспалительных цитокинов [8, 9].

Исследования показали, что Пэонол (2'-гидрокси-4'-метоксиацетофенон), из *Paeonia suffruticosa* оказывает благоприятное влияние на профилактику и лечение сердечно-сосудистых заболеваний путем подавления экспрессии молекулы адгезии сосудистых клеток VCAM-1, которая играет решающую роль в случае ранних воспалительных реакций, в том числе при развитии атеросклероза [10].

В корнях некоторых травянистых видов пионов и древовидного *P. suffruticosa* обнаружено гепариноподобное низкомолекулярное вещество (гепариноид), которое оказывает противосвертывающее действие в условиях *in vitro* и при внутривенном введении животным [11]. Установлено, что гепариноиды из различных растений способны предотвращать процессы тромбообразования при повышенной свертываемости крови, возникающей в организме в разных условиях, в том числе при предтромбозах и тромбозах [12].

Цель исследования — изучение антикоагулянтного действия и процессов деполимеризации фибрина гибридных сортов пионов («Куинджи», «Академик Садовничий» и «Коралл») и используемого для их выращивания древовидного пиона (*P. Suffruticosa*) в сравнительном аспекте.

Методика

В работе использованы корни гибридных пионов («Куинджи», «Академик Садовничий», «Коралл»), выращенных М.С. Успенской (Ботанический сад МГУ), и древовидного пиона (*Suffruticosa*), используемого для выращивания этих гибридных сортов. Разработаны способы получения экстрактов корней каждого вида пионов согласно методу [12]. При различных разведениях экстрактов, содержащих активное начало, определены антикоагулянтная активность и степень полимеризации фибрина крови крыс, а также их влияние на разные виды фибринолиза: суммарный (СФА), ферментативный (ФФ) и неферментативный (НФ) или фибриндеполимеризационную активность — (ФДПА).

Для изучения влияния экстрактов разных видов пионов на ингибирование процессов свертывания крови поступали следующим образом: получали 2%-е экстракты из очищенных и высушенных корней пионов, которые освобождали от белков воздействием спиртовых растворов, а затем центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 30 мин. После этого супернатант, содержащий активный целевой продукт, лиофилизировали при 37 °С. В целевом продукте (сухом остатке) каждого вида пионов биохимическими методами с применением красителя Азур А и ингибитора гепарина протаминсульфата определяли содержание гепарина, которое составляло от 2.3 мг% до 2.5 мг%, причем в гибридных пионах оно было максимальным.

Далее готовили разные концентрации целевых продуктов (от 10⁻³ до 1 мг/мл физиологического раствора), после чего инкубировали их с нормальной плазмой крови крыс в течение 15 мин при 37 °С и затем проводили определение противосвертывающих свойств плазмы. Контролем служили образцы нормальной плазмы крыс, где вместо препаратов добавляли физиологический раствор. Для получения крови использовали здоровых лабораторных белых крыс-самцов массой тела 200-220 г. Все эксперименты на животных проведены в соответствии с этическими принципами и документами, рекомендованными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Стокгольм, 15.06.2006). Взятие крови у крыс осуществляли из *vena jugularis* (2 мл от каждого животного). В качестве консерванта использовали 3.8%-й цитрат натрия

в соотношении кровь:консервант как 9 : 1. Образцы крови центрифугировали при 3 000 g в течение 10–12 мин для получения бедной тромбоцитами плазмы.

В крови на приборе «Анализатор свертывания крови – АСК-2-01-Астра» определяли биохимические параметры гемостаза: антикоагулянтную активность по данным активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), характеризующему внутренний путь свертывания крови, тромбинового времени (ТВ), характеризующему общий путь свертывания крови, и протромбинового времени (ПВ), характеризующему внешний путь свертывания крови и фибринолитическую активность (суммарную – СФА, неферментативную – НФ или ФДПА, ферментативную – ФФ), а также определяли степень полимеризации фибрина по тесту выявления фибринполимеризационной активности [13].

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

Результаты и обсуждение

Как видно из **таблицы** в условиях *in vitro* в опытных образцах гибридных пионов по сравнению с древовидным пионом, используемым при скрещивании, при всех исследованных концентрациях (10^{-3} и 1 мг/мл) установлена высокая антикоагулянтная активность по тесту АЧТВ и умеренная по тестам ПВ и ТВ. Эта активность была максимально повышенной при используемых концентрациях (10^{-3} мг/мл) гепариноидов из гибридных пионов «Куинджи» и «Академик Садовничий».

Так, при высокой (1 мг/мл) и низкой (10^{-3} мг/мл) концентрациях гепариноидов из гибридных пионов по тесту АЧТВ наблюдалось повышение антикоагулянтной активности на 32–48% по сравнению с нормой и на 9–25% по сравнению с активностью гепариноида из древовидного пиона.

По данным тромбинового времени добавление гепариноидов из гибридных пионов к нормальной плазме крыс также способствовало увеличению антикоагулянтных свойств плазмы, но особенно при использовании гепариноида из пиона «Куинджи». Тест ТВ показал также изменения в сторону повышения антитромбиновой активности при использовании гепариноидов гибридных пионов «Коралл» и «Академик Са-

довничий». Самые низкие значения ТВ были и у древовидного пиона.

По тесту протромбиновое время (ПВ) максимальный антикоагулянтный эффект обнаружен у гепариноида из пиона «Академик Садовничий», антикоагулянтная активность которого превышала тот же вид активности гепариноида из древовидного пиона на 14–21 %. ПВ у гибридных пионов «Коралл» и «Куинджи» практически соответствовало аналогичному показателю и у пиона «Академик Садовничий». Итак, ПВ, влияющее на внешний путь свертывания, увеличивалось при действии всех гибридных пионов, в то время как древовидный пион таким действием не обладал. Как известно, повышение ПВ указывает на способность исследуемых веществ блокировать тканевой фактор свертывания крови [1].

Показано также, что гепариноиды всех гибридных пионов активно влияют на фибринолитические процессы (СФА, НФ (ФДПА) и ФФ), статистически значимо повышая значения их показателей, в то время как гепариноид из древовидного пиона обладал слабым влиянием на фибринолиз. Что касается исследования фибриндеполимеризационной активности и степени полимеризации фибрина каждым из гепариноидов гибридных пионов, то доказан факт ингибирования полимеризации фибрина, причем в большей степени у гибридных пионов, чем у древовидного.

Анализируя полученные данные, следует сказать, что гепариноиды из гибридных пионов проявляют синергетические эффекты по сравнению с применяемым для скрещивания древовидным пионом. Максимальным антикоагулянтным действием (по тесту АЧТВ и ПВ) обладал пион «Академик Садовничий», на втором месте – «Коралл»; по тесту ТВ максимальным антитромбиновым действием обладал сорт «Куинджи». Способностью влиять на повышение фибринолиза (СФА, НФ и ФФ) обладают все гибридные пионы с максимальным эффектом у сорта «Коралл». Все гибридные сорта способны препятствовать процессам фибрино- и тромбообразования, поскольку у всех высокая степень деполимеризации по сравнению с древовидным пионом, хотя и последний также способен препятствовать полимеризации фибрина. Гепариноид из пиона «Академик Садовничий» влияет на внутренний и внешний механизмы свертывания крови в большей степени, чем другие гибридные пионы. В то же время все они проявляют антитромбиновое действие, что указывает на присутствие в гепариноидах и высокомолекулярных фракций гепарина [2].

Таким образом, по данным коагулологического исследования гепариноиды из всех гибридных пио-

Таблица/Table

Антикоагулянтная (по тестам АЧТВ, ТВ, ПВ) и фибринолитическая (СФА, НФ, ФФ) активность, степень полимеризации фибрина экстрактов из корней пионов «Куинджи», «Академик Садовничий», «Коралл» и «древовидный пион» в разных концентрациях, (M ± m)

Anticoagulant (according to the tests of APTT, TT, PT) and fibrinolytic (SFA, NF, FF) activity, degree of fibrin polymerization of extracts from the roots of peonies «Kuindzhi», «Academician Sadovnichy», «Coral» and tree peony *P. suffruticosa* in different concentrations

Исследуемые показатели Researched indicators	Экстракты из корней пионов Peony roots extract				Контроль 0,85%-ый NaCl Control NaCl, 0,85%
	«Куинджи» «Kuindzhi»	«Академик Садовничий» «Academician Sadovnichy»	«Коралл» «Coral»	«Древовидный пион» «Tree peony <i>P. suffruticosa</i> »	
АЧТВ, с (%) APTT, s (%)					32.9 ± 1.0 (100%)
A	46.0 ± 0.8** (139%)	49.8 ± 1.4** (148%)	44.0 ± 0.9** (133%)	40.5 ± 0.8** (123%)	
B	46.7 ± 0.8** (140%)	49.7 ± 1.4** (148%)	43.0 ± 0.9** (132%)	40.0 ± 1.3** (123%)	
ТВ, с (%) TT, s (%)					17.3 ± 0.7 (100%)
A	20.0 ± 0.6** (114%)	18.6 ± 2.0* (109%)	18.3 ± 0.9* (107%)	18.0 ± 1.0* (107%)	
B	21.0 ± 0.4** (115%)	18.5 ± 1.4* (108%)	18.5 ± 1.1* (108%)	18.0 ± 0.8 (107%)	
ПВ, с (%) PT, s (%)					28.0 ± 0.7 (100%)
A	32.2 ± 0.6** (115%)	32.9 ± 0.9** (117%)	31.9 ± 0.7** (114%)	28.0 ± 0.7 (100%)	
B	32.3 ± 0.6** (116%)	34.1 ± 0.8** (121%)	32.1 ± 0.6* (115%)	28.0 ± 0.7 (100%)	
СФА, мм ² (%) SFA mm ² (%)					32.5 ± 1.1 (100%)
A	41.5 ± 1.2** (127%)	43.6 ± 1.0** (133%)	48.8 ± 1.3** (150%)	40.0 ± 1.9** (120%)	
B	41.8 ± 1.4** (128%)	43.8 ± 1.0** (133%)	48.0 ± 1.3** (148%)	39.0 ± 1.9** (118%)	
НФ, мм ² (%) NF, mm ² (%)					12.2 ± 0.7 (100%)
A	18.8 ± 1.5** (149%)	21.0 ± 1.1** (172%)	23.0 ± 1.3** (180%)	18.0 ± 1.1** (147%)	
B	18.9 ± 1.5** (149%)	21.6 ± 1.1** (173%)	23.0 ± 1.3** (180%)	18.0 ± 1.1** (147%)	
ФФ, мм ² (%) FF, mm ² (%)					20.0 ± 0.7 (100%)
A	22.0 ± 0.2* (111%)	22.3 ± 0.5* (112%)	24.0 ± 1.4** (120%)	21.0 ± 0.7 (105%)	
B	22.0 ± 1.1* (111%)	22.2 ± 1.2* (112%)	24.0 ± 0.9** (120%)	21.0 ± 0.9 (105%)	
Степень полимеризации фибрина (%) Degree of fibrin polymerization (%)					100 ± 1.1
B	85 ± 3.4*	89 ± 2.2*	89 ± 2.5*	92 ± 2.5*	

Примечание. Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля, принятых за 100%. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Обозначения: АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, ТВ – тромбиновое время, ПВ – протромбиновое время, СФА – суммарная фибринолитическая активность, НФ(ФДПА) – неферментативная фибринолитическая активность, ФФ – ферментативная фибринолитическая активность. Концентрации А – 1 мг/мл, В = 10⁻³ мг/мл.

Note. Statistical indicators are calculated relative to the corresponding control samples taken for 100%. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; Designations: APTT – activated partial thromboplastin time, TT – thrombin time, PT – prothrombin time, SFA – total fibrinolytic activity, NF – non-enzymatic fibrinolytic activity, FF – enzymatic fibrinolytic activity. Concentrations A – 1 mg/ml, B = 10⁻³ mg/ml.

нов, особенно сорта «Коралл» и «Академик Садовничий» по сравнению с контрольным образцом древовидного пиона оказывали значительный антикоагулянтный и ингибиторный по отношению к факторам свертывания крови эффект. Максимальное их действие проявлялось в отношении процесса внутреннего механизма свертывания крови и тромбинообразования (2-й стадии свертывания крови). Это подтверждает данные других авторов [14] о влиянии препаратов коммерческого гепарина животного происхождения на ингибирование активности фермента тромбина. По-видимому, в гибридных пионах вследствие более высокого содержания гепарина и биологически активных соединений и обнаруживаются и более высокие антикоагулянтно-фибринолитические эффекты. Выявлена отчетливая тенденция: поступление в кровь гепариноидов способствовало снижению времени наступления свертывания крови, т.е. предотвращению процессов фибрино- и тромбообразования. Полученные результаты указывают на потенциальные возможности указанных соединений влиять на гемостатические процессы, участвуя в их регуляции и поддержании нормального баланса.

Заключение

На основании полученных данных, где использован специальный подход для выявления влияния биологически активных соединений эндогенного происхождения, выделенных из разных видов гибридных пионов, впервые установлено наличие гепариноидов. Также впервые был доказан факт блокады активности тромбина и внутреннего механизма свертывания крови всех гибридных пионов, а также получены данные по ингибированию внешнего механизма свертывания крови, что свидетельствует о блокаде активности и тканевого фактора свертывания под влиянием гибридных пионов. Сравнимый с ними древовидный пион оказывал влияние в основном на внутренний механизм свертывания крови. Сделан важный вывод об установлении синергического эффекта антикоагулянтов гибридных пионов по сравнению с используемым в скрещивании древовидным пионом. Показан максимальный антикоагулянтный и фибриндеполимеризационный эффекты у гибридных пионов по сравнению с древовидным пионом. Итак, препараты гибридных видов пионов оказывали противосвертывающее действие по внутреннему, внешнему и общему механизмам свертывания крови, в то время как препараты из древовидного пиона ингибировали свертывание крови по внутреннему и частично по общему путям

свертывания крови, не затрагивая внешний механизм свертывания крови.

Таким образом, исследованные нами гепариноиды из гибридных пионов обладают уникальным сочетанным действием на все фазы свертывания крови, повышая антикоагулянтные и фибринолитические свойства плазмы крови, а также ингибируя процессы фибринообразования, приводящего в последующем к тромбозам. Эти гепариноиды могут быть отнесены к терапевтическим средствам с антикоагулянтно-фибринолитическим действием в организме. Наиболее выраженное и устойчивое позитивное действие на организм проявляли гепариноиды, содержащиеся в гибридном пионе «Академик Садовничий».

Литература

(п.п. 2; 4; 6-11 см. References)

1. Бокарев И.Н. *Гематология для практического врача*. 2018. М.: Мед. информ. агентство.
2. Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В., Мелкумян А.Л., Козлов А.А., Нешкова Е.А. и др. *Методы определения активности гепарина: учебно-методическое пособие ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования»*. М.: ГБОУ ДПО РМАПО, 2015.
5. Криштанова Н.А., Сафонова М.Ю., Болотова В.Ц., Павлова Е.Д., Саканян Е.И. Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лечебных и лечебно-профилактических средств. *Вестник ВГУ, Серия: Биология. Химия. Фармация*. 2005; (1): 212–21.
12. Ляпина М.Г., Успенская М.С., Майстренко Е.С. О механизме антикоагулянтного действия экстракта из корней пиона молочноцветкового. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016; (11): 1091-3.
13. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. *Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови*. М.: Адвансед Солюшнз, 2012.
14. Хомутов А.Е., Гинойн Р.В., Лушникова О.В. Динамика изменения показателей тромбозластограммы при введении гепарина. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Биология*. 2008; (5): 81-5.

References

1. Bokarev I.N. *Hematology for the practitioner. [Gematologiya dlya prakticheskogo vracha]*. 2018. Moscow: Medical information agency. (in Russian)
2. Berkovsky A.L., Sergeeva E.V., Suvorov A.V., Melkumyan A.L., Kozlov A.A., Neshkova E.A., et al. *Methods for determining the activity of heparin: teaching aid GBOU DPO «Russian Medical Academy of Postgraduate Education»*. [Metody opredeleniya aktivnosti geparina: uchebno-metodicheskoe posobie GBOU DPO «Rossiyskaya meditsinskaya akademiya poslediplomnogo obrazovaniya»]. Moscow: GBOU DPO RMAPO, 2015. (in Russian)
3. Rabenstein D.I. Heparin and heparin sulfate: structure and function. *Nat. Prod. Rep.* 2002; 19: 312-31.

4. Vazhappilly C.G., Ansari S.A., Al-Jaleeli R., Al-Azawi A.M., Ramadan W.S., Menon V., et al. Flavonoids also reduce the risk of atherosclerosis. *Inflammopharmacology*. 2019; 27(5): 863-69. doi: 10.1007/s10787-019-00612-6
5. Krishtanov N.A., Safonova M.Yu., Bolotova V.Ts., Pavlova E.D., Sakanyan E.I. Prospects for the use of plant polysaccharides as therapeutic and prophylactic agents. *Vestnik VGU, Seriya: Biologiya. Khimiya. Farmatsiya*. 2005; (1): 212–21. (in Russian)
6. Collic-Jouault S., Bavington C., Delbarre-Ladrat C. Heparin-like entities from marine organisms. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2012; 207: 423-49.
7. Owczarek M.P., Matczak M., Kosno M., Szymański P., Mikiciuk-Olasik E., Kilanowicz A., et al. Metabolite profiling of eastern teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) lipophilic leaf extracts with hyaluronidase and lipoxygenase inhibitory activity. *Molecules*. 2017; 22(3): E412–E414.
8. Li J., Chen C.X., Shen Y.H. Effects of total glucosides from peony (*Paeonia lactiflora* Pall) roots on experimental atherosclerosis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2011; 135(2): 469-75. doi: 10.1016/j.jep.2011.03.045
9. Wang Y.Q., Dai M., Zhong J.C., Yin D.K. Paeonol inhibits oxidized low density lipoprotein-induced monocyte adhesion to vascular endothelial cells by inhibiting the mitogen activated protein kinase pathway. *Biol Pharm Bull.* 2012; 35(5): 767-72.
10. Pan L.L., Dai M. Paeonol from *Paeonia suffruticosa* prevents TNF- α -induced monocytic cell adhesion to rat aortic endothelial cells by suppression of VCAM-1 expression. *Phytotherapy Research*. 2009; 16(11): 1027-32. doi: 10.1016/j.phymed.2009.04.003
11. Uspenskaya M.S., Pastorova V.E., Lyapin G.Yu., Smolina T.Yu., Novikov V.S., Lyapina L.A. Antithrombotic agent of extracts from peony roots. *Thrombosis and Haemostasis*, Publ. Schattauer. 1995; 73(6): 1324.
12. Lyapina M.G., Uspenskaya M.S., Maistrenko E.S. On the mechanism of the yanticoagulant action of the extract from the roots of *lactiflora* peony. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2016; 11: 1091-3. (in Russian)
13. Lyapina L.A., Grigoryeva M.E., Obergan T.Yu., Shubina T.A. *Theoretical and practical issues of studying the functional state of the blood anticoagulant system. [Teoreticheskie i prakticheskie voprosy izucheniya funktsional'nogo sostoyaniya protivosvertvyayushchey sistemy krovi]*. Moscow: Advanced Solutions, 2012. (in Russian)
14. Khomutov A.E., Ginoyan R.V., Lushnikova O.V. Dynamics of changes in thromboelastogram indicators with the introduction of heparin. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo. Biologiya*. 2008; (5): 81-5. (in Russian)

Сведения об авторах:

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

Мурашев Владимир Владимирович, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. каф. физиологии растений биологического факультета МГУ, e-mail: ms-uspenskaya@yandex.ru;

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

Майстренко Евгения Семеновна, ст. науч. сотр. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, e-mail: mag238@mail.ru;

Ляпина Людмила Анисимовна, проф., доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, e-mail: lyapinal@mail.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-074:616-053:616.9

Волчков В.А.², Титова О.Н.^{2,3}, Рукавишников С.А.¹⁻³, Ахмедов Т.А.¹⁻³, Пушкин А.С.¹⁻³, Сагинбаев У.Р.^{1,2}, Давыдова Е.П.^{1,2}

Иммунопрофилактика COVID-19 в аспектах разных возрастных групп

¹АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии»,

197110, Санкт-Петербург, Россия, пр. Динамо, д. 3;

²СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2»,
194354, Санкт-Петербург, Россия, Учебный переулок, д. 5;

³ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»,
197022, Санкт-Петербург, Россия, ул. Льва Толстого, д. 6-8

Введение. Согласно данным литературы к ключевым клеткам-мишеням SARS-CoV-2 отнесены эндотелиоциты, в цитоплазме которых происходит репликация вируса. COVID-19 характеризуется сравнительно отсроченным антителообразованием. Организм возрастных людей не может вовремя «завершить» иммунный ответ или нуждается в длительной стимуляции для развития эффективного специфического иммунного ответа из-за общего снижения адаптационного потенциала, что обусловлено старением организма. **Цель работы** – проведение сравнительной оценки количества заболевших, выздоровевших и умерших от COVID-19 в зависимости от прививочного анамнеза среди лиц молодого, среднего, пожилого и старческого возраста, а также долгожителей.

Методика. В исследование включено 1800 пациентов, госпитализированных в СПб ГБУЗ «ГМПБ №2» с 1 по 30 ноября 2021 г. Среди госпитализированных пациентов на долю лиц молодого и среднего возраста приходилось 32,2%, пожилого – 35,8%, старческого – 28,0%, долгожителей – 4,0%. Сформированы следующие группы сравнения: группа пациентов молодого и среднего возраста, группа пациентов пожилого возраста, группа пациентов старческого возраста, группа пациентов-долгожителей. Каждая из групп, в свою очередь, разделена на подгруппы вакцинированных и невакцинированных. Все группы сопоставимы по половому признаку. Прививочный анамнез включал факт иммунопрофилактики против новой коронавирусной инфекции не менее чем за 1 мес до госпитализации вакцинами отечественного производства («Гам-КОВИД-Вак», «ЭпиВак-Корона», «Спутник Лайт»). Применены статистические методы исследования: проведен анализ экстенсивных показателей. **Результаты.** Лица старше 60 лет имеют более высокий риск инфицирования и развития постинфекционных осложнений. Разработанные вакцины способны предотвратить развитие постковидных сосудистых событий путем повышения иммунологической резистентности.

Заключение. Продемонстрирована высокая эффективность вакцинации от COVID-19: иммунопрофилактика позволяет существенно снизить как уровень инцидентности, так и показатели смертности. Обнаружено тяжелое течение COVID-19 у пациентов старшей возрастной группы.

Ключевые слова: вакцинация; патохимия; пожилой и старческий возраст; COVID-19

Для цитирования: Волчков В.А., Титова О.Н., Рукавишников С.А., Ахмедов Т.А., Пушкин А.С., Сагинбаев У.Р., Давыдова Е.П. Иммунопрофилактика COVID-19 в аспектах разных возрастных групп. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(2): 66-71.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.66-71

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Рукавишников С.А.; сбор и обработка материала – Ахмедов Т.А., Пушкин А.С.; подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка – Давыдова Е.П.; написание текста – Сагинбаев У.Р.; редактирование – Волчков В.А., Титова О.Н. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

Для корреспонденции: Сагинбаев Урал Ринатович, e-mail: starosta-mpf@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила 02.04.2022

Принята к печати 31.03.2022

Опубликована 27.05.2022

Volchkov V.A.², Titova O.N.^{2,3}, Rukavishnikova S.A.¹⁻³, Akhmedov T.A.¹⁻³, Pushkin A.S.¹⁻³, Saginbaev U.R.^{1,2}, Davydova E.P.^{1,2}

Immunoprophylaxis COVID-19 in aspects of different age groups

¹St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology,
Prospekt Dynamo, 3, Petersburg 197110, Russian Federation;

²Municipal Multifunctional Hospital #2,
Uchebny Pereulok 5, St., Petersburg 194354, Russian Federation;

³I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University,
L'va Tolstogo St., 6-8, Petersburg 197022, Russian Federation

According to the literature, endotheliocytes are assigned to key target cells of SARS-CoV-2 since virus replication occurs in their cytoplasm. COVID-19 is characterized by relatively delayed antibody formation. The body of aged people cannot “complete” the immune response quickly enough or needs prolonged stimulation to develop an effective specific immune response due to a general age-related decrease in adaptive potential. **The aim** of this study was to compare the number of patients who have recovered or died from COVID-19 depending on the vaccination history among young, middle-aged, late-middle-aged, old, and very old persons.

Methods. In total, the study included 1800 patients hospitalized in St. Petersburg Municipal Multifunctional Hospital #2 from November 1 to 30, 2021. Among hospitalized patients, young and middle-aged people accounted for 32.2%, late-middle-aged 35.8%, old 28.0%, and very old 4.0%. The following comparison groups were formed: 1) young and middle-aged patients; 2) late-middle-aged patients; 3) old patients; and 4) very old patients. Each of the groups, in turn, was divided into subgroups of vaccinated and unvaccinated patients. All groups were sex-matched. The vaccination history included the fact of immunoprophylaxis against the new coronavirus infection at least 1 mo. before hospitalization with vaccines of domestic production (Gam-KOVID-Vak, EpiVakKorona, Sputnik Light). Statistical research methods were applied, and an analysis of extensive indicators was performed.

Results. Persons over 60 yrs. of age had a higher risk of infection and post-infection complications. The vaccines were able to prevent the development of post-COVID vascular events by increasing immunological resistance.

Conclusion. A high efficiency of vaccination against COVID-19 has been demonstrated. Immunoprophylaxis significantly reduced both the rates of incidence and mortality. Severe COVID-19 was found in patients of the older age group.

Keywords: vaccination; pathochemistry; old and senile age; COVID-19

For citation: Volchkov V.A., Titova O.N., Rukavishnikova S.A., Akhmedov T.A., Pushkin A.S., Saginbaev U.R., Davydova E.P. Immunoprophylaxis COVID-19 in aspects of different age groups. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(2): 66-71. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.66-71

Author's contribution: concept and design of the study – Rukavishnikova S.A.; material collecting and processing – Akhmedov T.A., Pushkin A.S.; preparation of illustrative material, statistical processing – Davydova E.P.; writing text – Saginbaev U.R.; text editing – Volchkov V.A., Titova O.N. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

For correspondence: Ural R. Saginbaev, Ph.D., Senior Researcher, St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, 3 Dynamo av., St. Petersburg 197110, e-mail: starosta-mpf@mail.ru

Financing. The study had no sponsorships.

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

Information about the authors:

Volchkov V.A., <https://orcid.org/0000-0002-5664-7386>

Titova O.N., <https://orcid.org/0000-0003-4678-3904>

Rukavishnikova S.A., <https://orcid.org/0000-0002-3105-4322>

Akhmedov T.A., <https://orcid.org/0000-0002-3105-4322>

Pushkin A.S., <https://orcid.org/0000-0003-2875-9521>

Saginbaev U.R., <https://orcid.org/0000-0001-9709-1882>

Davydova E.P., <https://orcid.org/0000-0002-2702-9394>

Received 02.04.2022

Accepted 31.03.2022

Published 27.05.2022

В настоящее время наиболее действующим инструментом борьбы против COVID-19 является вакцинопрофилактика [1]. К сожалению, часть населения относится весьма настороженно и даже негативно к иммунопрофилактике. Это приводит к замедлению темпов вакцинации и, следовательно, достижения кол-

лективного иммунитета [2] вследствие чего заболеваемость и смертность остаются на высоком уровне [3]. Известно, что к группе риска по многим заболеваниям и патологическим состояниям относятся лица старшей возрастной группы [4]. Но, в то же время, рядом авторов неоднократно отмечается, что люди старшей воз-

растной категории тяжелее переносят вакцинацию [5]. В настоящее время проводится мониторинг эффективности как вакцинации в целом, так и отдельных иммунобиологических препаратов [6]. Весьма актуальным остается изучение данного вопроса в возрастном аспекте: оценить эффективность иммунопрофилактики в разрезе разных возрастных групп [7].

Пандемия приводит к огромным человеческим потерям. Проникновение вирусных частиц в организм приводит к комплексным морфофункциональным нарушениям практически всех систем организма и в первую очередь страдают системы жизнеобеспечения -- сердечно-сосудистая, дыхательная, мочевыделительная и др. [8]. Согласно данным литературы к ключевым клеткам-мишеням SARS-CoV-2 отнесены эндотелиоциты, в цитоплазме которых происходит репликация вируса [9]. Описываемая инфекционная болезнь характеризуется сравнительно отсроченным антителообразованием [10].

У лиц пожилого и старческого возраста, относящихся к категории повышенного риска развития тяжелой инфекционной патологии, заболевание протекает тяжелее, чем у молодых [11]. Предполагается, что организм возрастных людей не может вовремя «завершить» иммунный ответ или нуждается в длительной стимуляции для развития эффективного специфического иммунного ответа из-за общего снижения адаптационного потенциала, что обусловлено старением организма. Из этого следует, что длительный период времени после заражения макроорганизм может противостоять внедрению и генерализации вируса только с помощью медленно усиливающегося неспецифического иммуновоспалительного ответа. Описанный сценарий способствует риску инициации «цитокинового шторма», раннему началу тяжелой формы заболевания и более высокой смертности [12].

С возрастом повышается уровень липопротеинов низкой плотности, характеризующихся проатерогенным действием [13]. Следует отметить, что у людей пожилого и старческого возраста часто наблюдается дисбаланс биологически активных веществ, обусловленный влиянием ряда факторов, в том числе феномена «возрастного десинхроноза». Так, фоновая концентрация провоспалительного цитокина, интерлейкина-6, оказалась повышенной у лиц старшей возрастной группы [14]. Сочетание дислипидемии и провоспалительного потенциала способствует развитию неблагоприятных сосудистых событий на фоне COVID-19.

Немаловажный вклад в исход заболевания вносит феномен полиморбидности, часто наблюдаемый у лиц старшей возрастной группы. Коронавирусная инфекция способна отягощать имеющуюся патологию и вызывать развитие оппортунистических болезней. Так,

к частым сопутствующим патологическим состояниям относят: гипертонию (21,1%), сахарный диабет (9,7%), кардиоваскулярные болезни (8,4%) и заболевания респираторного тракта (1,5%) [15]. Следовательно, предотвращение инфицирования новой коронавирусной инфекцией людей пожилого и старческого возраста относится к наиболее важной задаче современной профилактической медицины. Так как, с одной стороны, применение иммунобиологических препаратов снижает вероятность инфицирования, а с другой, существенно снижает риски развития осложнений [16].

Цель исследования – оценка влияния вакцинопрофилактики на тяжесть заболевания COVID-19 у лиц разных возрастных групп.

Методика

Проведена сравнительная оценка количества заболевших, выздоровевших и умерших от COVID-19 в зависимости от прививочного анамнеза среди лиц молодого и среднего (18-59 лет), пожилого (60-74 лет) и старческого (75-89 лет) возраста, а также долгожителей (90 лет и старше). Всего в исследование включено 1800 пациентов (700 мужчин (38,9%) и 1100 женщин (61,1%)), госпитализированных в СПб ГБУЗ «ГМПБ №2» с 1 по 30 ноября 2021 года. Среди госпитализированных пациентов на долю лиц молодого и среднего возраста приходилось 32,2%, пожилого – 35,8%, старческого – 28,0%, долгожителей – 4,0%. Сформированы следующие группы сравнения: группа пациентов молодого и среднего возраста (М-группа), группа пациентов пожилого возраста (П-группа), группа пациентов старческого возраста (С-группа), группа пациентов-долгожителей (Д-группа). Каждая из групп, в свою очередь, разделена на подгруппы вакцинированных (МВ-, ПВ-, СВ- и ДВ-подгруппы) и невакцинированных (МН-, ПН-, СН- и ДН-подгруппы). Все группы сопоставимы по половому признаку.

Прививочный анамнез включал факт иммунопрофилактики против новой коронавирусной инфекции не менее чем за 1 мес до госпитализации вакцинами отечественного производства («Гам-КОВИД-Вак», «ЭпиВакКорона», «Спутник Лайт»). Применены статистические методы исследования: проведен анализ экстенсивных показателей.

Результаты и обсуждение

Анализ доли привившихся пациентов показал, что удельный вес вакцинированных, среди госпитализированных пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением заболевания, составил не более 25%, в то же время по официальным данным полный цикл

вакцинирования в Санкт-Петербурге завершило около 60% жителей [17]. Таким образом, вакцинирование снизило количество обращений в стационар пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением.

Стоит отметить, что с возрастом доля госпитализированных больных, прошедших курс вакцинации снизилась (**рис. 1**).

Высокая эффективность вакцинации продемонстрирована в анализе исходов новой коронавирусной инфекции у пациентов разных возрастов. Так, из **рис. 2** видно, что во всех возрастных группах удельный вес выписанных пациентов выше среди вакцинированных по сравнению с группой не прошедших курс иммунопрофилактики.

Кроме того, из графика видно, что с возрастом увеличивается доля неблагоприятного исхода как среди вакцинированных, так и не вакцинированных. Причем летальность среди лиц, не прошедших курс иммунопрофилактики на порядок выше. Примечательно, что закономерность между исходом и прививоч-

ным анамнезом четко видна на «внутристолбиковой» диаграмме. Так, во всех возрастных группах летальный исход заболевания существенно выше у невакцинированных пациентов, причем доля летальных исходов закономерно возрастала с возрастом: если у лиц молодого возраста доля умерших среди не вакцинированных составляла 7,9%, то у пациентов старческого возраста и долгожителей аналогичный показатель составлял 36,6% и 58,8% соответственно. Иными словами, удельный вес летальных исходов имел неблагоприятную возрастающую тенденцию и вырос в 7,4 раза.

Аналогичная «возраст-зависимая» тенденция наблюдалась и среди вакцинированных лиц. Однако, стоит отметить, что доля смертельных случаев была на порядок ниже по сравнению с пациентами с положительным прививочным анамнезом. Так, у лиц молодого возраста удельный вес летальных исходов был в 2,8 раза ниже по сравнению с не вакцинированными, у пожилых – в 2,9 раза, у старческих – в 1,6 раз, у долгожителей – в 2,4 раза.



Рис. 1. Структура прививочного анамнеза у пациентов разных возрастных групп (a, b, c, d) госпитализированных в стационар (в %).

Fig. 1. The structure of the vaccination history in patients of different age groups (a, b, c, d) hospitalized in a hospital (in %).

Возрастные особенности течения и исхода новой коронавирусной инфекции являются следствием ряда причин, таких как нейроэндокринная дисрегуляция, возрастной десинхроноз, хроническое воспаление, феномен «цитокинового шторма» [18]. Перечисленные явления сопровождаются морфофункциональными изменениями иммунной, нервной, эндокринной систем [19]. Возникает дисбаланс между про- и противовоспалительными цитокинами, нарушаются процессы дифференцировки иммунных клеток. Это приводит к нарушениям специфического звена иммунитета. Стоит также отметить о нарушении трофики тканей и органов, в том числе барьерных. Это, в свою очередь, приводит к ослаблению факторов неспецифической защиты.

У пациентов старше 60 лет разрешены к применению вакцины «Гам-КОВИД-Вак», «ЭпиВакКорона», «Спутник Лайт». Возрастные ограничения по применению вакцин у людей старших возрастных групп будут в дальнейшем корректироваться по мере проведения новых клинических исследований и публикаций полученных новых данных в литературе [20].

Проводить вакцинацию против новой коронавирусной инфекции пока следует без учета данных гуморального иммунитета, поскольку на сегодня нет утвержденного маркера (определенной протективной концентрации антител). На настоящий момент проводится разработка данного параметра [18].

Важно подчеркнуть и об отдаленных последствиях перенесенной вирусной инфекции. Многие респираторные вирусные инфекции усугубляют течение соматических болезней, в том числе возраст-ассоциированных [4]. Например, ряд авторов отмечает, что при COVID-19 имеют место серьезные сосудистые осложнения, связанные с нарушениями функций свертывающей, противосвертывающей и фибринолитической систем [11]. Равновесие гемостаза смещается в сторону протромботического потенциала, что чревато развитием тромбозов и тромбоэмболий. Описанные патогенетические звенья способствуют прогрессированию таких возраст-ассоциированных заболеваний, как гипертоническая болезнь, атеросклероз [19]. Сердечно-сосудистая недостаточность приводит также к когнитивным расстройствам.

Заключение

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало высокую эффективность вакцинации от новой коронавирусной инфекции, что согласуется с данными научной литературы. Иммунопрофилактика позволяет существенно снизить не только уровень инцидентности, но и показатели смертности от вирусного заболевания.

Данная работа однозначно подчеркивает тяжелое течение COVID-19 у пациентов старшей возрастной

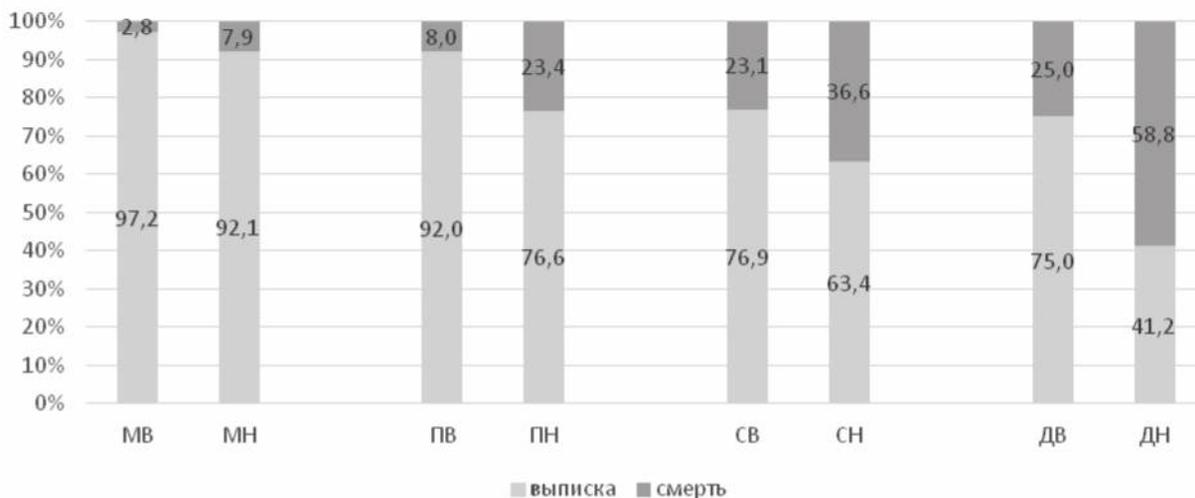


Рис. 2. Структура исхода заболевания у лиц разных возрастных групп в зависимости от прививочного анамнеза; светлая часть столбиков – выписка из стационара, темная – летальный исход (%); МВ – молодые вакцинированные, МН – молодые не вакцинированные; ПВ и ПН – пожилые, СВ и СН – старые, ДВ и ДН – долгожители – вакцинированные и не вакцинированные, соответственно

Fig. 2. The structure of the outcome of the disease in persons of different age groups, depending on the vaccination history; the light part of the columns – is an extract, the dark part – is a lethal outcome (%). Patients: М – Young, П – elderly, С – old, Д – long-lived. В – patients vaccinated, Н – not vaccinated

группы. Лица пожилого и старческого возраста относятся к группе риска и нуждаются в иммунопрофилактике в приоритетном порядке. Также важно помнить об отдаленных последствиях коронавирусной болезни, связанных с прогрессированием хронических возраст-ассоциированных заболеваний.

Литература

(п.п. 1; 6–9; 11–14; 16–18 см. References)

2. Ткачева О.Н., Переверзев А.П., Рунихина Н.К., Котовская Ю.В. К вопросу о безопасности вакцинации против гриппа пациентов пожилого и старческого возраста. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2018; 6(4): 155–61.
3. Кураков Ф.А., Цветкова Л.А. Оценка перспектив разработки вакцины от коронавирусной инфекции средствами патентного анализа. *Менеджер здравоохранения*. 2020; 4: 52–7.
4. Веселов Ю.В., Чернов Г.И. Питание пожилых: социологический аспект. *Успехи геронтологии*. 2020; 5(33): 879–84.
5. Костинов М.П., Свитич О.А., Маркелова Е.В. *Потенциальная иммунопрофилактика COVID-19 у групп высокого риска инфицирования. Временное пособие для врачей*. М.: Группа МДВ, 2020.
10. Рукавишников С.А., Ахмедов Т.А., Пушкин С.А., Сагинбаев У.Р. Гематологические показатели как предикторы исхода новой коронавирусной инфекции COVID-19 у
15. Торгашов М.Н., Мякотных В.С. Стресс-индуцированная патология и ускоренное старение. *Успехи геронтологии*. 2019; 4(32): 402–501.
19. Шамшева О.В. Новый коронавирус COVID-19 (SARS-CoV-2). *Детские инфекции*. 2020; 19(1): 5–6.

References

1. Long Q. X., Tang X.-J., Shi Q.-L. et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat. Med.* 2020; 26: 1200–4.
2. Tkacheva O.N., Pereverzev A.P., Runihina N.K., Kotovskaja Ju.V. On the safety of influenza vaccination for elderly and senile patients. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii*. 2018; №6(4): 155–161. (in Russian)
3. Kurakov F.A., Cvetkova L.A. Evaluation of the prospects for developing a vaccine for coronavirus infection by patent analysis. *Menedzher zdravooohraneniya*. 2020; 4: 52–7. (in Russian)
4. Veselov Ju.V., Chernov G.I. Nutrition of the elderly: sociological aspect. *Uspekhi gerontologii*. 2020; 5(33): 879–84. (in Russian)
5. Kostinov M.P., Svitich O.A., Markelova E.V. Potential COVID-19 immunoprophylaxis in high-risk groups. М.: Gruppa MDV, 2020, 60.6. Krammer F., Simon V. Serology assays to manage COVID-19. *Science*. 2020; 368(6495): 1060–1. (in Russian)
7. Jing Yang, Ya Zheng, Xi Gou Prevalence of comorbidities and its effects in coronavirus disease 2019 patients: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* 2020; 94: 91–5.
8. Adu-Amankwaah J., Mprah R., Adekunle A.O., et al. The cardiovascular aspect of COVID-19. *Ann Med.* 2021; 53(1): 227–36.
9. Libby P, Luscher T. COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. *Eur Heart J.* 2020; 41(32):3038–44.
10. Rukavishnikova S.A., Ahmedov T.A., Pushkin S.A., Saginbaev U.R. Hematological indicators as predictors of outcome of new coronavirus COVID-19 infection in patients of different age groups. *Vrach.* 2020; 7: 33–6. (in Russian)
11. Rokni M., Ghasemi V., Tavakoli Z. Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: Comparison with SARS and MERS. *Rev Med Virol.* 2020; 30(3): 2107.
12. Bassetti M. The Novel Chinese Coronavirus (2019-nCoV) Infections: challenges for fighting the storm. *Eur. J. Clin. Invest.* 2020; 50(3): 13209.
13. Ku Y.C. Relationship between vitamin D deficiency and cardiovascular disease. *World J. Cardiol.* 2013; 9: 337–46.
14. Sun B., Feng Y., Mo X., et al. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect.* 2020; 9(1): 940–8.
15. Torgashov M.N., Mjakotnyh V.S. Stress-induced pathology and accelerated aging. *Uspekhi gerontologii*. 2019; 4(32): 402–501. (in Russian)
16. Hussin A.R., Sidappa N.B. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J. Autoimmun.* 2020; 109: 44–8.
17. Tan Y., Liu F., Xu X. et al. Durability of neutralizing antibodies and T-cell response post SARS-CoV-2 infection. *Front Med.* 2020; 5: 1–6.
18. Amraei R., Rahimi N. COVID-19, Renin-Angiotensin System and Endothelial Dysfunction. *Cells.* 2020; 9(7): 1652.
19. Shamsheva O.V. New coronavirus COVID-19 (SARS-CoV-2). *Detskie infektsii*. 2020; 19(1): 5–6. (in Russian)

Сведения об авторах:

Волчков В.А., доктор мед. наук, проф., заслуженный врач РФ, гл. врач СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2», e-mail: Volchkovva@mail.ru;

Титова О.Н., доктор мед. наук, проф., директор НИИ пульмонологии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России, e-mail: titovaon@spb-gmu.ru;

Рукавишников С.А., доктор биол. наук, доцент, вед. науч. сотр. АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», e-mail: kdlb2@yandex.ru;

Ахмедов Т.А., канд. мед. наук, доцент, ст. науч. сотр. АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», e-mail: timaxm@mail.ru;

Пушкин А.С., доктор биол. наук, доцент, ст. науч. сотр. АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», e-mail: pushkindoc@mail.ru;

Сагинбаев У.Р., канд. биол. наук, ст. науч. сотр. АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», e-mail: starosta-mpf@mail.ru;

Давыдова Е.П., науч. сотр. АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», e-mail: elenadavydova2000@yandex.ru

Обзоры

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092.18-616.01/-099

Литвицкий П.Ф.¹, Галимов К.Ш.¹, Громенко Ю.Ю.², Галимова С.Ш.³, Гилязова И.Р.^{3,4}, Галимова Э.Ф.³, Павлов В.Н.³

Роль митохондрий сперматозоидов в возникновении и развитии мужского бесплодия

¹ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет),

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

²Медицинский центр «Семья»,

450075, Уфа, Россия, проспект Октября, д. 73/1;

³ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России,

450008, Уфа, Россия, ул. Ленина, д. 3;

⁴Институт биохимии и генетики ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук,

450054, Уфа, Россия, проспект Октября, д. 71

Цель обзора – анализ современных данных о роли митохондрий сперматозоидов в возникновении и развитии репродуктивных форм патологии. Митохондрии занимают центральное место в метаболизме сперматозоидов. Это обусловлено их участием в синтезе макроэргических фосфатов и поддержании окислительно-восстановительного потенциала; регуляции скорости их пролиферации, дифференцировки, апоптоза и митофагии; генерации активных форм кислорода; реализации внутриклеточного сигналинга и других процессов, обеспечивающих подвижность жгутиков, капацитацию, акросомальную реакцию, активацию ооцитов и слияние гамет. В большинстве случаев изменения этих функций ассоциированы с субфертильностью и/или бесплодием. Продемонстрирована также тесная связь между митохондриальным геномом, протеомом, метаболомом и оплодотворяющей способностью сперматозоидов. Выявлены ключевые белки митохондрий (АТФ-синтаза, аденилаттранслоказа, аденилаткиназа 1, изоцитратдегидрогеназа 3β, аконитатгидратаза, фумаратгидратаза, пируватдегидрогеназный комплекс, сиртуины, пероксиредоксины и др.), участвующие в репродуктивном процессе. Показана корреляция aberrантной экспрессии генов этих белков с ухудшением качественных и количественных характеристик эякулята. Доказана облигатная роль в метаболизме сперматозоидов таких энергетических субстратов митохондрий как лактат и длинноцепочечные жирные кислоты. Вместе с тем, высокая пластичность митохондрий, сравнительно легко модулирующих свою локализацию, форму и метаболическую активность, затрудняет однозначную интерпретацию имеющегося в настоящее время массива фактических данных об их функциях. Расшифровка молекулярно-генетических механизмов нарушения структуры митохондрий и их дисфункции может стать основой для разработки эффективных методов диагностики и таргетной терапии мужского бесплодия.

Ключевые слова: мужское бесплодие; сперматозоиды; митохондрии; протеом; окислительное фосфорилирование; активные формы кислорода; апоптоз

Для цитирования: Литвицкий П.Ф., Галимов К.Ш., Громенко Ю.Ю., Галимова С.Ш., Гилязова И.Р., Галимова Э.Ф., Павлов В.Н. Роль митохондрий сперматозоидов в возникновении и развитии мужского бесплодия. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(2): 72-79.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.72-79

Участие авторов: концепция и дизайн работы – Литвицкий П.Ф.; сбор данных – Галимов К.Ш., Гилязова И.Р.; анализ и интерпретация данных – Громенко Ю.Ю., Галимова С.Ш.; написание статьи – Галимова Э.Ф.; редактирование статьи – Павлов В.Н. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Галимова Эльмира Фанисовна, e-mail: efgalimova@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.02.2022

Принята в печать 31.03.2022

Опубликована 27.05.2022

Litvitskiy P.F.¹, Galimov K.Sh.¹, Gromenko J.Y.², Galimova S.Sh.³, Gilyazova I.R.^{3,4}, Galimova E.F.³, Pavlov V.N.³

The role of sperm mitochondria in occurrence and development of male infertility

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),

Trubetskaya St., Bldg. 2, Moscow 119991, Russian Federation;

²Medical Center «Family»,

Prospekt Oktyabrya 73/1, Ufa 450075, Russian Federation;

³Bashkir State Medical University,

Lenina St. 3, Ufa 450008, Russian federation;

⁴Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences,

Prospekt Oktyabrya 71, Ufa 450054, Russian Federation

The aim of this review was to analyze current data on the role of sperm mitochondria in the occurrence and development of reproductive pathologies. Mitochondria play a major role in the sperm metabolism due to their participation in the synthesis of high-energy phosphates; maintenance of redox potential; regulation of the sperm proliferation rate, differentiation, apoptosis, and mitophagy; generation of reactive oxygen species; implementation of intracellular signaling, and other processes that ensure flagella motility, capacitation, acrosomal reaction, oocyte activation, and gamete fusion. In most cases, changes in these functions are associated with subfertility and/or infertility. A close relationship between the mitochondrial genome, proteome, metabolome, and sperm fertility has also been demonstrated. The key mitochondrial proteins (ATP synthase, adenylate translocase, adenylate kinase 1, isocitrate dehydrogenase 3 β , aconitate hydratase, fumarate hydratase, pyruvate dehydrogenase complex, sirtuins, peroxiredoxins, etc.) involved in the reproductive process were identified. Correlations were found between the aberrant gene expression of these proteins and the deterioration of qualitative and quantitative characteristics of the ejaculate. The obligate role in sperm metabolism of mitochondrial energy substrates, such as lactate and long-chain fatty acids, has been proved. At the same time, the high plasticity of mitochondria, which relatively easily modulate their localization, shape, and metabolic activity, makes it difficult to interpret unambiguously the currently available body of facts on their functions. Deciphering the molecular genetic mechanisms of mitochondrial structural disorders and dysfunction may become a basis for development of effective diagnostic methods and targeted therapy for male infertility.

Keywords: male infertility; spermatozoa; mitochondria; proteome; oxidative phosphorylation; reactive oxygen species; apoptosis

For citation: Litvitskiy P.F., Galimov K.Sh., Gromenko J.Yu., Galimova S.Sh., Gilyazova I.R., Galimova E.F., Pavlov V.N. The role of sperm mitochondria in the occurrence and development of male infertility. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(2): 72-79. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.72-79

Author's contribution: research concept and design – Litvitskiy P.F.; data collection – Galimov K.Sh., Gilyazova I.R.; data analysis and interpretation – Gromenko J.Yu., Galimova S.Sh.; article writing – Galimova E.F.; article editing – Pavlov V.N. Approval of the final version of the article, for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

For correspondence: Galimova Elmira Fanisovna, Doctor of medical sciences, associate professor; FSBEI HE «Bashkir State Medical University», 3 Lenina str., 450008, Ufa, Russia, e-mail: efgalimova@mail.ru

Financing. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:

Litvitskiy P.F., <https://orcid.org/0000-0003-0151-9114>Galimov K.Sh., <https://orcid.org/0000-0002-0148-4380>Gromenko J.Y., <https://orcid.org/0000-0002-3373-0873>Galimova S.Sh., <https://orcid.org/0000-0002-7865-8326>Gilyazova I.R., <https://orcid.org/0000-0001-9499-5632>Galimova E.F., <https://orcid.org/0000-0002-3351-7669>Pavlov V.N., <https://orcid.org/0000-0003-2125-4897>.

Received 15.02.2022

Accepted 31.03.2022

Published 27.05.2022

Мужское бесплодие является глобальной проблемой современного здравоохранения [1]. Оно выявляется в различных странах мира в среднем у 15 % мужчин репродуктивного возраста. В период с 1990 по 2017 г.

стандартизированная по возрасту распространенность этой формы патологии ежегодно увеличивалась на 0,291% [2]. В настоящее время у каждого двадцатого молодого мужчины количество сперматозоидов недо-

статочны для нормального выполнения функции воспроизводства, тогда как в прежние годы такого не наблюдалось [3]. В России число мужчин с бесплодием за последние два десятилетия увеличилось более чем в 2 раза [4].

Конкретные причины и механизмы ухудшения репродуктивного здоровья мужчин исследованы недостаточно, несмотря на интенсивную разработку этой проблемы [5-7]. Количество статей, индексированных в PubMed по этой тематике, превысило 53000, в том числе почти 20000 из них за последнее десятилетие (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=male+infertility>). Так, активно изучаются аспекты диагностики и лечения мужского бесплодия на генетическом, молекулярном и клеточном уровнях. Сдвиг парадигмы к протеомным, транскриптомным и т.п. исследованиям выявил несколько кандидатов на роль биомаркеров, которые ассоциированы с многочисленными причинами бесплодия. В то же время, еще не достигнуто значительного прогресса в ответах на фундаментальные вопросы андрологии, а также в разработке надежных методов диагностики и эффективных стратегий ведения пациентов после интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ИКСИ) и других процедур ЭКО.

Одним из таких нерешенных вопросов является роль и место митохондрий сперматозоидов в генезе репродуктивных нарушений. В фокусе научных поисков причин и механизмов дисфункции митохондрий, в том числе при бесплодии, находятся 3 основных направления: расстройства энергетического обеспечения, окислительного стресса и апоптоза сперматозоидов.

Энергетическое обеспечение сперматозоидов: источники, субстраты и дисфункция. Роль митохондрий в энергетическом обеспечении сперматозоидов является предметом дискуссий [8, 9]. Синтез АТФ в сперматозоидах млекопитающих осуществляется двумя путями: в процессе гликолиза и тканевого дыхания. Поскольку окислительное фосфорилирование намного эффективнее гликолиза, считается, что АТФ, необходимый для подвижности сперматозоидов, образуется преимущественно в митохондриях.

Сперматозоиды млекопитающих эволюционировали под непрерывным давлением естественного отбора, что привело к сильно поляризованной и эффективной конструкции. Важнейшим её компонентом является компартиментализация специфических метаболических путей в различных областях клетки [10]. Хотя ограниченная локализация митохондрий в средней части является наиболее известным примером этой конструкции, организация ферментов гликолиза вдоль фиброзной оболочки заслуживает отдельного рассмотрения.

Эволюция вариантов этих метаболических систем позволила им функционировать совместно и согласованно, обеспечивая локализованное производство энергии.

Нормальный сперматозоид в среднем содержит от 72 до 80 митохондрий [11], образующих трубчатые структуры, которые спирально распределены вокруг передней части аксонемы, формируя среднюю часть. Поскольку жгутик сперматозоида длинный и тонкий, а локация митохондрий ограничена его проксимальным концом, закономерен вопрос, может ли АТФ, полученный при окислительном фосфорилировании, диффундировать через весь жгутик для эффективной поддержки активности аксонемы.

В гаметях некоторых животных, например, морского ежа, диффузия АТФ вдоль жгутика происходит благодаря челночному механизму с участием креатинфосфата, который обеспечивает оптимальное соотношение АТФ/АДФ благодаря дуэту креатинфосфат/креатин. Однако в сперматозоидах млекопитающих отсутствует или содержится лишь небольшое количество креатинфосфата и других фосфагенов [12], что делает маловероятным участие этого челнока в транспорте АТФ в аксонему. Показано также, что сперматозоиды мышей с нокаутом гена митохондриальной изоформы креатинкиназы демонстрировали сходные паттерны подвижности с контрольными образцами дикого типа [13].

Эти и другие факты явились основанием для смещения акцента с окислительного фосфорилирования как единственного «поставщика» макроэргов на гликолиз. Анаэробное окисление глюкозы (и фруктозы) сохраняет оптимальный профиль внутрифлагеллярной концентрации адениловых нуклеотидов в дистальной части жгутика. Важно, что в качестве субстратов гликолиза при необходимости могут использоваться моносахариды, образованные в ходе глюконеогенеза, для стимуляции которого используется АТФ митохондриального происхождения, т.е. гликолиз и тканевое дыхание метаболически и пространственно тесно связаны [14].

Основным субстратом метаболизма мужских гамет, особенно зародышевых клеток, на протяжении всего их развития, является лактат [15]. Он поступает из клеток Сертоли и используется развивающимися зародышевыми клетками в качестве основного энергетического субстрата, кроме того, лактат оказывает антиапоптотическое действие на всех этапах сперматогенеза. В зрелых сперматозоидах молочная кислота инициирует в них тканевое дыхание и стимулирует двигательную активность благодаря трансферу в митохондрии, где она быстро окисляется [16]. Именно поэтому лактат является оптимальным субстратом для сперматозоидов даже при наличии глюкозы и фруктозы.

Детальный анализ аспектов биоэнергетики [17, 18] позволил обобщить результаты исследований, выполненных в разных лабораториях и сделать заключение о том, что: во-первых, и гликолиз, и дыхание важны для успешного оплодотворения; во-вторых, генерация энергии в сперматозоидах может быть ограничена процессом либо гликолиза, либо тканевого дыхания, либо их комбинацией в зависимости от окружающих условий и наличия соответствующих субстратов; в-третьих, гликолитический путь энергообеспечения преобладает при гиперактивации/капацитации, окислительное фосфорилирование — при созревании/дифференцировке сперматозоидов.

Существует еще один, неканонический, путь эндогенной подпитки сперматозоидов, наиболее активный в его хвостовой части. При анализе субклеточного протеома жгутика сперматозоида человека с помощью жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии идентифицировано более тысячи белков, большая часть которых ранее не были описаны [19]. Классификация белков по их функциям выявила 2 основные группы: белки-участники процессов метаболизма и производства энергии, и белки, связанные со структурой жгутика и подвижностью сперматозоидов. Важно, что большую часть метаболического протеома составляют ферменты обмена липидов, в том числе β -окисления. Были выделены также пероксисомные белки, которые участвуют в окислении длинноцепочечных жирных кислот. Эти результаты были позднее подтверждены методом ПМР-спектроскопии [20]. Анализ полученных сведений с помощью базы данных Reactome показал, что использование жирных кислот в качестве клеточного «топлива» в гаметях более значимо, чем считалось ранее. В пользу этого свидетельствует феномен подавления подвижности сперматозоидов при их инкубации с ингибитором окисления жирных кислот этомоксиром. Эти факты, вопреки ранее принятому мнению, поддерживают гипотезу о способности сперматозоидов получать энергию в митохондриях с использованием эндогенного пула липидов и, таким образом, адаптироваться к экзогенным колебаниям уровня других субстратов [21].

В целом, ресинтез АТФ в сперматозоидах базируется на 3 процессах (гликолиза, окислительного фосфорилирования, β -окисления) и 4 субстратах (глюкозе, лактате, фруктозе, жирных кислотах). Конкретный вклад указанных процессов и субстратов в общий баланс энергии в сперматозоиде в норме и патологии интенсивно изучается.

В серии «омиксных» исследований, выполненных в последнее время, получены доказательства ведущей роли в развитии тяжелых форм мужского бесплодия абер-

рантной экспрессии белков митохондрий, причастных, прежде всего, к энергопродукции, регуляции апоптоза и митофагии [22–27]. Так, у пациентов с повторными неудачными исходами оплодотворения после ИКСИ выявлены множественные дефекты митохондриальных белков: ферментов пируватдегидрогеназного комплекса (дигидролипоилтрансацилазы — DLAT, пируватдегидрогеназы — PDHA) и цикла трикарбоновых кислот (фумаратгидратазы — FH); АТФ-синтазы (дельта-субъединицы F_1 -компонента — ATP5F1D и D-субъединицы F_0 -компонента — ATP5H); переносчика фосфат-ионов (SLC25A3); транслоказы адениловых нуклеотидов (ANT4); прохибитина 2-го типа (PHB2) и др. [22]. Два последних белка, помимо основных функций, вовлечены в процессы регуляции жизненного цикла сперматозоидов. Первый путем индукции апоптоза посредством активации каспаз и деградации ДНК, второй — путем убиквитинирования митохондрий сперматозоидов и их клиренса в яйцеклетке после оплодотворения [28, 29]. Показано также, что у этой категории пациентов снижена экспрессия аденилаткиназы 1 и аконитазы 2, митохондриальных ферментов, критически важных участников энергетического метаболизма сперматозоидов [25].

Оценка доступных в открытых источниках транскриптомных данных по всему спектру нарушений мужской репродуктивной функции, включая необструктивную и обструктивную азооспермию, их комбинацию, а также микроделецию Y-хромосомы, для идентификации дифференциально экспрессированных генов и их продуктов, дала возможность верифицировать потенциальные маркерные белки идиопатического бесплодия [27]. Авторами подтверждена патогенетическая значимость пируватдегидрогеназного комплекса и ансамбля ассоциированных с ним белков, 13 из которых вовлечены в энергетический метаболизм (спермспецифическая лактатдегидрогеназа C, аденилаттранслоказа ANT4, F_0 -компонент и альфа-субъединица F_1 -компонента АТФ-синтазы, транслоказа внутренней мембраны митохондрий — TIM4 и др.).

Митохондрии как центр сопряжения окислительного стресса и апоптоза. Апоптозоподобные явления могут быть индуцированы в сперматозоиде человека различными стимулами, не опосредованными рецепторами. Это в конечном итоге приводит к инициации окислительного стресса, как было показано для воздействия электромагнитного излучения, криохранения и прямого добавления перекиси водорода [30]. Ключевым событием, способствующим усеченному (митохондриальному) апоптотическому каскаду, является ингибирование сигнального пути фосфатидилинозитол-3-киназы [31]. В работе подчеркивается до-

минирующее положение пероксиредоксина-6 (PDX6) в поддержании нативного фосфорилированного статуса фосфатидилинозитол-3-киназы как фактора выживаемости сперматозоидов путем контроля апоптоза.

Важно, что хотя активные формы кислорода (АФК) можно считать триггером митохондриального пути апоптоза, последний непосредственно связан с окислительным стрессом, создавая порочный круг. Как было продемонстрировано на различных клеточных линиях, высвобождение цитохрома с в цитозоль оказывает прооксидантное действие, поскольку оно вызывает утечку электронов в дыхательной цепи и увеличение концентрации супероксид-аниона. Это может объяснить факт одновременного появления признаков митохондриальной генерации свободных радикалов кислорода и апоптоза сперматозоидов, связанных с активацией каспазы-9 и каспазы-3 в условиях, способствующих потере трансмембранного потенциала $\Delta\Psi_m$ [8].

Низкие уровни АФК продуцируются сперматозоидами человека и участвуют в физиологических процессах, таких как фосфорилирование тирозина и гиперактивация сперматозоидов при оплодотворении [30]. Неконтролируемое нарастание образования АФК ведет к повреждению мембран и генома сперматозоидов. Этот процесс инициируется гидроксильным радикалом $OH\cdot$ как наиболее реакционноспособной молекулой благодаря наличию неспаренного электрона и сопровождается окислением липидов биологических мембран, аминокислот в белках и углеводов в нуклеотидах. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) начинается с дегидрирования мембранных жирных кислот, что приводит к образованию углеводородных радикалов, которые быстро реагируют с кислородом. Образующийся пероксидный радикал для стабилизации отщепляет атом водорода от соседней жирной кислоты, формируя новый углеводородный радикал, который запускает цепную реакцию в липидах мембран. В результате накапливаются цитотоксические аддукты, такие как малоновый диальдегид, акролеин и 4-гидроксиноненаль, влияющие на текучесть мембран и их способность к слиянию -- обязательных условий акросомальной реакции и взаимодействия сперматозоидов с яйцеклеткой [32]. Механизм действия вторичных дериватов свободнорадикального окисления сводится к повреждению ферментов дыхательной цепи, что стимулирует самовоспроизводящийся цикл наработки АФК. Оксид азота также входит в группу агрессивных форм кислорода, к которым относятся пероксинитритные, нитроксильные и нитрозильные соединения. Продукт реакции оксида азота с супероксидом - пероксинитрит вызывает гиперактивацию полиАДФ-рибозилполимеразы с истощением внутрикле-

точного НАД, нарушением репарации ДНК и экспоненциальным разрушением сперматозоидов [33].

Хотя процедура ИКСИ позволяет преодолеть последствия повреждений мембранных структур, окисление пуриновых/пиримидиновых оснований и дезоксирибозного остова нарушает целостность ДНК сперматозоидов, ставя под угрозу их жизнеспособность и вклад отцовского генома в развитие эмбриона. В частности, АФК, доставляемые из митохондрий, могут быстро перемещаться в головку сперматозоида, повреждая нуклеиновые кислоты. Наблюдается образование аберрантных оснований типа 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина как маркера деструкции ДНК, а также модификация других азотистых оснований, индукция поперечных сшивок или одно- и двунитевых разрывов ДНК с последующей деконденсацией хроматина.

Сперматозоиды особенно уязвимы к окислительному стрессу из-за особенностей их клеточной архитектуры и биохимического состава [30]. Высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в мембране сперматозоидов повышает восприимчивость к перекисному окислению. ПНЖК, с одной стороны, необходимы для поддержания текучести мембран сперматозоидов, с другой -- являются мишенью для свободных радикалов из-за низких энергий диссоциации атомов углерода и водорода бисаллильных метиленовых групп, фланкированных двойными связями. Кроме того, в ходе созревания сперматозоиды теряют большую часть своей цитоплазмы, которая содержит антиоксидантные ферменты. Хотя семенная плазма и субклеточные компартменты гамет содержат пероксиредоксины, обеспечивающие эффективную защиту от АФК, сперматозоиды бесплодных мужчин демонстрируют низкий уровень PDX1 и PDX6 с высокой степенью окисления тиолов [34]. Семенная плазма также содержит неферментативные антиоксиданты (АО), включая аскорбиновую кислоту, глутатион, альбумин, α -токоферол, карнитин, аминокислоты, флавоноиды и каротиноиды, которые могут осуществлять свою активность с помощью двух основных механизмов. Во-первых, они химически нейтрализуют свободные радикалы; во-вторых, могут окисляться подобно альбумину. Более того, хелаторы металлов семенной плазмы, такие как лактоферрин, трансферрин и церулоплазмин, также способны блокировать генерацию АФК. Однако во время прохождения придатка яичка и в женских половых путях сперматозоиды лишены семенной плазмы и ее антиоксидантных факторов, что делает их более уязвимыми к окислительному стрессу, особенно при наличии инфекций половых путей.

В дефектных сперматозоидах на определенном этапе их дифференциации активируется процесс самораз-

рушения, а свободные радикалы выполняют роль триггера перепрограммирования клеточного цикла и переключения апоптоза на некроз [35]. Эти данные явились предпосылкой гипотезы о том, что окислительное разрушение зрелых сперматозоидов АФК-вырабатывающими незрелыми сперматозоидами во время их миграции из семенных канальцев в придаток может быть одной из основных причин мужского бесплодия. Важнейшая роль в управлении первичными каскадами элиминации герминативных клеток принадлежит митохондриальному дыханию и сопряженным с ним процессам аэробного окисления глюкозы и синтеза АТФ. Гипоксия, с неизбежным снижением АТФ, подавляет апоптоз сперматозоидов и индуцирует в них некротические явления.

Митохондрии и окислительно-восстановительный гомеостаз. Митохондрии являются центром многочисленных метаболических процессов, таких как цикл трикарбоновых кислот, окислительное декарбоксилирование пирувата, окислительное фосфорилирование, окисление жирных кислот, цикл мочевины, биосинтез пиримидиновых нуклеотидов и др. Митохондриальная недостаточность сопровождается изменением окислительно-восстановительного баланса и способности к биохимической адаптации, предрасполагая к тотальным метаболическим изменениям и клеточной патологии. Интактные митохондрии – важнейшее условие размножения млекопитающих, поскольку дисфункция митохондрий связана с субфертильностью и бесплодием [18].

Особое положение в регуляции редокс-состояния клеток и тканей занимают НАД-зависимые белки сиртуины [9]. Семейство сиртуинов состоит из семи членов, три из которых, SIRT3-5, расположены в митохондриях. Они катализируют НАД⁺-зависимое деацелирование и АДФ-рибозилирование митохондриальных белков, модулируя экспрессию генов и активность ферментов, участвующих в окислительном метаболизме и реакциях на стресс. Митохондриальные сиртуины действуют синергично или антагонистично в зависимости от конкретной ситуации для защиты клеток от экстремальных воздействий и сопряженных метаболических аномалий. Большинство исследований сосредоточено на их роли в женской репродукции, в которых получены доказательства, что SIRT3 повышает выживаемость ооцитов и ранних эмбрионов, защищает яичники от стрессовых состояний. Также была продемонстрирована связь между нарушением передачи сигналов сиртуинами и дисбалансом про- и антиоксидантных систем в яичках.

Как ключевые митохондриальные регуляторы, НАД-деацетилазы и полиАДФ-рибозилполимеразы семейства сиртуинов обеспечивают эффективные метабо-

лические потоки и оптимальный энергетический баланс соматических и половых клеток, а благодаря зависимости своей активности от соотношения НАД⁺/НАДН, эти семейства белков могут служить датчиками энергетического статуса органов и тканей [36]. В нашей лаборатории получены прямые доказательства возможности использования показателей окислительно-восстановительного состояния пиридиновых нуклеотидов эякулята в качестве молекулярных предикторов развития идиопатического бесплодия [37]. В модельных экспериментах, результаты которых были опубликованы в 2022 г., отмечается ведущее место митохондриальной НАД-изоцитратдегидрогеназы 3β (IDH3B) в контроле скорости цикла трикарбоновых кислот в сперматозоидах в широком диапазоне значений клеточного редокс-потенциала [38]. Интермедиаты цикла трикарбоновых кислот, такие как цитрат, изоцитрат, α-кетоглутарат и сукцинат, являются эссенциальными сигнальными молекулами посттрансляционных модификаций и эпигенетического контроля экспрессии генов. Принципиальная задача работ в этой области – понять, можно ли рассматривать системы на основе сиртуинов и других НАД-ассоциированных белков в качестве потенциальных мишеней лекарственных средств при нарушении оплодотворяющей способности сперматозоидов.

В последнее время появились свидетельства фундаментального значения величины окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) для адекватной коррекции бесплодия антиоксидантами. ОВП является объективным клиническим биомаркером интенсивности ОС и отражает текущий баланс окислителей и восстановителей в исследуемом образце спермы [39]. Важно, что расстройства сперматогенеза является самым частым показанием для приема антиоксидантов. По данным клинических исследований, эмпирическая терапия такого рода приводит к неубедительным или отрицательным результатам [40–42], что обусловлено, вероятно, развитием осложнений по типу «антиоксидантного парадокса» или редуцированного стресса.

К. Yamasaki и соавт. [43] обнаружили неизвестный ранее феномен зависимости эффективности АО от уровня ОВП эякулята. По их данным, у пациентов с показателем ОВП более 2,59 мВ/10⁶ сперматозоидов, комбинированная антиоксидантная терапия сопровождалась нормализацией параметров спермограммы, в то время как при низком базальном уровне ОВП применение АО было неэффективным. Эти результаты согласуются с представлениями о высокой чувствительности гамет к колебаниям редокс-потенциала, который может быть разбалансирован при назначении антиоксидантов в неадекватных дозах.

В целом, можно констатировать, что нормальное функционирование сперматозоидов возможно в узком диапазоне значений окислительно-восстановительного потенциала, генерируемого митохондриями при биосинтезе АТФ посредством окислительного фосфорилирования или гликолиза. Митохондрии также непосредственно вовлечены в модуляцию многочисленных изменений на многих этапах репродуктивного процесса от сперматогенеза до оплодотворения: дифференцировки сперматогонимальных стволовых клеток, стероидогенеза и развития соматических клеток яичек, конденсации/деконденсации ДНК сперматозоидов в эпидидимисе, гомеостаза АФК как мессенджеров емкости, акросомной реакции и взаимодействия с ооцитами и др.

В последние годы сформулировано представление о специфическом сигнальном пути, связанном с фертильностью, дефекты митохондриальных белков которого могут быть причиной идиопатического бесплодия [18, 44]. Однако, независимо от метаболических особенностей, митохондрии играют основную роль в механизмах выживания сперматозоидов как ключевые органеллы при взаимодействии процессов генерации АФК и апоптоза. Понимание молекулярных основ этих явлений необходимо для оптимального выбора препаратов антиоксидантов и других биологически активных соединений, воздействующих на митохондрии, с целью нормализации структуры и функции сперматозоидов и в целом репродуктивного потенциала мужчин.

Литература

(п.п. 1–3; 5; 7–41; 43; 44 см. References)

4. Лебедев Г.С., Голубев Н.А., Шадеркин И.А., Шадеркина В.А., Аполихин О.И., Сивков А.В. Мужское бесплодие в Российской Федерации: статистические данные за 2000–2018 годы. *Экспериментальная и клиническая урология*. 2019; 4: 4–12. DOI: 10.29188/2222-8543-2019-11-4-4-12
6. Галимов Ш.Н., Божедомов В.А., Галимова Э.Ф., Павлов В.Н., Сухих Г.Т. Мужское бесплодие: молекулярные и иммунологические аспекты. М: ГЭОТАР-Медиа, 2020.
42. Галимова Э.Ф., Галимов Ш.Н. Мужская фертильность: модифицируемые и немодифицируемые факторы риска. *Проблемы репродукции*. 2015; 21(5): 89–95.

References

1. Agarwal A., Baskaran S., Parekh N., Cho C., Henkel R., Vij S. et al. Male infertility. *Lancet*. 2021; 397(10271): 319–33. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32667-2
2. Sun H., Gong T., Jiang Y., Zhang S., Zhao Y., Wu Q. *Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990–2017: results from a global burden of disease study, 2017*. Aging (Albany NY). 2019; 11(23): 10952–91. DOI: 10.18632/aging.102497

3. Barratt C., De Jonge C., Sharpe R. ‘Man Up’: the importance and strategy for placing male reproductive health centre stage in the political and research agenda. *Hum Reprod*. 2018; 1; 33(4): 541–5. DOI: 10.1093/humrep/dey020
4. Lebedev G.S., Golubev N.A., Shaderkin I.A., Shaderkina V.A., Apolikhin O.I., Sivkov A.V. Male infertility in the Russian Federation: statistical data for 2000–2018. *Eksperimental'naya i klinicheskaya urologiya*. 2019; 4: 4–12. (in Russian) DOI: 10.29188/2222-8543-2019-11-4-4-12
5. Agarwal A., Majzoub A., Parekh N., Henkel R. A Schematic Overview of the Current Status of Male Infertility Practice. *World J Mens Health*. 2020; 38(3): 308–22. DOI: 10.5534/wjmh.190068
6. Galimov Sh.N., Bozhedomov V.A., Galimova E.F., Pavlov V.N., Suih G.T. *Male Infertility: Molecular and Immunological Aspects [Muzhskoe besplodie: molekulyarnye i immunologicheskie aspekty]*. М: GEOTAR-Media, 2020. (in Russian)
7. Grau Grau M. et al. (eds.). *Engaged Fatherhood for Men, Families and Gender Equality, Contributions to Management Science*. Springer Nature, 2022. DOI: 10.1007/978-3-030-75645-1_3
8. Castellini C., D’Andrea S., Cordeschi G., Totaro M., Parisi A., Di Emidio G., et al. Pathophysiology of Mitochondrial Dysfunction in Human Spermatozoa: Focus on Energetic Metabolism, Oxidative Stress and Apoptosis. *Antioxidants (Basel)*. 2021; 10(5): 695. DOI: 10.3390/antiox10050695
9. Di Emidio G., Falone S., Artini P., Amicarelli F., D’Alessandro A., Tatone C. Mitochondrial Sirtuins in Reproduction. *Antioxidants (Basel)*. 2021; 10(7): 1047. DOI: 10.3390/antiox10071047
10. Mukai C., Travis A. What sperm can teach us about energy production. *Reprod Domest Anim*. 2012; 47(Suppl 4): 164–9. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2012.02071.x
11. Freitas M., Vijayaraghavan S., Fardilha M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biology of reproduction*. 2017; 96(1): 2–12.
12. Ford W. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum Reprod Update*. 2006; 12(3): 269–74. Doi: 10.1093/humupd/dmi053
13. Steeghs K., Oerlemans F., Wieringa B. Mice deficient in ubiquitous mitochondrial creatine kinase are viable and fertile. *Biochim. Biophys. Acta*. 2005; 1230: 130–8.
14. Takei G., Miyashiro D., Mukai C., Okuno M. Glycolysis plays an important role in energy transfer from the base to the distal end of the flagellum in mouse sperm. *J. Exp. Biol*. 2014; 217(Pt 11): 1876–86. DOI: 10.1242/jeb.090985
15. Rato L., Alves M., Socorro S. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat. Rev. Urol*. 2012; 9: 330–8. DOI: 10.1038/nrurol.2012.77.
16. Reynolds S., Ismail N., Calvert S., Pacey A., Paley M. Evidence for Rapid Oxidative Phosphorylation and Lactate Fermentation in Motile Human Sperm by Hyperpolarized ¹³C Magnetic Resonance Spectroscopy. *Sci. Rep*. 2017; 7(1): 4322. DOI: 10.1038/s41598-017-04146-1
17. du Plessis S., Agarwal A., Mohanty G., van der Linde M. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? *Asian J. Androl*. 2015; 17(2): 230–5. DOI: 10.4103/1008-682X.135123
18. Park Y., Pang M. Mitochondrial Functionality in Male Fertility: From Spermatogenesis to Fertilization. *Antioxidants (Basel)*. 2021; 10(1): 98. DOI: 10.3390/antiox10010098
19. Amaral A., Castillo J., Estanyol J., Ballescà J., Ramalho-Santos J., Oliva R. Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways. *Mol. Cell. Proteomics*. 2013; 12(2): 330–42. DOI: 10.1074/mcp.M112.020552
20. Lombo M., Ruiz-Díaz S., Gutiérrez-Adán A., Sánchez-Calabuig M. Sperm Metabolomics through Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Animals (Basel)*. 2021; 11(6): 1669. DOI: 10.3390/ani11061669

21. Islam M., Umehara T., Tsujita N., Shimada M. Saturated fatty acids accelerate linear motility through mitochondrial ATP production in bull sperm. *Reprod. Med. Biol.* 2021; 20(3): 289-98. DOI: 10.1002/rmb2.12381
22. Torra-Massana M., Jodar M., Barragán M., Soler-Ventura A., Delgado-Dueñas D., Rodríguez A. et al. Altered mitochondrial function in spermatozoa from patients with repetitive fertilization failure after ICSI revealed by proteomics. *Andrology.* 2021; 9(4): 1192-204. DOI: 10.1111/andr.12991
23. Sinha A., Singh V., Yadav S. Multi-omics and male infertility: status, integration and future prospects. *Front. Biosci.* 2017; 9: 375-94. DOI: 10.2741/s493
24. Zarezadeh R., Nikanfar S., Oghbaei H., Rastgar Rezaei Y., Jafari-Gharabaghlou D., Ahmadi Y., et al. Omics in Seminal Plasma: An Effective Strategy for Predicting Sperm Retrieval Outcome in Non-obstructive Azoospermia. *Mol. Diagn. Ther.* 2021; 25(3): 315-25. DOI: 10.1007/s40291-021-00524-8
25. Liang J., Zheng Y., Zeng W., Chen L., Yang S., Du P. et al. Proteomic Profile of Sperm in Infertile Males Reveals Changes in Metabolic Pathways. *Protein J.* 2021; 40(6): 929-39. DOI: 10.1007/s10930-021-10013-w
26. Joseph S., Mahale S. Male Infertility Knowledgebase: decoding the genetic and disease landscape. *Database (Oxford).* 2021; 2021:baab049. DOI: 10.1093/database/baab049
27. Omolayo T., Omolayo V., Kandasamy R., Hachim M., Du Plessis S. Omics and Male Infertility: Highlighting the Application of Transcriptomic Data. *Life.* 2022; 12(2): 280. DOI: 10.3390/life12020280
28. Clemençon B., Babot M., Trezeguet V. The mitochondrial ADP/ATP carrier (SLC25 family): pathological implications of its dysfunction. *Mol. Aspects Med.* 2013; 34(2-3): 485-93. DOI: 10.1016/j.mam.2012.05.006
29. Amaral A., Lourenço B., Marques M., Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction.* 2013; 146(5): R163-74. DOI: 10.1530/REP-13-0178
30. Aitken R., Drevet R. The Importance of Oxidative Stress in Determining the Functionality of Mammalian Spermatozoa: A Two-Edged Sword. *Antioxidants (Basel).* 2020; 9(2): 111. DOI: 10.3390/antiox9020111
31. Amaral A., Paiva C., Attardo C., Estanyol J., Ballescà, J., Ramalho-Santos J., et al. Identification of proteins involved in human sperm motility using high-throughput differential proteomics. *J. Proteome Res.* 2014; 13: 5670-84.
32. Aitken R., Gibb Z., Mitchell L., Lambourne S., Connaughton H., De Iulius G. Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. *Biol Reprod.* 2012; 87(5): 110. DOI: 10.1095/biolreprod.112.102020
33. Henkel R., Samanta L., Agarwal A., eds. *Oxidants, antioxidants, and impact of the oxidative status in male reproduction.* London, UK: Elsevier; 2018.
34. Barbonetti A., Castellini C., Di Giammarco N., Santilli G., Francavilla S., Francavilla F. In vitro exposure of human spermatozoa to bisphenol A induces pro-oxidative/apoptotic mitochondrial dysfunction. *Reprod Toxicol.* 2016; 66: 61-7. DOI: 10.1016/j.reprotox.2016.09.014
35. Erkkila K., Kytтанen S., Wikstrom M., Taari K., Hikim A., Swerdloff R. Regulation of human male germ cell death by modulators of ATP production. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.* 2006; 290(6): E1145-1154. DOI: 10.1152/ajpendo.00142.2005
36. Tatone C., Di Emidio G., Barbonetti A., Carta G., Luciano A., Falone S. Sirtuins in gamete biology and reproductive physiology: Emerging roles and therapeutic potential in female and male infertility. *Hum. Reprod. Update.* 2018; 24: 267-89.
37. Galimov Sh.N., Gromenko J.Y., Bulygin K.V., Galimov K.S., Galimova E.F., Sinelnikov M.Y. The level of secondary messengers and the redox state of NAD⁺/NADH are associated with sperm quality in infertility. *J. Reprod. Immunol.* 2021; 148: 103383. DOI: 10.1016/j.jri.2021.103383
38. Zhu S., Huang J., Xu R., Wang Y., Wan Y., McNeel R., et al. Isocitrate dehydrogenase 3b is required for spermiogenesis but dispensable for retinal degeneration. *BioRxiv.* 2022.02.09.479735; DOI: 10.1101/2022.02.09.479735
39. Agarwal A., Roychoudhury S., Sharma R., Gupta S., Majzoub A., Sabanegh E. Diagnostic application of oxidation-reduction potential assay for measurement of oxidative stress: clinical utility in male factor infertility. *Reprod. Biomed. Online.* 2017; 34(1): 48-57. Doi: 10.1016/j.rbmo.2016.10.008
40. Smits R., Mackenzie-Proctor R., Yazdani A., Stankiewicz M., Jordan V., Showell M. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2019; 3: CD007411. DOI: 10.1002/14651858.CD007411.pub4
41. Caroppo E., Dattilo M. Sperm redox biology challenges the role of antioxidants as a treatment for male factor infertility. *F&S Reviews.* 2022; 3(1): 90-104. DOI: 10.1016/j.xfnr.2021.12.001
42. Galimova E.F., Galimov Sh.N. Male fertility: modifiable and unmodifiable risk factors. *Problemy reproduktsii.* 2015; 21(5): 89-95. (in Russian)
43. Yamasaki K., Uchida M., Watanabe N. Effects of antioxidant co-supplementation therapy on spermatogenesis dysfunction in relation to the basal oxidation-reduction potential levels in spermatozoa: A pilot study. *Reprod Med Biol.* 2022; 21:e12450. DOI: 10.1002/rmb2.12450
44. Bogueuet M., Bouet P., Spiers A., Reynier P., May-Panloup P. Mitochondria: their role in spermatozoa and in male infertility. *Hum Reprod Update.* 2021; 27(4): 697-719. DOI: 10.1093/humupd/dmab001

Сведения об авторах:

Литвицкий Петр Францевич, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, зав. каф. патофизиологии ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);

Галимов Камиль Шамилевич, студент, Институт клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО ПМГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);

Громенко Юлия Юрьевна, канд., мед. наук, гл. врач Медицинского центра «Семья», Уфа;

Галимова Саида Шамилевна, ассистент каф. терапии и сестринского дела с уходом за больными ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России;

Гилязова Ирина Ришатовна, канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотр. Института биохимии и генетики ФГБНУ Уфимского ФИЦ РАН; доцент каф. медицинской генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России;

Галимова Эльмира Фанисовна, доктор мед. наук, доцент, проф., каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России;

Павлов Валентин Николаевич, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, ректор, зав. каф. урологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616.8-092

Луговая А.В.^{1,1}, Эмануэль В.С.¹, Иванов А.М.², Артемова А.В.¹, Семенова Е.В.¹, Семенова В.В.¹

Современные представления о роли митофагии в патогенезе острого ишемического инсульта

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, Санкт-Петербург, Россия, ул. Льва Толстого, д. 6-8;

²ФГБ военное образовательное учреждение ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО России, 194044, Санкт-Петербург, Россия, ул. Академика Лебедева, д. 6

Проблема ранней диагностики, профилактики и прогнозирования исхода острого ишемического инсульта (ИИ) по-прежнему актуальна. Особый интерес исследователей вызывает нейрональная гибель, осуществляемая по механизму аутофагии и митофагии (селективной аутофагии), активация которых отмечается после ишемической атаки. Результаты модельных экспериментов на животных показывают центральное вовлечение митохондриальной дисфункции в повреждение нейронов и клеток микроглии при остром ИИ. В то же время данные литературы, касающиеся роли митофагии в патогенезе острого ИИ, противоречивы и освещены недостаточно. Цель обзора – анализ современной литературы, посвященной экспериментальному изучению молекулярных механизмов митофагии и ее роли в патогенезе острого ИИ. При подготовке обзора использованы международные и отечественные базы данных: Scopus, Web of Science, Springer, РИНЦ. Анализ данных литературы позволил охарактеризовать ключевые митохондриальные белки, участвующие в сигнальных каскадах митофагии при остром ИИ, показал, что митофагия при остром ИИ играет двойственную роль, и ее участие в патогенезе данного заболевания неоднозначно. Обсуждаются результаты экспериментальных методов фармакологического модулирования защитной (базовой) митофагии в моделях острого ИИ.

Ключевые слова: острый ишемический инсульт; аутофагия; аутофагосома; митофагия; рецепторы митофагии; митохондриальная динамика; митохондриальный потенциал; NLRP3-инфламмосома; постишемическое нейровоспаление

Для цитирования: Луговая А.В., Эмануэль В. С., Иванов А.М., Артемова А.В., Семенова Е.В., Семенова В.В. Современные представления о роли митофагии в патогенезе острого ишемического инсульта. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66 (2): 80-90.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.80-90

Участие авторов: концепция и дизайн – Луговая А.В., Эмануэль В.С.; работа с научными базами данных – Эмануэль В.С., Артемова А.В.; обработка литературного материала – Семенова Е.В., Семенова В.В.; написание текста – Луговая А.В.; редактирование – Иванов А.М. Обсуждение окончательной версии статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Луговая Анна Владимировна, e-mail: lugovaya2710spb@icloud.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.04.2022

Принята к печати 31.03.2022

Опубликована 27.05.2022

Lugovaya A.V.¹, Emanuel V.S.¹, Ivanov A.M.², Artemova A.V.¹, Semenova E.V.¹, Semenova V.V.¹

Current views on the role of autophagy in the pathogenesis of acute ischemic stroke

¹I.P. Pavlov University,

L'va Tolstogo St. 6–8, Saint Petersburg 197022, Russian Federation;

²S.M. Kirov Military Medical Academy,

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

Acute ischemic stroke (IS) is an urgent medical and social challenge. Despite extensive studying the causes for acute cerebrovascular ischemia, the issues of early diagnosis, prevention, and prediction of IS outcome is still relevant. Elucidation of molecular mechanisms operating in the penumbra is of a great clinical interest for development of new diagnostic and therapeutic strategies. Of particular interest is neuronal death through autophagy and mitophagy (selective autophagy) noted to be activated after an ischemic attack. Experiments on animal models have shown that mitochondrial dysfunction is centrally involved in damage to neurons and microglial cells in acute IS. However, reports on the role of mitophagy in the pathogenesis of acute IS are inconsistent and scarce. The aim of this review was to analyze current experimental studies on molecular mechanisms and the patho-

genetic role of mitophagy in modeled acute IS. The reviewed literature was obtained from international and Russian databases, including Scopus, Web of Science, Springer, and Russian Science Citation Index. This review characterizes the key mitochondrial proteins involved in signaling cascades of mitophagy in acute IS and shows that mitophagy plays a dual, Janus-faced role in the IS pathogenesis. Ineffective mitophagy contributes to the activation of NLRP3-inflammation in acute IS, while the pharmacological induction of basic mitophagy blocks the activation of NLRP3-inflammasome. The authors presented results of experimental pharmacological modulation of protective (basic) mitophagy in models of acute IS. The most promising strategy is to target signaling cascades that suppress NLRP3 inflammation and proteins inducing basic neuroprotective mitophagy. This review shows that mitophagy is actively involved in various stages of the pathogenesis of acute IS. Mitophagy is a promising therapeutic target provided it is properly modulated. However, clear understanding of the factors influencing the balance between basic (protective) and activated (pathological) mitophagy has not yet been achieved, and this issue requires further study.

Keywords: acute ischemic stroke; autophagy; autophagosome; mitophagy; mitophagy receptors; mitochondrial dynamics; mitochondrial potential; NLRP3-inflammasome; postischemic neuroinflammation

For citation: Lugovaya A.V., Emanuel V.S., Ivanov A.M., Artemova A.V., Semenova E.V., Semenova V.V. Current views on the role of autophagy in the pathogenesis of acute ischemic stroke. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(2): 80-90. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.80-90

Author's contribution: concept and design – Lugovaya A.V.; working with scientific databases – Emanuel V.S., Artemova A.V.; processing of literary material – Semenova E.V., Semenova V.V.; writing the text – Lugovaya A.V.; editing – Ivanov A.M. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Anna V. Lugovaya, Cand. of Sci. (Med.), Assistant of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a Course in Molecular Medicine, Specialist of Clinical Laboratory Diagnostics, clinic of the Department of Laboratory Diagnostics, Pavlov University; L'va Tolstogo street 6-8, Saint Petersburg, 197022, Russian Federation, e-mail: lugovaya2710spb@icloud.com

Financing. The study was not sponsored.

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

Information about the authors:

Lugovaya A.V., <https://orcid.org/0000-0002-7690-9064>

Ivanov. A.M., <https://orcid.org/0000-0002-8899-7524>

Semenova E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1086-3304>

Received 01.04.2022

Accepted 31.03.2022

Published 27.05.2022

Введение

Острый ишемический инсульт (ИИ) представляет собой важную медицинскую и социальную проблему, так как занимает в мире одно из ведущих мест среди основных причин смертности, пожизненной или длительной утраты трудоспособности среди взрослого населения [1, 2].

В последние годы все большую актуальность приобретает изучение роли аутофагии в патогенезе заболеваний центральной нервной системы (ЦНС) [3--5]. Аутофагия или ПКС II (программируемая клеточная гибель II типа), является процессом, ответственным за «контроль качества» клеточного белка, и играет важную роль в поддержании аксонального гомеостаза в нейронах. Важность аутофагии в гомеостазе нейронов была продемонстрирована N. Mizushima и соавторами в 2006 г. при таргетировании генов аутофагии Atg5 и Atg7 у мышей. Поражение со стороны ЦНС характеризовалось когнитивными дисфункциями, двига-

тельными нарушениями и накоплением убиквитин-позитивных включений в нейронах [6, 7].

Согласно данным литературы, недостаточная аутофагия является причиной многих нейродегенеративных заболеваний. В свою очередь чрезмерная активация аутофагии также губительна для нейронов головного мозга, в частности, при остром ИИ [8, 9].

Известно, что некроз, апоптоз и аутофагия являются основными механизмами гибели нейронов после острого ИИ [10–13]. Особый интерес исследователей вызывает нейрональная гибель, осуществляемая по механизму аутофагии, усиление которой отмечается после острого ишемического поражения ткани головного мозга [14–16]. В модельных экспериментах на животных установлено, что аутофагия, как и апоптоз, активируется в пенумбре [17]. Считается, что поврежденные апоптозом и аутофагией нейроны можно восстановить в отличие от нейронов, погибших по ме-

ханизму некроза, локализующихся в зоне ишемического ядра и не подлежащих регенерации [17, 18]. По мнению ученых, модуляция аутофагического процесса в пенумбре, воздействие на отдельные этапы аутофагии, а также таргетирование конкретных аутофагических белков, задействованных в нейрональной гибели, может способствовать индукции процессов регенерации нейронов и разработке новых методов лечения острого ИИ [18, 19].

В зависимости от маршрута доставки клеточного груза к лизосомам выделяют три типа аутофагии: макроаутофагия, микроаутофагия и опосредованная шаперонами аутофагия.

Также выделяют селективную и неселективную аутофагию [20, 21]. Когда случайно выбранная часть цитоплазмы вместе с содержащимися в ней включениями подвергается лизосомальной переработке говорят о неселективной аутофагии. Она используется для поддержания баланса между количеством и размером отдельных компонентов цитоплазмы и ответственна за общий оборот цитозольного материала. Селективная аутофагия специфически нацелена на белковые агрегаты и отдельные органеллы [20, 22]. При этом виде аутофагии деградации подвергаются определенные органеллы, например, эндоплазматическая сеть (ретикулофагия), рибосомы (рибофагия), пероксисомы (пексофагия) или митохондрии (митофагия) [23]. Важнейшей функцией митофагии является селективная деградация стареющих или поврежденных митохондрий [24].

Термин «митофагия» впервые предложен J.J. Lemasters в 2005 г. Ученый описал деполяризованные митохондрии, поглощенные везикулами, содержащими ключевой биомаркер аутофагии белок LC3 [25]. Это явление было обнаружено в клеточной культуре крысиных гепатоцитов, подверженных сывороточному голоданию. Впоследствии было установлено, что описанные группой ученых везикулы являлись аутофагосомами — органеллами с двойной мембраной, которые формируются в процессе аутофагии [26].

Установлено, что митохондрии центрально вовлечены в повреждение нейронов и клеток микроглии при остром ИИ [18]. Как известно, митохондрии являются основными внутриклеточными источниками активных форм кислорода (АФК), чрезмерная выработка которых может вызвать деполяризацию митохондрий, повышение проницаемости митохондриальной мембраны, снижение митохондриального потенциала и способствовать запуску митохондриально-опосредованного апоптоза и митофагии [27, 28]. К факторам, индуцирующим избыточную генерацию митохондриальных АФК относятся окислительный стресс,

гипоксия, глутаматная эксайтотоксичность и накопление ионов Ca^{2+} , играющие центральную роль в патогенезе острого ИИ. Следует подчеркнуть, что избыточное количество АФК, генерируемое в основном НАДФН-оксидазами, является ответом на нарушение целостности гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) после ишемической атаки. Установлено, что биологическая антиоксидантная активация может ингибировать не только апоптоз за счет увеличения экспрессии белка Bcl-2, но и активированную ишемическим повреждением митофагию, а также способствовать выживанию и регенерации нейронов за счет увеличения продукции нейротрофических факторов NGF (nerve growth factor — фактор роста нервов) и BDNF (brain derived neurotrophic factor — мозговой нейротрофический фактор) [29].

Ключевые белки макроаутофагии LC3 (биомаркер формирования активных аутофагосом), Beclin-1 (важнейший белок стадии инициации аутофагии) и адаптерный белок p62 (регулятор аутофагии, участвующий в формировании аутофагосом) находятся в тесном взаимодействии с митохондриальными белками и участвуют в индукции конститутивной митофагии. Полноценное связывание липидированной формы белка LC3 (LC3-II) и p62 имеет значение для нормального протекания митофагии [30]. Порог, при котором митофагия выполняет защитную функцию при инсульте посредством контроля качества митохондрий, требует рассмотрения. Показано, что умеренное открытие MPTP (mitochondrial permeability transition pore — митохондриальной поры повышенной проницаемости) и снижение митохондриального потенциала инициирует базовую митофагию, являющуюся физиологическим процессом, который необходим для удаления поврежденных дисфункциональных митохондрий [29].

Результаты модельных экспериментов на животных показали, что острый ИИ сопровождается чрезмерным открытием MPTP и вовлечением большого количества митохондрий в генерацию АФК [17, 31]. Данное явление рассматривается как компенсаторный механизм, срабатывающий в ответ на ишемическую атаку, но, вследствие нарушения баланса в генерации жизненно важных в условиях стресса молекулярных соединений, приводит к запуску митохондриально-опосредованного апоптоза и митофагии нейронов. При значительном снижении уровня клеточного АТФ происходит некротическая гибель нейронов [31, 32]. В экспериментальной модели острого ИИ показано, что акцепторы АФК напрямую активируют цитозольный LC3-I, а во внешней митохондриальной мембране регистрируется скопление аутофагического

белка-адаптера p62, что свидетельствует об активном участии митофагии в патогенезе острого ИИ [29, 33]. С другой стороны, при индукции митофагии рапамицином в модели церебральной ишемии у крыс отмечалось восстановление функции митохондрий за счет рекрутирования p62 в поврежденные митохондрии [34]. Было установлено, что улучшение митохондриальной функции происходило за счет резкого уменьшения содержания малонового диальдегида, восстановления уровня АТФ и митохондриального потенциала [29, 34]. Таким образом, данные литературы о роли митофагии в патогенезе острого ИИ противоречивы, что свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения данной проблемы.

Открытие МРПТ приводит к деполяризации митохондрий, потере потенциала митохондриальной мембраны и запуску апоптоза или, в случае слишком распространенного открытия МРПТ – некроза. Показано, что на этапе реперфузионной фазы острого ИИ ингибирование открытия МРПТ в пределах постишемического интервала уменьшает объем инфаркта [18]. Это свидетельствует о том, что регулирование открытия МРПТ, направленное на предотвращение коллапса потенциала митохондриальной мембраны, может оказывать нейропротективное действие при инсульте [17].

В экспериментальной модели окклюзии средней мозговой артерии крыс установлено, что сразу после ишемической атаки происходит резкая активация митофагии, затем она постепенно ингибируется, а через 24 ч от начала острого ИИ происходит полная блокада митофагии. Морфологически на данном этапе в зоне поражения выявляется скопление митохондрий с грубыми структурными нарушениями, клеточным отеком и ядерным пикнозом [18]. Следует подчеркнуть, что блокада митофагии является фармакологически обратимой. В эксперименте с использованием лабораторных животных показано, что метиленовый синий (липофильное соединение, обладающее нейропротективным действием) способен индуцировать базовую (защитную) митофагию через 36-48 ч от начала заболевания [31]. Этот препарат легко проникает через ГЭБ, накапливается в митохондриальном матриксе и нормализует мембранный потенциал митохондрий, способствуя индукции базовой (защитной) митофагии и ингибированию усиленного апоптоза нейронов, обеспечивая нейропротективный эффект [18, 31]. Другим препаратом, нормализующим митохондриальный потенциал и восстанавливающим функции митохондрий в пенумбре является антиоксидант ресвератрол. Установлено, что данный препарат повышает активность СОД (супероксиддисмутазы),

нормализует окислительно-восстановительный баланс и способствует значительному ослаблению апоптоза нейронов, что приводит к уменьшению объема инфаркта головного мозга и неврологического дефицита у мышей с кардиоэмболическим патогенетическим вариантом острого ИИ [29].

Таким образом, при фармакологической индукции базовой (защитной) митофагии наблюдается выраженный нейропротективный эффект, который, согласно данным литературы, четко ассоциирован с временным фактором: чем раньше будет индуцирована митофагия, тем лучше будет исход заболевания, проявляющийся в уменьшении очага поражения и неврологического дефицита [31].

По мнению ученых, нейропротективный эффект митофагии объясняется тем, что, функционируя на базовом уровне, она обеспечивает «контроль качества» митохондрий, осуществляя избирательную элиминацию поврежденных органелл, не затрагивая при этом нормально функционирующие митохондрии [18]. Эти данные, полученные в экспериментальных исследованиях по моделированию острого ИИ с использованием лабораторных животных, позволяют многим авторам рассматривать митофагию как защитный механизм при церебральной ишемии [18, 28, 29].

Белки, регулирующие митофагию, и их участие в патогенезе острого ИИ. Открытие рецепторов митофагии – митохондриальных белков PINK1, PARKIN, NIX, BNIP3 и FUNDC1, принимающих непосредственное участие в сигнальном каскаде митофагии, помогло продвинуться в понимании ее молекулярных механизмов и роли в патогенезе острого ИИ. Как было сказано выше, при индукции митофагии эти белки взаимодействуют с ключевыми белками макроаутофагии LC3, Beclin-1 и адаптерным белком p62.

В настоящий момент известны два основных сигнальных пути митофагии, реализуемых митохондриальными белками:

1. PARKIN-зависимый путь или PINK1–PARKIN – опосредованный сигнальный каскад.
2. PARKIN-независимый путь, включающий NIX/BNIP3– и FUNDC1–опосредованные сигнальные каскады [29].

Белок PARKIN (кодируется геном *PARK2*) относится к семейству E3 убиквитин-лигаз [22]. Совместно с другими белками он участвует в регуляции аутофагии и известен как супрессор опухолевого роста [35]. Белок PINK1 (PTEN–induced kinase 1) кодируется PTEN-индуцированной киназой 1, которая содержит аминокислотную последовательность, нацеленную на митохондрии (MTS–mitochondrial targeting sequence).

В здоровых клетках PINK1 импортируется в митохондрии и расщепляется ромбоид-подобным белком, ассоциированным с презенилином (PARL— presenilin-associated rhomboid-like protein), который локализуется на внутренней мембране митохондрий [29]. Результаты большинства модельных экспериментов на животных показали, что PINK1 экспрессируется на наружной мембране старых или поврежденных митохондрий, где он распознается и убиквитинируется белком PARKIN. Затем убиквитинированный PINK1 связывается с адаптерным белком p62, транспортируется в аутофагосому и утилизируется в процессе p62-опосредованной митофагии. Мутации белков PINK1 и PARKIN приводят к нарушению взаимодействия LC3-II и p62, скоплению этих белков в лизосомах и развитию целого ряда нейродегенеративных заболеваний: болезнь Ниманна–Пика (лизосомные болезни накопления), болезнь Леви, боковой амиотрофический склероз [20, 22].

Протеины PINK1 и PARKIN участвуют в регуляции динамики митохондрий. Совместно с другими белками, они контролируют митохондриальное слияние и деление, обеспечивают целостность и функциональность сохранности митохондрий [18].

Слияние и деление митохондрий являются важнейшими составляющими динамики этих органелл. Главным регулятором процесса слияния является белок Opa1 (optic atrophy protein 1 – белок оптической атрофии 1), получивший свое название в связи с тем, что у животных, с дефектом гена этого белка развивается атрофия зрительного нерва [36, 37]. В клетках млекопитающих существует восемь изоформ белка Opa1 [38]. Дефект этого белка приводит к серьезным нарушениям структуры крист митохондрий [39]. Следует подчеркнуть, что для нормального функционирования белка OPA1 требуется присутствие белков митофузинов 1 и 2 (Mfn1 и Mfn2 – mitofusins 1 and 2), которые представляют собой связанные с динамином ГТФазы (dynamine-related GTPases) [40]. ГТФазы – это большое семейство гидролазных ферментов, которые связываются с нуклеотидом гуанозинтрифосфатом (ГТФ) и гидролизуют его до гуанозиндифосфата (ГДФ). Установлено, что Mfn2 представляет собой рецептор для белка PARKIN и в случае повреждения митохондрий способствует транслокации PARKIN из цитозоля в митохондрии с целью индукции митофагии, которая обеспечивает элиминацию поврежденных органелл [41].

Процесс деления митохондрий строго регулируется, и клетка всегда поддерживает тонкий баланс между их слиянием и делением. Контроль митохондриального деления осуществляется, главным образом, со стороны цитозоля. Основными регуляторами митохон-

дриального деления являются адапторный белок Fis1 (mitochondrial fission protein 1 – белок митохондриального деления 1) и белок DRP1 (dynamine-related protein 1 – связанный с динамином белок 1), являющийся представителем большого семейства динаминподобных ГТФаз [42, 43].

Белки BNIP3 и NIX являются членами семейства белка Bcl-2 [18]. Как известно, семейство Bcl-2 включает как противоапоптотические белки Bcl-2 и Bcl-xL, так и проапоптотические белки Bax, Bim, Bik и Bak [44, 45]. Эти протеины являются регуляторами митохондриального пути запуска апоптоза, играющего важную роль в гибели нейронов при церебральной ишемии. Установлено, что избыток противоапоптотических белков семейства Bcl-2 защищает ткань мозга от ишемии [46]. BNIP3 и NIX являются гомологичными белками (более 55% идентичности аминокислотных последовательностей), что объясняет сходство выполняемых ими функций в регуляции митофагии [47]. Эти белки интегрируют сигналы, предназначенные для реализации апоптоза и митофагии в клеточных доменах, и при определенных условиях могут увеличивать генерацию АФК, способствуя активации митофагии [18]. BNIP3 и NIX конкурируют за связывание с белком Bcl-2, что может приводить к диссоциации комплекса Bcl-2–Beclin-1 с высвобождением инициатора аутофагии белка Beclin-1 и немедленной активацией митофагии [47]. Известно, что Beclin-1 необходим для нормального протекания митофагии. Установлено, что взаимодействие Beclin-1 – PARKIN необходимо для транслокации последнего в митохондрии и индукции базовой PARKIN – зависимой митофагии [18, 28].

Сверхэкспрессия белка BNIP3 может стимулироваться фактором HIF-1 α (Hypoxia inducible factor 1 α – фактор 1 α , индуцируемый гипоксией) [49]. В экспериментальных исследованиях с использованием различных моделей церебральной ишемии у лабораторных животных выявлена повышенная экспрессия белка BNIP3 в нейронах коры больших полушарий головного мозга в условиях гипоксии [29]. Установлено, что при дефиците кислорода BNIP3 ингибирует активацию проапоптотических белков семейства Bcl-2 и активирует митофагию [28]. Впервые, механизмы митофагии, индуцированные гипоксией были исследованы в эксперименте на грызунах вида *Spalax ehrenbergi* (палестинский слепыш), которые демонстрируют наибольшую выживаемость в условиях кислородного голодания по сравнению с другими видами грызунов [49]. Было установлено, что толерантность к гипоксии у *Spalax ehrenbergi* обусловлена BNIP3-регулируемой митофагией. Авторы высказывают предположе-

ние о нейропротективной функции BNIP3-опосредованной митохондриальной митофагии [50].

Рецептор митофагии NIX является белком внешней митохондриальной мембраны и связывается с белком LC3, участвующим в образовании аутофагосом *in vitro* и *in vivo* [35]. Существует мнение, что белок NIX играет более важную роль в регуляции митофагии по сравнению с протеином BNIP3 [47]. В экспериментальных исследованиях показано, что у мышей с нокаутом гена белка NIX наблюдается тяжелая форма острого ИИ с обширным поражением паренхимы головного мозга [18]. Напротив, сверхэкспрессия NIX ингибирует каспазу-3, что способствует значительному уменьшению апоптоза нейронов и уменьшению объема инфаркта мозга у мышей в модели окклюзии средней мозговой артерии [29].

FUNDC1 (Fun14 domain-containing protein 1) представляет собой белок наружной мембраны митохондрий. Он играет важную роль в индукции митофагии, особенно в условиях гипоксии [29, 48]. Кроме того, этот протеин участвует в регуляции митохондриальной динамики посредством взаимодействия с белками DRP1 и OPA1 [47]. FUNDC1 содержит LC3-взаимодействующий регион LIR (LC3-interaction region), который позволяет ему напрямую связываться с белком LC3, индуцируя митофагию [18]. Показано, что FUNDC1-опосредованная митофагия не зависит от других белков-рецепторов митофагии (BNIP3 и NIX) [47]. Установлено, что при остром ИИ, в условиях стресса, вызванного гипоксией, белок FUNDC1 фосфорилируется по участку, содержащему аминокислоту Ser-17 (серин-17), и взаимодействует с белком LC3, способствуя митофагии [35]. В экспериментальных исследованиях с использованием лабораторных животных показано, что FUNDC1-опосредованная митофагия активируется при остром инфаркте миокарда, ингибируя апоптоз кардиомиоцитов и уменьшая зону инфаркта. При этом регистрируется селективное удаление поврежденных митохондрий, что, по мнению авторов, свидетельствует о защитной роли митофагии [18, 29].

Для эффективной митофагии необходимо нормальное функционирование митохондриальной динамики, сбалансированная работа процессов митохондриального деления и слияния. Одной из главных целей слияния митохондрий является обмен содержимым их матрикса (в основном генетическим материалом) [51]. Кроме того, процесс слияния обеспечивает гетерогенность состава митохондриальной популяции, предотвращая тем самым потерю важных компонентов митохондрий. Нарушение процесса митохондри-

ального слияния приводит к накоплению популяции митохондрий, лишенных нуклеотидов мтДНК (митохондриальной ДНК) и, вследствие этого, имеющих дефект дыхательной функции [29].

Процесс деления участвует в «контроле качества» митохондрий, обеспечивая отделение поврежденных компонентов от здоровой митохондриальной сети с их последующей митофагией и деградацией.

Таким образом, морфология митохондрий поддерживается динамическим равновесием между факторами слияния (продуктами белков Opa1 и Mfn2) и факторами деления (продуктами белков DRP1 и Fis1), обеспечивая нормальное функционирование базовой митофагии, которая в свою очередь контролирует митохондриальный гомеостаз [18, 29].

Нарушение митохондриальной динамики в патогенезе острого ИИ. Роль митофагии. В экспериментальных исследованиях с использованием лабораторных животных установлено, что при остром ИИ происходит нарушение динамики митохондрий, проявляющееся в усилении митохондриального деления и уменьшении активности процессов слияния. В нейронах головного мозга мышей выявляется снижение содержания белков Opa1 и Mfn2, обеспечивающих механизм митохондриального слияния, и повышение уровня белков митохондриального деления DRP1 и Fis1 [29].

На этом фоне отмечается активированная ишемическим повреждением митофагия и митохондриально-опосредованный апоптоз, осуществляющие совместную деструкцию нейронов [28, 29]. Интересно, что применение ингибитора митохондриального деления MDIVI-1 (mitochondrial division inhibitor 1), подавляющего активность белка DRP1, приводило к блокаде активированной митофагии и митохондриально-опосредованного апоптоза, но не влияло на уровень экспрессии липидированной формы LC3-II (маркера активных аутофагосом) и p62 в пирамидных нейронах гиппокампа у крыс [52]. По мнению авторов это означает, что ингибирование сверхэкспрессии DRP1 подавляет патологически активированную митофагию и митохондриально-опосредованный апоптоз, но при этом не влияет на базовую неселективную аутофагию (макроаутофагию), обеспечивая нейропротективный эффект. Об этом свидетельствует уменьшение зоны ишемического повреждения у крыс.

В другом экспериментальном исследовании в качестве ингибиторов митохондриального деления использовали MDIVI-1 и миРНК (малые интерферирующие РНК). Результаты продемонстрировали подавление митофагии и митохондриально-опосредованного апоптоза, однако ингибирования рецепторно-опо-

средованного апоптоза пирамидных нейронов не наблюдалось, что приводило к увеличению объема очага поражения и усилению неврологического дефицита у крыс [53].

Противоречивые данные литературы могут быть объяснены использованием разных экспериментальных моделей острого ИИ и разными условиями проведения исследований. В первом случае крыс подвергали 10-минутной тяжелой глобальной ишемии с использованием модели окклюзии 4 сосудов 4-VO (four-vessel occlusion) [52]. В другом исследовании использовали экспериментальную модель окклюзии средней мозговой артерии крыс [53]. Следует подчеркнуть, что оба экспериментальных исследования ставили своей целью подавление вызванного ишемией усиленного митохондриального деления с ингибированием белка DRP1.

Считается, что белок DRP1 может быть потенциальной терапевтической мишенью в терапии острого ИИ [43].

По мнению ряда авторов, стратегия регулирования митофагии путем модулирования митохондриальной динамики является перспективным направлением в разработке новых методов лечения церебральной ишемии, однако ввиду противоречивых результатов исследований требует дальнейшего изучения [47, 49, 52].

Основные сигнальные пути, вовлеченные в митофагию при остром ИИ, представлены на рисунке.

При гипоксии ткани головного мозга повышается уровень экспрессии митохондриальных белков Bnip3 и NIX, конкурирующих за связывание с белком Bcl-2. В результате связывания одного из этих белков с Bcl-2 происходит высвобождение инициатора аутофагии Beclin-1 из комплекса Beclin-1–Bcl-2 с дальнейшей ин-



Рис. Схематическое изображение основных сигнальных путей, вовлеченных в митофагию при остром ИИ.

Примечание. Список обозначений и сокращений, использованных в схеме: 1) HIF-1α – фактор 1α, индуцируемый гипоксией; 2) Bnip3 – является членом семейства Bcl-2, относится к белкам-рецепторам митофагии; 3) NIX – является членом семейства Bcl-2, относится к белкам-рецепторам митофагии; 4) Beclin-1 – белок, инициирующий аутофагию; 5) Bcl-2 – белок, ингибирующий апоптоз; 6) АФК – активные формы кислорода; 7) ΔΨ – мембранный потенциал митохондрий; 8) PARKIN – белок, инициирующий митофагию; 9) PINK1 – белок, инициирующий митофагию; 10) Opa1 – белок оптической атрофии 1, регулирующий митохондриальное слияние; 11) Mfn – белок митофузин, регулирующий митохондриальное слияние. 12) DRP1 – белок, регулирующий митохондриальное деление 13) Fis1 – белок митохондриального деления.

Fig. Schematic representation of the main signaling pathways involved in mitophagy in acute IS.

Note. List of symbols and abbreviations used in the scheme: 1) HIF-1α, hypoxia-induced factor 1α; 2) Bnip3 -- is a member of the Bcl-2 family, belongs to mitophagy receptor proteins; 3) NIX - is a member of the Bcl-2 family, belongs to mitophagy receptor proteins; 4) Beclin-1, a protein initiating autophagy; 5) Bcl-2, protein that inhibits apoptosis; 6) ROS -- reactive oxygen species; 7) ΔΨ – membrane potential of mitochondria; 8) PARKIN, mitophagy-initiating protein; 9) PINK1, protein initiating mitophagy; 10) Opa1, optic atrophy protein 1, which regulates mitochondrial fusion; 11) Mfn, mitofusin protein regulating mitochondrial fusion; 12) DRP1 is a protein that regulates mitochondrial division; 13) Fis1 is a mitochondrial division protein.

дукцией митофагии [48]. Постишемическая реперфузия способствует повышенной генерации АФК, приводящей к снижению мембранного потенциала митохондрий, транслокации митохондриального белка PARKIN из цитозоля к поврежденным митохондриям и индукции PINK1-PARKIN—опосредованной митофагии [29]. Как показано на **рисунке**, при острой церебральной ишемии происходит нарушение митохондриальной динамики, характеризующееся снижением содержания белков Opa1 и Mfn, обеспечивающих механизм митохондриального слияния, и повышением белков митохондриального деления DRP1 и Fis1. Эти события приводят к нарушению баланса между процессами митохондриального деления и слияния и, как следствие, усилению митофагии.

Анализ данных литературы показывает, что митофагия и митохондриальная динамика связаны между собой и нарушение их взаимодействия играет важную роль в патогенезе острого ИИ. [18, 28]. Процессы слияния и деления митохондрий имеют важное значение для нормального протекания митофагии. Недостаточное удаление поврежденных митохондрий или чрезмерная деградация нормально функционирующих митохондрий могут привести к гибели клеток. В связи с этим, процесс митофагии должен быть четко сбалансирован и ограничиваться элиминацией только дисфункциональных органелл.

Роль митофагии в регуляции NLRP3-опосредованного воспаления. Постишемическое нейровоспаление является критическим патофизиологическим процессом в рамках всей схемы церебральной ишемии, охватывающей раннее повреждение и период восстановления тканей. Продолжают накапливаться доказательства, свидетельствующие о важной роли NLRP3-опосредованного воспаления в патогенезе острого ИИ [53–55].

NLRP-воспалительные реакции реализуются инфламмосомами (inflammasomes) —мультипротеиновыми олигомерными комплексами. Инфламмосома является молекулярной платформой, которая обеспечивает активацию каспазы-1, созревание и секрецию провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18, способствует гибели инфицированных макрофагов по механизму пироптоза, обеспечивая защиту организма от инфекционных агентов, и, таким образом, играет важную роль в реакциях врожденного иммунитета [56].

NOD-подобные рецепторы выполняют функцию цитозольных сенсоров, которые реагируют на «сигналы опасности», представляющие собой следующие молекулярные паттерны: PAMP (pathogen-associated molecular patterns), DAMP (damage-associated molecular patterns), TAMP (tumor associated molecular patterns)

и SAMP (self associated molecular patterns) [54]. DAMP — молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями, имеют важное патогенетическое значение при остром ИИ, поскольку образуются при деструкции ткани головного мозга [56]. «Сигналы опасности» по одиночке или в комбинации стимулируют активацию инфламмосомы [53].

Показано, что недостаточная митофагия играет существенную роль в активации NLRP3-опосредованного воспаления в микроглии при остром ИИ [29, 31]. Базовая митофагия сдерживает воспалительную активность за счет уменьшения выработки АФК, являющихся не только важнейшими участниками ишемического каскада, но и триггерами NLRP3-воспаления [57]. Подавление активации NLRP3-воспаления митофагия реализует через удаление поврежденных митохондрий, высвобождающих мтАФК (митохондриальных АФК) и мтДНК (митохондриальные ДНК), выступающих в роли «сигналов опасности» при остром ИИ [56]. Фармакологическое ингибирование митофагии приводит к накоплению АФК-продуцирующих митохондрий и, как следствие, к усилению активации NLRP3-воспаления [54].

Результаты модельных экспериментов на животных показали, что недостаточная PARKIN—зависимая митофагия приводит к митохондриальной дисфункции и активации NLRP3-опосредованного воспаления [29, 28].

Особый интерес вызывают недавно опубликованные отчеты, сообщающие что NF- κ B — ключевой активатор NLRP3-воспаления, может сдерживать активацию NLRP3-инфламмосомы за счет индукции р62-зависимой митофагии, предотвращая, тем самым, чрезмерное тканевое повреждение при остром ИИ [58]. Показано, что путь NF- κ B→р62→митофагия представляет собой макрофагальную внутреннюю регуляторную «петлю безопасности», через которую NF- κ B ограничивает свою собственную активность, стимулирующую воспаление, и, тем самым, предупреждает избыточный воспалительный ответ, который может быть губителен для макроорганизма. Установлено, что только белок-адаптер р62 распознает митохондрии, которые были повреждены агонистами NLRP3 [58, 59]. Поврежденные митохондрии высвобождают «сигналы опасности», которые распознаются белком р62, удаляющим дисфункциональные митохондрии посредством р62—опосредованной митофагии [57, 60]. Недавно было показано, что противовоспалительный модуль «NF- κ B→р62» предотвращает чрезмерную активацию каспазы-1 и, как следствие, гиперпродукцию IL-1 β и IL-18, приводящую к гибели макрофагов и неконтролируемому накоплению нейтрофилов [58, 60].

Следовательно, недавно обнаруженный сигнальный путь NF- κ B \rightarrow p62 \rightarrow митофагия способствует пониманию, казалось бы, противоречивого факта того, что активация NF- κ B, инициирующая транскрипцию генов ключевых медиаторов воспаления, в то же время обеспечивает защиту от чрезмерного воспалительного ответа [58]. В 2016 г. Z. Zhong и соавт., одними из первых описавшие этот сигнальный путь, сформулировали понятие «Selflimiting inflammation» (самоограничивающееся воспаление) [59].

Заключение

Настоящий обзор демонстрирует накопленные к моменту его публикации литературные данные, подтверждающие актуальность изучения роли митофагии в патогенезе острого ИИ. Фактический материал по исследованию сигнальных путей митофагии, участвующих в патохимических реакциях ишемического каскада, постоянно пополняется новыми результатами экспериментальных исследований, свидетельствуя о том, что дальнейшее изучение данной проблемы является перспективным направлением.

Принимая во внимание многочисленные механизмы, с помощью которых митофагия влияет на отдельные этапы патогенеза острого ИИ, целесообразно рассмотрение возможных путей ее модуляции с целью воздействия на наиболее значимые мишени сигнальных каскадов митофагии. В качестве подобных мишеней могут выступать рецепторы, участвующие в митофагии, белки, регулирующие митохондриальную динамику. Кроме того, по мнению ряда авторов, в качестве одной из стратегий потенциальных методов терапии острого ИИ может рассматриваться ингибирование NLRP3-воспаления путем модулирования p62-зависимой митофагии [58, 57].

Проведенный анализ литературы показывает, что митофагия при остром ИИ играет двойственную роль, и ее участие в патогенезе данного заболевания неоднозначно. Не вызывает сомнений тот факт, что дальнейшее изучение механизмов митофагии, реализуемых при остром ИИ, будет способствовать более глубокому пониманию патогенеза данного заболевания.

Литература

(п.п. 3–16; 18–34; 36–60 см. References)

1. Баранова Е.В. Маркеры воспаления у больных с различными типами мозговых инсультов. *Международный неврологический журнал*. 2014; 5(67): 45-8.
2. Баринов Э.Ф., Евтушенко С.К., Максименко Т.Л., Баранова М.Э., Твердохлеб Т.А., Евтушенко И.С. Механизмы регуляции воспаления в ишемизированном мозге (научный обзор). *Международный неврологический журнал*. 2013; 8(62): 13-21.

17. Ключник Т.П., Отман И.Н., Чуканова А.С., Надарейшвили Г.Г., Гулиева М.Ш., Гусев Е.И. Динамика маркеров апоптоза в остром периоде ишемического инсульта. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски*. 2018; 118(9): 26-31.
35. Пархитко А.А., Фаворова О.О., Хенске Э.П. Аутофагия: механизмы, регуляция и роль в развитии опухолей. *Биохимия*. 2013; 78(4): 466–80.

References

1. Baranova Ye.V. Markers of inflammation in patients with different types of cerebral strokes. *Mezhdunarodnyy neurologicheskiy zhurnal*. 2014; 5(67): 45-8. (In Russian)
2. Barinov E.F., Yevtushenko S.K., Maksimenko T.L., Barinova M.E., Tverdokhlebl T.A., Yevtushenko I.S. Mechanisms of regulation of inflammation in the ischemic brain (scientific review). *Mezhdunarodnyy neurologicheskiy zhurnal*. 2013; 8(62): 13-21. (In Russian)
3. Pupyshv A.B., Korolenko T.A., Tikhonova M.A. A therapeutic target for inhibition of neurodegeneration: autophagy. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2017; 47(9): 1109–27. <https://doi.org/10.1007/s11055-017-0519-7>
4. Rui Y.-N., Le W. Selective role of autophagy in neuronal function and neurodegenerative diseases. *Neuroscience Bulletin*. 2015; (31): 379–81. <https://doi.org/10.1007/s12264-015-1551-7>
5. Son J.H., Shim J.H., Kim K.-H., Ha J.-Y. and Han J.Y. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Experimental and Molecular Medicine*. 2012; 44(2): 89-98. <https://doi.org/10.3858/emmm.2012.44.2.031>
6. Caberlotto L. and Nguyen T.P. A systems biology investigation of neurodegenerative dementia reveals a pivotal role of autophagy. *BMC Systems Biology*. 2014; 8, Article 65: 1-15. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-8-65>
7. Pierzynowska K., Gaffke L., Zuzanna Cyske Z., Puchalski M., Rintz E., Bartkowski M. et al. Autophagy stimulation as a promising approach in treatment of neurodegenerative diseases. *Metabolic Brain Disease*. 2018; 33: 989–1008. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0214-6>
8. Ham O., Le S., Lee C., Lee C.Y., Park J.-H., Lee J., et al. Let-7b suppresses apoptosis and autophagy of human mesenchymal stem cells transplanted into ischemia/reperfusion injured heart 7b by targeting caspase-3. *Stem Cell Research and Therapy*. 2015; 6(147): 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0134-x>
9. Hassanpour M., Rezabakhsh A., Pezeshkian M., Rahbarghazi R., Nouri M. Distinct role of autophagy on angiogenesis: highlights on the effect of autophagy in endothelial lineage and progenitor cells. *Stem Cell Research and Therapy*. 2018; 9(305): 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1060-5>
10. Carmichael S.T. Targets for neural repair therapies after stroke. *Stroke*. 2010; 41(10): 124-6.
11. Gandolfi M., Nicola Smania N., Antonio Vella A., Picelli A., Chirumbolo S. Assessed and Emerging Biomarkers in Stroke and Training-Mediated Stroke Recovery: State of the Art. *Neural Plasticity*. 2017; 2017: Article ID 1389475: 1-15. <https://doi.org/10.1155/2017/1389475>
12. Goodall M.L., Fitzwalter B.E., Zahedi S., Wu M., Rodriguez D., Mulcahy-Levy J.M., et al. The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis. *Developmental Cell*. 2016; 37: 337–49. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.04.018>

13. Nikolettou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1833(12): 3448–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>
14. Hu C., Zhao L., Wu D., Li L. Modulating autophagy in mesenchymal stem cells effectively protects against hypoxia- or ischemia-induced injury. *Stem Cell Research and Therapy*. 2019; 10: 120. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1225-x>
15. Huang Q., Zhong W., Hu Z., Tang X. A review of the role of cav-1 in neuropathology and neural recovery after ischemic stroke. *Journal of Neuroinflammation*. 2018; 15(348): 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1387-y>
16. Li W., Zhang X., Zhuang H., Chen H., Chen Y., Tian W., et al. MicroRNA-137 Is a novel hypoxia-responsive microRNA that inhibits mitophagy via regulation of two mitophagy receptors FUNDC1 and NIX. *Journal of Biological Chemistry*. 2016; 289(15): 10691–701.
17. Klushnik T.P., Otman I.N., Chukanova A.S., Nadareishvili G.G., Guliyeva M.S., Gusev E.I. The dynamics of markers of apoptosis in the acute period of ischemic stroke. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova. Spetsvyypuski*. 2018; 118(9): 26–31. (in Russian)
18. Tang Y.C., Tian H.X., Yi T., Chen H.B. The critical roles of mitophagy in cerebral ischemia. *Protein Cell*. 2016; 7(10): 699–713.
19. Berretta A., Yu-Chieh Tzeng Y.C., Clarkson A.N. Post-stroke recovery: the role of activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor. *Journal Expert Review of Neurotherapeutics*. 2014; 14:11. <https://doi.org/10.1586/14737175.2014.969242>
20. Jungverdorben J., Till A., Brüstle O. Induced pluripotent stem cell-based modeling of neurodegenerative diseases: a focus on autophagy. *Journal of Molecular Medicine*. 2017; 95(7): 705–18. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1533-5>
21. Parzych K.R., Klionsky D.J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20: 460–73.
22. Rui Y.-N., Le W. Selective role of autophagy in neuronal function and neurodegenerative diseases. *Neuroscience Bulletin*. 2015; 31(4): 379–81. <https://doi.org/10.1007/s12264-015-1551-7>
23. Dunn W.A. Jr., Cregg J.M., Kiel A.K.W., Klei I.J., Oky M., Sakai Y., et al. The Selective Autophagy of Peroxisomes. *Autophagy*. 2005; 1(2): 75–83.
24. Shu S., Pei L. and Lu Y. Promising targets of cell death signaling of NR2B receptor subunit in stroke pathogenesis. *Regenerative Medicine Research*. 2014; 2(8): 1–6. <https://doi.org/10.1186/2050-490X-2-8>
25. Lemasters J.J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res*. 2005; 8:3–5.
26. Park J., Lee S.B., Lee S., Kim Y., Song S., Kim S., et al. Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature*. 2006; 441: 1157–61.
27. Zhu J., Dagda R.K., Chu C.T. Monitoring mitophagy in neuronal cell cultures. *Methods Mol. Biol*. 2011; 793: 325–39.
28. Zhang X., Yuan Y., Jiang L., Zhang J., Gao J., Shen Z., et al. Endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin and thapsigargin protects against transient ischemic brain injury: involvement of PARK2-dependent mitophagy. *Autophagy*. 2014; 10: 1801–13.
29. Guan R., Zou W., Dai X., Yu X., Liu H., Chen O.T., et al. Mitophagy, a potential therapeutic target for stroke. *Journal of Biomedical Science*. 2018; 25: 87. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0487-4>
30. Rui Y.-N., Le W. Selective role of autophagy in neuronal function and neurodegenerative diseases. *Neuroscience Bulletin*. 2015; 31(4): 379–81. <https://doi.org/10.1007/s12264-015-1551-7>
31. Di Y., He Y., Zhao T., Huang X., Wu K.W., Liu S.H., et al. Methylene Blue Reduces Acute Cerebral Ischemic Injury via the Induction of Mitophagy. *Mol. Med*. 2015; 21: 420–9.
32. Gong Z., Pan J., Shen Q., Li M., Peng Y. Mitochondrial dysfunction induces NLRP3 inflammasome activation during cerebral ischemia/reperfusion injury. *J. Neuroinflammation*. 2018; 15: 242. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1282-6>
33. Bjorkoy G., Lamark T., Brech A., Outzen H., Perander M., Overvatn A., et al. 62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell. Biol*. 2005; 171(4): 603–14.
34. Urbaneck T., Kuczmik W., Basta-Kaim A., Gabryel B. Rapamycin induces of protective autophagy in vascular endothelial cells exposed to oxygen-glucose deprivation. *Brain Research*. 2014; 1553: 1–11.
35. Parkhitko A.A., Favorova O.O., Henske E.P. Autophagy: mechanisms, regulation and its role in tumorigenesis. *Biokhimiya*. 2013; 78(4): 466–80. (in Russian)
36. Delettre C., Griffoin, J.M., Kaplan J., Dollfus H., Lorenz B., Faivre L., et al. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet*. 2001; 109: 584–91. <https://doi.org/10.1007/s00439-001-0633-y>
37. Aung T., Ocaka L., Ebenezer N.D., Morris A.G., Krawczak M., Thiselton D.L., et al. A major marker for normal tension glaucoma: association with polymorphisms in the OPA1 gene. *Hum Genet*. 2002; 110: 52–6. <https://doi.org/10.1007/s00439-001-0645-7>
38. Olichon A., Elachouri G., Baricault L., Delettre C., Belenguer P., Lenaers G. OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death Differ*. 2007; 4: 682–92.
39. Griparic L., van der Wel N.N., Orozco I.J., Peters P.J., van der Blik A.M. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J. Biol. Chem*. 2004; 279: 18792–8.
40. Cipolat S., Martins de Brito, O., Dal Zilio B., Scorrano L. (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2004; 45: 15927–32.
41. Zhu J., Dagda R.K., Chu C.T. Monitoring mitophagy in neuronal cell cultures. *Methods Mol. Biol*. 2011; 793: 325–39.
42. Zuo W., Zhang S., Xia C.Y., Guo X.F., He W.B., Chen N.H. Mitochondria autophagy is induced after hypoxic/ischemic stress in a Drp1 dependent manner: the role of inhibition of Drp1 in ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2014; 8: 103–15.
43. Zuo W., Yang P.F., Chen J., Zhang Z., Chen N.H. Drp1, a potential therapeutic target for brain ischemic stroke. *Br. J. Pharmacol*. 2016; 173: 1665–77.
44. Goodall M.L., Fitzwalter B.E., Zahedi S., Wu M., Rodriguez D., Mulcahy-Levy J.M., et al. The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis. *Developmental Cell*. 2016; 37(4): 337–49. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.04.018>
45. Nikolettou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1833(12): 3448–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>
46. Zhang W., Meng A. MicroRNA-124 expression in the brains of rats during early cerebral ischemia and reperfusion injury is associated with cell apoptosis involving STAT3. *Exp. Ther. Med*. 2019; 17(4): 2870–6.
47. Li W., Zhang X., Zhuang H., Chen H., Chen Y., Tian W., et al. MicroRNA-137 Is a Novel Hypoxia-responsive MicroRNA That Inhibits Mitophagy via Regulation of Two Mitophagy Receptors FUNDC1 and NIX. *Journal of Biological Chemistry*. 2016; 289(15): 10691–701.

48. Lu N., Li X., Tan R., An J., Cai Z., Hu X., et al. HIF-1 α /Beclin1-Mediated Autophagy Is Involved in Neuroprotection Induced by Hypoxic Preconditioning. *J. Mol. Neurosci.* 2018; 66(2): 238–50. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1162-7>
49. Band M., Joel A., Hernandez A., Avivi A. Hypoxia-induced BNIP3 expression and mitophagy: in vivo comparison of the rat and the hypoxia-tolerant mole rat, *Spalax ehrenbergi*. *FASEB J.* 2009; 23(7): 2327–35.
50. Yuan Y., Zheng Y., Zhang X., Chen Y., Wu X., Wu J., et al. BNIP3L/NIX-mediated mitophagy protects against ischemic brain injury independent of PARK2. *Autophagy.* 2017; 13(10): 1754–66.
51. Frey T.G., Mannella C.A. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 2000; 7: 319–24.
52. Zuo W., Yang P.F., Chen J., Zhang Z., Chen N.H. Drp-1, a potential therapeutic target for brain ischaemic stroke. *Br J Pharmacol.* 2016; 173(10): 1665–77.
53. Zhou K., Shi L., Wang Y., Chen S., Zhang J. Recent Advances of the NLRP3 Inflammasome in Central Nervous System Disorders. *Journal of Immunology Research.* 2016; Article ID 9238290. <https://doi.org/10.1155/2016/9238290>
54. Gong Z., Pan J., Shen Q., Li M., Peng Y. Mitochondrial dysfunction induces NLRP3 inflammasome activation during cerebral ischemia/reperfusion injury. *Journal of Neuroinflammation.* 2018; 15(242): 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1282-6>
55. Liu T., Tang Q., Liu K., Xie W., Liu X., Wang H., et al. TRIM11 Suppresses AIM2 Inflammasome by Degrading AIM2 via p62-Dependent Selective Autophagy. *Cell Reports.* 2016; (16): 1988–2002.
56. Sun Q., Fan J., Billiar T.R., Scott M.J. Inflammasome and Autophagy Regulation: A Two-way Street. *Mol. Med.* 2017; 23: 188–95.
57. Cordero M.D., De Miguel M., Moreno Fernández A.M., López I.C., Maraver J.G., Cotán D., et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy activation in blood mononuclear cells of fibromyalgia patients: implications in the pathogenesis of the disease. *Arthritis Research and Therapy.* 2010; 12(R17). <https://doi.org/arthritiss-research.com/content/12/1/R17>
58. Zhong Z., Umemura A., Sanchez-Lopez E., Liang S., Shalpour S., Wong J., et al. NF- κ B Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. *Cell.* 2016; 164: 896–910.
59. Lepelley A., Ghosh S. Clean Up after Yourself. *Molecular Cell.* 2016; 61: 644–5.
60. Bjorkoy G., Lamark T., Brech A., Outzen H., Perander M., Øvervatn A., et al. 62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell. Biol.* 2005; 171(4): 603–14.

Сведения об авторах:

Луговая Анна Владимировна, канд. мед. наук, ассистент каф. клин. лаб. диагностики с курсом молекулярной медицины, ФГБОУ ВО «ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, e-mail: lugovaya2710spb@icloud.com;

Эмануэль Владимир Сергеевич, клинический ординатор каф. неврологии и мануальной медицины факультета последипломного образования, ФГБОУ ВО «ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, e-mail: Vladimir.emmanuel@yandex.ru;

Иванов Андрей Михайлович, доктор мед. наук., проф., член-корреспондент РАН, зав. каф. клинической биохимии и лабораторной диагностики ВМА им. С.М. Кирова МО РФ, гл. специалист по клин.-лаб. диагностике МО РФ, e-mail: iamvma@mail.com;

Артемова Анастасия Витальевна, ассистент каф. неврологии и мануальной медицины факультета последипломного образования, ФГБОУ ВО «ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, врач невролог отделения неврологии Ленинградской областной клинической больницы, e-mail: nastya-093@mail.ru;

Семенова Екатерина Валерьевна, клинический ординатор каф. клин.-лаб. диагностики с курсом молекулярной медицины, ФГБОУ ВО «ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, e-mail: katemelnikova@mail.ru;

Семенова Варвара Владимировна, клинический ординатор, каф. клин.-лаб. диагностики с курсом молекулярной медицины, ФГБОУ ВО «ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, e-mail: varya-semenova@mail.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092.18

Власова Т.И., Арсентьева Е.В., Спирина М.А., Белова Л.А.

Сигнальные пути и молекулярные маркеры эпидермальных стволовых клеток в процессе регенерации кожи

ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», 430005, Саранск, Россия, ул. Большевикская, д. 68

Регенеративная медицина – относительно новая перспективная отрасль современной медицины, объединяющая как теоретические представления о репаративных и регенеративных механизмах эпителиальных клеток, так и практические знания о факторах регуляции данного процесса. Регенеративная медицина позволяет существенно расширить возможности клиницистов. В обзоре рассмотрены результаты научных исследований, связанных с изучением на молекулярно-генетическом уровне механизмов влияния эпидермальных стволовых клеток на процессы репарации и регенерации кожи. В ходе регенерации активированные повреждающими факторами иммунные клетки включаются в процесс заживления ран, ремоделирование внеклеточного матрикса, миграцию, дедифференцировку и/или пролиферацию с последующей дифференциацией соматических или стволовых клеток. Противовоспалительный ответ останавливает регенеративный процесс, который заканчивается тканевым ремоделированием для достижения исходного функционального состояния. Примечательно, что многие из этих процессов связаны с усиленным гликолизом. Следовательно, рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом (PPAR) β/δ , который, как известно, принимает участие в катаболизме липидов, гомеостазе глюкозы, процессах воспаления, пролиферации и дифференцировки, а также регенерации кожи, костей и печени являются многообещающей мишенью для стимулирования процессов регенерации у млекопитающих. В обзоре обсуждаются современные представления об участии PPAR β/δ в процессах, связанных с заживлением и регенерацией ран.

Приведенные данные включают результаты исследований о возможных молекулярных сигнальных путях, обуславливающих изменение в процессах миграции, пролиферации и дифференцировки эпителиальных клеток, экспрессии интегринов, кератина, ряда микроРНК и длинных некодирующих РНК. Подчеркивается влияние микроокружения, в частности, через активацию Wnt и Notch (внутриклеточных) сигнальных систем, служащих важными регуляторными компонентами микроокружения стволовых клеток. Функционирование Wnt и Notch систем являются значимым в процессах заживлении ран. Обсуждаются данные по эпигенетической регуляции процесса эпидермальной регенерации. Озвучены механизмы, реализующие эффекты через PCG-активные протеины фактора роста и изменение активности гистоновых деметилаз, гистоновых деацетилаз и ДНК-метилтрансфераз. Представлена информация об АТФ-зависимом ремоделировании хроматина протеинами семейства SNF2 (включая SWI2 / SNF2 (BRG1 / BRM), ISWI и CHD / Mi-2 β), BRG1 и JMJD3 а также их влиянии на процессы дифференцировки и активность эпидермальных стволовых клеток.

Ключевые слова: эпидермальные стволовые клетки; интегрин; кератин; микроРНК; некодирующие РНК; Wnt и Notch сигнальные пути; PPAR β/δ ; эпигенетическая регуляция

Для цитирования: Власова Т.И., Арсентьева Е.В., Спирина М.А., Белова Л.А. Сигнальные пути и молекулярные маркеры эпидермальных стволовых клеток в процессе регенерации кожи. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(2): 91-101.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.91-101

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Власова Т.И.; поиск литературных источников – Белова Л.А.; написание текста – Арсентьева Е.В.; редактирование – Спирина М.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Власова Татьяна Ивановна, e-mail: vlasova.tatyanka@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.08.2021

Принята к печати 31.03.2022

Опубликована 27.05.2022

Vlasova T.I., Arsenteva E.V., Spirina M.A., Belova L.A.

Signaling pathways and molecular markers of epidermal stem cells during regenerationN.P. Ogarev National Research Mordovia State University,
Bolshevistskaya St. 68, Saransk 430005, Russian Federation

Regenerative medicine is a relatively new and very promising branch of modern medicine, which combines both the theoretical knowledge about reparative and regenerative mechanisms of epithelial cells and the practical knowledge about factors regulating this process. Thus, regenerative medicine can significantly expand the capabilities of clinicians. In our review, we present results of molecular and genetic studies on effects of epidermal stem cells on epithelial repair and regeneration.

During regeneration, injury-activated immune cells induce wound healing, extracellular matrix remodeling, migration, dedifferentiation, and/or proliferation followed by differentiation of somatic or stem cells. The anti-inflammatory response stops the regenerative process, which ends with tissue remodeling to achieve the original functional state. It is noteworthy that many of these processes are associated with increased glycolysis. Therefore, the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) β/δ , which is known to be involved in lipid catabolism, glucose homeostasis, inflammation, proliferation, differentiation, and regeneration in mammalian skin, bone and liver, is a promising target for stimulating regeneration in mammals. This review summarizes the current knowledge of PPAR β/δ involvement in the processes related with wound healing and regeneration.

The cited literature includes reports of possible molecular signaling pathways that cause changes in the processes of migration, proliferation and differentiation of epithelial cells and in the expression of integrins, keratin, a number of microRNAs, and long noncoding RNAs. The review addresses effects of the microenvironment, specifically, via activation of Wnt and Notch (intracellular) signaling systems, which serve as important regulatory components of the stem cell microenvironment. The functioning of the Wnt and Notch systems is essential for wound healing.

The epigenetic regulation of epidermal regeneration is discussed. The review presents the mechanisms mediated by PcG-active proteins of the growth factor and changes in the activities of histone demethylases, histone deacetylases, and DNA methyltransferases. Information is provided about the ATP-dependent chromatin remodeling by proteins of the SNF2 family (including SWI2/SNF2 (BRG1/BRM), ISWI and CHD/Mi-2 β), BRG1 and JMJD3) and their influence on differentiation and the activity of epidermal stem cells.

Keywords: epidermal stem cells; integrin; keratin; microRNA; non-coding RNAs; Wnt and Notch signaling pathways; PPAR β/δ ; epigenetic regulation

For citation: Vlasova T.I., Arsenteva E.V., Spirina M.A., Belova L.A. Signaling pathways and molecular markers of epidermal stem cells during regeneration *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(2): 91-101. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.91-101

Author's contribution: research concept and design – Vlasova T.I.; search for literary sources – Belova L.A.; text writing – Arsenteva E.V.; editing – Spirina M.A. All co-authors – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

For correspondence: *Tatyana I. Vlasova*, Doctor of Medical Sciences, Professor of Normal and-Pathological Physiology Chair, National Research Mordovia State University; 68 Bolshevistskaya Str., Saransk 430005, Russian Federation, e-mail: vlasova.tatyanka@mail.ru

Financing. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:Vlasova T.I., <https://orcid.org/0000-0002-2462-899X>Arsenteva E.V., <https://orcid.org/0000-0001-1687-4589>Spirina M.A., <https://orcid.org/0000-0001-9974-1981>Belova L.A., <https://orcid.org/0000-0001-6054-0111>

Received 10.08.2021

Accepted 31.03.2022

Published 27.05.2022

Введение

Первым барьером между внутренней средой организма и окружающей средой являются кожа и слизистые оболочки человека. Именно они практически постоянно атакуются патогенными факторами различной (как экзогенной, так и эндогенной) природы. Проблема регенерации кожи и заживления ран явля-

ется актуальной для клиницистов многих специальностей. Регенеративная медицина – относительно новое направление науки, имеющее несомненную практическую значимость для эффективной диагностики и терапии нарушений целостности кожи и слизистых оболочек [1].

Человечество очаровано феноменом регенерации с древних времен. Хотя явление регенерации уже упоминается в греческой мифологии (наказание Прометея, второй подвиг Геракла – убийство Лернейской гидры), дата первого письменного упоминания возвращает нас к Эмпедоклу (490–430 до н.э.) и Аристотелю (384–322 до н.э.). В 1901 г. Томас Морган определил «регенерацию» как «замену недостающих структур после травмы» [2].

Часто считается, что регенерация включает восстановление структуры и функции утраченных или поврежденных органов / тканей. Тем не менее, во время регенерации печени у млекопитающих при резекции доли печени функция восстанавливается за счет увеличения размера оставшихся долей, а не за счет повторного роста новой доли [3]. Таким образом, основная цель регенеративной медицины – восстановление функции тканей / органов.

Способность к регенерации широко и случайным образом распределена в животном мире [4]. Все же, эффективность и степень регенерации существенно различаются. Например, *Hydra vulgaris* и *Schmidtea mediterranea* считаются бессмертными, поскольку они могут преобразоваться из индивидуального специализированного типа клеток. Земноводные и рыбы, такие как тритон *Notophthalmus viridescens* и рыбка данио (*Danio rerio*), могут восстанавливать большое количество органов, включая придатки, сердце, хрусталик, сетчатку и центральную нервную систему [5].

Человеческий организм не демонстрирует подобных возможностей, что обуславливает большой интерес к пониманию молекулярных механизмов естественного исцеления и регенерации и применения этих знаний для восстановления человеческих тканей/органов после повреждений разного рода. Регенерация кожи представляет особый интерес.

Процесс восстановления кожи осуществляется в течение всей жизни (физиологическая регенерация) и после повреждений любого генеза и тяжести (репаративная регенерация). Исследование особенностей регуляции регенерации эпителия позволит аккумулировать фундаментальные знания о процессах регенерации с одной стороны, с другой – совершенствовать инновационные методы диагностики и лечения эпителиальных повреждений, модулировать активность данных факторов и в конечном итоге, повышать эффективность процесса заживления и функционального восстановления.

Регенераторная способность кожи, в первую очередь, обеспечивается эпидермальными стволовыми клетками, которые обладают потенциалом дифферен-

цировки по нескольким линиям. Теоретически, заживление любой раны может происходить за счет стволовых клеток [6–8]. Есть взаимосвязь между количеством стволовых клеток на раневой поверхности – чем больше их сохранилось, тем выше ожидаемая скорость заживления и меньше вероятность формирования рубцовой деформации. Эпидермальные стволовые клетки (ЭСК) способны к неограниченному делению и в основном локализируются в 3 отдельных нишах: базальный слой эпидермиса, «область луковицы» волосяного фолликула и область основания сальных желез [9]. ЭСК у взрослых людей способны адгезироваться к базальной мембране эпидермиса за счет экспрессии интегрина, что поддерживает стабильность базального слоя и препятствует формированию придатков кожи в несоответствующих локусах [10, 11].

В настоящее время существует определенная база медико-биологических знаний, посвященная изучению влияния различных факторов роста на клетки, есть и публикации, посвященные их влиянию на ЭСК. Биостимулирующим эффектом обладают фибриноген, тромбоцитарный (PDGF), эпидермальный (EGF), трансформирующий (TGF), инсулиноподобный (IGF) факторы роста, ряд цитокинов и цитомединов, факторы роста фибробластов (bFGF), гепатоцитов (HDGF), стромальный фактор (SDF), щелочная фосфоэстераза и ряд других [12–14]. Одновременно невозможно точно утверждать, как регулируется поведение ЭСК *in vivo* вне и внутри клетки и какова их роль в процессах заживления и регенерации кожной раны. В доступных источниках литературы рассмотрен довольно ограниченный ряд подобных факторов и механизмов.

Цель обзора – объединение имеющихся данных о структурных молекулах, внутриклеточных сигнальных путях, некоторых некодирующих РНК и их роли в регуляции поведения ЭСК (миграции, пролиферации, дифференцировке) при регенерации кожи.

PPAR β/δ рецепторы. В процессах регенерации участвуют рецепторы PPAR, активируемые пероксисомными компонентами. К настоящему времени идентифицированы 3 изоформы PPAR, которые обозначены как PPAR α , PPAR β/δ и PPAR γ . PPAR β/δ играют важную роль в метаболических процессах, ангиогенезе и воспалении, без которых регенерация невозможна. Кроме того, PPAR β/δ вовлечены сразу в несколько ключевых клеточных процессов, связанных с регенерацией: пролиферацию, дифференцировку, миграцию и апоптоз.

Рецепторы PPAR принадлежат к суперсемейству ядерных рецепторов, то есть действуют как факторы транскрипции при активации лиганда. PPAR β/δ мо-

жет активироваться эндогенными лигандами, такими как полиненасыщенные жирные кислоты и метаболиты эйкозаноидов (например, простаглицлин и 15-гидроксиэйкозатетраеновая кислота (15-НЕТЕ)) также, как и искусственными агонистами, включая GW501516, GW0742, L-165041 и карбациклин [15, 16]. Кроме того, действие PPAR β/δ может подавляться несколькими обратными агонистами и антагонистами. Тем не менее, в настоящее время ни агонистические, ни антагонистические препараты клинически недоступны [17, 18].

PPAR β/δ представляет собой ядерный рецептор, характеризующийся классическими доменами: N-концевой областью, содержащий лиганд-независимый домен трансактиваии, часто известный как функция активации 1 (AF-1), ДНК-связывающий домен (DBD), гибкую шарнирную область и домен AF-2, включая лиганд-связывающий домен (LBD) и лиганд-зависимый домен трансактиваии. Принцип действия PPAR β/δ представляет собой гетеродимеризацию с рецептором 9-цис ретиноевой кислоты (RXR или NR2B) и связывание через 2 цинковых пальца в DBD к элементам ответа пролифератора пероксисом (PPRE), расположенным в промоторной области их генов-мишеней [19].

Иммунопреципитация хроматина и последующее секвенирование позволило выявить 3 типа генов-мишеней: (1) I тип – PPAR β/δ -RXR связывается с PPRE как репрессорный комплекс. Экспрессия таких генов индуцируется при опосредованном малыми интерферирующими РНК (siRNA) истощении PPAR β/δ , но не агонистами; (2) гены типа II регулируются как гены типа I, но могут активироваться агонистами (каноническая регуляция); (3) третий класс генов содержит только PPRE-подобные мотивы. Они связаны PPAR β/δ –содержащими комплексами, которые действуют как активаторы транскрипции [20].

Экспрессия таких генов подавляется при siRNA-опосредованном истощении PPAR β/δ и слабо реагирует на лиганды, если вообще реагирует. Кроме того, PPAR β/δ может регулировать транскрипцию независимо от связывания ДНК путем подавления факторов транскрипции через прямое физическое взаимодействие, конкуренцию за ограничение количества общих коактиваторов и ингибирование передачи сигналов митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) [21]. Например, PPAR β/δ ингибирует ядерный фактор κ – усилитель легкой цепи активированных В-клеток (NF- κ B) – пути взаимодействия с субъединицей NF- κ B p65, тем самым уменьшая связывание NF- κ B

с ДНК, что приводит к ингибированию транскрипции генов-мишеней NF- κ B [22].

Кроме того, было показано, что PPAR β/δ взаимодействует с катенином в клетках рака толстой кишки, контролирующей экспрессию сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) A [23].

В кардиомиоцитах PPAR β/δ индуцирует через β -катенин циклин D2 и c-MYC. Важно отметить, что PPAR выполняет разные регуляторные роли в отношении одного и того же гена в зависимости от его окружения. Например, сообщалось, что несколько различных сигнальных киназ (включая протеинкиназу A и p38 митоген-активированную протеинкиназу) могут модулировать транскрипционную активность PPAR β/δ , [22]. Ряд исследователей предполагает, что модуляция активности PPAR β/δ может ускорять заживление и регенерацию тканей [24–30].

Защита, заживление и регенерация тканей требуют жесткого контроля над несколькими процессами, включая апоптоз (например, из-за повышенной функциональной потребности или недостатка кислорода), пролиферацию и/или дифференцировку стволовых клеток для воссоздания потерянных клеток, а также ремоделирование внеклеточного матрикса и его разрушение (например, рассасывание рубцовой ткани и восстановление поддерживающей ткани матрикса). Анализ естественной регенерации у модельных организмов, таких как рыбки данио, тритон и крупные мыши Мерфи Рот (MRL) показали, что заживление и регенерация зависят от индуцированной гипоксией передачи сигналов; воспаления, индуцированного воспалительными цитокинами и эйкозаноидами, продуцируемыми в течение первых часов после травмы; секреции проангиогенных факторов и метаболических изменений [31–33].

Для выживания всем видам приходится восстанавливаться после повреждения. Примечательно, что почти у всех видов есть регенеративная способность, в том числе человека. Например, сохраняется возможность весьма успешной регенерации печени и костей [34–36]. Основными этапами регенерации являются: (1) *воспалительная реакция*, вызванная различными повреждающими факторами, инфекцией, интоксикацией, биологическими повреждающими агентами или воздействием сигнальных молекул, испускаемых мертвыми или умирающими клетками [37]; (2) *заживление ран* [38], которое может сопровождаться кратковременным формированием рубцовой ткани; (3) *ремоделирование внеклеточного матрикса*, допускающего миграцию, а также индукцию пролиферации с последующей дифференцировкой структур для создания новой ткани

[4]; (4) *противовоспалительный и противомитохондриальный ответ* [39]; и (5) *ремоделирование ткани* для обеспечения функционального состояния [38]. Как следует из сказанного, PPAR β/δ участвует во всех этих механизмах.

В последние годы было показано, что манипуляции с активностью PPAR β/δ ингибируют или способствуют заживлению, а также регенерации клеток кожи. Поскольку PPAR β/δ имеет множество точек приложения и оказывает пролиферационное действие на кератиноциты, PPAR β/δ кажется идеальной терапевтической мишенью для повышения способности кожи к регенерации [40]. То, что PPAR β/δ участвует в заживлении кожи, было предположено на основании результатов ряда исследований. Экспрессия данного белка активно индуцируется при повреждении воспалительными цитокинами, например, TNF [41], и кератиноциты по краям ран сохраняют его высокую экспрессию, пока идет процесс восстановления. Анализ заживления ран у мышей с заблокированным PPAR β/δ показал, что PPAR β/δ необходим во время заживления кожи для пролиферации кератиноцитов, блок PPAR β/δ приводит к задержке заживления на 2 – 3 дня [41].

Активированные PPAR β/δ сигналы через путь PI3K / Akt1 опосредуют выживание клеток за счет инактивации BAD (BCL2-ассоциированный агонист гибели клеток), а также способствуют адгезии миграционных компонентов посредством ингибирования GSK3 [40, 43].

В процессе заживления экспрессия PPAR β/δ снижается за счет индуцированных трансформирующим фактором роста (TGF) 1 Smad3 / Smad4-репрессорных комплексов. Примечательно, что пролиферация кератиноцитов также регулируется дермальными фибробластами. Повреждение вызывает секрецию IL-1, который через IL-R1 активирует в фибробластах путь (трансформирующий фактор роста бета- активированная киназа 1 (TAK) 1 / cJun / AP1), приводящий к высвобождению цитокинов, способствующих пролиферации кератиноцитов. Однако в фибробластах активированный PPAR β/δ индуцирует экспрессию sIL-1Ra – секреторного антагониста рецептора IL-1. Это ослабляет чувствительность фибробластов к IL1, что приводит к снижению секреции пролиферативных факторов и, следовательно, к снижению активности пролиферации кератиноцитов [44].

Этот регуляторный механизм демонстрирует, насколько важна локальная активация PPAR β/δ . Доступные данные о PPAR β/δ в отношении заживления ран, а также кожных заболеваний в последнее время подробно рассмотрены в ряде работ [45, 46]. Тем не ме-

нее, похоже, что нет исследований, которые пытались бы использовать эти знания с целью повышения способности к регенерации, по крайней мере, в эксперименте у мышей или крыс.

Структурные белки. Интегрин представляет собой семейство гликопротеиновых рецепторов, расположенных на поверхности клеточных мембран, участвующих в межклеточной адгезии [47]. Он играет ключевую роль во многих важных физиологических и патофизиологических процессах: делении и дифференцировке клеток, апоптозе, воспалительной реакции, восстановлении тканей, инвазии опухоли и метастазировании. Интегрин включает одну α -субъединицу и одну β -субъединицу. Различные α и β субъединицы образуют множество различных по эффектам интегринов. В частности, интегрины $\beta1$ необходимы для апикальной локализации комплекса белков, регулирующих асимметричное деление эпидермальных стволовых клеток, которое обеспечивает баланс между расположенными на базальной мембране стволовыми и прогениторными клетками и их дифференцирующимися потомками в супрабазальных слоях эпидермиса [48].

Имеются данные о влиянии ряда факторов на экспрессию субъединиц интегрин и реализацию его эффектов. Так, оксид азота (NO) может индуцировать экспрессию $\beta1$ интегрин в кожном эпителии, действуя через сигнальный путь cGMP, что активирует пролиферацию и дифференцировку ЭСК волосяного фолликула и способствует заживлению ран [49-52]. Исследования S. E. J. Tanis b соавт. показали, что уменьшение уровня $\beta1$ -интегрин сопряжено с угнетением экспрессии гена « $\beta1$ -примыкающей длинной некодирующей РНК» (*BLNCR*), что сопровождается переходом ЭСК от пролиферации к дифференцировке и ограничению пролиферативного потенциала клетки [53].

При связывании ламинина 332 внеклеточного матрикса и интегрин клеточный ответ определяется состоянием молекул ламинина, что позволяет регулировать адгезию, миграцию и пролиферацию кератиноцитов. Вероятно, это осуществляется через NF-kB или MAPK-зависимый путь, инициируемый активацией $\beta4$ -интегрин, а также через активацию малой GTP-азы Rac1 при воздействии EGF, что приводит к супрессии и перераспределению интегрин $\alpha3\beta1$ из базальных фокальных контактов в область межклеточных соединений. Подобные изменения определяют миграцию кератиноцитов в виде единого пласта, что предполагает координацию хемотаксиса при репаративной регенерации кожи [54].

Кератин является важным структурным белком эпидермальных клеток. Разные типы кератина соот-

ветствуют разной степени дифференцировки эпидермальных клеток и могут быть использованы для маркировки стволовых, промежуточных – transient amplifying cells (TACs) и дифференцированных – terminally differentiated cells (TDCs) эпидермальных клеток [55]. ЭСК экспрессируют в основном кератин 15 и 19 (K15 и K19); TACs экспрессируют кератин 5 и 14 (K5 и K14); и TDCs экспрессируют кератин 1 и 10 (K1 и K10). Недавние исследования показали, что прямая репрессия цитокератина 15 (K15) miR-184 индуцирует активацию Notch и дифференцировку ЭСК [56].

Сигнальные пути Wnt и Notch. Известно, что микроокружение стволовых клеток, играет ключевую роль в регулировании их миграции, пролиферации и дифференцировки. В частности, выше было отмечено влияние компонентов внеклеточного матрикса на экспрессию интегрина и поведение ЭСК. Безусловно, поведение стволовых клеток контролируется взаимодействием между внешними сигналами и внутренними транскрипционными программами, которое достигается функционированием системы множественных сигнальных путей [57]. Большое внимание среди последних уделяется Wnt и Notch – сигнальным путям, активация которых является важными механизмами влияния микросреды на ЭСК, играющими значительную роль в формировании кожи и заживлении ран [58–60]. При повреждении кожи, изменение количества репарационных клеток, концентрации цитокинов и компонентов внеклеточного матрикса приводят к активации регуляторных связей, включая Wnt и Notch сигнальные пути в клетках раны [61]. Таким образом, индуцируются дифференцировка и пролиферация ЭСК в области повреждения.

Сигнальный путь Wnt. Сигнальный белок Wnt является секретлируемым гликопротеином и может регулировать пролиферацию, дифференцировку и миграцию родственных клеток [62, 63]. Он достигает клеток-мишеней главным образом посредством диффузии и активного транспорта и связывается с семейством белка Frizzled (Frz) (трансмембранного рецептора) или семейством белков, связанных с рецептором липопротеином, на поверхности клеток-мишеней, вызывая накопление вторичного мессенджера β -катенина в цитоплазме и, тем самым, активирует каскадную реакцию [64]. Когда сигнальный путь Wnt неактивен, вторичный мессенджер β -катенин фосфорилируется после связывания с комплексом протеинов, включая гликогенсинтаз-киназу-3 β (GSK-3 β), и затем деградирует. GSK-3 β это серин-треониновая протеинкиназа, которая участвует в регуляции стабильности β -катенина и играет ключевую роль в разрушении комплекса [65].

Связывание белка Wnt с трансмембранным рецептором блокирует GSK-3 β -опосредованное фосфорилирование β -катенина, что приводит к накоплению β -катенина в цитоплазме. Впоследствии он входит в ядро, чтобы связываться с факторами транскрипции TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor), активируя транскрипцию генов-мишеней (с-Мус, циклин D1 и т. д.). Таким образом, происходит активация этого сигнального пути [59]. Исследователи доказали, что специфическое подавление экспрессии β -катенина ограничивает пролиферацию ЭСК [66–68]. Ингибирование активности сигнального пути Wnt с помощью секретлируемого протеина DKK1 (Dickkopf Related Protein 1) также может обратить вспять чрезмерную пролиферацию ЭСК [69, 70]. Высокий уровень активности Wnt сигнального пути может стимулировать пролиферацию ЭСК в структурах волосяного фолликула и сальной железы, тогда как блокирование передачи сигналов Wnt приводит к дифференцировке ЭСК в клетки эпидермиса [71].

C. Fathke, L. Wilson, K. Shah и соавт. доказали, что активация Wnt/ β -catenin сигнального пути может значительно улучшить качество заживления кожи у млекопитающих [72]. Следовательно, изменения в Wnt/ β -catenin сигнальных путях могут быть одним из важных молекулярных механизмов неадекватного заживления ран и образования рубцов при глубоком повреждении кожи, а использование данных сигнальных путей для регуляции дифференцировки ЭСК может улучшить качество заживления.

Notch сигнальный путь. Notch сигнальный путь участвует в системах передачи сигналов, которые определяют судьбу клеток в различных тканях, в частности играет решающую роль в регуляции пролиферации плюрипотентных стволовых клеток [73, 74]. Он включает рецепторный белок Notch (Notch1–4), лигандный белок Notch соседних клеток (Delta1, Delta3–4, Jag1, Jag2 и т. д.) и ДНК-связывающий белок. ДНК-связывающий фактор транскрипции CSL взаимодействует с областями гена-мишени ДНК и рекрутирует корепрессоры (SMRT), которые, в свою очередь, связываются с комплексами гистондеацетилазы, сохраняя хроматин в режиме молчания транскрипции. При связывании лигандов Notch с рецепторными белками происходит высвобождение внутриклеточного домена Notch (NICD), который вытесняет корепрессоры и связывается с CSL, формируя тройной комплекс с ДНК. Тройной комплекс привлекает факторы транскрипции, такие как связанный с p300 CBP фактор, PCAF, GCN5 и CREB-связывающий белок, активирующие p300 чувствительные гены (*Hes1*, *Deltex*). Эта

стратегия, при которой репрессорная форма эффекторов сигнального пути трансформируется в активный фрагмент, характерна для промоторов, регулируемых сигналом, и имеет ряд преимуществ, наиболее важно то, что эффектор идентифицирует мишени в отсутствие сигнала [75, 76]. *Hes1* является известной мишенью передачи сигналов Notch и играет важную роль в поддержании пролиферирующих клеток в недифференцированном состоянии и угнетении апоптоза [77].

Исследованиями последних лет показана важная роль взаимодействия разных сигнальных путей (в частности Notch, Wnt, Oct3/4) в регуляции пролиферации, дифференцировки, миграции и апоптоза клеток [78, 79].

МикроРНК. МикроРНК (miRNA, miR) регулируют экспрессию комплементарных мессенджерных РНК. В последние годы, роль miRNAs в формировании эпидермальной ткани и их влияние на ЭСК привлекает повышенное внимание многих исследователей [80]. Как уже было упомянуто ранее, экспрессия miRNA-184 блокирует пролиферацию ЭСК и способствует дифференцировке клеток [56]. J. Hildebrand и соавт. обнаружили, что в дифференцированных кератиноцитах повышается экспрессия miR-203, miRNA-23b, miR-95, miR-210, miRNA-224, miR-26a, miRNA-200a, miRNA-27b и miRNA-328, в то время, как экспрессия miRNA-376a снижается [81], что указывает на их участие в дифференцировке ЭСК. Также важная регуляторная роль в биологической активности ЭСК принадлежит miRNA-125b и miRNA-203.

Liang Zhang и соавт. продемонстрировали роль miR-125b как маркера «стволовости», снижение экспрессии которого необходимо для перехода в состояние быстрой пролиферации и дифференцировки. Достоверно подтвержденными мишенями miR-125b в коже являются гены, кодирующие факторы транскрипции *Blimp1* и *VDR*. Авторами показано, что в условиях эксперимента введение miR-125b в быстро пролиферирующие и дифференцирующиеся клетки кожи приводит к подавлению экспрессии *Blimp1* и *VDR* и развитию чрезмерно утолщенного эпидермиса, увеличению сальных желез и нарушению формирования волосяного покрова, данные изменения полностью обратимы после восстановления нормальной регуляции miR-125b [82].

MiR-203 является наиболее распространенной кератиноцит-специфичной miRNA, она первоначально была описана как репрессор «стволовости» и косвенный промотор процесса дифференцировки в эпидермальных кератиноцитах из-за способности останавливать пролиферацию и блокировать клеточный цикл

в фазе G0 / G1. Ведущую роль в этих путях, вероятно, играет p63 и LASP1, которые были идентифицированы как мишень miR-203 [83]. В исследовании G. Viticchiè и соавт. RAN и RAPH1 выявлены как новые мишени для miR-203. RAN является членом суперсемейства малых GTP-связывающих белков, активность которых ассоциирована с пролиферацией и выживанием клеток, ядерно-цитоплазматическим транспортом и формированием цитоскелета. RAPH1 является регулятором модуляции актина, принимающим участие в комплексах ремоделирования цитоскелета и в приобретении инвазивной способности раковыми клетками. Авторами показано, что MiR-203 подавляет экспрессию RAN и p63, что угнетает пролиферацию и вызывает задержку G0/G1 эпидермальных кератиноцитов человека. Кроме того, подавление экспрессии мишени miR-203 снижает миграционный потенциал клеток в условиях регенерации кожной раны, в данном аспекте наиболее значимо подавление RAPH1. В исследовании продемонстрировано, что miR-203 отсутствует в пролиферирующих и мигрирующих кератиноцитах на краю раны, но в значительной степени обнаруживается в областях, окружающих рану, где кератиноциты снова начинают дифференцироваться для восстановления нормального многослойного эпителия [84-87].

Длинные некодирующие РНК. Недавние исследования выявили важную регуляторную роль многих некодирующих РНК (нкРНК) в физиологии и патологии клеток [88]. Длинные некодирующие РНК (днкРНК) – это многочисленное семейство некодирующих РНК с более чем 200 нуклеотидами. Различно экспрессируемые днкРНК участвуют в регуляции биологической активности ЭСК, их пролиферации и дифференцировки путем регулирования связанных факторов транскрипции или повышения стабильности связанных мРНК [89]. Так, днкРНК *BLNCR* и ее связь с процессом дифференцировки была описана выше. M. Kretz и соавт. идентифицировали *ANCR* («антидифференцировочную» днкРНК) как днкРНК из 855 пар оснований, экспрессия которой снижается во время дифференцировки. Исследователями показано истощение *ANCR* в популяциях, содержащих предшественники, привело к быстрой индукции гена дифференцировки без дополнительных стимулов, что позволило заключить, что днкРНК *ANCR* требуется для обеспечения недифференцированного состояния клеток в эпидермисе. *ANCR* нацелена на белок *EZH2 Polycomb*, который подавляет экспрессию *MAF* и *MAFB* в ЭСК. В более поздних работах данной исследовательской группы показана важная роль другой днкРНК – *TINCR* в терминальной дифференцировке кератиноцитов посред-

ством механизма рекрутирования белка STAU1 для стабилизации специфичных для дифференцировки мРНК MAF и MAFB [90-92]. В работах последних лет показана важная роль днкРНК LINC00941 и HOTAIR как регуляторов регенерации эпидермиса у человека. LINC00941 репрессирует белок SPRR5, который функционирует как важный положительный регулятор дифференцировки кератиноцитов. HOTAIR способствует пролиферации ЭСК и поддерживает состояние «стволовости». ЭСК с избыточной экспрессией HOTAIR ускоряет реэпителизацию и способствует заживлению ожоговой раны [93, 94].

Заключение

Таким образом, несмотря на существенное число научных публикаций, посвященных механизмам регенерации и репарации эпителия и эпидермиса, данный вопрос продолжает оставаться актуальным. На регенераторный потенциал оказывает влияние большое количество различных экзогенных влияний, биологически активных веществ, аллогенных и аутогенных трансплантатов и этот список неуклонно растет [95, 13]. Обнаружено, что основную роль в гомеостатическом регулировании состояния тканей кожи играют эпидермальные стволовые клетки. Именно активность ЭСК определяет, восстановится и обновится ли эпидермис после травмы или нет. Внутриклеточные пути управления поведением стволовых клеток и их триггерные молекулы зачастую пока неизвестны.

Подчеркнем, что во многих вышеприведенных исследованиях использованы CreERT2-опосредованные рекомбинантные технологии, дающие возможность использовать контролируемые целевые соматические мутации с целью изолированного изучения функции генов. Особенно интересны мутации в локусах, кодирующих информацию о формировании эпителия как в условиях физиологической, так и в условиях репаративной регенерации [96-98]. В целом проблема изучения влияния ЭСК на процессы кожной репарации, а также управления их функционированием является нерешенной. Надеемся, что будущие исследования позволят составить более полную картину и сформировать новые принципы и взгляды на терапию нарушений целостности кожных покровов и слизистых в рамках регенеративной медицины.

Литература

(п.п. 1– 8; 10; 14 – 94; 96–98 см. References)

9. Еремина М.Г., Еремин А.В., Елдесбаева Я.С., Дроздова С.Б., Рощепкина Е.В., Чумаченко Ю.В. Регенеративные возможности кожи. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2018; 14(4): 738-39.

11. Чепурненко М. Н. Источники посттравматической регенерации эпителия кожи. *Гены и клетки*. 2006; 1 (2): 29-31.
 12. Мяделец О.Д., Лебедева Е.И., Мяделец Н.Я. Фосфатазопозитивные стволовые клетки кожи крыс при ее посттравматической регенерации в разных условиях нанесения раны. *Вестник ВГМУ*. 2018; 17 (3): 44-57.
 13. Пронина Е.А., Масляков В.В., Степанова Т.В., Попыхова Э.Б., Иванов А.Н. Анализ механизмов регенерации при аутоотрансплантации. *Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова*. 2019; 27 (3): 393-406.
 95. Силина Е.В., Мантурова Н.Е., Артюшкова Е.Б., Литвицкий П.Ф., Васин В.И., Синельникова Т.Г. и др. Динамика заживления кожной раны при применении инъекционных стимуляторов регенерации у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(3): 54-63.

References

1. Ronghua Y., Jingru W., Xiaodong Ch., Yan Sh., Julin X. Epidermal stem cells in wound healing and regeneration. *Stem Cells International* 2020; available at: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2020/9148310/>
 2. Morgan T.H. *Regeneration*. Macmillan; London, UK; 1901.
 3. Michalopoulos G.K., DeFrances M.C. Liver regeneration. *Science*. 1997; 276: 60–6.
 4. Sanchez Alvarado A., Tsonis P.A. Bridging the regeneration gap: Genetic insights from diverse animal models. *Nat. Rev. Genet.* 2006; 7: 873–84.
 5. Galliot B., Crescenzi M., Jacinto A., Tajbakhsh S. Trends in tissue repair and regeneration. *Development*. 2017; 144: 357–64.
 6. Yuan A.R, Bian Q., Gao J.Q. Current advances in stem cell-based therapies for hair regeneration. *Eur J Pharmacol*. 2020; 881:173197.
 7. Korbling M., Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair – a new therapeutic concept? *N. Engl. J. Med.* 2003; 6: 570–82.
 8. Xie L., Li T. Z., Qi S. H., et al. A preliminary study on the identification and distribution of epidermal stem cells in different degrees of burn wounds in scalded rats. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2003; 6 (19): 344–46.
 9. Eremina M.G., Eremina A.V., Eldesbaeva YA.S., Drozdova S.B., Roshchepkina E.V., Chumachenko Yu.V. Regenerative capabilities of the skin. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy*. 2018; 14 (4): 738-39. (in Russian)
 10. Rzepka K., Schaarschmidt G., Nagler M., Wohlrab J. Epidermalstemcells. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2005; 12(3): 962–73.
 11. Чепурненко М. Н. Sources of post-traumatic regeneration of skin epithelium. *Geny i kletki*. 2006; 1 (2): 29-31. (in Russian)
 12. Myadec O.D., Lebedeva E.I., Myadec N.YA. Phosphatase-positive stem cells of rat skin during its post-traumatic regeneration under different conditions of wounding. *Vestnik VGMU*. 2018; 17 (3): 44-57. (in Russian)
 13. Pronina E.A., Maslyakov V.V., Stepanova T.V., Popyhova E.B., Ivanov A.N. Analysis of regeneration mechanisms during autotransplantation. *Ros. med.-biol. vestn. im. akad. I.P. Pavlova*. 2019; 27 (3): 393-406. (in Russian)
 14. Blanpain C., Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10(3): 207-17.
 15. Neels J.G., Grimaldi P.A. Physiological functions of peroxisome proliferator-activated receptor beta. *Physiol. Rev*. 2014; 94: 795–858.

16. Magadum A., Ding Y., He L., Kim T., Vasudevarao M.D., Long Q., et al. Live cell screening platform identifies PPARdelta as a regulator of cardiomyocyte proliferation and cardiac repair. *Cell Res.* 2017; 27: 1002–19.
17. De Lellis L., Cimini A., Veschi S., Benedetti E., Amoroso R., Cama A. et al. The Anticancer Potential of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Antagonists. *Chem Med Chem.* 2018; 13: 209–19.
18. Palomer X., Barroso E., Pizarro-Delgado J., Pena L., Botteri G., Zarei M. PPARbeta/delta: A Key Therapeutic Target in Metabolic Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19.
19. Palomer X., Barroso E., Zarei M., Botteri G., Vazquez-Carrera M. PPARbeta/delta and lipid metabolism in the heart. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016; 1861: 1569–78.
20. Muller R. PPARbeta/delta in human cancer. *Biochimie.* 2017; 136: 90–9.
21. Palomer X., Barroso E., Zarei M., Botteri G., Vazquez-Carrera M. PPARbeta/delta and lipid metabolism in the heart. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016; 1861: 1569–78.
22. Neels J.G., Grimaldi P.A. Physiological functions of peroxisome proliferator-activated receptor beta. *Physiol. Rev.* 2014; 94: 795–858.
23. Hwang I., Kim J., Jeong S. Beta-Catenin and peroxisome proliferator-activated receptor-delta coordinate dynamic chromatin loops for the transcription of vascular endothelial growth factor A gene in colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2012; 287: 41364–73.
24. Magadum A., Ding Y., He L., Kim T., Vasudevarao M.D.; Long Q. et al. Live cell screening platform identifies PPARdelta as a regulator of cardiomyocyte proliferation and cardiac repair. *Cell Res.* 2017; 27: 1002–19.
25. Montagner A., Wahli W., Tan N.S. Nuclear receptor peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) beta/delta in skin wound healing and cancer. *Eur. J. Dermatol.* 2015; 25 (Suppl. 1): 4–11.
26. Scholtyssek C., Katzenbeisser J., Fu H., Uderhardt S., Ipseiz N., Stoll C. et al. PPARbeta/delta governs Wnt signaling and bone turnover. *Nat. Med.* 2013; 19: 608–613.
27. Nakamura Y., Nakamura T., Tarui T., Inoue J., Kinoshita S. Functional role of PPARdelta in corneal epithelial wound healing. *Am. J. Pathol.* 2012; 180: 583–98.
28. Mothe-Satney I., Piquet J., Murdaca J., Sibille B., Grimaldi P.A., Neels J.G., et al. Peroxisome Proliferator Activated Receptor Beta (PPARbeta) activity increases the immune response and shortens the early phases of skeletal muscle regeneration. *Biochimie.* 2017, 136, 33–41.
29. Liu H.X., Fang Y., Hu Y., Gonzalez F.J., Fang J., Wan Y.J. PPAR-beta Regulates Liver Regeneration by Modulating Akt and E2f Signaling. *PLoS ONE.* 2013; 8: e65644.
30. Gupta M., Mahajan V.K., Mehta K.S., Chauhan P.S., Rawat R. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and PPAR agonists: The ‘future’ in dermatology therapeutics? *Arch. Dermatol. Res.* 2015; 307: 767–80.
31. Galliot B., Crescenzi M., Jacinto A., Tajbakhsh S. Trends in tissue repair and regeneration. *Development.* 2017; 144: 357–64.
32. Karin M., Clevers H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature.* 2016; 529: 307–15.
33. Abnave P., Ghigo E. Role of the immune system in regeneration and its dynamic interplay with adult stem cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2018; 10849: 30200–8.
34. Michalopoulos G.K., DeFrances M.C. Liver regeneration. *Science.* 1997; 276: 60–6.
35. Hankenson K.D., Gagne K., Shaughnessy M. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015; 94: 3–12.
36. Hankenson K.D., Zimmerman G., Marcucio R. Biological perspectives of delayed fracture healing. *Injury.* 2014; 45 (Suppl. 2): S8–S15.
37. Zhang Q., Raoof M., Chen Y., Sumi Y., Sursal T., Junger W., et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature.* 2010; 464: 104–7.
38. Stoick-Cooper C.L., Moon R.T., Weidinger G. Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. *Genes Dev.* 2007; 21: 1292–315.
39. Wynn T.A., Vannella K.M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity.* 2016; 44: 450–62.
40. Montagner A., Wahli W. Contributions of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta to skin health and disease. *Biomol. Concepts.* 2013; 4: 53–64.
41. Tan N.S., Michalik L., Noy N., Yasmin R., Pacot C., Heim M., et al. Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Genes Dev.* 2001; 15: 3263–77.
42. Michalik L., Desvergne B., Tan N.S., Basu-Modak S., Escher P., Rieusset J., et al. Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *J. Cell Biol.* 2001; 154: 799–814.
43. Tan N.S., Icre G., Montagner A., Bordier-ten-Heggeler B., Wahli W., Michalik L. The nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta potentiates cell chemotaxis, polarization, and migration. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27: 7161–75.
44. Chong H.C., Tan M.J., Philippe V., Tan S.H., Tan C.K., Ku C.W., et al. Regulation of epithelial-mesenchymal IL-1 signaling by PPAR-beta/delta is essential for skin homeostasis and wound healing. *J. Cell Biol.* 2009; 184: 817–31.
45. Montagner A., Wahli W., Tan N.S. Nuclear receptor peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) beta/delta in skin wound healing and cancer. *Eur. J. Dermatol.* 2015; 25 (Suppl. 1): 4–11.
46. Gupta M., Mahajan V.K., Mehta K.S., Chauhan P.S., Rawat R. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and PPAR agonists: The ‘future’ in dermatology therapeutics? *Arch. Dermatol. Res.* 2015; 307: 767–80.
47. Shibuya T., Honma M., Fujii M., Iinuma S., and Ishida-Yamamoto A. Podoplanin suppresses the cell adhesion of epidermal keratinocytes via functional regulation of β 1-integrin. *Archives of Dermatological Research.* 2019; 1(311): 45–53.
48. Lechler T, Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature.* 2005 8; 437(7056): 275–80. doi: 10.1038/nature03922
49. Jones P. H. and Watt F. M. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell.* 1993; 4 (73): 713–24.
50. Zhan R., Wang F., Wu Y. et al. Nitric oxide induces epidermal stem cell de-adhesion by targeting integrin β 1 and Talin via the cGMP signalling pathway. *Nitric Oxide.* 2018; 78: 1–10.
51. Zhu J., Wang P., Yu Z. et al. Advanced glycosylation end product promotes forkhead box O1 and inhibits Wnt pathway to suppress capacities of epidermal stem cells. *American Journal of Translational Research.* 2016; 12(8): 5569–79.
52. Bai W.F., Xu W.C., Zhu H.X., Huang H., Wu B., Zhang M.S. Efficacy of 50 Hz electromagnetic fields on human epidermal stem cell transplantation seeded in collagen sponge scaffolds for wound healing in a murine model. *Bioelectromagnetics.* 2017; 3(38): 204–12.
53. Tanis S.E.J., Köksal E.S., van Buggenum J.A.G.L., Mulder K.W. BLNCR is a long non-coding RNA adjacent to integrin beta-1 that

- is rapidly lost during epidermal progenitor cell differentiation. *Scientific Reports*. 2019; 1(9): 31.
54. Ripa A.L., Vorotelyak E., Vasiliev A.V., Terskikh V. The Role of Integrins in the Development and Homeostasis of the Epidermis and Skin Appendages. *Acta naturae*. 2013. 5. 22-33. 10.32607/20758251-2013-5-4-22-33
 55. Zhou X., Li G., Wang D., Sun X., Li X. Cytokeratin expression in epidermal stem cells in skin adnexal tumors. *Oncology Letters*. 2019; 1(17): 927–32.
 56. Nagosa S., Leesch F., Putin D., et al. microRNA-184 induces a commitment switch to epidermal differentiation. *Stem Cell Reports*. 2017; 6(9): 1991–4.
 57. Spradling A., Drummond-Barbosa D., and Kai, T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001; 414(6859): 98–4.
 58. Kretzschmar K. and Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells. *Developmental Biology*. 2017; 2(428): 273–82.
 59. Sato M. Upregulation of the Wnt/ β -catenin pathway induced by transforming growth factor- β in hypertrophic scars and keloids. *Acta Dermato-Venereologica*. 2006; 4(86): 300–7.
 60. Fre S., Huyghe M., Mourikis P., Robine S., Louvard D., Artavanis-Tsakonas S. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature*. 2005; 7044(435): 964–68.
 61. Zhang H., Nie X., Shi X., et al. Regulatory mechanisms of the Wnt/ β -Catenin pathway in diabetic cutaneous ulcers. *Frontiers in Pharmacology*. 2018; 9: 1114.
 62. Xu G., Emmons R., Hernández-Saavedra D., Kriska A., Pan Y.X., Chen H. Regulation of gene expression of wnt signaling pathway by dietary high fat and effects on colon epithelia of male mice. *The FASEB Journal*. 2017; 31(Suppl. 1): 622–43.
 63. Nusse R., Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell*. 2017; 6(169): 985–99.
 64. Huang P., Yan R., Zhang X., Wang L., Ke X., Qu Y. Activating Wnt/ β -catenin signaling pathway for disease therapy: challenges and opportunities. *Pharmacology & Therapeutics*. 2019; 196: 79–90.
 65. McCubrey J. A., Rakus D., Gizak A., et al. Effects of mutations in Wnt/ β -catenin, hedgehog, Notch and PI3K pathways on GSK-3 activity—Diverse effects on cell growth, metabolism and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. 2016; 12(1863): 2942–76.
 66. Huelsken J., Vogel R., Erdmann B., Cotsarelis G., and Birchmeier W. β -catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*. 2001; 4(105): 533–45.
 67. Choi Y. S., Zhang Y., Xu M., et al. Distinct functions for Wnt/ β -catenin in hair follicle stem cell proliferation and survival and interfollicular epidermal homeostasis. *Cell*. 2013; 6(13): 720–33.
 68. Lim X., Tan S.H., Koh W.L.C., et al. Interfollicular epidermal stem cells self-renew via autocrine Wnt signaling. *Science*. 2013; 6163(342): 1226–30.
 69. Niemann C., Owens D.M., Huelsken J., Birchmeier W., Watt F. M. Expression of Δ NLE1 in mouse epidermis results in differentiation of hair follicles into squamous epidermal cysts and formation of skin tumours. *Development*. 2002; 1(129): 95–9.
 70. Andl T., Reddy S.T., Gaddapara T., Millar S.E. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Developmental Cell*. 2002; 5(2): 643–53.
 71. Kretzschmar K., Cottle D.L., Schweiger P. J., Watt F.M. The androgen receptor antagonizes Wnt/ β -catenin signaling in epidermal stem cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 2015; 11(135): 2753–63.
 72. Fathke C., Wilson L., Shah K., et al. Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing. *BMC Cell Biology*. 2006; 1(7): 4.
 73. Kopan R. Notch signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012; 10(4): a011213.
 74. Hori K., Sen A., Artavanis-Tsakonas S. Notch signaling at a glance. *Journal of Cell Science*. 2013; 126(Pt 10): 2135–40.
 75. Varshney S. and Stanley P. Notch ligand binding assay using flow cytometry. *Bio-Protocol*. 2017; 23(7): e2637.
 76. Fiúza U., Arias A. Cell and molecular biology of Notch, *Journal of Endocrinology*. 2007; 194(3), 459–74.
 77. Zhang R.Z., Zeng X.H., Lin Z.F., et al. Downregulation of Hes1 expression in experimental biliary atresia and its effects on bile duct structure. *World Journal of Gastroenterology*. 2018; 29(24): 3260–72.
 78. Shi Y., Shu B., Yang R., et al. Wnt and Notch signaling pathway involved in wound healing by targeting c-Myc and Hes1 separately. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015; 1(6):120.
 79. Zeng F., Chen H., Zhang Z., et al. Regulating glioma stem cells by hypoxia through the Notch1 and Oct3/4 signaling pathway. *Oncology Letters*. 2018; 5(16): 6315–22.
 80. Yi R., Fuchs E. MicroRNA-mediated control in the skin. *Cell Death & Differentiation*. 2010; 2(17): 229–35.
 81. Hildebrand J., Rütze M., Walz N., et al. A comprehensive analysis of MicroRNA expression during human keratinocyte differentiation in vitro and in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*. 2011; 131(1): 20–9.
 82. Zhang L., Stokes N., Polak L., Fuchs E. Specific microRNAs are preferentially expressed by skin stem cells to balance self-renewal and early lineage commitment. *Cell Stem Cell*. 2011; 8(3): 294–8.
 83. Lena A.M., Shalom-Feuerstein R., Rivetti di Val Cervo P., Aberdam D., Knight R.A., et al. MiR-203 represses ‘stemness’ by repressing DeltaNp63. *Cell Death Differ*. 2008; 15(7): 1187–95.
 84. Viticchiè G., Lena A. M., Cianfarani F., et al. MicroRNA-203 contributes to skin re-epithelialization. *Cell Death & Disease*. 2012;3(11): e435.
 85. Yi R., Poy M.N., Stoffel M., Fuchs E. A skin microRNA promotes differentiation by repressing ‘stemness’. *Nature*. 2008; 452(7184): 225–29.
 86. Koster M.I., Kim S., Mills A.A., DeMayo F., Roop D.R. *p63* is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes & Development*. 2004; 18(2): 126–31.
 87. Pastar I., Khan A. A., Stojadinovic O., et al. Induction of specific microRNAs inhibits cutaneous wound healing. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(35):29324–35.
 88. Michel M., L’Heureux N., Auger F. A., and Germain L. From newborn to adult: phenotypic and functional properties of skin equivalent and human skin as a function of donor age. *Journal of Cellular Physiology*. 1997; 2(171): 179–89.
 89. Hu W., Alvarez-Dominguez J.R., Lodish H.F. Regulation of mammalian cell differentiation by long non-coding RNAs. *EMBO Reports*. 2012; 13(11): 971–83.
 90. Kretz M., Siprashvili Z., Chu C., Webster D.E., Zehnder A., Qu K., et al. Suppression of progenitor differentiation requires the long non-coding RNA ANCR. *Genes Dev*. 2012; 26: 338–43.
 91. Kretz M., Siprashvili Z., Chu C., Webster D.E., Zehnder A., Qu K., et al. Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR. *Nature*. 2013; 493(7431): 231–5.
 92. Lopez-Pajares V., Qu K., Zhang J., et al. A LncRNA-MAF:MAFB transcription factor network regulates epidermal differentiation. *Dev Cell*. 2015; 32(6): 693–706. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.028

93. Ziegler C., Graf J., Faderl S., Schedlbauer J., Strieder N., Förstl B., et al. The long non-coding RNA LINC00941 and SPRR5 are novel regulators of human epidermal homeostasis. *EMBO Rep.* 2019 (2):e46612. doi: 10.15252/embr.201846612
94. Shi Y., Yang R., Tu L., Liu D. Long non-coding RNA HOTAIR promotes burn wound healing by regulating epidermal stem cells. *Mol Med Rep.* 2020; (3): 1811-20. doi: 10.3892/mmr.2020.11268
95. Silina E.V., Manturova N.E., Artyushkova E.B., Litvickij P.F., Vasin V.I., Sinel'nikova T.G., et al. The dynamics of skin wound healing with the use of injectable regeneration stimulants in rats. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2020; 64(3): 54-63. (in Russian)
96. Indra A.K., Li M., Brocard J., Warot X., Bornert J.M., Gerard C., et al. Targeted somatic mutagenesis in mouse epidermis. *Horm Res.* 2000; 54(5-6): 296-300.
97. Indra A.K., Warot X., Brocard J., Bornert J.M., Xiao J.H., Chambon P., et al. Temporally controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27(22): 4324-27.
98. Metzger D., Indra A.K., Li M., Chapellier B., Calleja C., Ghyselinck N.B., et al. Targeted conditional somatic mutagenesis in the mouse: temporally-controlled knock out of retinoid receptors in epidermal keratinocytes. *Methods Enzymol.* 2003; 364: 379-8.

Сведения об авторах:

Власова Татьяна Ивановна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. нормальной и патологической физиологии медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева»;

Арсентьева Екатерина Владимировна, канд. мед. наук, доцент каф. нормальной и патологической физиологии медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева»;

Спирина Мария Александровна, канд. мед. наук, доцент каф. нормальной и патологической физиологии медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева»;

Белова Людмила Александровна, канд. мед. наук, доцент, каф. нормальной и патологической физиологии медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева».

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Хохлова А.В.¹, Бойченко П.К.², Востриков А.А.³, Магомедов М.У.⁴

Роль белков теплового шока в патогенезе ряда компонентов метаболического синдрома

¹ГОУ ВО ЛНР «Луганский государственный педагогический университет»,

Луганск, ул. Оборонная, д. 2;

²ГУ ЛНР «Луганский государственный медицинский университет им. Святителя Луки»,

91045, Луганск, квартал 50-летия Обороны Луганска, д. 1г;

³ГУ ЛНР «Луганский республиканский Центр экстренной медицинской помощи и медицины катастроф»,

Луганск, ул. Щаденко, д. 10а;

⁴ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»,

Москва, Россия, ул. Щепкина, д. 61/2

Проблема изучения метаболического синдрома (МС) на протяжении долгого времени остается крайне важной. Масштабы и темпы распространения входящих в синдром патологических состояний таких как: ожирение, артериальная гипертензия (АГ), сахарный диабет 2 типа (СД 2), дислипидемия, гиперинсулинемия и пр., придали МС статус пандемии XXI века. В последнее время большинство исследований направлено на поиск маркеров риска развития МС с целью предиктивной и превентивной диагностики. Обзор посвящен анализу возможного участия белков теплового шока (БТШ) в различных патологических процессах, сопровождающих МС. Знание молекулярных механизмов патогенеза МС играет важную роль в разработке персонализированного подхода к ведению таких пациентов, а дальнейшее углубленное исследование БТШ может позволить использовать данные белки в качестве одной из возможных мишеней при разработке методов лечения МС.

Ключевые слова: белки теплового шока; метаболический синдром; сахарный диабет 2-го типа; малые белки теплового шока; полиморфизм; сердечно-сосудистые заболевания

Для цитирования: Хохлова А.В., Бойченко П.К., Востриков А.А., Магомедов М.У. Роль белков теплового шока в патогенезе ряда компонентов метаболического синдрома. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66 (2): 102-107.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.102-107

Участие авторов: концепция дизайна исследования – Хохлова А.В., Бойченко П.К.; сбор материала – Хохлова А.В., Магомедов М.У.; анализ и интерпретация данных – Хохлова А.В., Бойченко П.К., Востриков А.А., Магомедов М.У.; написание текста – Хохлова А.В.; редактирование текста – Бойченко П.К., Востриков А.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

Для корреспонденции: *Востриков Алексей Андреевич*, e-mail: seruj_strag@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 26.03.2021

Принята к печати 31.03.2022

Опубликована 27.05.2022

Khokhlova A.V.¹, Boichenko P.K.², Vostrikov A.A.³, Magomedov M.U.⁴

The role of heat shock proteins in the pathogenesis of some components of metabolic syndrome. Literature review

¹Lugansk State Pedagogical University,
Oboronnaya 2, Luhansk²Saint Luka Lugansk State Medical University,
50th Anniversary of Luhansk Defense Quarter, Luhansk;³Luhansk Republic Center for Emergency Medical Aid and Catastrophe Medicine,
Shchadenko St. 10a, Luhansk;⁴Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute,
Shchepkina St. 61/2, Moscow, Russian Federation

Studying metabolic syndrome (MS) has remained extremely important for a long time. The magnitude and increasing prevalence of pathological conditions that comprise this syndrome, such as obesity, arterial hypertension (AH), type 2 diabetes mellitus (T2DM), dyslipidemia, hyperinsulinemia, etc., have given MS a status of pandemic of the 21st century. Recently, for prevention

and prognosis, most studies have focused on identifying risk factors for MS. This review analyzes the participation of heat shock proteins (HSPs) in various pathological processes emerging in MS. The knowledge of molecular mechanisms of MS pathogenesis plays an important role in developing a personalized approach for managing MS patients. Detailed studies of HSPs may allow using these proteins as possible targets in the development of MS treatments.

Keywords: HSP; metabolic syndrome; Type 2 diabetes mellitus; heat shock proteins; polymorphism; cardiovascular disease

For citation: Khokhlova A.V., Boichenko P.K., Vostrikov A.A., Magomedov M.U. The role of heat shock proteins in the pathogenesis of some components of metabolic syndrome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(2): 102-107. (in Russian).

DOI:10.25557/0031-2991.2022.02.102-107

Author's contribution: concept and design – Khokhlova A.V., Boichenko P.K.; collection of material – Khokhlova A.V., Magomedov M.U.; analysis and interpretation of data – Khokhlova A.V., Boichenko P.K., Vostrikov A.A., Magomedov M.U.; writing of the text – Khokhlova A.V.; editing of the text – Boichenko P.K., Vostrikov A.A. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondens: Vostrikov A.A., e-mail: seruj_strag@mail.ru

Financing. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:

Khokhlova A.V., <https://orcid.org/0000-0002-9569-8928>; SPIN:6970-0037

Boichenko P.K., <https://orcid.org/0000-0000-0000-0000>

Vostrikov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0638-2375>; SPIN: 2403-4230

Magomedov M.U., <https://orcid.org/0000-0002-5790-281X>

Received 26.03.2021

Accepted 31.03.2022

Published 27.05.2022

Список сокращений

АГ – артериальная гипертензия

БТШ – белки теплового шока

БТШ70 – белки теплового шока 70

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИР – инсулинорезистентность

МС – метаболический синдром

СД 2 – сахарный диабет 2 типа

СД – сахарный диабет

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

мБТШ – малые белки теплового шока

Состояние проблемы. Термин «метаболический синдром» – отражает набор факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), в основе которых лежит инсулинорезистентность (ИР). В 2005 г. Международная федерация сахарного диабета определила сочетание абдоминального ожирения, ИР, дислипидемии, артериальной гипертонии (АГ), нарушений системы гемостаза, гипергликемии и хронического субклинического воспаления как метаболический синдром (МС) [1].

В общей популяции распространенность МС достаточно высока и колеблется от 15 до 25%, при этом имея тенденцию к росту. В возрасте 19 – 28 лет МС ди-

агностируется у 7% лиц, в диапазоне 59-70 лет этот показатель превышает 44%, а у пациентов старше 70 лет составляет 42% [2]. Частота встречаемости МС в разных странах варьирует в широких пределах и четко коррелирует с образом жизни и возрастом. Так среди взрослого населения в США МС встречается более чем у 23%, в Китае – 11%, а в Российской Федерации до 23%. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) примерно 1,7 млрд человек на планете имеют ожирение или избыточную массу тела. Повсеместно возросла частота ожирения более чем на 75% за последнее десятилетие, а согласно прогнозам к 2025 г. ожирением будут страдать 51% женщин и 42% мужчин [3].

Рядом популяционных исследований продемонстрировано, что сочетание нескольких факторов МС суммарно составляют высокий риск развития ССЗ и атеросклероза, что в свою очередь приводит к фатальному течению инсульта головного мозга и инфаркта миокарда [4, 5]. Сахарный диабет 2 типа (СД 2) в комплексе с АГ встречается более чем у 80% больных МС, что повышает риск летальных исходов более чем в 3 раза по сравнению с пациентами, имеющими одно из этих заболеваний в контексте синдрома [6]. Таким образом, проблема отсутствия сочетанного алгоритма в диагностике МС и своевременной персона-

лизированной профилактики является приоритетной и актуальной, что в свою очередь требует углубленно-го изучения патогенеза этого синдрома.

Белки теплового шока (БТШ) – представляют собой белки, вырабатываемые в клетках как ответ на стрессовые воздействия (гипертермия, этанол, гипоксия, свободные радикалы и пр.) и являются важным звеном клеточной системы репарации [7, 8]. Они обеспечивают правильную сборку белка, формирование его третичной структуры, функционируя как молекулярные шапероны. БТШ также принимают участие в транспорте протеинов в клеточные компартменты, контролируют процесс апоптоза и клеточный цикл. БТШ классифицируются в зависимости от своей молекулярной массы, что отражено в их названии, они кодируются генами, расположенными в коротком плече шестой хромосомы человека (*br21.3*) [9]. В 2003 г. ученые А. Rockley и соавт. опубликовали работу, которая была посвящена роли БТШ в патогенезе атеросклероза. Полученные данные наглядно продемонстрировали, что БТШ70, представляющие собой обширное семейство белков массой 70 000 дальтон, участвующие преимущественно в презентации антигенов и защите клетки, ассоциированы с развитием атеросклероза у пациентов с уже диагностированной АГ [10]. Подобные исследования имеются и у других авторов, что позволяет назвать БТШ70 одними из ключевых молекул, которые принимают непосредственное участие в развитии АГ [11, 12]. Существует 3 гена, кодирующие молекулы БТШ70: БТШ70-1 (*HSPA1A*), БТШ70-2 (*HSPA1B*) и БТШ70-hom (*HSPA1L*). БТШ70-1 и БТШ70-2 кодируют белок, синтезирующийся при тепловом шоке, то есть при аномально высокой температуре, а БТШ70-hom кодирует нечувствительную к тепловому шоку форму [13].

Белки теплового шока и СД. Диабет остается одной из основных причин смертности во всем мире и согласно прогнозам Международной Диабетической Федерации (IDF), к 2035 г. будет выявлен у 592 млн человек [14]. В ряде исследований было продемонстрировано, что у больных СД 2 уровень БТШ70 значительно снижается в скелетных мышцах, а его пониженная экспрессия, возможно, коррелирует со степенью инсулинорезистентности (ИР) [15, 16]. В 2014 г. L. Chichester и соавт. подтвердили, что уровень БТШ70 значительно снижен в чувствительных к инсулину тканях у больных СД 2 на фоне МС [17]. Восстановление уровня БТШ70 у белых лабораторных крыс с СД существенно понижало степень диабетических осложнений, а снижение степени системного воспаления нивелировало сердечно-сосудистые риски [18].

Гипергликемия, возникающая при сахарном диабете (СД) неизбежно сопровождается развитием карбонильного стресса, а также накоплением различных продуктов гликирования белков. Это приводит к нарушению нормального функционирования ферментов и формированию агрегатов денатурированных белков. С целью предотвращения этих неблагоприятных процессов и происходит активация сложной системы шаперонов, которые препятствуют агрегации денатурированных белков и их полной или частичной ренатурации. БТШ70 и малые белки теплового шока (мБТШ) являются компонентами системы шаперонов, и нарушение в их работе может являться одним из факторов в патогенезе СД 2. Следовательно, БТШ обладают высоким потенциалом для изучения, спорным остается вопрос о том, являются ли они причиной или следствием в патогенезе как сердечно-сосудистой патологии, так и некоторых компонентов МС [19].

При СД происходит активация сложной системы шаперонов препятствующих агрегации денатурированных белков. Одним из компонентов системы шаперонов являются малые белки теплового шока (мБТШ). Мономеры данных белков имеют молекулярную массу 12-43 кДа и склонны к образованию гетеро- и гомо-олигомерных комплексов. В организме человека синтезируются 10 различных мБТШ (мБТШ В1-10) [20]. В крупном проспективном исследовании у пациентов с диабетом первого типа было установлено, что течение заболевания сопровождалось повышением уровня мБТШ-В1 в периферической крови, и авторами было предложено использование этого белка в качестве маркера диабетической нейропатии [21]. При похожем исследовании, у больных СД 2 были получены абсолютно противоположные результаты, а уровень мБТШ-В1 был статистически значимо ниже, чем у соматически здоровых лиц [22].

В связи с этим существует гипотеза, что увеличение мБТШ внутри клетки должно улучшить общее состояние больных диабетом [23–25]. Различные способы повышения внутриклеточной концентрации мБТШ могут оказаться перспективными при лечении СД, т.к. повышение их уровня существенно защищает клетку от окислительного стресса, способствует передаче сигнала от инсулинового рецептора внутрь клетки, а также ингибирует процессы апоптоза [25].

БТШ70 и сердечно-сосудистые заболевания. Основной причиной смерти во всем мире по данным ВОЗ являются ССЗ, высокая летальность при которых прослеживается как в развитых, так и в развивающихся странах [26, 27]. Для более точного понимания патогенеза ССЗ большие возможности представляет исследова-

ние различных молекулярных взаимодействий. Особое место отведено изучению роли БТШ70, который принимает участие в таких процессах, как АГ, ишемическая болезнь сердца (ИБС), инфаркт миокарда и др. Доказанным является факт, что значительное количество БТШ70 циркулирующих в периферической крови коррелирует с основными маркерами воспаления и способны спровоцировать развитие атеросклероза [28].

В одном из исследований в 2017 г. была произведена оценка уровня сывороточных БТШ70 у пациентов с атеросклерозом магистральных сосудов. Критерием наличия атероматозных бляшек были взяты средние значения толщины комплекса интима-медиа сонных артерий больных. В результате было доказано, что более значительное увеличение толщины комплекса интима-медиа наблюдались у пациентов с более высоким уровнем циркулирующих БТШ70 [29]. В крупном рандомизированном исследовании «The EURODIAB Study» (3250 пациентов) G. Gruden и соавт. наглядно показали, что антитела против БТШ70 могут выступать предиктивным маркером при оценке риска возникновения микро- и макрососудистых осложнений, а непосредственно молекулы БТШ70 способны каким-либо образом участвовать в развитии повреждения сосудов [30]. R. Heads и соавт. продемонстрировали, что кардиомиобласты, эндотелиальные клетки и первичная культура кардиомиоцитов, трансфицированные постоянно БТШ70, обладали большей устойчивостью к повреждающим воздействиям, чем обычные клетки [31].

В патогенезе АГ, атеросклероза, коронарной сердечной недостаточности БТШ70 принято выделять как один из основных кардиопротекторных стрессовых белков [32, 33]. Достаточно хорошо освещен в литературе кардиопротективный эффект экспрессии БТШ при ишемическом инфаркте и инсульте [34, 35].

Некоторые полиморфизмы белков теплового шока.

Был проведен целый ряд исследований, где анализировалась ассоциация полиморфизма БТШ70-1 с ССЗ, включая и инфаркт миокарда [36, 37]. У пациентов пожилого возраста выявлена ассоциация полиморфизма БТШ70-2 с ишемией [38], а генотипов кодирующих БТШ70-hom и БТШ70-2 – у пациентов с повышенным риском высокогорной болезни сердца [39]. При изучении ассоциированности аллельного полиморфизма генов кодирующих БТШ70-2 и БТШ70-hom у больных европеоидного происхождения, перенесших острый инфаркт миокарда с классическими факторами риска его развития, были обнаружены статистически значимые различия между пациентами с индексом массы тела

выше 25 и здоровыми по частотам генотипов кодирующих БТШ70-hom [40]. Немаловажным является изучение однонуклеотидных замен генов, кодирующих молекулу БТШ70, которые способны влиять на функционирование данного белка в контексте развития ССЗ. X. Zhang и соавт. выявили, что определенные аллельные варианты полиморфного маркера +190G/C в гене *HSPA1A* ассоциированы с повышенным риском развития острого коронарного синдрома у людей, имеющих отличающиеся от здоровых доноров уровни анти-HSP70-антител [41]. В другом исследовании получены достоверные данные, что пятилетняя выживаемость без сердечно-сосудистых событий, после перенесенной почечной патологии группы пациентов с генотипами *GG* и *AG* полиморфного маркера +1267A/G гена *HSPA1B* была значительно лучше, чем у группы с генотипами *AA* позволяет сделать вывод о возможной ассоциации аллельного варианта *AA* полиморфного маркера +1267A/G гена *HSPA1B* с наличием сердечно-сосудистых осложнений у пациентов [42].

Прослеживается четкая взаимосвязь полиморфизмов генов, кодирующих белки теплового шока БТШ70-2 и БТШ70-hom с развитием ожирения и нарушением толерантности к глюкозе, а также выявлена ассоциация аллельных вариантов полиморфного маркера +1267A/G гена *HSPA1B* с ожирением по абдоминальному типу [40, 43]. У людей с высоким индексом массы тела, которые подвержены в ряду ССЗ, чаще других встречался аллельный вариант 1267 БТШ70-2 [44].

Заключение

Таким образом, БТШ обладает большим потенциалом для изучения патогенеза, как некоторых компонентов МС, так и сердечно-сосудистых катастроф. *HSP70* принимает активное участие в воспалительных процессах при атеросклерозе и увеличение уровня его экспрессии, может служить прогностическим признаком и быть ассоциированным с повышенным риском развития некоторых компонентов МС и ряда ССЗ.

В этиопатогенезе таких мультифакториальных заболеваний, как СД, ожирение, ИБС, АГ основываясь на индивидуальных генетических особенностях структуры кодирующих последовательностей генов белков теплового шока, можно не только расширить понимание механизмов развития данных патологий, но и прогнозировать степень риска развития их осложнений, а также проводить ранние профилактические мероприятия. Поэтому анализ стандартных факторов риска заболеваемости и смертности в комплексе с поли-

морфизмами генов-кандидатов, кодирующих БТШ является актуальным.

Литература

(п.п. 2; 4–24; 28; 30–39; 41–43 см. References)

- Плавинская С.Н., Плавинский С.Л. Метаболический синдром, его компоненты и смертность в длительном проспективном исследовании. *Российский семейный врач*. 2010; 14(1): 24–32.
- Мамедов М.Н. Эпидемиологические аспекты метаболического синдрома. *Кардиология*. 2004; 9: 4–8.
- Судницyna М.В., Гусев И.Б. Малые белки теплового шока и диабет. *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. 2015; 2: 24–30.
- Искаков Е.Б. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний. *Медицина и экология*. 2017; 2: 19–28.
- Научно-организационный комитет проекта ЭССЕ-РФ. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в различных регионах России (ЭССЕ-РФ). Обоснование и дизайн исследования. *Профилактическая медицина*. 2013; 16(6): 25–34.
- Искаков Е.Б. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний. *Медицина и экология*. 2017; 2: 19–28.
- Шевченко А.В., Голованова О.В., Коненков В.И., Воевода М.И., Максимов В.Н. Особенности полиморфизма HSP-70 и HSP70-НОМ генов у пациентов с инфарктом миокарда в анамнезе. *Медицинская иммунология*. 2011; 13(1): 87–92.
- Cai W.-F., Zhang X.-W., et al. Intracellular or extracellular heat shock protein 70 differentially regulates cardiac remodelling in pressure overload mice. *Cardiovasc. Res*. 2010; 88 (1): 140–9.
- Srivastava K., Narang R., Bhatia J., Saluja D. Expression of heat shock protein 70 gene and its correlation with inflammatory markers in essential hypertension. *PLoS ONE*. 2016; 11(3): 1–15.
- Bielecka-Dabrowa A., Barylski M., et al. HSP 70 and atherosclerosis – protector or activator? *Expert Opin. Ther. Targets*. 2009; 13(3): 307–17.
- Kondo T., Sasaki K., Matsuyama R., et al., 2012. Hyperthermia with mild electrical stimulation protects pancreatic beta-cells from cell stresses and apoptosis. *Diabetes*. 2012; 61(4): 838–47.
- Kurucz I., Morva A., Vaag A., et al. Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. *Diabetes*. 2002; 51: 1102–9.
- Bruce C.R., Carey A.L., Hawley, M.A. FebbraioIntramuscular heat shock protein 72 and heme oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes: evidence that insulin resistance is associated with a disturbed antioxidant defense mechanism. *Diabetes*. 2003; 52: 2338–45.
- Chichester L., Wylie A.T., Craft S., Kavanagh K. Muscle heat shock protein 70 predicts insulin resistance with aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015; 70(2): 155–62. doi:10.1093/gerona/glu015
- Koga T, Kai Y, Fukuda R, et al. Mild electrical stimulation and heat shock ameliorates progressive proteinuria and renal inflammation in mouse model of Alport syndrome. *PLoS One*. 2012; 7(8): 43852. doi: 10.1371/journal.pone.0043852
- Basha E., O’Neill H., Vierling E. Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem*. 2012; 37(3): 106–117.
- Gruden G., Bruno G., et al. Group E.P.C.S. Serum heat shock protein 27 and diabetes complications in the EURODIAB prospective complications study: a novel circulating marker for diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2008; 57(7): 1966–70.
- Pourhamidi K., Dahlin L.B., Boman K., Rolandsson O. Heat shock protein 27 is associated with better nerve function and fewer signs of neuropathy. *Diabetologia*. 2011; 54(12): 3143–9.
- Hooper P.L., Balogh G., Rivas E., Kavanagh K., Vigh L. The importance of the cellular stress response in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell Stress Chaperones*. 2014; 19(4): 447–44.
- McCarty M.F. Induction of heat shock proteins may combat insulin resistance. *Med. Hypotheses*. 2006; 66(3): 527–34.
- Simar D., Jacques A., Caillaud C. Heat shock proteins induction reduces stress kinases activation, potentially improving insulin _lpha_ing in monocytes from obese subjects. *Cell Stress Chaperones*. 2012; 17(5): 615–21.
- Sudnicyna M.V., Gusev I.B. Small proteins of heat shock and diabetes. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16: Biologiya*. 2015; 2: 24–30. (In Russian)
- Iskakov E.B. Epidemiology of cardiovascular diseases. *Meditsina i ekologiya*. 2017; 2: 19–28. (In Russian)
- Scientific Organizing Committee of the ESSE-RF project. Epidemiology of cardiovascular diseases in various regions of Russia (ESSE-RF). Rationale and design of the study. *Profilakticheskaya meditsina*. 2013; 16(6): 25–34. (In Russian)
- Srivastava K., Narang R., Bhatia J., Saluja D. Expression of heat shock protein 70 gene and its correlation with inflammatory markers in essential hypertension. *PLoS ONE*. 2016; 11(3): 1–15.

References

- Plavinskaja S.N., Plavinskij S.L. Metabolic syndrome, its components and mortality in a long-term prospective study. *Russian family doctor*. 2010; 14(1): 24–32. (in Russian)
- Piepoli M.F., Hoes A.W., Agewall S., et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur Heart J*. 2016; 37: 2315–81.
- Mamedov M.N. Epidemiological aspects of metabolic syndrome. *Cardiologiya*. 2004; 9: 4–8. (in Russian)
- Haffner S. Relationship of proinsulin and insulin to cardiovascular risk factors in nondiabetic subjects. *Diabetologia*. 1993; 42: 1297–302.
- Novakovich B. Occurrence of the metabolic syndrome in the population of the town of Novi Sad. *Med. Pregl*. 2001; 54: 17–20.
- Grundy S.M. Metabolic syndrome: a multiplex cardiovascular risk factor. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92: 399–404. doi:10.1210/jc.2006-0513
- Bernardo B.C., Weeks K.L., Patterson N.L., McMullen J.R. HSP70: therapeutic potential in acute and chronic cardiac disease settings. *Future Med. Chem*. 2016; 8(18): 2177–83.
- Schlesinger M.J. Heat shock proteins. *J. Biol. Chem*. 1990; 265 (21): 12111–4.
- Kim Y.E., Hipp M.S., et al. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annu. Rev. Biochem*. 2013; 82 (1): 323–55.
- Pockley A.G., Georgiades A., et al. Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension*. 2003; 42(3): 235–8.

29. Iskakov E.B. Epidemiology of cardiovascular diseases. *Meditsina i ekologiya*. 2017; 2: 19-28. (In Russian)
30. Gruden G., Bruno G., et al. ANTI-HSP60 and ANTI-HSP70 antibody levels and micro/ macrovascular complications in type 1 diabetes: The EURODIAB Study. *J. Intern. Med.* 2009; 266(6): 527-36.
31. Heads R.J., Latchman D.S., Yellon D.M. Differential stress protein mRNA expression during early ischemic preconditioning in the rabbit heart and its relationship to adenosine receptor function. *J Mol Cell Cardiol.* 1995; 27: 2133-48.
32. Jayakumar J., Suzuki K., et al. Gene transfer for myocardial protection: transfection of donor hearts with heat shock protein 70 gene protects cardiac function against ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2000; 102(3): 302-6.
33. Jong P.R., Schadenberg A.W.L., et al. Hsp70 and cardiac surgery: molecular chaperone and inflammatory regulator with compartmentalized effect. *Cell Stress and Chaperones*. 2009; 14: 117-31.
34. Meng X., Harken A.H. The interaction between HSP70 and TNF- α expression: a novel mechanism for protection of the myocardium against postinjury depression. *Shock*. 2002; 17(5): 345-53.
35. Suzuki K., Sawa Y., et al. Reduction in myocardial apoptosis associated with over expression of heat shock protein 70. *Basic Res Cardiol.* 2000; 95: 397-403.
36. Bolla M.K., Miller G.J., et al. Analysis of the association of a heat shock protein70-1 gene promoter polymorphism with myocardial infarction and coronary risk traits. *Dis Markers*. 1998; 13: 227-35.
37. He M., Guo H., et al. Functional SNPs in HSPA1A Gene Predict Risk of Coronary Heart Disease. *PLoS ONE*. 2009; 4(3): 4851.
38. Giacconi R., Cipriano C., et al. Involvement of -308 TNF- α and 1267 Hsp70-2 polymorphisms and zinc status in the susceptibility of coronary artery disease (CAD) in old patients. *Biogerontology*. 2006; 7(5-6): 347-56.
39. Zhou F., Wang F., et al. Association of hsp70-2 and hsp-hom gene polymorphisms with risk of acute high-altitude illness in a Chinese population. *Cell Stress Chaperones*. 2005; 10 (4): 349-56.
40. Shevchenko A.V., Golovanova O.V., Kononov V.I., Voevoda M.I., Maksimov V.N. Features of HSP-70 and HSP70-HOM gene polymorphism in patients with a history of myocardial infarction. *Meditsinskaya immunologiya*. 2011; 13(1): 87-92. (In Russian)
41. Xiao L., Liu Y., Wang N. New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells. *AJP Hear. Circ. Physiol.* 2014; 306(3): 317-25.
42. Poon P.Y.K., Szeto C.C., et al. Relationship between HSP70-2 A+1267G polymorphism and cardiovascular events of chinese peritoneal dialysis patients. *Nephron. Clin. Pract.* 2014; 128(1-2): 153-8.
43. Mardan-Nik M., Pasdar A., et al. Association of heat shock protein70-2 (HSP70-2) gene polymorphism with obesity. *Ann. of Hum. Biol.* 2016; 43: 542-6.

Сведения об авторах:

Хохлова Александра Викторовна, аспирант ГОУ ВО ЛНР «ЛГПУ»;

Бойченко Павел Константинович, доктор мед. наук, проф., ГУ ЛНР «ЛГМУ им. Св. Луки»;

Востриков Алексей Андреевич, начальник лаб. клинической нейрофизиологии и нейромодуляции ГУ ЛНР «ЛРЦЭМП и МК» e-mail: seruj_strag@mail.ru;

Магомедов Мурад Умарович, мл. науч. сотр. отд-ния оториноларингологии отдела головы и шеи ГБУЗ МО «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского».

Вопросы преподавания

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-92

Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Шарпань Ю.В.

Патофизиология биоритмов (лекция)

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1

Актуальным вопросом для специалистов самых разных клинических дисциплин является совершенствование подходов к диагностике и лечению широкого круга заболеваний, в патогенезе которых большую роль играет рассогласованность циклических процессов, управляемых внутренними и внешними ритмогенными детерминантами. **Цель лекции** – представление накопленных к настоящему времени знаний о физиологии и патофизиологии биоритмов, причинах и последствиях десинхронозов.

Ключевые слова: биоритмы; десинхронозы

Для цитирования: Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Шарпань Ю.В. Патофизиология биоритмов. (Лекция). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(2): 108-116.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.108-116

Участие авторов: концепция и дизайн – Порядин Г.В.; подбор литературы – Шарпань Ю.В.; подготовка иллюстративного материала – Шарпань Ю.В.; написание текста – Порядин Г.В., Салмаси Ж.М.; редактирование – Порядин Г.В. Утверждение окончательного варианта, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Порядин Геннадий Васильевич, e-mail: poryadin_gv@rsmu.ru

Поступила 23.03.2022

Принята к печати 31.03.2022

Опубликована 27.05.2022

Poryadin G.V., Salmasi J.M., Sharpan Yu.V.

Pathophysiology of biorhythms

Pirogov Russian State Medical University
117997, Moscow, Russia st. Ostrovityanova, 1

An urgent challenge for various clinical specialists is improving approaches to the diagnosis and treatment of multiple diseases, which pathogenesis includes a mismatch of cyclic processes controlled by internal and external rhythmogenic determinants. The purpose of this lecture was to present the current knowledge about physiology and pathophysiology of biorhythms as well as and about the causes and consequences of desynchronization.

Keywords: biorhythms; desynchronization

For citation: Poryadin G.V., Salmasi J.M., Sharpan Yu.V. Pathophysiology of biorhythms. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(2): 108-116. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.108-116

Author's contribution: research concept and design, editing – Poryadin G.V.; preparation of illustrative material, selection of literature – Sharpan Yu.V.; writing text – Poryadin G.V., Salmasi J.M. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

For correspondence: Poryadin G.V., prof., Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, Faculty of Medicine, Pirogov Russian State Medical University, e-mail: poryadin_gv@rsmu.ru

Information about the authors:

Poryadin G.V., <https://doi.org/0000-0003-2010-3296>

Salmasi J.M., <https://doi.org/0000-0001-8524-0019>

Received 23.03.2022

Accepted 31.03.2022

Published 27.05.2022

Определение понятия «биоритмы», их характеристика, классификация и примеры циклически повторяющихся феноменов. Согласно существующим представлениям, **биоритмами** принято называть эволюционно закрепленное чередование (циклическое повторение) каких-либо типовых изменений в течении физиологических процессов. В проявлении биоритмов важнейшей их характеристикой является *период*, под которым понимают продолжительность цикла какого-либо явления, повторяющегося через определенные промежутки времени, и *частота*, отображающая число циклов в единицу времени. В случаях, если биоритмы сопровождаются фазами нарастания и затухания, для их характеристики дополнительно используют следующие показатели (**рис. 1**):

мезор — представляет собой среднее значение исследуемого показателя;

амплитуда — отображает разность между мезором и максимальным или минимальным значениями показателя;

акрофаза — отображает максимальное отклонение амплитуды показателя от мезора при его наибольшем подъеме;

батифаза — отображает максимальное отклонение амплитуды показателя от мезора при его наибольшем спаде.

По месту проявления циклически повторяющихся феноменов, они подразделяются на *молекулярные, субклеточные, клеточные, тканевые, органные, системные и организменные биоритмы*.

По длительности периода различают следующие биоритмы:

Миллисекундные (период < 1 с). Типичным примером миллисекундных биоритмов являются повторяющиеся изменения электрической активности головного мозга, отображаемой на электроэнцефалограмме в виде разноамплитудных волн, генерируемых с частотой от 0,5 до 4 Гц (дельта-ритм) до 30 Гц и более (гамма-ритм). Эти волновые ритмы характеризуют различные физиологические состояния ЦНС.

Околосекундные (период ≈ 1 с). К феноменам околосекундных биоритмов, относится циклическая активность сердца, проявляемая в чередовании систолы и диастолы, которые сопровождаются согласованными изменениями биохимических и биофизических (электрофизиологических) процессов, инициирующих фазные изменения в работе водителя ритма и обеспечивающих сократительную функцию миокарда.

Околочасовые (период ≈ 1 ч). Примером околочасового биоритма являются повторяющиеся циклы желудочной моторики.

Околосуточные, или циркадианные (период ≈ 1 сут). Биоритмы с продолжительностью цикла около суток (22-28 ч), называемые циркадианными (или циркадными) являются доминирующими как для функционирования организма в целом, так и для деятельности его отдельных систем и органов. Например, циркадианная нейроэндокринная регуляция обеспечивает суточные и связанные со сном колебания различных физиологических переменных: артериального давления, температуры тела, и выделения гипофизарных гормонов, посредством которых регулируются многие вегетативные функции.

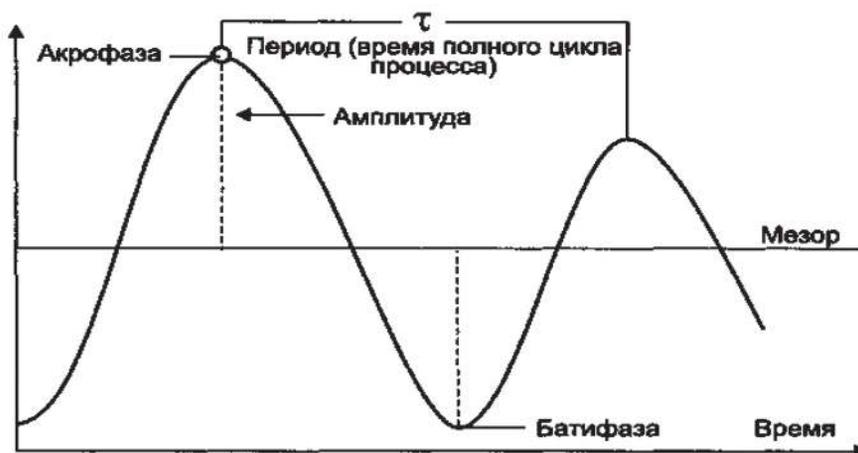


Рис. 1. Показатели биологических ритмов, основные характеристики колебаний.

Fig. 1. Indicators of biological rhythms, the main characteristics of oscillations.

Околочесные (период ≈ 1 мес). Примером околочесного биоритма является менструальный цикл у здоровой женщины в репродуктивном периоде.

Сезонные биоритмы связаны с перенастройкой управления многими вегетативными функциями при смене времен года (зима на лето или лето на зиму), в весенний и осенний периоды. Эти биоритмы служат адаптации организма к меняющимся природно-климатическим условиям, в том числе связанным с продолжительностью светового дня и температурой окружающей воздушной среды.

Мегаритмы (период 1-10 лет и более). Примером сверхдлительного течения циклического процесса является костное ремоделирование, активная фаза которого занимает около 3 мес, тогда как промежутки между ними (фаза покоя) достигают примерно 10 лет. При костном ремоделировании происходит периодическая замена старого костного вещества на новое, что нивелирует накапливаемые со временем усталостные повреждения костной ткани.

Геосоциальные мегаритмы отражают циклические глобальные изменения в окружающей среде и могут охватывать длительные периоды — от нескольких лет до нескольких десятилетий и даже столетий. Примером геосоциальных мегаритмов является циклический возврат эпидемий инфекционных заболеваний, которые регулярно наблюдали до начала широкого внедрения в практику гигиенических нормативов и препаратов антибиотиков.

Влияние биоритмов на физиологические и патологические процессы. Эмпирически установлены следующие факты, которые иллюстрируют регулируемую функцию биоритмов по отношению к отдельным физиологическим функциям:

Сезонные феномены. В приложении к сердечно-сосудистой системе отмечается, что при смене сезонов имеет место изменение хроноструктуры циркадианного ритма функции сердца, что проявляется в отклонениях акрофазы, амплитуды и мезора показателя силы сердечных сокращений. Самая низкая амплитуда колебаний показателей сердечно-сосудистой системы наблюдается летом, когда они составляют всего 50% от среднегодовых значений.

С сезонной перестройкой биоритмов ассоциируют риск обострения весной и осенью целого ряда хронических заболеваний, например, язвенной болезни, а также многих психических (шизофрения) и обменно-эндокринных (радикулит, остеоартроз) заболеваний. С сезонными особенностями биоритмов связывают и такие феномены, как возрастание сексуальной и мышечной возбудимости весной

и в начале лета и более быстрый рост у детей в летний период.

Суточные (циркадианные) феномены. Отражением изменения состояния организма под влиянием циркадианных ритмов являются следующие проявления:

- в ночные часы отмечается снижение системного артериального давления на 10-22% от уровня, регистрируемого в дневное время;

- кожа обладает наименьшей чувствительностью к парентеральным инъекциям в утренние часы;

- активация родовой деятельности чаще всего происходит в промежутке от полуночи до 4 ч утра;

- первые 6 ч после пробуждения являются периодом риска сосудистых катастроф (геморрагических и ишемических инсультов, внезапной сердечной смерти) у пациентов с сердечно-сосудистой патологией, т.к. в это время суток отмечается нарастание симпатической активности, сниженной во время сна;

- у лиц, страдающих бронхиальной астмой, более вероятно развитие бронхоспазма в период доминирования парасимпатической активности, максимум которой приходится обычно на 4 ч утра.

Феномены с месячной периодикой. У женщин репродуктивного возраста имеет место ухудшение самочувствия (со снижением работоспособности) и настроения в дни, предшествующие началу месячных и в период их прохождения, занимающий от 3 до 7 дней. Время для успешного зачатия у женщин репродуктивного возраста охватывает перiovуляторный период, который приходится примерно на 13-15-й день после прихода месячных при 28-дневном регулярном менструальном цикле.

Ритмогенные детерминанты в регуляции биоритмов

Регулирующие детерминанты наблюдаемых в человеческом организме биоритмов подразделяются на *внутренние*, определяемые эволюционно запрограммированными особенностями функционирования управляющих структур, и *внешние*, в роли которых выступают экзогенные воздействующие факторы.

Внутренние ритмогенные детерминанты, согласно доминирующим представлениям об управлении биоритмами, имеют 3 уровня организации.

Первый уровень, обеспечивающий циклическое течение физиологических процессов, связан с функционированием эпифиза (шишковидной железы). Деятельность эпифиза характеризуется четко выраженной циркадианной динамикой, проявляющейся в усилении его стимулирующего влияния на многие эндокринные железы ночью и ослаблении в дневное время. Вероят-

но основным регулирующим медиатором, продуцируемым в эпифизе, является *мелатонин*, который влияет на баланс процессов, обеспечивающих переход от сна к бодрствованию и наоборот.

Второй уровень, обеспечивающий регуляцию биоритмов, ассоциируется с функционированием супраоптических (супрахиазмальных) ядер гипоталамуса, которые посредством субкомиссурального тела связаны с эпифизом. Супрахиазмальные ядра гипоталамуса являются коллектором для поступающей информации из эпифиза и других структур ЦНС и обеспечивают синхронизацию (то есть эффективное взаимодействие) между многочисленными биоритмами организма.

Третий уровень, создающий условия для нормальной периодики при реализации разнообразных физиологических функций, связан с клеточными мембранами и субклеточными структурами. Полагают, что отдельные участки мембран способны реализовывать не только управляющие сигналы, приходящие из ЦНС, но и отвечать на стимулы при прямом воздействии экзогенных ритмогенных детерминант.

Существуют, однако, и другие взгляды на происхождение биоритмов, порождаемых внутренними факторами. Так, согласно *теории мультиосциллярного механизма* в организме нет доминирующей структуры, порождающей единый управляющий биоритм, а существует множество независимых, но при этом взаимосвязанных водителей ритма (пейсмейкеров) определяющих соответствующие циклические процессы в разных органах и системах. Синхронизация между всеми этими биоритмами осуществляется путем прямых и обратных положительных и отрицательных связей с участием нервных и гуморальных механизмов.

Теория хронона в объяснении функционирования внутренних ритмогенных детерминант делает акцент на молекулярной составляющей биоритмов. В соответствии с этой теорией в суточном ритме происходят колебательные изменения репликационной активности в участках молекул ДНК (называемых *хрононами*), ответственных за регуляцию биоритмов. Задаваемая при этом периодичность репликации фрагментов цепи ДНК служит своего рода частотным эталоном (подобно метроному) для ритмических процессов, связанных с течением метаболических процессов, обеспечивающих разнообразные физиологические функции.

Внешние ритмогенные детерминанты — это воздействия, порождаемые глобальными природными явлениями, которые влияют не только на отдельного человека, но и на популяцию в целом. В роли одного из внешних регуляторов биоритмов может выступать смена света и темноты в течение суток, т.е. *фотопери-*

одичность, которая активирует функции эпифиза и через образование мелатонина вовлекает в циклические процессы структуры ЦНС, вегетативные центры и регулируемые ими эндокринные железы (**рис. 2**).

Фотопериодичность, однако, не является единственным фактором, определяющим околосуточную продолжительность циркадианных ритмов. Это доказывается тем, что у людей, долгое время пребывающих в условиях отсутствия освещенности (например, у спелеологов) после относительно короткого (примерно 3-недельного) периода удлинения циркадианных биоритмов до 48-52 ч отмечается возврат их продолжительности до значений не более 28 часов, т.е. почти до нормы. Фотопериодичность вообще не может служить регулятором циркадианных биоритмов у слепых от рождения людей (или ослепших уже в постнатальном периоде) у которых, тем не менее, все важнейшие, в том числе и околосуточные, биоритмы оказываются вполне нормальными.

Магнитное и гравитационное поле Земли также может выступать в качестве одной из внешних ритмогенных детерминант. Это подтверждают наблюдения, согласно которым пребывание птиц в помещении, экранированном от магнитных воздействий, лишает их способности к ориентации по сторонам света и одновременно вызывает расстройства циркадианных биоритмов. Значимость фактора земной гравитации для нормального течения циклического процесса костного ремоделирования подтверждается развитием остеопороза в условиях невесомости при продолжительных космических полетах.

Магнитные возмущения при возрастании солнечной активности могут провоцировать дисбаланс продукции мелатонина в эпифизе. Наблюдаемые при этом отклонения показателей циклических процессов способны провоцировать нарушения в самых разных органах систем, в особенности при исходном наличии в них той или иной патологии (например, ишемической болезни сердца).

Реликтовые магнитные флуктуации, продолжающиеся с периода существования Земли в виде газового шара, согласно так называемой *теории «волновых пакетов»*, вероятно, могут предопределять разницу в заболеваемости одной и той же патологией в сравниваемых достаточно отдаленных друг от друга регионах. Например, частота обострений ишемической болезни сердца в Центральной России увеличивается зимой, тогда как в Восточной Сибири — в летний период. Причем данное различие не связано с климатическими факторами. Это доказывается тем, что, например, заболеваемость ИБС на географически близких территориях,

но с разными климатическими особенностями (в частности, на севере европейской части России и в Московской области), оказывается сходной.

Десинхронозы – определение понятия, классификация, причины и проявления наблюдаемых расстройств

Десинхронозы – это различные нарушения биоритмов организма, которые характеризуются изменением (увеличением или уменьшением) длительности периода, частоты, амплитуды, акрофазы и батифазы циклически повторяемого процесса и рассогласованием ранее синхронизированных биоритмов, управляемых внутренними или внешними ритмогенными детерминантами. В Международном Классификаторе Болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) термин «десинхроноз» считается нозологическим синонимом диагнозов:

- нарушения засыпания и поддержания сна (бессонница) – G47.0;
- нарушения цикличности сна и бодрствования – G47.2

На практике клинические проявления десинхронозов оказываются значительно обширнее той сим-

птоматики, которую рекомендует учитывать МКБ-10, и могут иметь крайне негативные последствия как для функционирования отдельных органов систем, так и для организма в целом (вплоть до летального исхода).

Классификация десинхронозов

Острый десинхроноз развивается при резком нарушении согласованности в работе внешних и внутренних индукторов биоритмов, которые ранее были сопряжены. Такое состояние может возникать у авиапассажиров при авиаперелете с быстрым пересечением нескольких часовых поясов, в результате чего нарушаются все циркадианные ритмы. Острый десинхроноз может быть также спровоцирован воздействием многочисленных стресс-факторов физической и химической природы (перегревание, переохлаждение, алкогольная интоксикация и др.).

Хронический десинхроноз развивается при продолжающемся (или часто повторяющемся) действии фактора, вызвавшего острый десинхроноз.

Скрытый десинхроноз не имеет клинических проявлений и может быть обнаружен только при специальном обследовании.

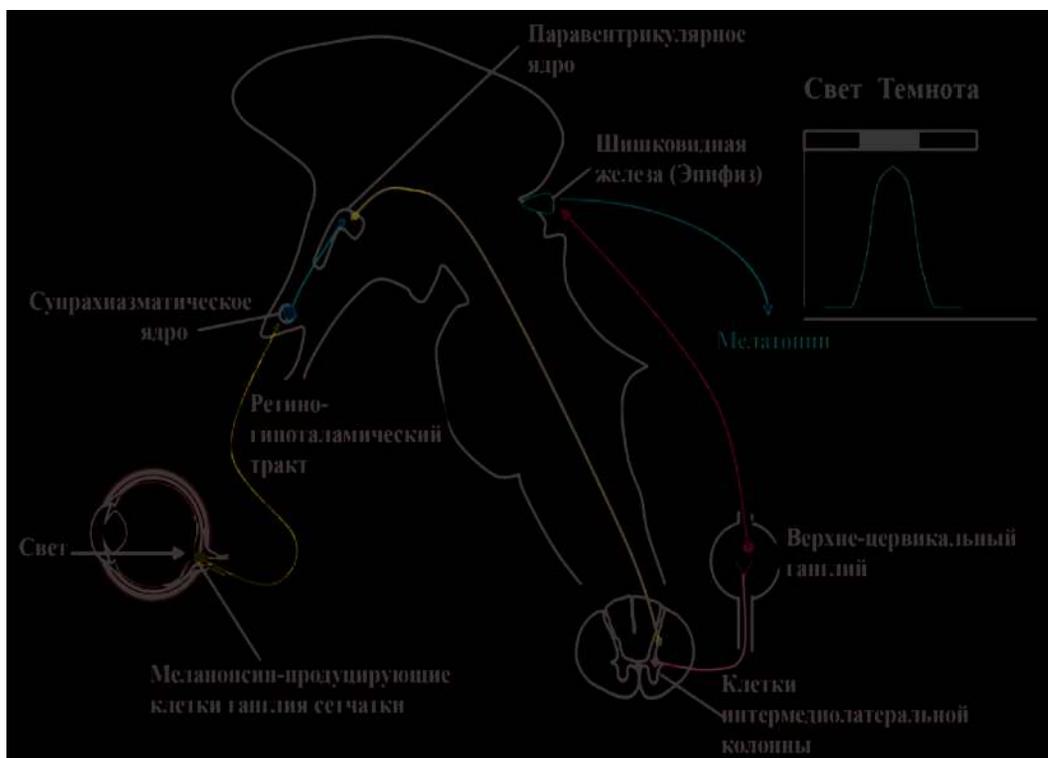


Рис. 2. Фотопериодичность в регуляции циркадианных биоритмов.
Fig. 2. Photoperiodicity in the regulation of circadian biorhythms.

Частичный десинхроноз проявляется изменениями циклических процессов в пределах одного органа или системы (пример – сердечные аритмии).

Тотальный десинхроноз охватывает большинство органов и систем с доминированием отклонений в функционировании ЦНС.

Асинхроноз — это максимально выраженный тотальный десинхроноз, обычно не совместимый с жизнью (развивается у лиц с сопутствующими заболеваниями, резко снижающими адаптацию к воздействию внешних факторов, провоцирующих десинхронозы).

Причины отдельных десинхронозов и их проявления

Дальние авиаперелеты, сопровождаемые пересечением 3 и более часовых поясов, провоцируют у многих авиапассажиров вялость, усталость, снижение умственной и физической работоспособности, расстройство сна, головные боли, шум в ушах, нарушения работы сердечно-сосудистой, эндокринной, иммунной систем и желудочно-кишечного тракта, развитие депрессивного состояния. Выраженность и продолжительность проявлений десинхроноза при дальних авиаперелетах определяется индивидуальными адаптационными возможностями организма, которые зависят от возраста и психо-эмоциональных особенностей конкретного человека. Дети и лица пожилого возраста оказываются более чувствительными к потере сложившегося суточного стереотипа. То же можно отметить в отношении субъектов, склонных к невротическим реакциям. Данный десинхроноз в англоязычной литературе получил название *jetlag-синдрома* (jet – самолет; lag-задержка) или синдрома смены часового пояса.

Сходные нарушения возникают при *полярном десинхронозе*, который возникает при нахождении в высокоширотных регионах у лиц, пребывающих туда для вахтовой работы из областей с обычной сменой дня и ночи. Такие люди испытывают на себе влияние арктического климата и, в частности, последствия воздействия полярной ночи. Адаптация организма к изменившимся параметрам смены освещенности развивается в следующей последовательности: сначала восстанавливаются психофизиологические показатели, далее – соматические и в завершение – вегетативные функции. Наиболее инертными оказываются основной, гормональный и электролитный обмены, а наиболее отстающей из постепенно нормализуемых функций – половая.

Заслуживает внимания тот факт, что на циркадианные биоритмы может оказывать влияние *часовой сдвиг при переходе на летнее или зимнее время*. Даже от-

носительно небольшое изменение настройки датчика времени при чередующихся в году переходах на летнее и зимнее время способно вызывать в той или иной мере выраженные отклонения циркадианной ритмики в периоде, предшествующем окончательному привыканию к новым условиям. В основном при этом страдают лица, склонные к невротическим реакциям из-за наследственных или приобретенных отклонений в функционировании ЦНС.

• *Космические полеты* сопровождаются развитием десинхроноза, причинами которого при пребывании в космосе становятся:

• прекращение влияния смены дня и ночи в рамках 24-часового циркадианного ритма и отсутствие воздействия фоновых флюктуаций погодных, гелио- и геомагнитных факторов;

• усиление действия космического электромагнитного излучения;

• воздействие невесомости, лишаящей способности к пространственной ориентации из-за выключения отолитового аппарата внутреннего уха.

Указанные причины приводят к общему десинхронозу с различными по выраженности психологическими, вегетативными и соматическими нарушениями. При этом отмечается существенное снижение производительности умственного труда, которое может достигать 45% от исходного уровня, а продолжительность регистрируемых психофизиологических нарушений до момента достигаемой адаптации может колебаться от нескольких дней до месяца. Особую опасность для космонавтов представляет возникающий у них десинхроноз в костном ремоделировании, который может привести к тяжелому остеопорозу. Центральное звено патогенеза «космического остеопороза» состоит в том, что в условиях отсутствия земного притяжения исчезает фоновая гравитационная нагрузка на костную ткань, которая в норме является важным регулятором костного метаболизма и циклического процесса костного ремоделирования.

Побывавшие продолжительное время в космосе лица при возвращении на Землю нуждаются в достаточно длительной реабилитации, что связано с повторной перестройкой измененных в космосе биоритмов, которые относительно медленно возвращают свои характеристики, типичные для земных условий.

Повторяющиеся нарушения цикла «сон-бодрствование» при сменной и ночной работе. Особенностью социального устройства человеческого общества является существование профессий, которые диктуют необходимость выполнения трудовых функций по сменному графику (сутки через сутки, сутки через двое и т.д.) или

в ночное время, т.е. в тот период, который предопределен эволюцией для отдыха. Разрушение филогенетически сложившейся иерархии биоритмов приводит к развитию синдрома неадаптированности к сменной и ночной работе, который проявляется в виде повышенной сонливости и хронической усталости в дневное время. Одним из последствий этого является возрастание риска всякого рода аварийных инцидентов из-за потери должного контроля над ситуацией. Люди с недостаточной продолжительностью сна, длительное время работающие в ночные смены или по сменному графику, чаще подвержены болезням, связанным с неврозами (артериальная гипертензия, язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки, половая дисфункция).

Влияние на биоритмы природных гелио- и геомагнитных факторов. Известно, что увеличение солнечной активности сопровождается учащением геомагнитных бурь: при средней частоте 30 бурь в год их число может колебаться от 1-2 бурь в год вблизи солнечного минимума до 50 бурь в год вблизи солнечного максимума. Подсчитано, что в условиях умеренных и сильных геомагнитных возмущений человек за свою 75-летнюю жизнь проживает в среднем около 15 лет. При этом главной мишенью возмущенного геомагнитного поля становится сердечно-сосудистая система. По этой причине в периоды геомагнитных бурь отмечается значительное учащение и отягощение приступов стенокардии, развития инфарктов, гипертонических кризов, инсультов, а также возрастание числа случаев внезапной сердечной смерти.

Восприятие геомагнитных воздействий осуществляется через магниторецепторы, которые, как предполагают, располагаются в участке прилежания головного мозга к клиновидной кости и в области надпочечников. Активность функционирования магниторецепторов у разных людей выражено варьирует. В связи с этим принято выделить когорту *метеочувствительных лиц*, которые из-за своей врожденной или приобретенной сенсibilизации к геомагнитным воздействиям составляют группу риска для развития нарушений, ассоциируемых с вихревыми всплесками в земной магнитосфере.

Действие на организм различных стресс-факторов, наркотических и токсических веществ. Как известно, в роли индукторов стрессового состояния могут выступать самые разные агенты, имеющие физическую, химическую и биологическую природу, например, механические и термические травмы, химические ожоги или тяжелые инфекции. К стрессу также способны приводить и многочисленные психогенные факторы, например, страх, утомление при продолжительных ин-

теллектуальных нагрузках, резкое изменение жизненного уклада при переездах, разводе и т.д.

Для спровоцированных стрессом неврозов типичны нарушения циркадианных биоритмов, что проявляется в рассогласовании фаз «сон-бодрствование» и имеет своим последствием дневную сонливость и ночную бессонницу, повышенную утомляемость, снижение внимания, ухудшение памяти и когнитивных способностей. Следует отметить, что стресс дезорганизует не только циркадианную ритмику, но и циклические процессы с более продолжительным периодом. Так, известно, что у женщин ассоциируемый со стрессом невроз может «гасить» менструальную функцию, что является одной из причин женского бесплодия и раннего климакса. В среднесрочной перспективе ассоциируемый с продолжительным стрессом десинхроноз ведет к прогрессирующим отклонениям в управлении вегетативными центрами, в результате чего возрастает риск развития многих хронических заболеваний.

Постоянное употребление психоактивных веществ и алкоголя способствует формированию феноменов сначала психической, а затем физической зависимости от них, проявляемой в виде абстинентного синдрома при отмене их приема. Большую значимость для таких нарушений имеет рассогласование синхронизированных биоритмов в метаболизме центральных нейромедиаторов (норадреналина, дофамина, серотонина, ацетилхолина, ГАМК). У лиц, страдающих хроническим алкоголизмом, наркоманиями и токсикоманиями, проявлением десинхроноза в обмене нейромедиаторов являются нарушения мозговой активности по данным ЭЭГ, отклонения ритмов работы сердца, разбалансировка мелатонинзависимой эпифизарной регуляции фаз сна и бодрствования и сопряженных циркадианных биоритмов. В конечном итоге последствием дигрими при злоупотреблении наркотическими веществами и алкоголем становится потеря контроля над вегетативными центрами, осуществляющими контроль многочисленных органных функций. По этой причине спектр заболеваний, сопровождающих наркомании, токсикомании и хронический алкоголизм, охватывает практически все системы организма (основной мишенью остается ЦНС) и становится причиной выраженного сокращения продолжительности жизни.

Хрономедицинские принципы в клинической практике

Хрономедициной называют направление медицинской науки, которое акцентирует внимание на связи заболеваемости с отклонениями физиологических биоритмов и ставит целью повышение эффективно-

сти профилактических и терапевтических мероприятий при патологических состояниях, связанных с десинхронозами.

В структуре хрономедицины выделяют несколько разделов, решающих специализированные задачи с обязательным учетом механизмов, связанных с ритмогенной модуляцией (временным фактором управления) циклических процессов. К ним относятся:

- хронофизиология и хронобиохимия;
- хронопатология;
- хронопрофилактика;
- хронодиагностика;
- хронофармакология;
- хронотерапия.

Хронофизиология и хронобиохимия — это разделы хрономедицины, изучающие ритмогенную модуляцию (управление) физиологических и биохимических составляющих циклических процессов. С использованием физиологических и биохимических методов исследуется влияние факторов связанных с временем суток, сезонностью и другими внутренними и внешними ритмогенными детерминантами на показатели биоритмов.

Хронопатология — раздел хрономедицины, использующий клинические наблюдения и экспериментальные модели для изучения этиологии, патогенеза, клинических проявлений и исходов нарушений ритмических процессов в отдельных органах и в организме в целом. С учетом специфики функционирования тех или иных органных систем или особенностей проявления патологических процессов выделяют хронокардиологию, хронопсихиатрию, хроногастроэнтерологию, хроноонкологию и др.

Хроногигиена — раздел хрономедицины, в задачи которого входит разработка гигиенических нормативов, регламентирующих условия учебы, труда, отдыха, повседневного быта, питания и оказания медицинской помощи с учетом хроноструктуры организма (особенностей его биоритмов) и внешних регулирующих ритмогенных детерминант (суточной освещенности, сезонных факторов и др.).

Хронопрофилактика — раздел хрономедицины, разрабатывающий подходы к предупреждению десинхронозов, вызываемых разными хронофакторами (дальними трансмеридиональными перемещениями, сменным графиком работы и др.). По набору решаемых задач хронопрофилактика тесно связана с хроногигиеной. Принципы, направленные на подстройку к физиологическим биоритмам, используются при разработке рекомендаций, регламентирующих режимы сна/бодрствования, питания, а также объемы и виды допустимых физических нагрузок. В круг задач хронопро-

филактики входит также хронобиологический отбор кандидатов, пригодных для физического и интеллектуального труда в условиях повышенного риска десинхронозов (при сменной или вахтовой работе, полетах в космос и др.). Эти же лица должны проходить повторные обследования с целью их своевременного отстранения от профессиональной деятельности в случаях выявления у них признаков десинхроноза.

Хронодиагностика — раздел хрономедицины, изучающий зависимость, ассоциируемых с биоритмами нормативных показателей от фактора времени. Необходимо делать поправку на то, что даже в условиях нормы отдельные показатели циклических процессов у некоторых субъектов периодически могут выходить за пределы доверительных интервалов, что может быть связано с индивидуальными особенностями биоритмов или с кратковременным случайным воздействием внешних факторов, не оставляющих после себя стойких биоритмических нарушений. Знание природы таких явлений позволяет избежать гипердиагностики и назначения лекарственных средств в ситуациях, когда без них можно обойтись.

С другой стороны, хронодиагностика позволяет выявлять начинающиеся нарушения, когда при динамических измерениях того или иного показателя его колебания, оставаясь в пределах нормативных значений, меняют свою амплитуду, что является ранним признаком начинающегося десинхроноза. Очевидно, что в таких ситуациях своевременное начало проведения тех или иных мероприятий, противодействующих прогрессированию десинхроноза, будет способствовать повышению их терапевтической (профилактической) эффективности.

Хронофармакология — раздел фармакологии, использующий хронобиологические принципы, в соответствии с которыми изыскиваются способы, позволяющие потенцировать и пролонгировать позитивные и ослаблять или сокращать негативные эффекты лекарственных средств с учетом индивидуальных биоритмов организма и особенностей действия внешних ритмогенных детерминант. В рамках хронофармакологии изучают особенности преобразования (метаболизма) лекарственных веществ в организме и колебания чувствительности воспринимающих структур с целью оптимизации терапевтических режимов, предусматривающих выполнение тех или иных лечебных процедур в период, когда они могут принести наибольшую пользу. Так, например, лицам, страдающим аллергией (и усиленной гистаминолиберацией), целесообразно рекомендовать прием H_1 -антигистаминных препаратов на ночь, а не утром или днем, так как в ночное время

усиливается активность парасимпатической системы, потенцирующей эффекты гистамина. К тому же следует принимать во внимание, что H_1 -антигистаминные препараты в своем большинстве обуславливают снотворный эффект, что так же определяет целесообразность их приема на ночь, а не в утреннее время.

Хронотерапия — раздел хрономедицины, предусматривающий оптимизацию терапевтических режимов с учетом хронофизиологических эффектов используемых средств и их зависимость от внешних и внутренних ритмогенных факторов. При проведении хронотерапии она может быть использована в виде *имитационного* (подражающего) или *превентивного* (предупреждающего) лечения.

Примером *имитационного* лечения является применение 2-фазной заместительной гормональной терапии препаратами эстрогенов и прогестерона (в ритме нормального менструального цикла) для купирования климактерических проявлений у женщин в постменопаузе.

К *превентивной* терапии можно отнести использование бисфосфонатов и других антирезорбтивных средств с целью предупреждения/ослабления развития остеопороза в условиях космического полета или при длительной иммобилизации, а также назначение препаратов витамина Д для предотвращения последствий недостаточной инсоляции (в зимнее время и, в особенности, в период полярной ночи в высокоширотных регионах).

Заключение

Изучение биоритмов имеет большое практическое значение для определения адаптационных возможностей организма к воздействию внешних и внутренних болезнетворных факторов, для своевременной диагностики возникающих патологических изменений и правильного выбора необходимых терапевтиче-

ских и профилактических мероприятий, а также для оценки эффективности проводимого лечения, прогноза течения заболевания и его исхода. Очевидно, что использование хрономедицинских принципов вооружает врача дополнительными диагностическими и терапевтическими ресурсами, что расширяет возможности оказания эффективной помощи пациентам, страдающим заболеваниями, ассоциированными с десинхронозами.

Литература

1. Ашофф Ю. *Биологические ритмы* (пер. с англ). М.: Мир, 1984.
2. Губин, Д.Г. Возрастной десинхроноз: фундаментальные и прикладные аспекты. *Тюменский медицинский журнал*. 2014; 2: 66-8.
3. Ежов С.Н. Основные концепции биоритмологии. *Вестник ТГЭУ*. 2008; 2: 104-21.
4. Заславская, Р.М., Васькова, Л.Б., Болсуновская Ю.Р. Хронофармакология и хрономедицина как новый методологический подход к оптимизации лечения. *Пространство и Время*. 2012; 1: 195-8.
5. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И. *Хронобиология и хрономедицина*. М.: Триада-Х, 2000.
6. Кузнецов Ю.Ф. *Биоритмы человека. Физический, эмоциональный, интеллектуальный*. 2-е изд. М.; Амрита-Русь, 2006.
7. Ставцева Ю.В. и др. Механическая десинхрония у пациентов с хронической сердечной недостаточностью: классификация, методы оценки, значение при отборе больных для СРТ. *Сердечная недостаточность*. 2014; 2: 101-9.
8. Чибисов С.М., Рапопорт С.И., Благоданова М.Л. *Хронобиология и хрономедицина*. М.: Из-во РУДН, 2018.
9. Шурлыгина, А.В. *Основные принципы хронотерапии, Методическое пособие*. Новосибирск: НГУ, 2002.
10. Ishaque S. et al. Rhodiola rosea for physical and mental fatigue: a systematic review. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012; Vol.12:1-9
11. Panossian A., Wikman G. Evidence-based efficacy of adaptogens in fatigue, and molecular mechanisms related to their stress-protective activity. *Curr Clin Pharmacol*. 2009; Vol.4: 198-219.

Сведения об авторах:

Порядин Геннадий Васильевич, чл.-корр. РАН, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, e-mail: poryadin_GV@rsmu.ru;

Салмаси Жан Мустафаевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета;

Шарпань Юрий Владимирович, доцент каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета.

Вопросы преподавания

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-92

Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Шарпань Ю.В.

Патофизиология биоритмов (лекция)

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1

Актуальным вопросом для специалистов самых разных клинических дисциплин является совершенствование подходов к диагностике и лечению широкого круга заболеваний, в патогенезе которых большую роль играет рассогласованность циклических процессов, управляемых внутренними и внешними ритмогенными детерминантами. **Цель лекции** – представление накопленных к настоящему времени знаний о физиологии и патофизиологии биоритмов, причинах и последствиях десинхронозов.

Ключевые слова: биоритмы; десинхронозы

Для цитирования: Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Шарпань Ю.В. Патофизиология биоритмов. (Лекция). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(2): 108-116.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.108-116

Участие авторов: концепция и дизайн – Порядин Г.В.; подбор литературы – Шарпань Ю.В.; подготовка иллюстративного материала – Шарпань Ю.В.; написание текста – Порядин Г.В., Салмаси Ж.М.; редактирование – Порядин Г.В. Утверждение окончательного варианта, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Порядин Геннадий Васильевич, e-mail: poryadin_gv@rsmu.ru

Поступила 23.03.2022

Принята к печати 31.03.2022

Опубликована 27.05.2022

Poryadin G.V., Salmasi J.M., Sharpan Yu.V.

Pathophysiology of biorhythms

Pirogov Russian State Medical University
117997, Moscow, Russia st. Ostrovityanova, 1

An urgent challenge for various clinical specialists is improving approaches to the diagnosis and treatment of multiple diseases, which pathogenesis includes a mismatch of cyclic processes controlled by internal and external rhythmogenic determinants. The purpose of this lecture was to present the current knowledge about physiology and pathophysiology of biorhythms as well as and about the causes and consequences of desynchronization.

Keywords: biorhythms; desynchronization

For citation: Poryadin G.V., Salmasi J.M., Sharpan Yu.V. Pathophysiology of biorhythms. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(2): 108-116. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.108-116

Author's contribution: research concept and design, editing – Poryadin G.V.; preparation of illustrative material, selection of literature – Sharpan Yu.V.; writing text – Poryadin G.V., Salmasi J.M. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

For correspondence: Poryadin G.V., prof., Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, Faculty of Medicine, Pirogov Russian State Medical University, e-mail: poryadin_gv@rsmu.ru

Information about the authors:

Poryadin G.V., <https://doi.org/0000-0003-2010-3296>

Salmasi J.M., <https://doi.org/0000-0001-8524-0019>

Received 23.03.2022

Accepted 31.03.2022

Published 27.05.2022

Определение понятия «биоритмы», их характеристика, классификация и примеры циклически повторяющихся феноменов. Согласно существующим представлениям, **биоритмами** принято называть эволюционно закрепленное чередование (циклическое повторение) каких-либо типовых изменений в течении физиологических процессов. В проявлении биоритмов важнейшей их характеристикой является *период*, под которым понимают продолжительность цикла какого-либо явления, повторяющегося через определенные промежутки времени, и *частота*, отображающая число циклов в единицу времени. В случаях, если биоритмы сопровождаются фазами нарастания и затухания, для их характеристики дополнительно используют следующие показатели (**рис. 1**):

мезор — представляет собой среднее значение исследуемого показателя;

амплитуда — отображает разность между мезором и максимальным или минимальным значениями показателя;

акрофаза — отображает максимальное отклонение амплитуды показателя от мезора при его наибольшем подъеме;

батифаза — отображает максимальное отклонение амплитуды показателя от мезора при его наибольшем спаде.

По месту проявления циклически повторяющихся феноменов, они подразделяются на *молекулярные, субклеточные, клеточные, тканевые, органные, системные и организменные биоритмы*.

По длительности периода различают следующие биоритмы:

Миллисекундные (период < 1 с). Типичным примером миллисекундных биоритмов являются повторяющиеся изменения электрической активности головного мозга, отображаемой на электроэнцефалограмме в виде разноамплитудных волн, генерируемых с частотой от 0,5 до 4 Гц (дельта-ритм) до 30 Гц и более (гамма-ритм). Эти волновые ритмы характеризуют различные физиологические состояния ЦНС.

Околосекундные (период ≈ 1 с). К феноменам околосекундных биоритмов, относится циклическая активность сердца, проявляемая в чередовании систолы и диастолы, которые сопровождаются согласованными изменениями биохимических и биофизических (электрофизиологических) процессов, инициирующих фазные изменения в работе водителя ритма и обеспечивающих сократительную функцию миокарда.

Околочасовые (период ≈ 1 ч). Примером околочасового биоритма являются повторяющиеся циклы желудочной моторики.

Околосуточные, или циркадианные (период ≈ 1 сут). Биоритмы с продолжительностью цикла около суток (22-28 ч), называемые циркадианными (или циркадными) являются доминирующими как для функционирования организма в целом, так и для деятельности его отдельных систем и органов. Например, циркадианная нейроэндокринная регуляция обеспечивает суточные и связанные со сном колебания различных физиологических переменных: артериального давления, температуры тела, и выделения гипофизарных гормонов, посредством которых регулируются многие вегетативные функции.

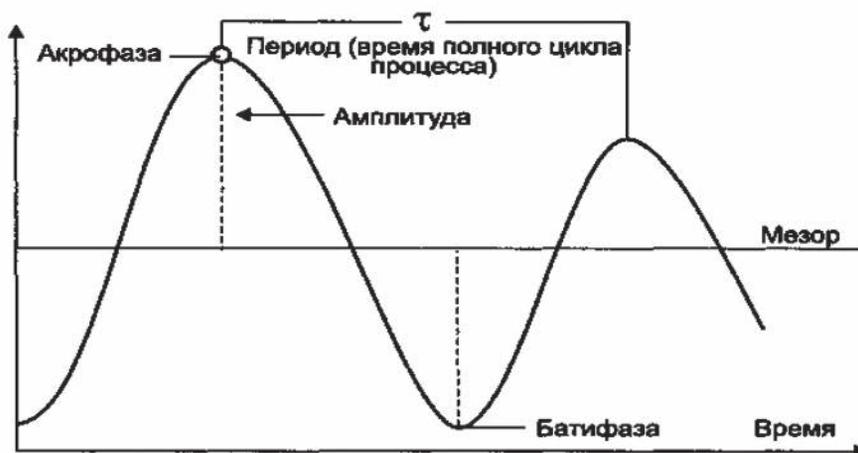


Рис. 1. Показатели биологических ритмов, основные характеристики колебаний.

Fig. 1. Indicators of biological rhythms, the main characteristics of oscillations.

Околочесные (период ≈ 1 мес). Примером околочесного биоритма является менструальный цикл у здоровой женщины в репродуктивном периоде.

Сезонные биоритмы связаны с перенастройкой управления многими вегетативными функциями при смене времен года (зима на лето или лето на зиму), в весенний и осенний периоды. Эти биоритмы служат адаптации организма к меняющимся природно-климатическим условиям, в том числе связанным с продолжительностью светового дня и температурой окружающей воздушной среды.

Мегаритмы (период 1-10 лет и более). Примером сверхдлительного течения циклического процесса является костное ремоделирование, активная фаза которого занимает около 3 мес, тогда как промежутки между ними (фаза покоя) достигают примерно 10 лет. При костном ремоделировании происходит периодическая замена старого костного вещества на новое, что нивелирует накапливаемые со временем усталостные повреждения костной ткани.

Геосоциальные мегаритмы отражают циклические глобальные изменения в окружающей среде и могут охватывать длительные периоды — от нескольких лет до нескольких десятилетий и даже столетий. Примером геосоциальных мегаритмов является циклический возврат эпидемий инфекционных заболеваний, которые регулярно наблюдали до начала широкого внедрения в практику гигиенических нормативов и препаратов антибиотиков.

Влияние биоритмов на физиологические и патологические процессы. Эмпирически установлены следующие факты, которые иллюстрируют регулируемую функцию биоритмов по отношению к отдельным физиологическим функциям:

Сезонные феномены. В приложении к сердечно-сосудистой системе отмечается, что при смене сезонов имеет место изменение хроноструктуры циркадианного ритма функции сердца, что проявляется в отклонениях акрофазы, амплитуды и мезора показателя силы сердечных сокращений. Самая низкая амплитуда колебаний показателей сердечно-сосудистой системы наблюдается летом, когда они составляют всего 50% от среднегодовых значений.

С сезонной перестройкой биоритмов ассоциируют риск обострения весной и осенью целого ряда хронических заболеваний, например, язвенной болезни, а также многих психических (шизофрения) и обменно-эндокринных (радикулит, остеоартроз) заболеваний. С сезонными особенностями биоритмов связывают и такие феномены, как возрастание сексуальной и мышечной возбудимости весной

и в начале лета и более быстрый рост у детей в летний период.

Суточные (циркадианные) феномены. Отражением изменения состояния организма под влиянием циркадианных ритмов являются следующие проявления:

- в ночные часы отмечается снижение системного артериального давления на 10-22% от уровня, регистрируемого в дневное время;

- кожа обладает наименьшей чувствительностью к парентеральным инъекциям в утренние часы;

- активация родовой деятельности чаще всего происходит в промежутке от полуночи до 4 ч утра;

- первые 6 ч после пробуждения являются периодом риска сосудистых катастроф (геморрагических и ишемических инсультов, внезапной сердечной смерти) у пациентов с сердечно-сосудистой патологией, т.к. в это время суток отмечается нарастание симпатической активности, сниженной во время сна;

- у лиц, страдающих бронхиальной астмой, более вероятно развитие бронхоспазма в период доминирования парасимпатической активности, максимум которой приходится обычно на 4 ч утра.

Феномены с месячной периодикой. У женщин репродуктивного возраста имеет место ухудшение самочувствия (со снижением работоспособности) и настроения в дни, предшествующие началу месячных и в период их прохождения, занимающий от 3 до 7 дней. Время для успешного зачатия у женщин репродуктивного возраста охватывает перiovуляторный период, который приходится примерно на 13-15-й день после прихода месячных при 28-дневном регулярном менструальном цикле.

Ритмогенные детерминанты в регуляции биоритмов

Регулирующие детерминанты наблюдаемых в человеческом организме биоритмов подразделяются на *внутренние*, определяемые эволюционно запрограммированными особенностями функционирования управляющих структур, и *внешние*, в роли которых выступают экзогенные воздействующие факторы.

Внутренние ритмогенные детерминанты, согласно доминирующим представлениям об управлении биоритмами, имеют 3 уровня организации.

Первый уровень, обеспечивающий циклическое течение физиологических процессов, связан с функционированием эпифиза (шишковидной железы). Деятельность эпифиза характеризуется четко выраженной циркадианной динамикой, проявляющейся в усилении его стимулирующего влияния на многие эндокринные железы ночью и ослаблении в дневное время. Вероят-

но основным регулирующим медиатором, продуцируемым в эпифизе, является *мелатонин*, который влияет на баланс процессов, обеспечивающих переход от сна к бодрствованию и наоборот.

Второй уровень, обеспечивающий регуляцию биоритмов, ассоциируется с функционированием супраоптических (супрахиазмальных) ядер гипоталамуса, которые посредством субкомиссурального тела связаны с эпифизом. Супрахиазмальные ядра гипоталамуса являются коллектором для поступающей информации из эпифиза и других структур ЦНС и обеспечивают синхронизацию (то есть эффективное взаимодействие) между многочисленными биоритмами организма.

Третий уровень, создающий условия для нормальной периодики при реализации разнообразных физиологических функций, связан с клеточными мембранами и субклеточными структурами. Полагают, что отдельные участки мембран способны реализовывать не только управляющие сигналы, приходящие из ЦНС, но и отвечать на стимулы при прямом воздействии экзогенных ритмогенных детерминант.

Существуют, однако, и другие взгляды на происхождение биоритмов, порождаемых внутренними факторами. Так, согласно *теории мультиосциллярного механизма* в организме нет доминирующей структуры, порождающей единый управляющий биоритм, а существует множество независимых, но при этом взаимосвязанных водителей ритма (пейсмейкеров) определяющих соответствующие циклические процессы в разных органах и системах. Синхронизация между всеми этими биоритмами осуществляется путем прямых и обратных положительных и отрицательных связей с участием нервных и гуморальных механизмов.

Теория хронона в объяснении функционирования внутренних ритмогенных детерминант делает акцент на молекулярной составляющей биоритмов. В соответствии с этой теорией в суточном ритме происходят колебательные изменения репликационной активности в участках молекул ДНК (называемых *хрононами*), ответственных за регуляцию биоритмов. Задаваемая при этом периодичность репликации фрагментов цепи ДНК служит своего рода частотным эталоном (подобно метроному) для ритмических процессов, связанных с течением метаболических процессов, обеспечивающих разнообразные физиологические функции.

Внешние ритмогенные детерминанты — это воздействия, порождаемые глобальными природными явлениями, которые влияют не только на отдельного человека, но и на популяцию в целом. В роли одного из внешних регуляторов биоритмов может выступать смена света и темноты в течение суток, т.е. *фотопери-*

одичность, которая активизирует функции эпифиза и через образование мелатонина вовлекает в циклические процессы структуры ЦНС, вегетативные центры и регулируемые ими эндокринные железы (**рис. 2**).

Фотопериодичность, однако, не является единственным фактором, определяющим околосуточную продолжительность циркадианных ритмов. Это доказывается тем, что у людей, долгое время пребывающих в условиях отсутствия освещенности (например, у спелеологов) после относительно короткого (примерно 3-недельного) периода удлинения циркадианных биоритмов до 48-52 ч отмечается возврат их продолжительности до значений не более 28 часов, т.е. почти до нормы. Фотопериодичность вообще не может служить регулятором циркадианных биоритмов у слепых от рождения людей (или ослепших уже в постнатальном периоде) у которых, тем не менее, все важнейшие, в том числе и околосуточные, биоритмы оказываются вполне нормальными.

Магнитное и гравитационное поле Земли также может выступать в качестве одной из внешних ритмогенных детерминант. Это подтверждают наблюдения, согласно которым пребывание птиц в помещении, экранированном от магнитных воздействий, лишает их способности к ориентации по сторонам света и одновременно вызывает расстройства циркадианных биоритмов. Значимость фактора земной гравитации для нормального течения циклического процесса костного ремоделирования подтверждается развитием остеопороза в условиях невесомости при продолжительных космических полетах.

Магнитные возмущения при возрастании солнечной активности могут провоцировать дисбаланс продукции мелатонина в эпифизе. Наблюдаемые при этом отклонения показателей циклических процессов способны провоцировать нарушения в самых разных органах систем, в особенности при исходном наличии в них той или иной патологии (например, ишемической болезни сердца).

Реликтовые магнитные флуктуации, продолжающиеся с периода существования Земли в виде газового шара, согласно так называемой *теории «волновых пакетов»*, вероятно, могут предопределять разницу в заболеваемости одной и той же патологией в сравниваемых достаточно отдаленных друг от друга регионах. Например, частота обострений ишемической болезни сердца в Центральной России увеличивается зимой, тогда как в Восточной Сибири — в летний период. Причем данное различие не связано с климатическими факторами. Это доказывается тем, что, например, заболеваемость ИБС на географически близких территориях,

но с разными климатическими особенностями (в частности, на севере европейской части России и в Московской области), оказывается сходной.

Десинхронозы – определение понятия, классификация, причины и проявления наблюдаемых расстройств

Десинхронозы – это различные нарушения биоритмов организма, которые характеризуются изменением (увеличением или уменьшением) длительности периода, частоты, амплитуды, акрофазы и батифазы циклически повторяемого процесса и рассогласованием ранее синхронизированных биоритмов, управляемых внутренними или внешними ритмогенными детерминантами. В Международном Классификаторе Болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) термин «десинхроноз» считается нозологическим синонимом диагнозов:

- нарушения засыпания и поддержания сна (бессонница) – G47.0;
- нарушения цикличности сна и бодрствования – G47.2

На практике клинические проявления десинхронозов оказываются значительно обширнее той сим-

птоматики, которую рекомендует учитывать МКБ-10, и могут иметь крайне негативные последствия как для функционирования отдельных органов систем, так и для организма в целом (вплоть до летального исхода).

Классификация десинхронозов

Острый десинхроноз развивается при резком нарушении согласованности в работе внешних и внутренних индукторов биоритмов, которые ранее были сопряжены. Такое состояние может возникать у авиапассажиров при авиаперелете с быстрым пересечением нескольких часовых поясов, в результате чего нарушаются все циркадианные ритмы. Острый десинхроноз может быть также спровоцирован воздействием многочисленных стресс-факторов физической и химической природы (перегревание, переохлаждение, алкогольная интоксикация и др.).

Хронический десинхроноз развивается при продолжающемся (или часто повторяющемся) действии фактора, вызвавшего острый десинхроноз.

Скрытый десинхроноз не имеет клинических проявлений и может быть обнаружен только при специальном обследовании.

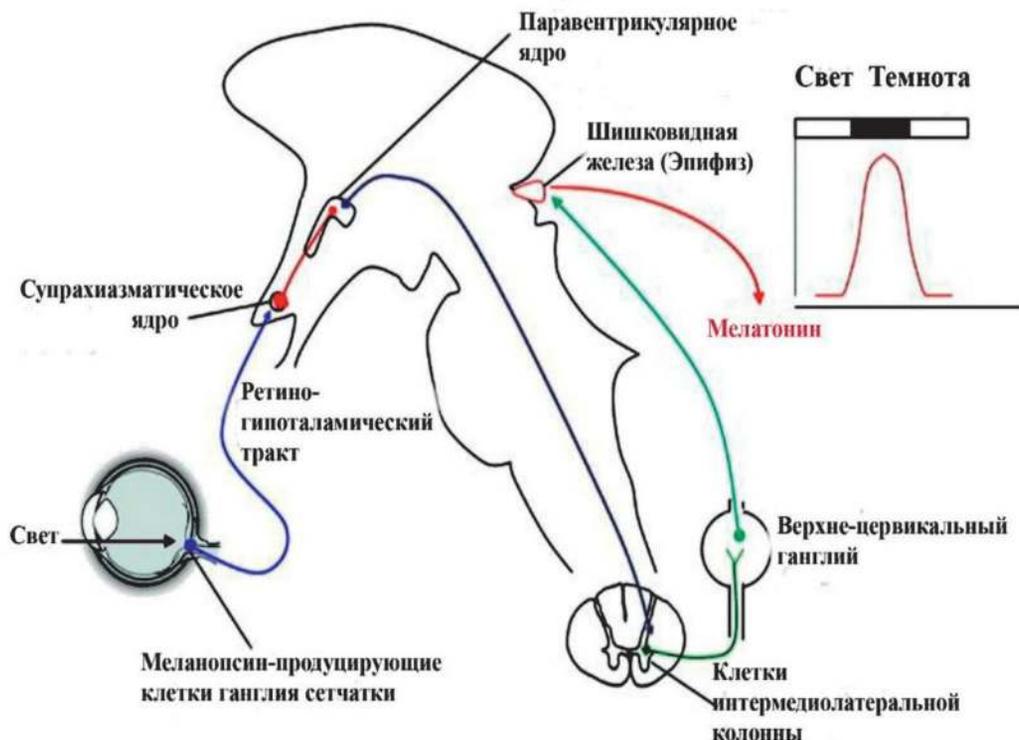


Рис. 2. Фотопериодичность в регуляции циркадианных биоритмов.
Fig. 2. Photoperiodicity in the regulation of circadian biorhythms.

Частичный десинхроноз проявляется изменениями циклических процессов в пределах одного органа или системы (пример – сердечные аритмии).

Тотальный десинхроноз охватывает большинство органов и систем с доминированием отклонений в функционировании ЦНС.

Асинхроноз — это максимально выраженный тотальный десинхроноз, обычно не совместимый с жизнью (развивается у лиц с сопутствующими заболеваниями, резко снижающими адаптацию к воздействию внешних факторов, провоцирующих десинхронозы).

Причины отдельных десинхронозов и их проявления

Дальние авиаперелеты, сопровождаемые пересечением 3 и более часовых поясов, провоцируют у многих авиапассажиров вялость, усталость, снижение умственной и физической работоспособности, расстройство сна, головные боли, шум в ушах, нарушения работы сердечно-сосудистой, эндокринной, иммунной систем и желудочно-кишечного тракта, развитие депрессивного состояния. Выраженность и продолжительность проявлений десинхроноза при дальних авиаперелетах определяется индивидуальными адаптационными возможностями организма, которые зависят от возраста и психо-эмоциональных особенностей конкретного человека. Дети и лица пожилого возраста оказываются более чувствительными к потере сложившегося суточного стереотипа. То же можно отметить в отношении субъектов, склонных к невротическим реакциям. Данный десинхроноз в англоязычной литературе получил название *jetlag-синдрома* (jet – самолет; lag-задержка) или синдрома смены часового пояса.

Сходные нарушения возникают при *полярном десинхронозе*, который возникает при нахождении в высокоширотных регионах у лиц, пребывающих туда для вахтовой работы из областей с обычной сменой дня и ночи. Такие люди испытывают на себе влияние арктического климата и, в частности, последствия воздействия полярной ночи. Адаптация организма к изменившимся параметрам смены освещенности развивается в следующей последовательности: сначала восстанавливаются психофизиологические показатели, далее – соматические и в завершение – вегетативные функции. Наиболее инертными оказываются основной, гормональный и электролитный обмены, а наиболее отстающей из постепенно нормализуемых функций – половая.

Заслуживает внимания тот факт, что на циркадианные биоритмы может оказывать влияние *часовой сдвиг при переходе на летнее или зимнее время*. Даже от-

носительно небольшое изменение настройки датчика времени при чередующихся в году переходах на летнее и зимнее время способно вызывать в той или иной мере выраженные отклонения циркадианной ритмики в периоде, предшествующем окончательному привыканию к новым условиям. В основном при этом страдают лица, склонные к невротическим реакциям из-за наследственных или приобретенных отклонений в функционировании ЦНС.

• *Космические полеты* сопровождаются развитием десинхроноза, причинами которого при пребывании в космосе становятся:

• прекращение влияния смены дня и ночи в рамках 24-часового циркадианного ритма и отсутствие воздействия фоновых флюктуаций погодных, гелио- и геомагнитных факторов;

• усиление действия космического электромагнитного излучения;

• воздействие невесомости, лишаящей способности к пространственной ориентации из-за выключения отолитового аппарата внутреннего уха.

Указанные причины приводят к общему десинхронозу с различными по выраженности психологическими, вегетативными и соматическими нарушениями. При этом отмечается существенное снижение производительности умственного труда, которое может достигать 45% от исходного уровня, а продолжительность регистрируемых психофизиологических нарушений до момента достигаемой адаптации может колебаться от нескольких дней до месяца. Особую опасность для космонавтов представляет возникающий у них десинхроноз в костном ремоделировании, который может привести к тяжелому остеопорозу. Центральное звено патогенеза «космического остеопороза» состоит в том, что в условиях отсутствия земного притяжения исчезает фоновая гравитационная нагрузка на костную ткань, которая в норме является важным регулятором костного метаболизма и циклического процесса костного ремоделирования.

Побывавшие продолжительное время в космосе лица при возвращении на Землю нуждаются в достаточно длительной реабилитации, что связано с повторной перестройкой измененных в космосе биоритмов, которые относительно медленно возвращают свои характеристики, типичные для земных условий.

Повторяющиеся нарушения цикла «сон-бодрствование» при сменной и ночной работе. Особенностью социального устройства человеческого общества является существование профессий, которые диктуют необходимость выполнения трудовых функций по сменному графику (сутки через сутки, сутки через двое и т.д.) или

в ночное время, т.е. в тот период, который предопределен эволюцией для отдыха. Разрушение филогенетически сложившейся иерархии биоритмов приводит к развитию синдрома неадаптированности к сменной и ночной работе, который проявляется в виде повышенной сонливости и хронической усталости в дневное время. Одним из последствий этого является возрастание риска всякого рода аварийных инцидентов из-за потери должного контроля над ситуацией. Люди с недостаточной продолжительностью сна, длительное время работающие в ночные смены или по сменному графику, чаще подвержены болезням, связанным с неврозами (артериальная гипертензия, язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки, половая дисфункция).

Влияние на биоритмы природных гелио- и геомагнитных факторов. Известно, что увеличение солнечной активности сопровождается учащением геомагнитных бурь: при средней частоте 30 бурь в год их число может колебаться от 1-2 бурь в год вблизи солнечного минимума до 50 бурь в год вблизи солнечного максимума. Подсчитано, что в условиях умеренных и сильных геомагнитных возмущений человек за свою 75-летнюю жизнь проживает в среднем около 15 лет. При этом главной мишенью возмущенного геомагнитного поля становится сердечно-сосудистая система. По этой причине в периоды геомагнитных бурь отмечается значительное учащение и отягощение приступов стенокардии, развития инфарктов, гипертонических кризов, инсультов, а также возрастание числа случаев внезапной сердечной смерти.

Восприятие геомагнитных воздействий осуществляется через магниторецепторы, которые, как предполагают, располагаются в участке прилежания головного мозга к клиновидной кости и в области надпочечников. Активность функционирования магниторецепторов у разных людей выражено варьирует. В связи с этим принято выделить когорту *метеочувствительных лиц*, которые из-за своей врожденной или приобретенной сенсibilизации к геомагнитным воздействиям составляют группу риска для развития нарушений, ассоциируемых с вихревыми всплесками в земной магнитосфере.

Действие на организм различных стресс-факторов, наркотических и токсических веществ. Как известно, в роли индукторов стрессового состояния могут выступать самые разные агенты, имеющие физическую, химическую и биологическую природу, например, механические и термические травмы, химические ожоги или тяжелые инфекции. К стрессу также способны приводить и многочисленные психогенные факторы, например, страх, утомление при продолжительных ин-

теллектуальных нагрузках, резкое изменение жизненного уклада при переездах, разводе и т.д.

Для спровоцированных стрессом неврозов типичны нарушения циркадианных биоритмов, что проявляется в рассогласовании фаз «сон-бодрствование» и имеет своим последствием дневную сонливость и ночную бессонницу, повышенную утомляемость, снижение внимания, ухудшение памяти и когнитивных способностей. Следует отметить, что стресс дезорганизует не только циркадианную ритмику, но и циклические процессы с более продолжительным периодом. Так, известно, что у женщин ассоциируемый со стрессом невроз может «гасить» менструальную функцию, что является одной из причин женского бесплодия и раннего климакса. В среднесрочной перспективе ассоциируемый с продолжительным стрессом десинхроноз ведет к прогрессирующим отклонениям в управлении вегетативными центрами, в результате чего возрастает риск развития многих хронических заболеваний.

Постоянное употребление психоактивных веществ и алкоголя способствует формированию феноменов сначала психической, а затем физической зависимости от них, проявляемой в виде абстинентного синдрома при отмене их приема. Большую значимость для таких нарушений имеет рассогласование синхронизированных биоритмов в метаболизме центральных нейромедиаторов (норадреналина, дофамина, серотонина, ацетилхолина, ГАМК). У лиц, страдающих хроническим алкоголизмом, наркоманиями и токсикоманиями, проявлением десинхроноза в обмене нейромедиаторов являются нарушения мозговой активности по данным ЭЭГ, отклонения ритмов работы сердца, разбалансировка мелатонинзависимой эпифизарной регуляции фаз сна и бодрствования и сопряженных циркадианных биоритмов. В конечном итоге последствием дигрими при злоупотреблении наркотическими веществами и алкоголем становится потеря контроля над вегетативными центрами, осуществляющими контроль многочисленных органных функций. По этой причине спектр заболеваний, сопровождающих наркомании, токсикомании и хронический алкоголизм, охватывает практически все системы организма (основной мишенью остается ЦНС) и становится причиной выраженного сокращения продолжительности жизни.

Хрономедицинские принципы в клинической практике

Хрономедициной называют направление медицинской науки, которое акцентирует внимание на связи заболеваемости с отклонениями физиологических биоритмов и ставит целью повышение эффективно-

сти профилактических и терапевтических мероприятий при патологических состояниях, связанных с десинхронозами.

В структуре хрономедицины выделяют несколько разделов, решающих специализированные задачи с обязательным учетом механизмов, связанных с ритмогенной модуляцией (временным фактором управления) циклических процессов. К ним относятся:

- хронофизиология и хронобиохимия;
- хронопатология;
- хронопрофилактика;
- хронодиагностика;
- хронофармакология;
- хронотерапия.

Хронофизиология и хронобиохимия — это разделы хрономедицины, изучающие ритмогенную модуляцию (управление) физиологических и биохимических составляющих циклических процессов. С использованием физиологических и биохимических методов исследуется влияние факторов связанных с временем суток, сезонностью и другими внутренними и внешними ритмогенными детерминантами на показатели биоритмов.

Хронопатология — раздел хрономедицины, использующий клинические наблюдения и экспериментальные модели для изучения этиологии, патогенеза, клинических проявлений и исходов нарушений ритмических процессов в отдельных органах и в организме в целом. С учетом специфики функционирования тех или иных органных систем или особенностей проявления патологических процессов выделяют хронокардиологию, хронопсихиатрию, хроногастроэнтерологию, хроноонкологию и др.

Хроногигиена — раздел хрономедицины, в задачи которого входит разработка гигиенических нормативов, регламентирующих условия учебы, труда, отдыха, повседневного быта, питания и оказания медицинской помощи с учетом хроноструктуры организма (особенностей его биоритмов) и внешних регулирующих ритмогенных детерминант (суточной освещенности, сезонных факторов и др.).

Хронопрофилактика — раздел хрономедицины, разрабатывающий подходы к предупреждению десинхронозов, вызываемых разными хронофакторами (дальними трансмеридиональными перемещениями, сменным графиком работы и др.). По набору решаемых задач хронопрофилактика тесно связана с хроногигиеной. Принципы, направленные на подстройку к физиологическим биоритмам, используются при разработке рекомендаций, регламентирующих режимы сна/бодрствования, питания, а также объемы и виды допустимых физических нагрузок. В круг задач хронопро-

филактики входит также хронобиологический отбор кандидатов, пригодных для физического и интеллектуального труда в условиях повышенного риска десинхронозов (при сменной или вахтовой работе, полетах в космос и др.). Эти же лица должны проходить повторные обследования с целью их своевременного отстранения от профессиональной деятельности в случаях выявления у них признаков десинхроноза.

Хронодиагностика — раздел хрономедицины, изучающий зависимость, ассоциируемых с биоритмами нормативных показателей от фактора времени. Необходимо делать поправку на то, что даже в условиях нормы отдельные показатели циклических процессов у некоторых субъектов периодически могут выходить за пределы доверительных интервалов, что может быть связано с индивидуальными особенностями биоритмов или с кратковременным случайным воздействием внешних факторов, не оставляющих после себя стойких биоритмических нарушений. Знание природы таких явлений позволяет избежать гипердиагностики и назначения лекарственных средств в ситуациях, когда без них можно обойтись.

С другой стороны, хронодиагностика позволяет выявлять начинающиеся нарушения, когда при динамических измерениях того или иного показателя его колебания, оставаясь в пределах нормативных значений, меняют свою амплитуду, что является ранним признаком начинающегося десинхроноза. Очевидно, что в таких ситуациях своевременное начало проведения тех или иных мероприятий, противодействующих прогрессированию десинхроноза, будет способствовать повышению их терапевтической (профилактической) эффективности.

Хронофармакология — раздел фармакологии, использующий хронобиологические принципы, в соответствии с которыми изыскиваются способы, позволяющие потенцировать и пролонгировать позитивные и ослаблять или сокращать негативные эффекты лекарственных средств с учетом индивидуальных биоритмов организма и особенностей действия внешних ритмогенных детерминант. В рамках хронофармакологии изучают особенности преобразования (метаболизма) лекарственных веществ в организме и колебания чувствительности воспринимающих структур с целью оптимизации терапевтических режимов, предусматривающих выполнение тех или иных лечебных процедур в период, когда они могут принести наибольшую пользу. Так, например, лицам, страдающим аллергией (и усиленной гистаминолиберацией), целесообразно рекомендовать прием H_1 -антигистаминных препаратов на ночь, а не утром или днем, так как в ночное время

усиливается активность парасимпатической системы, потенцирующей эффекты гистамина. К тому же следует принимать во внимание, что H_1 -антигистаминные препараты в своем большинстве обуславливают снотворный эффект, что так же определяет целесообразность их приема на ночь, а не в утреннее время.

Хронотерапия — раздел хрономедицины, предусматривающий оптимизацию терапевтических режимов с учетом хронофизиологических эффектов используемых средств и их зависимость от внешних и внутренних ритмогенных факторов. При проведении хронотерапии она может быть использована в виде *имитационного* (подражающего) или *превентивного* (предупреждающего) лечения.

Примером *имитационного* лечения является применение 2-фазной заместительной гормональной терапии препаратами эстрогенов и прогестерона (в ритме нормального менструального цикла) для купирования климактерических проявлений у женщин в постменопаузе.

К *превентивной* терапии можно отнести использование бисфосфонатов и других антирезорбтивных средств с целью предупреждения/ослабления развития остеопороза в условиях космического полета или при длительной иммобилизации, а также назначение препаратов витамина Д для предотвращения последствий недостаточной инсоляции (в зимнее время и, в особенности, в период полярной ночи в высокоширотных регионах).

Заключение

Изучение биоритмов имеет большое практическое значение для определения адаптационных возможностей организма к воздействию внешних и внутренних болезнетворных факторов, для своевременной диагностики возникающих патологических изменений и правильного выбора необходимых терапевтиче-

ских и профилактических мероприятий, а также для оценки эффективности проводимого лечения, прогноза течения заболевания и его исхода. Очевидно, что использование хрономедицинских принципов вооружает врача дополнительными диагностическими и терапевтическими ресурсами, что расширяет возможности оказания эффективной помощи пациентам, страдающим заболеваниями, ассоциированными с десинхронозами.

Литература

1. Ашофф Ю. *Биологические ритмы* (пер. с англ). М.: Мир, 1984.
2. Губин, Д.Г. Возрастной десинхроноз: фундаментальные и прикладные аспекты. *Тюменский медицинский журнал*. 2014; 2: 66-8.
3. Ежов С.Н. Основные концепции биоритмологии. *Вестник ТГУ*. 2008; 2: 104-21.
4. Заславская, Р.М., Васькова, Л.Б., Болсуновская Ю.Р. Хронофармакология и хрономедицина как новый методологический подход к оптимизации лечения. *Пространство и Время*. 2012; 1: 195-8.
5. Комаров Ф.И., Рапопорт С.И. *Хронобиология и хрономедицина*. М.: Триада-Х, 2000.
6. Кузнецов Ю.Ф. *Биоритмы человека. Физический, эмоциональный, интеллектуальный*. 2-е изд. М.; Амрита-Русь, 2006.
7. Ставцева Ю.В. и др. Механическая десинхрония у пациентов с хронической сердечной недостаточностью: классификация, методы оценки, значение при отборе больных для СРТ. *Сердечная недостаточность*. 2014; 2: 101-9.
8. Чибисов С.М., Рапопорт С.И., Благоданова М.Л. *Хронобиология и хрономедицина*. М.: Из-во РУДН, 2018.
9. Шурлыгина, А.В. *Основные принципы хронотерапии, Методическое пособие*. Новосибирск: НГУ, 2002.
10. Ishaque S. et al. Rhodiola rosea for physical and mental fatigue: a systematic review. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012; Vol.12:1-9
11. Panossian A., Wikman G. Evidence-based efficacy of adaptogens in fatigue, and molecular mechanisms related to their stress-protective activity. *Curr Clin Pharmacol*. 2009; Vol.4: 198-219.

Сведения об авторах:

Порядин Геннадий Васильевич, чл.-корр. РАН, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, e-mail: poryadin_GV@rsmu.ru;

Салмаси Жан Мустафаевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета;

Шарпань Юрий Владимирович, доцент каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета.