

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.: 0,500

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

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

Сдано в набор 26.08.2022
Подписано к печати 02.09.2022
Опубликовано 12.09.2022

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. № 3. 1–176.

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 № 3 · 2022

Июль–Сентябрь

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 0,500

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 26.08.2022
Signed for publication on 02.09.2022
Published on 12.09.2022

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 3. 1-176.

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 № 3 · 2022

July–September

Editor in chief:

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

Assistant editors in chief:

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

Executive editor:

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

Editorial Board:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Advisory Committee:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Московцев А.А., Иванов А.В., Зайченко Д.М., Микрюкова А.А., Суханова И.Ф., Соколовская А.А., Кожевникова Л.М., Кубатиев А.А.** Липополисахариды увеличивают активность IRE1-опосредуемого сигнального пути ответа на гомоцистеин-индуцированный стресс эндоплазматического ретикулума в эндотелиоцитах..... 5
- Булатова И.А., Соболев А.А., Гуляева И.Л.** Анализ ассоциации полиморфизма генов *VWF* (T2385C) и *VEGFA* (G634C) с развитием неалкогольного стеатоза печени у женщин с ожирением в период менопаузы 19
- Жуковская Е.В., Коробейникова Т.В., Карелин А.Ф., Гончаров А.П., Рахаев Д.С., Литвицкий П.Ф.** Изменение содержания в сыворотке крови свободных аминокислот у детей с острым лимфобластным лейкозом и лимфомами после химиотерапии 25
- Лебедева М.А., Медведева Ю.С., Баранов М.В., Золотов Н.Н., Арутюнян А.В., Карганов М.Ю.** Особенности развития экспериментального инфаркта миокарда в течении месяца после действия моделированной микрогравитации 34
- Сороколетов С.М., Ляпина Л.А., Григорьева М.Е.** Антитромботические эффекты комплексных препаратов низкомолекулярного гепарина с аспирином в норме и при гиперкоагуляции 45
- Кузник Б.И., Смоляков Ю.Н., Давыдов С.О., Пармс Д.С.** Состояние микроциркуляторной гемодинамики при операции трансплантации коленного и тазобедренного суставов 52
- Проценко А.М.** Влияние аутоантител к инсулину у беременных с сахарным диабетом I типа на состояние новорожденных 59
- Александрова С.Г., Бычкова Л.В., Александрова М.Р., Ляпунова Т.В., Родоман М.Г.** Изменения в анализах мочи и показателях функции почек у пациентов с вирусной пневмонией COVID-19..... 69
- Булгакова Я.В., Савилов П.Н.** Перекисное окисление липидов и антиоксидантная система головного мозга крыс при адаптации к гипероксической нагрузке 80
- Осиков М.В., Кайгородцева Н.В.** Сравнительный анализ противовоспалительного действия озона и 5-аминосалициловой кислоты при экспериментальном колите..... 91
- Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Базарный В.В.** Активация репаративной регенерации печени с помощью стволовых клеток 101
- Иванов А.Н., Савкина А.А., Ленгерт Е.В., Ермаков А.В., Попыхова Э.Б., Кузнецова Н.А., Степанова Т.В., Лойко Д.Д.** Влияние геля с микрокапсулами, загруженными таниновой кислотой, на развитие системных проявлений эндотелиальной дисфункции при экспериментальном пародонтите у белых крыс 113
- Жариков А.Ю., Кальницкий А.С., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Бобров И.П., Жарикова Г.В.** Активность матриксной металлопротеиназы-2 и оксидативный стресс в почках при экспериментальном уратном нефролитиазе 122

ORIGINAL ARTICLES

- Moskovtsev A.A., Ivanov A.V., Zaichenko D.M., Mikryukova A.A., Sukhanova I.F., Sokolovskaya A.A., Kozhevnikova L.M., Kubatiev A.A.** Lipopolysaccharides increase the ire1-mediated unfolded protein response signaling induced by homocysteine in endotheliocytes 5
- Bulatova I.A., Sobol A.A., Gulyaeva I.L.** Analysis of the association of *VW* (T2385C) and *VEGFA* (G634C) gene polymorphism with the development of non-alcoholic liver steatosis in obese women during menopause 19
- Zhukovskaja E.V., Korobejnikova T.V., Karelin A.F., Goncharov A.P., Rahaev D.S., Litvickiy P.F.** Changes in free amino acid concentrations in blood serum of children with acute lymphoblastic leukemia and lymphomas after chemotherapy 25
- Lebedeva M.A., Medvedeva Yu.S., Baranov M.V., Zolotov N.N., Arutyunyan A.V., Karganov M.Yu.** Peculiarities of experimental myocardial infarction development during one month after simulated microgravity 34
- Sorokoletov S.M., Lyapina L.A., Grigorjeva M.E.** Antithrombotic effects of low molecular weight heparin-aspirin combination therapy in normal condition and hypercoagulation 45
- Kuznik B.I., Smolyakov Y.N., Davydov S.O., Parts D.S.** State of microcirculatory hemodynamics during knee and hip joint transplantation surgery 52
- Protsenko A.M.** Effects of insulin autoantibodies of different orders in pregnant women with type 1 diabetes mellitus on the condition of the newborn 59
- Alexandrova S.G., Bychkova L.V., Alexandrova M.R., Lyapunova T.V., Rodoman M.G.** Changes in urine tests and renal function indices in patients with COVID-19 viral pneumonia 69
- Bulgakova Ya.V., Savilov P.N.** Lipid peroxidation and the antioxidant system of the rat brain during adaptation to hyperoxic load 80
- Osikov M.V., Kaygorodtseva N.V.** Comparative analysis of the anti-inflammatory effect of ozone and 5-aminosalicylic acid in experimental colitis 91
- Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Bazarniy V.V.** Activation of reparative liver regeneration using stem cells 101
- Ivanov A.N., Savkina A.A., Lengert E.V., Ermakov A.V., Popkova E.B., Kuznetsova N.A., Stepanova T.V., Loiko D.D.** Effect of gel with tannic acid-loaded microcapsules on the development of systemic manifestations of endothelial dysfunction in white rats with experimental periodontitis 113
- Zharikov A.Yu., Kalnitsky A.S., Mazko O.N., Makarova O.G., Bobrov I.P., Zharikova G.V.** Matrix metalloproteinase-2 activity and oxidative stress in the kidneys during experimental urate nephrolithiasis 122

СОДЕРЖАНИЕ

- Баринов Э.Ф., Малинин Ю.Ю., Григорян Х.В.** Патогенез дисфункции мочеточника и компенсаторные механизмы трафика мелких конкрементов: роль пуринергической сигнализации..... 129

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Порядин Г.В., Панина М.И., Ларина В.Н., Рыжих А.А., Стоделова Е.А.** Постковидный синдром сопровождается формированием нейтрофильных экстраклеточных ловушек в нитевидной форме ... 137

ОБЗОРЫ

- Чаулин А.М.** Сердечные тропонины как биомаркеры повреждения кардиомиоцитов при артериальной гипертензии: акцент на патофизиологические механизмы 141
- Ревокатова Д.П., Зурина И.М., Горкун А.А., Сабурин И.Н.** Современные подходы к созданию васкуляризированных костных биоэквивалентов..... 151
- Фефелова Ю.А., Мурашев Б.Ю.** Влияние ограничения калорийности питания на процессы старения и развитие нейродегенеративных заболеваний 166

CONTENTS

- Barinov E.F., Malinin Yu.Yu., Grigoryan Kh.V.** Pathogenesis of ureteral dysfunction and compensatory mechanisms of small stone passage: the role of purinergic signaling

BRIEF MESSAGES

- Salmasi J.M., Kazimirskii A.N., Poryadin G.V., Panina M.I., Larina V.N., Ryzhikh A.A., Stodelova E.A.** Post-covid syndrome is associated with the formation of neutrophil extracellular traps in a filamentous form

REVEIWS

- Chaulin A.M.** Cardiac troponins as biomarkers of cardiomyocyte damage in arterial hypertension: emphasis on pathophysiological mechanisms
- Revokatova D.P., Zurina I.M., Gorkun A.A., Saburina I.N.** Modern approaches to bone tissue vascularization
- Fefelova Yu.A., Murashev B.Yu.** Effect of caloric restriction on aging and neurodegenerative diseases

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092.9

Московцев А.А.^{1,2}, Иванов А.В.¹, Зайченко Д.М.¹, Микрюкова А.А.¹, Суханова И.Ф.¹,
Соколовская А.А.¹, Кожевникова Л.М.¹, Кубатиев А.А.^{1,2}

Липополисахариды увеличивают активность IRE1-опосредуемого сигнального пути ответа на гомоцистеин-индуцированный стресс эндоплазматического ретикулула в эндотелиоцитах

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, Москва, Россия

Введение. Гипергомоцистеинемия (Ггц) – повышение уровня гомоцистеина в плазме крови выше 12 мкмоль/л – независимый фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний. Гипергомоцистеинемия, являясь сравнительно распространенным состоянием, ассоциирована также с рядом других патологий, таких как болезнь Альцгеймера, шизофрения, заболевания почек, остеопороз, инсулиннезависимый диабет. Повышенные концентрации гомоцистеина (Ггц) способны вызывать клеточный стресс (окислительный, стресс эндоплазматического ретикулула), что может приводить к эндотелиальной дисфункции и клеточной гибели. Ггц может отягощать течение инфекционных заболеваний, но механизмы такой модуляции изучены недостаточно. Предполагается, что Ггц является одним из факторов неблагоприятного прогноза SARS-CoV-2 инфекции. **Цель исследования** – изучение в эндотелиальных клетках механизмов действия гомоцистеина, липополисахаридов, их комбинации, а также модулирующего действия фолиевой кислоты и витамина B₁₂.

Методика. Эндотелиоцитоподобные клетки EA.hy926 подвергали действию дитиотрейтола, гомоцистеина, липополисахаридов, гомоцистеина в комбинации с липополисахаридами, с дополнительной инкубацией с витамином B₁₂ и фолиевой кислотой или только фолиевой кислотой. Использовали ДНК-цитометрию для подсчета процента гиподиплоидных клеток, а также МТТ-тест для оценки цитотоксических эффектов. Методом ПЦР-РВ оценивали уровни экспрессии мРНК генов, вовлеченных в ответ клетки на стресс эндоплазматического ретикулула: BiP, XBP1 (общего и сплайсированной формы), IRE1, ATF6 в двух временных точках после воздействия — 6 ч и 24 ч.

Результаты. Впервые показано, что совместное действие липополисахаридов и гомоцистеина приводит к увеличению активности пути IRE1-XBP1 – сигнальной ветви ответа на стресс эндоплазматического ретикулула. Являясь слабыми индукторами стресса ЭПР, липополисахариды значимо потенцируют активированный гомоцистеином сигнальный путь IRE1-XBP1, что мы связываем с взаимодействием сигнальных путей врожденного иммунитета и ответа на стресс. Обнаруженное потенцирование может объяснять небольшое увеличение цитотоксичности при сочетанном действии Ггц и ЛПС в связи с тем, что пролонгированная активность IRE1 обладает проапоптотическим действием. Впервые показано, что фолиевая кислота и витамин B₁₂ снижают активность пути IRE1-XBP1 при действии гомоцистеина и ЛПС, а также дитиотрейтола.

Заключение. В ходе исследования установлено значимое стимулирование сигнального пути IRE1-XBP1 комбинацией ЛПС и Ггц, а также аттенуация этого пути фолиевой кислотой и витамином B₁₂. Однако, потенцирование гомоцистеином цитотоксического эффекта ЛПС невелико. Хотя полученные в ходе данного *in vitro* исследования результаты не позволяют в полной мере рассматривать Ггц как фактор, усложняющий течение инфекционных заболеваний, состояние сосудистой системы и возрастающий риск ее дисфункции должны приниматься во внимание при выборе методов профилактики, терапии и прогноза течения инфекционных заболеваний на фоне гипергомоцистеинемии.

Ключевые слова: гипергомоцистеинемия; липополисахариды; стресс эндоплазматического ретикулула; рибонуклеаза IRE1; сплайсинг XBP1

Для цитирования: Московцев А.А., Иванов А.В., Зайченко Д.М., Микрюкова А.А., Суханова И.Ф., Соколовская А.А., Кожевникова Л.М., Кубатиев А.А. Липополисахариды увеличивают активность IRE1-опосредуемого сигнального пути ответа на гомоцистеин-индуцированный стресс эндоплазматического ретикулула в эндотелиоцитах. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(3): 5-18.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.5-18

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Кубатиев А.А., Московцев А.А.; сбор и обработка материала – Микрюкова А.А., Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф., Соколовская А.А.; подготовка иллюстративного материала – Московцев А.А., Иванов А.В.; статистическая обработка материала – Московцев А.А.; написание текста – Московцев А.А., Кубатиев А.А.; редактирование – Московцев А.А., Зайченко Д.М. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

Для корреспонденции: *Московцев Алексей Александрович*, e-mail: bioinf@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-04-60251.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 07.06.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Moskovtsev A.A.^{1,2}, Ivanov A.V.¹, Zaichenko D.M.¹, Mikryukova A.A.¹, Sukhanova I.F.¹, Sokolovskaya A.A.¹, Kozhevnikova L.M.¹, Kubatiev A.A.^{1,2}

Lipopolysaccharides increase the IRE1-mediated unfolded protein response signaling induced by homocysteine in endothelial cells

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology,

Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation;

²Russian Medical Academy of Continuing Professional Education,

Barrikadnaya St. 2/1, Moscow 125993, Russian Federation

Introduction. Hyperhomocysteinemia (HHcy) is a pathological condition described with high levels in plasma of homocysteine (Hcy), a nonprotein α -amino acid homologue of cysteine. It might cause oxidative and endoplasmic reticulum stress with resultant endothelial dysfunction and cell death. HHcy, that is a widespread condition, is associated with a number of other pathologies, such as Alzheimer's disease, schizophrenia, kidney disease, osteoporosis, and diabetes. Early studies emphasize HHcy as one of the crucial and independent risk factors for development of cardiovascular disorders. Moreover, hyperhomocysteinemia can escalate the severity of infectious diseases and even appears as a potential marker for forecasting the course of SARS-CoV-2 infection, as many patients are currently at risk for major clotting events once the infection is established. However, the mechanisms of these processes were poorly studied previously. Therefore, **the major focus** of this work is to study the mechanisms of actions of homocysteine and lipopolysaccharides (LPS) separately and combined together, and modulating actions of them by folic acid and vitamin B₁₂ in endothelial cells.

Methods. Endothelial cell-like EA.hy926 cells were exposed to dithiothreitol, homocysteine, LPS, and Hcy in combination with LPS, with additional incubation with vitamin B₁₂ and folic acid or folic acid alone. The DNA cytometry was performed to calculate the percentage of hypodiploid cells, and the MTT test was conducted to assess cytotoxic effects. RT-qPCR was done in order to evaluate the mRNA expression of the genes involved in the cell response to endoplasmic reticulum stress: BiP, XBP1 (common and spliced form), IRE1, ATF6 at two time points after exposure, 6 h and 24 h.

Results. During our research, it was discovered that the coaction of LPS and Hcy increased the activity of the IRE1-XBP1 pathway, a signaling branch of ER stress. LPS, as weak inducers of ER stress, significantly potentiates the Hcy-activated IRE1-XBP1 signaling pathway. We interpret this event as the interaction of signaling pathways of innate immunity and stress response. The observed potentiation may explain the elevated cytotoxicity under the coaction of Hcy and LPS due to the proapoptotic effect of IRE1 prolonged activity. In this paper, our research demonstrated that folic acid and vitamin B₁₂ restrict the activity of the IRE1-XBP1 pathway under the action of Hcy and LPS as well as of dithiothreitol.

Conclusion. A significant stimulation of the IRE1-XBP1 signaling pathway by a combination of LPS and Hcy, as well as attenuation of this pathway by folic acid and vitamin B₁₂ have been shown. However, the potentiation of the cytotoxic effect of LPS by homocysteine is relatively small. Although the results obtained during this *in vitro* study do not let us to fully consider HHcy as a factor aggravating the course of infectious diseases, the state of the vascular system and the increasing risk of its dysfunction should be taken into account while choosing methods for the prevention, treatment and forecasting of the infectious diseases course against the background of hyperhomocysteinemia.

Keywords: hyperhomocysteinemia; lipopolysaccharides; endoplasmic reticulum stress; ribonuclease IRE1; XBP1 splicing

For citation: Moskovtsev A.A., Ivanov A.V., Zaichenko D.M., Mikryukova A.A., Sukhanova I.F., Sokolovskaya A.A., Kozhevnikova L.M., Kubatiev A.A. Lipopolysaccharides increase the ire1-mediated unfolded protein response signaling induced by homocystein in endothelial cells. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(3): 5-18. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.5-18

Author's contribution: concept and design of the study – Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A.; collection and processing of material –

Mikryukova A.A., Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F., Sokolovskaya A.A.; preparation of illustrative material – Moskovtsev A.A., Ivanov A.V.; statistical processing – Moskovtsev A.A.; text writing – Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A.; editing – Moskovtsev A.A., Zaichenko D.M. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Aleksey A. Moskovtsev*, PhD, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: bioinf@mail.ru

Financing. The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Grant No. 20-04-60251

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

Information about the authors:

Ivanov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-2424-6115>

Sokolovskaya A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0112-2734>

Kozhevnikova L.M., <https://orcid.org/0000-0002-0112-2734>

Kubatiev A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>

Received 07.06.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Введение

Гомоцистеин (Гц) – биологически значимая не-протеиногенная аминокислота, относящаяся к ряду серосодержащих, включающему также метионин, цистеин, таурин [1]. Гц преимущественно образуется из незаменимой аминокислоты метионина путем отщепления метильной группы. Выраженное повышение концентрации общего Гц (связанного и несвязанного с белком) в крови из-за редких наследственных дефектов участвующих в метаболизме Гц ферментов ассоциировано с преждевременным развитием сердечно-сосудистых заболеваний в раннем подростковом возрасте и даже в детстве [2]. Сравнительно распространенным состоянием является умеренное повышение концентрации Гц, отражающее менее серьезные генетические дефекты и дефицит факторов метаболизма Гц (фолиевая кислота, витамин В₁₂, витамин В₆) [2] [3]. При гомоцистеинурии – патологическом состоянии, характерном для детского возраста, – концентрация Гц в плазме крови находится в миллимолярном диапазоне [4]. Гипергомоцистеинемия (Ггц) – повышение уровня гомоцистеина в плазме крови выше 12 мкмоль/л – считается независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний [5]. Гипергомоцистеинемия также ассоциирована с рядом других патологий, таких как болезнь Альцгеймера, шизофрения, заболевания почек, остеопороз, инсулиннезависимый диабет. К развитию Ггц приводит комбинация генетических и различных внешних факторов, нарушающих метаболизм метионина: дефекты реметилювания Гц, возникающие в связи с недостаточностью (гомозиготной и гетерозиготной) ферментов бетаин-гомоцистеин-метилтрансферазы (ВНМТ), метилентетрагидрофолатредуктазы (МТНФР); дефицит кофакторов и косубстратов – витаминов В₁₂, В₆, фолие-

вой кислоты; хроническая почечная недостаточность; использование различных лекарственных препаратов, влияющих на обмен Гц. Метаболизм метионина начинается с его превращения метионинаденозилтрансферазой в S-аденозилметионин (SAM), сульфоний-ион которого облегчает взаимодействие метильной группы с нуклеофилами [1]. Метильная группа SAM необходима более чем для 100 реакций трансметилирования, включая метилирование ДНК, РНК, аминокислот в белках, фосфолипидов и др. [1]. Все метилтрансферазы ингибируются продуктом реакции S-аденозилгомоцистеином (SAH). По этой причине эффективное удаление SAH чрезвычайно важно для функционирования клетки [6]. S-аденозилгомоцистеин гидролизуется в гомоцистеин и аденозин ферментом SAH гидролаза, встречающимся во всех клетках.

Гомоцистеин может реметилюваться в метионин или конвертироваться в цистеин транссульфированием. Существует 2 основных пути реметилювания Гц с образованием метионина. Первый из них катализируется повсеместно распространенной метионин синтазой (MS), кофактором этой реакции является кобаламин, а донором метильной группы выступает 5-метилтетрагидрофолат. Последний представляет собой главную форму фолата в плазме крови и образуется в результате восстановления 5,10-метилентетрагидрофолата ферментом метилентетрагидрофолатредуктазой [6]. Второй путь реметилювания представлен в печени и в меньшей степени в почках. Реакция катализируется бетаин-гомоцистеин-метилтрансферазой при участии в качестве кофактора пиридоксаль-5'-фосфата, производного витамина В₆. Донором метильной группы является бетаин, образующийся при окислении холина.

Гомоцистеин транссульфируется в цистеин через цистатионин. Для превращения цистатионина в ци-

стеин и α -кетомасляную кислоту необходим витамин B_6 . Транссульфирование имеет ограниченное тканевое распределение и в основном представлено в печени, почках, кишечнике и поджелудочной железе. Конверсия метионина в цистеин необратима, и, как известно, цистеин не является незаменимой аминокислотой [6].

Гомоцистеин в повышенной концентрации может быть токсичен для клеток. Высокий уровень Гц вызывает повреждение эндотелиальных клеток артерий, что способствует тромбозу и развитию атеросклероза [7]. Когда лабораторным животным вводили $0,1 \pm 0,3$ мМ гомоцистеина, в их артериях наблюдалось утолщение интимы, пролиферация гладкомышечных клеток, повышенная десквамация эндотелия и увеличение числа пенистых клеток [8]. Неблагоприятные эффекты Гц в высоких концентрациях были подтверждены в более поздних работах и изучены более детально. Например, Гц способствует развитию сердечно-сосудистых заболеваний путем ингибирования реэндотелизации [9], индуцирует циклин А в гладкомышечных клетках [10], снижает циркулирующие липопротеины высокой плотности [11]. Гомоцистеин в результате конверсии в гомоцистеин-тиолактон способен вызывать посттрансляционные модификации белков, которые способствуют индукции аутоиммунного ответа [11] и снижению эффективности тромболитика [12].

Ключевыми патофизиологическими механизмами, лежащими в основе токсичности высоких концентраций гомоцистеина, считаются окислительный стресс [13, 14] и стресс эндоплазматического ретикула [15, 16]. Обсуждается возможность [17] и вероятных механизмов индукции окислительного стресса. Тиольная группа Гц аутоокисляется в процессе циркуляции в присутствии церулоплазмينا – главного медь-связывающего белка плазмы, с формированием гомоцистина и перекиси [18]. Однако, цистеин окисляется гораздо быстрее гомоцистеина [19], при этом концентрации цистеина в 20 – 25 раз выше, чем гомоцистеина, и при этом цистеин не проявляет токсического действия. Кроме того, характерной чертой окислительного стресса является также повышение экспрессии и синтеза белков теплового шока, особенно HSP70, что предотвращает внутриклеточную агрегацию белков и повреждение клеток. Однако, нами не было зарегистрировано увеличение экспрессии цитоплазматических HSP70 при действии 5 мМ гомоцистеина в линиях клеток U937 и HeLa.

Гц может косвенно индуцировать окислительный стресс путем понижения транскрипции, трансляции [20] и каталитической активности антиоксидантных ферментов, таких как глутатион пероксидаза (GPx)

и супероксиддисмутаза (SOD) [21]. Было показано, что проинкубированные с Гц эндотелиальные клетки аорты быка характеризуются значительным снижением активности GPx. Гц снижает экспрессию и секрецию внеклеточной SOD, наиболее распространенного фермента в гладкомышечных клетках сосудистой стенки. Окислительный стресс может быть вызван также стрессом ЭПР [22], хотя это может зависеть от условий индукции стресса ЭПР [23].

Гипергомоцистеинемия является сравнительно распространенным состоянием, поэтому ее патофизиологические эффекты, по-видимому, необходимо учитывать как неблагоприятный фон при возникновении и развитии других заболеваний, однако, данный вопрос недостаточно изучен. Высокую актуальность в настоящее время в связи со стремительным распространением COVID-19 имеют пневмонии. Показано, что высокий уровень гомоцистеина в крови пациентов на ранних стадиях течения COVID-19 инфекции является прогностически неблагоприятным фактором развития в последующие дни тяжелой пневмонии [24]. Гц может выступать в качестве триггерного механизма развития клеточного стресса (окислительного стресса, стресса ЭПР), эндотелиальной дисфункции, тромбоза в микрососудах легких и негативно влиять на течение и исход острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) различной этиологии, в том числе при SARS-CoV-2 инфекции. Изучение роли гомоцистеина в острозаврывающихся патологических состояниях, в частности, патогенезе ОРДС приобретает особую актуальность. В нашей работе мы изучили способность липополисахаридов (ЛПС) модулировать цитопатические эффекты, вызываемые повышенной концентрацией гомоцистеина в культуре клеток, фенотипически близких к эндотелиальным. Нами исследована индукция маркеров стресса эндоплазматического ретикула и прослежена динамика активации сигнального каскада IRE1-XBP1. С учетом ранее показанных благоприятных эффектов фолиевой кислоты и витамина B_{12} на уровень гомоцистеина и патологические последствия гипергомоцистеинемии [15], нами изучена их модулирующая активность на сигнальный каскад IRE1-XBP1.

Методика

Клеточная линия. В работе использовалась гибридная эндотелиоцитоподобная клеточная линия EA.hy926, любезно предоставленная Dr. C.J. Edgel (University of North Carolina, США). Линия была получена путем слияния первичной эндотелиальной клеточной линии HUVEC с клеточной линией аденокарциномы легкого A-549. Для культивирования клеток

использовали среду DMEM (Gibco, США) с добавлением 4,5 г/л глюкозы, 10 % инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки, 50 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/л L- глутамина, 1% NEAA. Рост клеток проходил в инкубаторе («Sanyo», Япония) при 37 °С в 5% CO₂/95% воздушной атмосфере. Пересев клеточных линий осуществляли 1 раз в 3-4 сут по общепринятой методике, вызывая дезинтеграцию моноклона 3-минутной экспозицией в растворе трипси-на-ЭДТА (0,05%) (ПанЭко, Россия). В экспериментах использовали клетки 3-13 пассажей. Пассирование клеток осуществляли по достижению культурами 90 % конfluence.

Оценка жизнеспособности клеток методом исключения красителя. Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего. Аликвоту суспензии объемом 20 мкл от каждого образца смешивали с равным объемом 0,4% раствора красителя трипанового синего и помещали на поверхность рабочего слайда для анализа на автоматическом счётчике клеток Countess™ («Invitrogen», США). Каждый исследуемый образец клеток был подсчитан в дуплете.

Инкубация клеток с дитиотрептолом, гомоцистеином, липополисахаридами, преинкубации с фолиевой кислотой, витамином B₁₂. Клетки инкубировали в ростовой среде с добавлением дитиотрептола в конечной концентрации 1,25 мМ, D,L-гомоцистеина – 1.25 мМ, липополисахарида (Lipopolysaccharides from Salmonella enterica serotype typhimurium, Sigma) – 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, комбинации Гц 1,25 мМ, с липополисахаридами в концентрации 10 мкг/мл в течение от 6 ч и 24 ч, в атмосфере с 5% содержанием CO₂, при 37 °С. Фолиевую кислоту (Folic acid, C19H19N7O6 – AppliChem, Germany) в конечной концентрации 20 мкМ, витамин B₁₂ (Cyanocobalamin, Sigma-Aldrich) – 7,8 нМ – добавляли в ростовую среду перед внесением ЛПС, Гц и ДТТ за 24 ч.

Анализ клеточного цикла и sub-G1 пика. Для исследования изменений клеточного цикла ядерную ДНК окрашивали фенантридиновым флуорофором пропидий йодидом (PI), используя для этой цели коммерческий набор BD Pharmingen™ PI/RNase Staining Buffer и предложенный производителем протокол. Клетки осаждали из ростовой среды центрифугированием при 250 g в течение 5–10 мин (центрифуга «Joan BR4i» с бакет-ротатором («Thermo Electron Corporation», США)), отбирали супернатант и промывали осадок охлажденным (+4 °С) фосфатно-солевым буфером (PBS), после чего снова осаждали центрифугированием при тех же параметрах. Отобрав супернатант, фиксировали клетки, добавляя по каплям, при постоянном встряхивании, 0,5 – 1,0 мл 75% холодного (–20 °С) этанола. Фиксированные клетки окрашивали на следующий день, до этого момента образцы хранили при +4 °С. Перед окрашиванием клетки отмывали в буфере PBS и осаждали центрифугированием при 200 g в течение 10 мин. Затем отбирали супернатант и, встряхнув осадок, окрашивали клетки, добавляя 0,5 мл PI/RNase Staining Buffer, после чего инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте. Анализ суспензии клеток проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованном воздушно-охлаждаемым аргоновым лазером (длина волны 488 нм). В каждом образце анализировали 25 000 событий. Эмиссию флуоресценции (PI) регистрировали в канале FL2 (563-607 нм). Сбор данных проводили с использованием программного обеспечения CellQuest, версия 6.0, приложенного производителем к прибору. Анализ файловых данных проводили в программе ModFit LT, версия 3.2 («Software House», США).

Определение цитотоксичности. Цитотоксичность препаратов и влияние на метаболическую активность определяли с помощью МТТ-теста. Для этого клетки инкубировали (24 ч и 48 ч) с препаратами в различных концентрациях в 96-луночном планшете. После инкубации в каждую лунку вносили по 10 мкл раствора МТТ (3[4,5-диметил-тиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий). Раствор МТТ (2,5 мг/мл в PBS) стерилизовали через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. После инкубации с МТТ в течение 4 ч при 37 °С в увлажненной атмосфере 5% CO₂ в лунки вносили по 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и вращали планшеты на орбитальном шейкере при комнатной температуре в течение 20 мин, до полного растворения кристаллов формазана. Развитие окраски регистрировали путем измерения поглощения при длине волны 540 нм с помощью фотометра Hidex Chameleon (Hidex Oy, Финляндия).

Выделение суммарной РНК из культивируемых клеток. Выделение клеточной РНК осуществлялось с использованием метода гуанидинтиоционат-фенол-хлороформной экстракции в соответствии с протоколом производителя TRIzol («Invitrogen», США), а также ExtractRNA (Евроген, Россия). Лизис клеток проводился непосредственно в культуральной посуде (чашки Петри, планшеты), после удаления ростовой среды. После пипетирования лизат переносили в стерильные, свободные от РНКаз, полипропиленовые 1,5 или 2 мл микроцентрифужные пробирки типа «эппендорф». К лизатам добавляли хлороформ из расчета 20% от объема TRIzol/

ExtractRNA, встряхивали и оставляли на 10-15 мин при комнатной температуре до разделения фаз. Пробирки центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин при 4 °С. Верхнюю фазу отбирали и переносили в новые пробирки с внесенным на дно гликогеном. Сверху к образцам добавляли ацетат натрия до конечной концентрации 0,3 М и пропанол-2 объемом, равным собранной фракции. Пробирки встряхивали и помещали на –20 °С на 1 ч или на всю ночь. Затем образцы скручивали на центрифуге с охлаждением при 10 000 g в течение 30 минут при 4 °С. Супернатант удаляли, а осадок промывали 1 мл холодного 75-80% этанола. Пробирки центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин при 4 °С и этанол удаляли, затем повторяли промывку еще раз. Осадок высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 15 мин и растворяли в 10-30 мкл воды свободной от нуклеаз. Образцы нагревали до 55 °С на 5-10 мин для полного растворения и затем охлаждали при 2 °С. Выделенную РНК хранили при -70°С. Концентрацию суммарной РНК в образцах определяли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 («ThermoFisher Scientific Inc.», США).

Приготовление образцов суммарной РНК, свободной от ДНК. Выделенную суммарную РНК для предотвращения контаминации геномной ДНК обрабатывали ДНКазой I. Инкубацию образца нуклеиновой кислоты проводили при 37 °С в течение 30 мин. Фермент инактивировали нагреванием при 65 °С в течение 10 мин, предварительно добавив 25 мМ ЭДТА, из расчета 1 мкл на 10 мкл реакционной смеси.

Флуориметрическое определение содержания суммарной РНК в образцах. Количество суммарной РНК в образцах после обработки ДНКазой I определяли флуориметрически с использованием набора QuantiT™ RNA Assay Kit. Интенсивность флуоресценции измеряли с использованием флуориметра Qubit («Invitrogen», США).

Синтез первой цепи комплементарной ДНК. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием гексамерных Random праймеров и обратной транскриптазы M-MuLV (без активности РНКазы H) в составе набора RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit в соответствии с протоколом производителя.

Полимеразная цепная реакция «в реальном времени» (ПЦР-РВ). Для амплификации фрагментов кДНК исследуемых генов и генов «домашнего хозяйства» использовали наборы специфических праймеров (ДНК-Синтез, Россия) и набор реактивов для проведения ПЦР-РВ qPCRMix-HS SYBR+LowROX (Евроген, Россия). ПЦР-РВ проводили в 96-и луночной пластиковой прозрачной низкопрофильной ПЦР-планшете («Bio-Rad Laboratories,

Inc.», США) на амплификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) по следующему протоколу: шаг начальной денатурации в течение 10 мин при 95 °С; далее следовало 40 циклов, состоящих из денатурации при 95 °С в течение 15 с, отжига при 55 °С в течение 30 с, элонгации при 72 °С в течение 30 с. Регистрация флуоресценции SYBR Green, связанного с двухцепочечной ДНК, проходила автоматически в конце стадии элонгации каждого цикла по каналу SYBR Green. Для подтверждения специфичности реакции, после последнего цикла снимали кривую плавления при следующих условиях: предварительное удерживание при 60 °С в течение 30 с; плавление от 55 °С до 95 °С с временной полкой равной 5 с и шагом 0,5 °С. Предварительную обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения, приложенного к прибору. Расчет уровня матричной РНК (мРНК) проводили с использованием алгоритма $2^{-\Delta\Delta Ct}$ St, в основу которого положены относительные изменения пороговых циклов (Ct) исследуемого и референсного гена в опытных и контрольных образцах. В качестве референсного гена использовался ген GAPDH. В целях контроля специфичности и качества ПЦР-РВ использовались необходимые контроли (отрицательный контроль без кДНК, контроль без обратной транскриптазы, положительные контроли валидированных мишеней).

Статистический анализ и представление данных. Обработка данных проводилась с использованием критерия Краскела–Уоллиса и программного обеспечения Statistica.

Результаты

Индукция гибели эндотелиоцитоподобных клеток EA.hy926 гомоцистеином, липополисахаридом. С помощью ДНК-цитометрии нами было исследовано апоптоз-индуцирующее действие липополисахарида, гомоцистеина при 48-часовой инкубации с клеточной линией EA.hy926. Анализ показал, что инкубация с липополисахаридом в концентрации 1 мкг/мл приводит к заметному росту процента клеток с содержанием ДНК, соответствующим положению пика subG1 на гистограмме (рис. 1), что соответствует преимущественно апоптотическим клеткам. Гомоцистеин в концентрации 500 мкМ приводил лишь к небольшому, но статистически значимому росту процента апоптотических клеток, двукратный рост концентрации Гц индуцировал почти двукратный рост апоптоза, однако, его действие было существенно меньшим, чем липополисахарида в исследованной концентрации.

Анализ потенцирующего действия гомоцистеина на цитотоксичность липополисахарида. С помощью

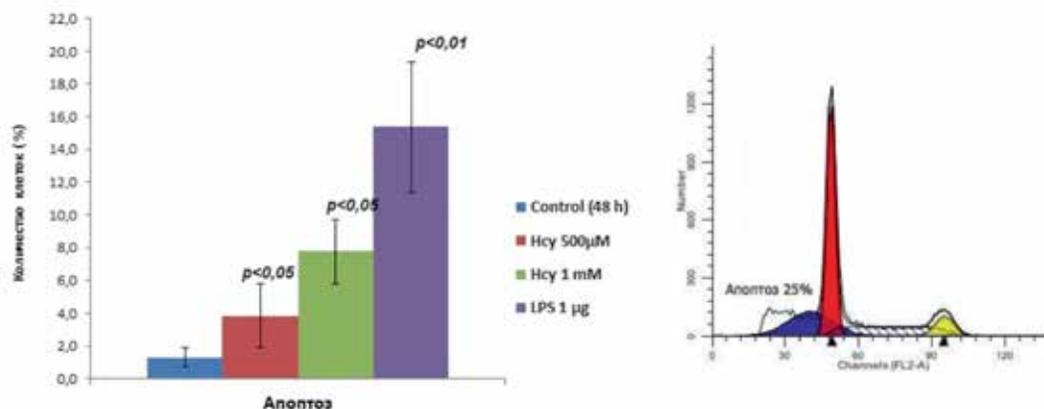


Рис. 1. Апоптоз-индуцирующее действие гомоцистеина (500 мкМ, 1 мМ) липополисахарида (1 мкг/мл) при 48-часовой инкубации с клеточной линией EA.hy926. (Проточная цитофлуориметрия). Справа пример гистограммы апоптоз-индуцирующего действия ЛПС в концентрации 1 мкг/мл через 48 часов.

Fig. 1. Apoptosis-inducing effect of homocysteine (500 μM, 1 mM) lipopolysaccharide (1 μg/ml) at 48-hour incubation with EA.hy926 cell line (Flow cytometry). On the right is an example of a histogram of the apoptosis-inducing effect of LPS at a concentration of 1 μg/ml after 48 hours.

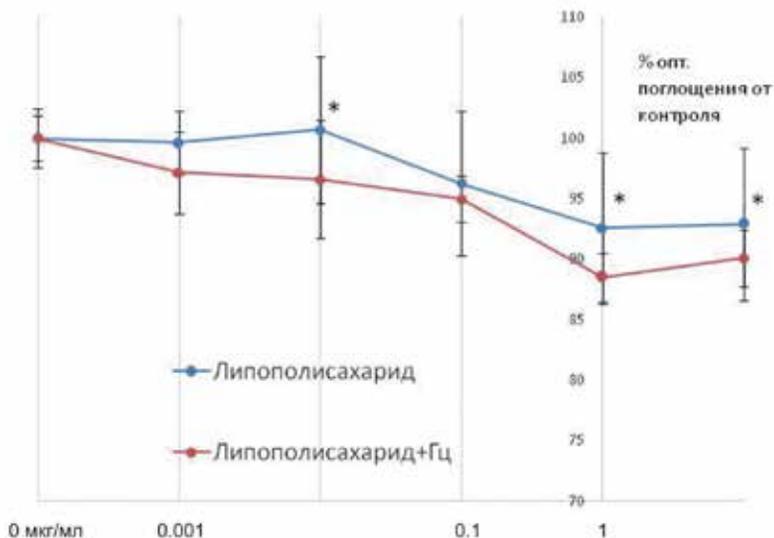


Рис. 2. Цитотоксичность гомоцистеина (1.25 мМ) совместно с липополисахаридом (1 нг-10 мкг/мл) при 24-часовой инкубации с клеточной линией EA.hy926 (МТТ-тест); * – $p < 0.09$.

Fig. 2. Cytotoxicity of homocysteine (1.25 mM) together with lipopolysaccharide (1 ng-10 μg/ml) during 24-hour incubation with the EA.hy926 cell line using the (MTT test); * – $p < 0.09$.

МТТ-теста была проведена оценка совместной токсичности гомоцистеина в концентрации 1.25 мМ и липополисахаридов в диапазоне концентраций 1 нг/мл – 10 мкг/мл при 24-часовой инкубации с клеточной линией EA.hy926.

Как видно из рис. 2, несмотря на слабовыраженную токсичность и небольшую разницу между действием липополисахарида и совместного действия липопо-

лисахарида с гомоцистеином, однонаправленные отличия наблюдаются во всех концентрационных точках, что может указывать на тенденцию гомоцистеина потенцировать цитотоксический эффект полисахарида. Интересной особенностью липополисахарида является гормезис-эффект – небольшой рост оптического поглощения при инкубации 10 нг/мл, при этом гомоцистеин устраняет этот эффект.

Анализ экспрессии маркеров стресса эндоплазматического ретикулаума при действии липополисахарида, гомоцистеина. Согласно полученным данным как гомоцистеин, так и липополисахариды вызывают лишь небольшой рост экспрессии мРНК ключевого шаперона ЭПР BiP при 6-часовой инкубации по сравнению с использованным нами положительным контролем – индуктором дитиотрейтолом (1,25мМ) (рис. 3, А). Вместе с тем, сочетанное действие Гц и ЛПС приводит к более значимому увеличению экспрессии шаперона BiP. Инкубации клеток с витаминами – фолиевой кислотой, сочетанием фолиевой кислоты и V_{12} – не оказывали существенного влияния на уровни мРНК шаперона BiP как при действии гомоцистеина и липополисахаридов, так и их комбинации на 6 ч (рис. 3, В, С) и 24 ч (рис. 3, ВВ, СС). Проведенный анализ не инкубированных с витаминами клеток по сравнению с инкубированными в присутствии ДТТ, ЛПС, Гц и Гц+ЛПС показал, что комбинация ФК и V_{12} приводила к значимому ($p < 0.05$) снижению уровня экспрессии BiP при 6-часовом действии ДТТ (рис. 3, С). Общий уровень мРНК ХВР1 (сХВР1), включающий в себя как сплайсированную форму sХВР1, так и не сплайсированную рибонуклеазой IRE1, стабильно повышался при действии ДТТ (рис. 3, D, DD). Была отмечена воспроизводимая в экспериментах тенденция к повышению уровня сХВР1 при 6- и 24-часовом (рис. 3, D, DD) действии Гц и Гц совместно с ЛПС 10 мкг/мл, при этом витамины демонстрировали тенденцию к снижению этого уровня (рис. 3, E, EE, F, FF).

Цитоплазматический сплайсинг мРНК ХВР1, опосредуемый активируемой рибонуклеазой IRE1, является характерным событием стресса ЭПР [25]. Нами была отмечена тенденция к повышению уровня сплайсированной формы ХВР1 при действии Гц, липополисахариды же потенцировали сплайсинг и приводили к статистически значимому, 2,5-кратному увеличению уровня мРНК ХВР1 на 6-часовой инкубации (рис. 3, G). Интересно, что при действии ДТТ нами не было отмечено роста уровня сплайсированной формы при 6-часовом воздействии (рис. 3, G). Сигнальный каскад IRE1-ХВР1 является наиболее медленным по кинетике активации из трех известных (PERK, ATF6, IRE1), в существенной степени формирующих ответ на стресс ЭПР. Это связано с необходимостью сплайсинга мРНК и трансляции транскрипционного фактора sХВР1, в то время как для осуществления PERK-опосредуемых эффектов требуются минуты (фосфорилирование), начало активации транскрипции фактором ATF6 занимает немногим большее относительно PERK время из-за процессинга ATF6 в комплексе Гольджи и его транспорта в ядро.

Существенное повышение уровня мРНК BiP при 6-часовом действии 1.25мМ ДТТ в клетках EA.hy926, таким образом, происходит вследствие активации ATF6-опосредуемой ветви Unfolded Protein Response (UPR) на фоне неактивной IRE1. Это подтверждается повышением уровня общей формы ХВР1 (сХВР1) (рис. 3, D) при 6-часовом действии ДТТ – ATF6 является транскрипционным индуктором ХВР1 [25]. Инкубация с витаминами не изменяла уровень сплайсированной формы ХВР1 при 6-часовой инкубации с липополисахаридами и Гц (рис. 3, H, I).

24-часовая инкубация с ДТТ, липополисахаридами и Гц приводила к падению уровня BiP ниже контрольного в случае ДТТ и поддержанию повышенной экспрессии BiP для Гц, липополисахаридов и их комбинаций (рис. 3, AA), при этом витамины опять-таки существенно не влияли на уровни BiP, что может указывать на отсутствие прямого или косвенного действия витаминов на фолдинг белка в описанных условиях (рис. 3 ВВ, СС).

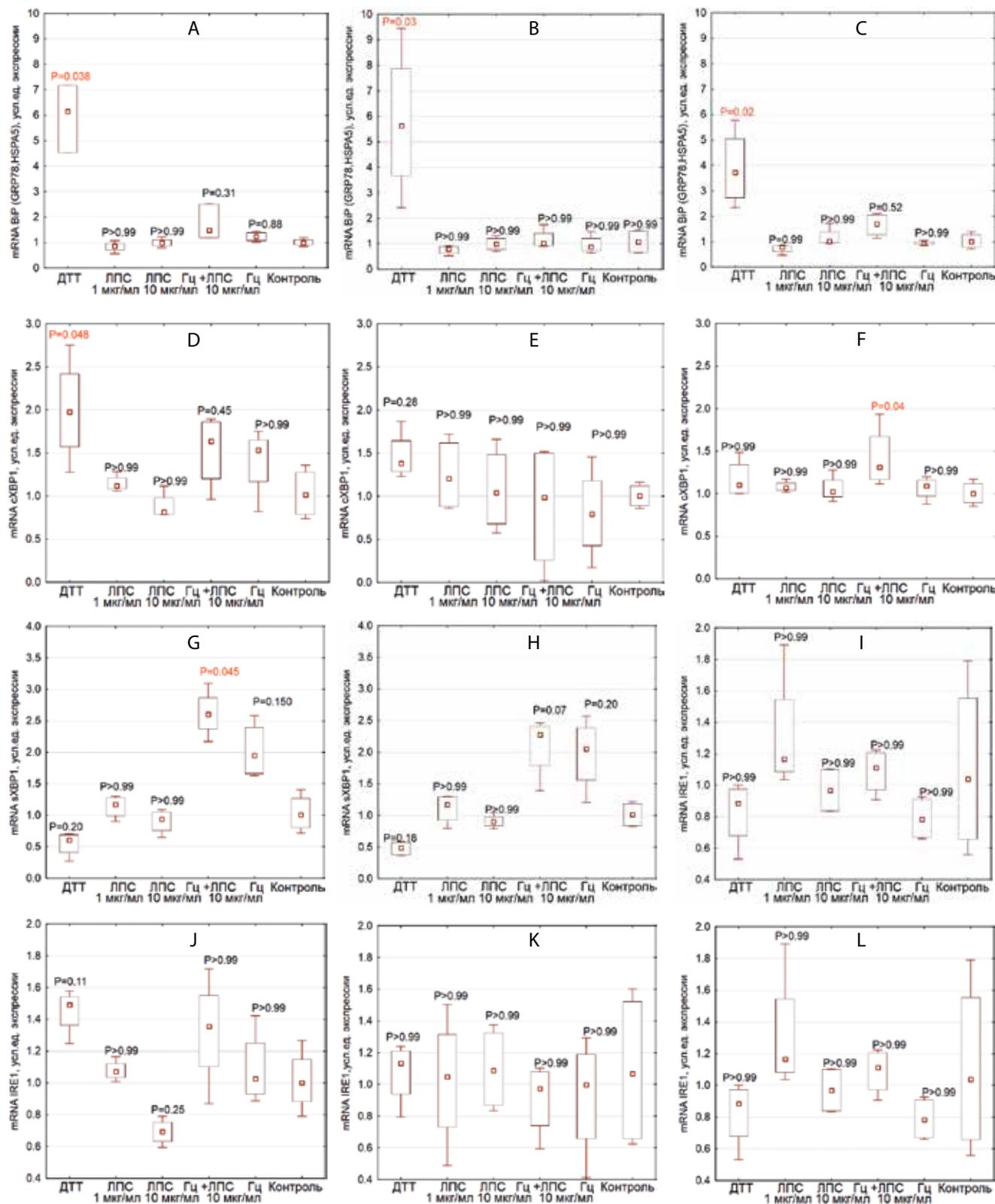
Однако нами было отмечено существенное повышение уровня сплайсированной формы ХВР1 при 24-часовом действии ДТТ и сохранение значимо повышенного ее уровня при действии комбинации Гц с липополисахаридами на фоне снижения уровня BiP для ДТТ и сохранения умеренно повышенного уровня BiP для Гц+ЛПС (рис. 3, GG). Инкубация с витаминами значимо снижала уровень мРНК sХВР1 при 24-часовом действии ДТТ, менее значимое снижение наблюдалось для сплайсинга, индуцированного комбинацией липополисахарида и Гц, а также для Гц в отдельности (рис. 3, HH, II).

Существенных изменений в уровнях экспрессии мембранного белка-сенсора стресса ЭПР ATF6 в большинстве случаев отмечено не было, за исключением небольшого увеличения экспрессии при инкубации с ФК и V_{12} при действии липополисахаридов (рис. 3, OO).

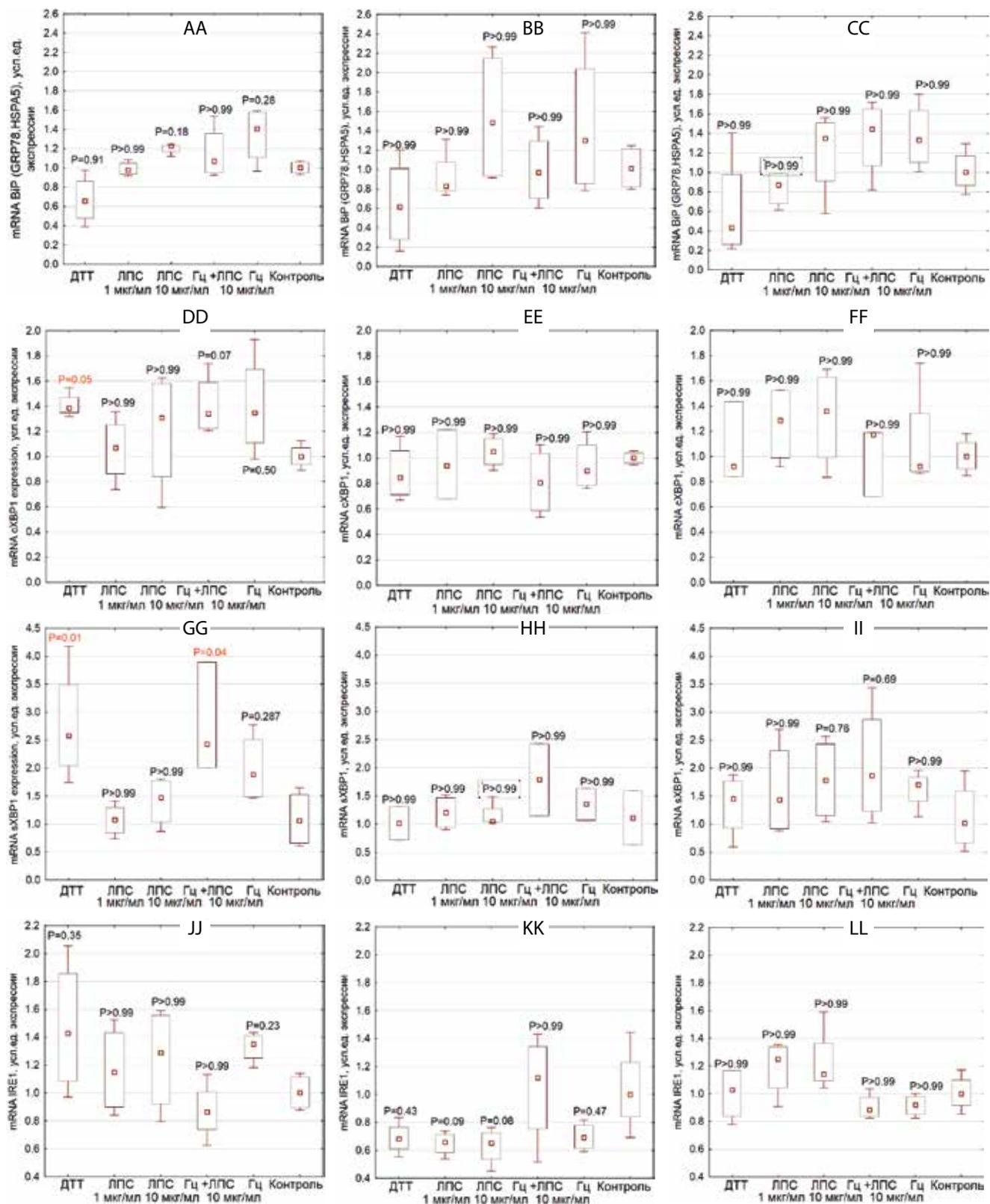
Рибонуклеаза IRE1 на 6-ч (рис. 3, J-L) и 24-ч (рис. 3, JJ-LL) также не меняла существенно существенно своей экспрессии за исключением тенденции к повышению при 6-ч и 24-часовом действии ДТТ (рис. 3, J, JJ), что коррелировало (на 24-часовом интервале) с увеличением IRE1-опосредуемого сплайсинга и уровня общего ХВР1.

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что и липополисахариды, и гомоцистеин индуцируют клеточную гибель эндотелиоцитоподобных клеток по механизму апоптоза, при этом наблюдается тенденция к потенцированию гомоцистеином цитотоксического эффекта



Продолжение рис. 3 см. на стр. 14.



Продолжение рис. 3 см. на стр. 15.

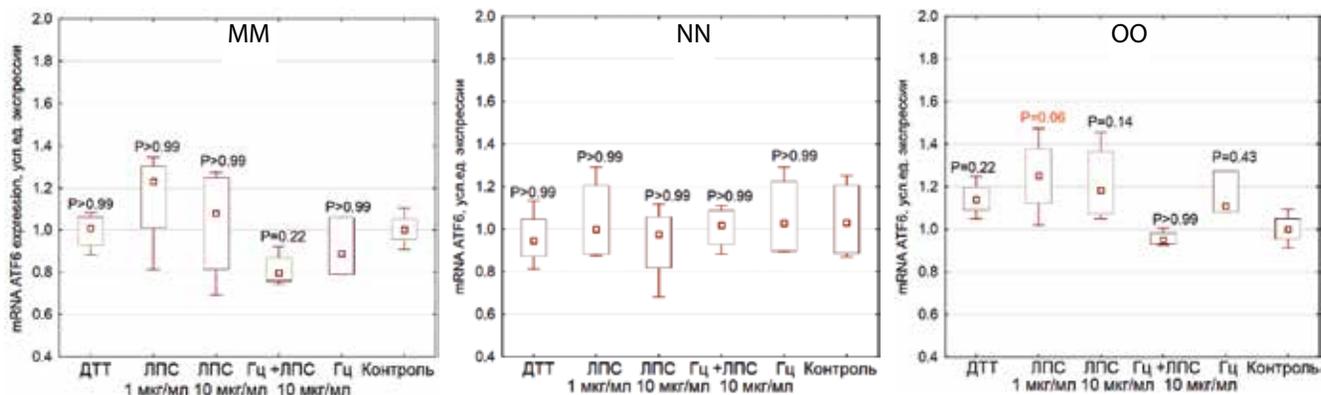


Рис. 3. А-С, АА-СС Экспрессия мРНК BiP при 6 ч (А-С) и 24 ч (АА-СС) действии дитиотрейтола (1.25мМ), липополисахарида (1 мг/мл), липополисахарида (10 мг/мл), D,L-гомоцистеина (1.25 мМ), совместном действии D,L-гомоцистеина (1.25мМ) и липополисахарида (10 мг/мл) с инкубацией с фолиевой кислотой (В,ВВ), фолиевой кислотой и В₁₂ (С,СС) и без нее (А,АА)

D-F, DD-FF Экспрессия мРНК sXBP1 при 6 ч (D-F) и 24 ч (DD-FF) действии дитиотрейтола (1.25мМ), липополисахарида (1 мг/мл), липополисахарида (10 мг/мл), D,L-гомоцистеина (1.25мМ), совместном действии D,L-гомоцистеина (1.25мМ) и липополисахарида (10 мг/мл) с инкубацией с фолиевой кислотой (Е,ЕЕ), фолиевой кислотой и В₁₂ (F,FF) и без нее (D,DD);

G-I, GG-II Экспрессия мРНК sXBP1 при 6 ч (G-I) и 24 ч (GG-II) действии дитиотрейтола (1.25мМ), липополисахарида (1 мг/мл), липополисахарида (10 мг/мл), D,L-гомоцистеина (1.25мМ), совместном действии D,L-гомоцистеина (1.25мМ) и липополисахарида (10 мг/мл) с инкубацией с фолиевой кислотой (Н,НН), фолиевой кислотой и В₁₂ (I,II) и без нее (G,GG);

J-L, JJ-LL Экспрессия мРНК IRE1 при 6 ч (J-L) и 24 ч (JJ-LL) действии дитиотрейтола (1.25мМ), липополисахарида (1 мг/мл), липополисахарида (10 мг/мл), D,L-гомоцистеина (1.25мМ), совместном действии D,L-гомоцистеина (1.25мМ) и липополисахарида (10 мг/мл) с инкубацией с фолиевой кислотой (К,КК), фолиевой кислотой и В₁₂ (L,LL) и без нее (J,JJ);

MM-OO Экспрессия мРНК ATF6 при 24ч (MM-OO) действии дитиотрейтола (1.25мМ), липополисахарида (1 мг/мл), липополисахарида (10 мг/мл), D,L-гомоцистеина (1.25мМ), совместном действии D,L-гомоцистеина (1.25мМ) и липополисахарида (10 мг/мл) с инкубацией с фолиевой кислотой (NN), фолиевой кислотой и В₁₂ (OO) и без нее (MM);

Fig.3. Expression of BiP, sXBP1, sXBP1, IRE1, ATF6 mRNA in the presence of dithiothreitol (1.25mM), lipopolysaccharide (1mg/ml), lipopolysaccharide (10mg/ml), D,L-homocysteine (1.25mM), combined action of D,L-homocysteine (1.25mM) for 6 h (A-L) and for 24 h (AA-OO) and lipopolysaccharide (10 mg/ml) with and without incubation with folic acid, folic acid and B₁₂.

липополисахаридов. Нами рассматривался некомпенсированный стресс ЭПР как возможная причина гибели клеток. Согласно полученным данным, гомоцистеин в концентрациях, характерных для гипергомоцистеинемии и для гомоцистинурии, является слабым индуктором шаперона BiP – мы наблюдали лишь незначительное увеличение экспрессии при 6 ч- и 24-часовом действии, при этом липополисахариды при совместном с гомоцистеином действии приносили тенденцию к повышению уровня BiP .

Нами было впервые обнаружено, что совместное действие липополисахаридов и гомоцистеина приводит к значимому росту сплайсинга XBP1 и, соответственно, активности сигнального пути IRE1-XBP1, причем временная динамика активации существенно отличалась от использованного нами классического индуктора стресса ЭПР – ДТТ. В нашей работе мы использовали сравнительно невысокую концентрацию ДТТ для приближения нашей модели к действию гомоцистеина. В такой концентрации ДТТ вызыва-

ет, по-видимому, отсроченную активацию пути IRE1, регистрируемую по уровню сплайсированной формы XBP1. Значительное повышение уровня шаперона BiP на 6 часовом интервале происходит не за счет сенсора IRE1, а за счет активации других сигнальных ветвей UPR, что совместно с изначально высокой фолдинговой емкостью данных клеток (эндотелиоциты – секреторные клетки) не создает условий для ранней активации IRE1. Совместное действие Гц и ЛПС приводит к пролонгированной активации IRE1 на фоне сравнительно низкого уровня шаперона. Сами липополисахариды в исследованных концентрациях не являются эффективными индукторами ни шаперона, ни IRE1-опосредованной сигнальной ветви, однако, они способны усиливать активность IRE1-опосредуемого сигналинга. С учетом поэтапной активации IRE1 (димеры – олигомеры) [25–27], можно предположить, что липополисахариды могут повышать рибонуклеазную активность уже активированной IRE1. Известно, что IRE1 имеет гомологию с активированной путями врожден-

ного иммунитета РНКазой L (RNase L). С учетом повышения активности клеточных рибонуклеаз при активации TLR-рецепторов для защиты от экзогенной РНК, повышение активности IRE1 при действии инфекционных агентов, в том числе включение механизма деградации клеточной РНК RIDD (regulated IRE1-dependent decay), может иметь биологический смысл.

Известно, что пролонгированная активация IRE1 обладает проапоптотическим действием [28, 29], что может быть причиной повышения цитотоксичности при сочетанном действии Гц и ЛПС. Наше исследование также показало, что инкубация с ФК и V_{12} способствовала снижению активности IRE1-опосредуемого сигнального пути при сочетанном действии гомоцистеина и липополисахаридов.

В работе [30] уровни ViP и белка СНОР были значительно повышены в тканях легких мышей, получавших липополисахариды путем интратрахеальной инстилляцией. Кроме того, в культуре клеток нормального бронхиального эпителия NHBE, обработанных 100 мкг/мл ЛПС показан в среднем двукратный рост уровня белка ViP. Также был повышен ряд других белковых маркеров стресса ЭПР, включая ATF6, XBP1, в тканях легких мышей, получавших ЛПС. Кроме того, уровень белков ViP и СНОР в мононуклеарных клетках периферической крови, полученных от пациентов с тяжелым воспалением легких, был значительно выше, чем у здоровых лиц [30].

Считается, что Гц оказывает провоспалительное действие, возможно, за счет окислительного стресса и последующей активации фактора NF- κ B [14]. Стимуляция провоспалительных путей в эндотелиальных клетках приводит к экспрессии молекул адгезии, рекрутированию лейкоцитов к стенке сосуда, их последующей инфильтрации, опосредованной повышенной секрецией хемокинов, и, кроме того, к дифференцировке моноцитов в макрофаги [14]. Также было показано, что индукция обогащенной метионином и обедненной фолиевой кислотой и витаминами B_6 и B_{12} диетой Гц у мышей, нокаутных по апополипротеину E, увеличивала площадь и тяжесть атеросклеротических поражений, а также повышала экспрессию рецептора конечных продуктов гликирования (RAGE), молекул клеточной адгезии VCAM-1, тканевого фактора и матриксной металлопротеиназы 9 (MMP-9) в сосудах. Эти вызванные Гц эффекты были значительно подавлены, параллельно со снижением уровня Гц в плазме, при добавлении в пищу фолиевой кислоты и витаминов B_6 / B_{12} .

Наши данные согласуются в большей степени с провоспалительным действием гомоцистеина — активация IRE1 способна приводить к активации NF- κ B [31, 32], в нашем же случае имеет место пролонгированная ее

активация. В работе [31] указывается, что именно киназная, а не рибонуклеазная активность IRE1 является ключевой для активации NF- κ B. Однако, в недавней работе был идентифицирован IRE1-зависимый сигнальный путь, который непосредственно контролирует экспрессию/высвобождение провоспалительных хемокинов (CXCL2, IL-6, IL-8) и зависит от неклассического сплайсинга мРНК XBP1 и sXBP1-зависимой экспрессии убиквитинлигазы E2 UBE2D3, которая способствует деградации ингибитора NF- κ B I κ B, что приводит к провоспалительному фенотипу [33].

Хотя в работе [30] была показана прямая активация экспрессии шаперона ViP липополисахаридами, в нашей работе мы наблюдали незначительную индукцию экспрессии шаперона с использованием 10 мкг/мл липополисахарида. Однако, опосредуемый IRE1 сплайсинг возрастал в большей степени, что предположительно может указывать на двунаправленный характер связи сигнальных путей врожденного иммунитета, активируемых липополисахаридами, и ветви IRE1-XBP1.

Нами показано, что фолиевая кислота и витамин B_{12} — ключевые участники процесса реметилирования Гц — способны снижать активность пути IRE1-XBP1 при действии не только Гц и Гц с ЛПС, но и в значительной степени при действии ДТТ. Наши результаты представляют собой интересную параллель с недавней работой группы авторов, в которой использовались *C. elegans* для оценки физиологических эффектов ДТТ [34]. Авторы показали, что ДТТ вызывает дефекты развития у *C. elegans*, но эти дефекты зависят от диеты. Витамин B_{12} в составе диеты, действуя как кофактор для метионинсинтазы, облегчал дефекты развития, вызванные ДТТ. Для установления взаимосвязи между ДТТ и витамином B_{12} , в прямом генетическом скрининге были выделены мутанты *C. elegans*, устойчивые к токсическим эффектам ДТТ. Оказалось, что потеря функции S-аденозилметионин (SAM)-зависимой метилтрансферазы (R08E5.3) придает устойчивость к ДТТ. ДТТ приводил к усилению экспрессии R08E5.3 и модулировал метионин-гомоцистеиновый цикл, истощая пул SAM. Модуляция метионин-гомоцистеинового цикла с помощью ДТТ также приводила к стрессу ЭПР и митохондрий. По мнению авторов, токсичность ДТТ у *C. elegans* связана с модуляцией метионин-гомоцистеинового цикла, однако, для устранения токсичности ДТТ необходим функциональный каскад IRE1-XBP1 [34]. Известно, что соотношение SAM/SAH, или индекс метилирования, — важный показатель интенсивности процессов метилирования в клетке. Интересно, что снижение уровня SAM увеличивает продолжительность жизни и улучшает метаболизм разных орга-

низмов [35]. Для уточнения механизмов обнаруженного нами модулирования сигнального пути IRE1/XBP1 фолиевой кислотой и витамином В₁₂ требуется проведение дополнительных исследований.

Заключение

Таким образом, нами было впервые обнаружено, что совместное действие липополисахаридов и гомоцистеина приводит к значимому росту активности сигнального пути IRE1-XBP1 ответа на стресс эндоплазматического ретикулума. Липополисахариды в исследованных концентрациях являются слабыми индукторами стресса ЭПР, но потенцируют активность сигнального пути IRE1-XBP1, что мы связываем с взаимодействием сигнальных путей врожденного иммунитета и ответа на стресс. С потенцированием может быть связано повышение цитотоксичности при сочетанном действии Гц и ЛПС в связи с проапоптотическим действием IRE1. Нами впервые показано, что фолиевая кислота и витамин В₁₂ снижают активность пути IRE1-XBP1 при действии гомоцистеина и ЛПС, а также ДТТ. Полученные результаты указывают на то, что повышенный уровень гомоцистеина в плазме крови должен приниматься во внимание как фактор, способный усложнить течение инфекционных заболеваний, в частности, пневмоний, что актуально в современных условиях пандемии COVID-19.

Литература

(п.п. 1-22; 24; 26; 28–35 см. References)

23. Меситов М.В., Московцев А.А., Кубатиев А.А. Молекулярная логика сигнальных путей при стрессе эндоплазматического ретикулума: система upr (unfolded protein response). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 57(4): 97-108.
25. Меситов М.В., Игнашкова Т.И., Мещерский М.Е., Акопов А.С., Соколовская А.А., Московцев А.А. и др. Индукция стресса эндоплазматического ретикулума в условиях окислительно-восстановительного дисбаланса в клетках т-лимфоцитарной лейкемии человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012; 56(3): 87-93.
27. Московцев А.А., Клементьева Т.С., Зайченко Д.М., Колесов Д.В., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Проадаптивная и проапоптотическая активности стресс-активируемой рибонуклеазы ire1: разделение на временной шкале клеточного стресса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2018; 62(4): 21-7.

References

1. Brosnan J., Brosnan M. 5th Amino Acid Assessment Workshop. *J Nutr*. 2006; 136: 16365–405. Available: <https://www.pkdiet.com/pdf/aaa/aminoacidwrksp.pdf>
2. Perry I.J., Morris R.W., Ebrahim S.B., Shaper A.G., Refsum H., Ueland P.M. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet (Lond, England)*. 1995; 346: 1395–8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)92407-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)92407-8)
3. Selhub J., Jacques P.F., Rush D., Rosenberg I.H., Wilson P.W.F. Vitamin Status and Intake as Primary Determinants of Homocysteinemia in an Elderly Population. *JAMA*. 1993; 270: 2693–8. <https://doi.org/10.1001/JAMA.1993.03510220049033>
4. Lipton S.A., Kim W.K., Choi Y.B., Kumar S., D'Emilia D.M., Rayudu P.V., et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94: 5923–8. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.11.5923/ASSET/CBD81ED4-E990-4EAE-9528-BAAB56CE7A2A/ASSETS/GRAPHIC/PQ1173230004.JPEG>
5. Clarke R., Daly L., Robinson K., Naughten E., Cahalane S., Fowler B., et al. Hyperhomocysteinemia: An Independent Risk Factor for Vascular Disease. *N Engl J Med*. 1991;324: 1149–55. <https://doi.org/10.1056/NEJM199104253241701>
6. Finkelstein J.D. The metabolism of homocysteine: Pathways and regulation. *Eur J Pediatr Suppl*. 1998; 157: 40–4. <https://doi.org/10.1007/pl00014300>
7. Harker L., Slichter S.J., Scott C.R., Ross R. Homocystinemia. Vascular injury and arterial thrombosis. *N Engl J Med*. 1974; 291: 537–43. [doi:10.1056/NEJM197409122911101](https://doi.org/10.1056/NEJM197409122911101)
8. Harker L.A., Ross R., Slichter and Scott S.J.C.R. Homocystine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest*. 1976; 58: 731–41. <https://doi.org/10.1172/JCI108520>
9. Tan H., Jiang X., Yang F., Li Z., Liao D., Trial J., et al. Hyperhomocysteinemia inhibits post-injury reendothelialization in mice. *Cardiovasc Res*. 2006; 69: 253–62. <https://doi.org/10.1016/J.CARDIORES.2005.08.016>
10. Tsai JC, Wang H, Perrella MA, Yoshizumi M, Sibinga NES, Tan LC, et al. Induction of cyclin A gene expression by homocysteine in vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1996; 97: 146. <https://doi.org/10.1172/JCI118383>
11. Liao D., Tan H., Hui R., Li Z., Jiang X., Gaubatz J., et al. Hyperhomocysteinemia decreases circulating high-density lipoprotein by inhibiting apolipoprotein A-I Protein synthesis and enhancing HDL cholesterol clearance. *Circ Res*. 2006; 99: 598–606. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000242559.42077.22>
12. Undas A., Brozek J., Jankowski M., Siudak Z., Szczeklik A., Jakubowski H. Plasma homocysteine affects fibrin clot permeability and resistance to lysis in human subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 1397–404. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000219688.43572.75>
13. Tyagi N., Sedoris K.C., Steed M., Ovechkin A.V., Moshal K.S., Tyagi S.C. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00548.2005>
14. Papatheodorou L., Weiss N. Vascular oxidant stress and inflammation in hyperhomocysteinemia. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9: 1941–58. <https://doi.org/10.1089/ARS.2007.1750>
15. Tripathi M., Zhang C.W., Singh B.K., Sinha R.A., Moe K.T., Desilva D.A., et al. Hyperhomocysteinemia causes ER stress and impaired autophagy that is reversed by Vitamin B supplementation. *Cell Death Dis* 2016 712. 2016;7: e2513–e2513. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.374>
16. Werstuck G.H., Lentz S.R., Dayal S., Hossain G.S., Sood S.K., Shi Y.Y., et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride bio-

- synthetic pathways. *J Clin Invest.* 2001; 107: 1263. <https://doi.org/10.1172/JCI11596>
17. Jacobsen D.W. Hyperhomocysteinemia and Oxidative Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1182–4. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.5.1182>
 18. Starkebaum G., Harlan J.M. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J Clin Invest.* 1986; 77: 1370–6. <https://doi.org/10.1172/JCI112442>
 19. Sengupta S., Wehbe C., Majors A.K., Ketterer M.E., DiBello P.M., Jacobsen D.W. Relative roles of albumin and ceruloplasmin in the formation of homocystine, homocysteine-cysteine-mixed disulfide, and cystine in circulation. *J Biol Chem.* 2001; 276: 46896–904. <https://doi.org/10.1074/JBC.M108451200>
 20. Handy D.E., Zhang Y., Loscalzo J. Homocysteine Down-regulates Cellular Glutathione Peroxidase (GPx1) by Decreasing Translation *. *J Biol Chem.* 2005; 280: 15518–25. <https://doi.org/10.1074/JBC.M501452200>
 21. Upchurch G.R., Welche G.N., Fabian A.J., Freedman J.E., Johnson J.L., Keaney J.F., et al. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem.* 1997; 272: 17012–7. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.27.17012>
 22. Malhotra J.D., Kaufman R.J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9: 2277–93. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1782>
 23. Mesitov M.V., Ignashkova T.I., Meshcherskiĭ M.E., Akopov A.S., Sokolovskaya A.A., Moskovtsev A.A., et al. Induction of the endoplasmic reticulum stress in conditions of acid-base imbalance in human cells of T-lymphoblastic leukemia. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2012; 87–93. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23072118/>
 24. Yang Z., Shi J., He Z., Lu Y., Xu Q., Ye C., et al. Predictors for imaging progression on chest CT from coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients. *Aging (Albany NY).* 2020; 12: 6037–48. <https://doi.org/10.18632/AGING.102999>
 25. Mesitov M.V., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A. Molecular logic of the endoplasmic reticulum stress signal pathways: the system of unfolded protein response. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2013; 97–108. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24640782/>
 26. Schröder M., Kaufman R.J. the Mammalian Unfolded Protein Response. *Annu Rev Biochem.* 2005; 74: 739–89. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134>
 27. Korennykh A.V., Korostelev A.A., Egea P.F., Finer-Moore J., Stroud R.M., Zhang C., et al. Structural and functional basis for RNA cleavage by IRE1. *BMC Biol.* 2011; 9: 1–15. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-47/FIGURES/5>
 28. Tabas I., Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol.* 2011; 13: 184. <https://doi.org/10.1038/NCB0311-184>
 29. Moskovtsev A.A., Klementyeva T.S., Zaychenko D.M., Kolesov D.V., Sokolovskaya A.A., Kubatiev A.A. Time-restricted IRE1 activity: impact on cell survival. *Patol Fiziol i Eksp Ter.* 2018; 62: 21–7. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2018.04.21-27>
 30. Kim H.J., Jeong J.S., Kim S.R., Park S.Y., Chae H.J., Lee Y.C. Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates lipopolysaccharide-induced lung inflammation through modulation of NF- κ B/HIF-1 α signaling pathway. *Sci Reports.* 2013 31. 2013; 3: 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep01142>
 31. Tam A.B., Mercado E.L., Hoffmann A., Niwa M.E.R. Stress Activates NF- κ B by Integrating Functions of Basal IKK Activity, IRE1 and PERK. *PLoS One.* 2012; 7: 45078. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0045078>
 32. Hu P., Han Z., Couvillon A.D., Kaufman R.J., Exton J.H. Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated NF- κ B activation and down-regulation of TRAF2 expression. *Mol Cell Biol.* 2006; 26: 3071–84. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.8.3071-3084.2006>
 33. Obacz J., Archambeau J., Sicari D., Reste P.J. Le, Pineau R., Martin S., et al. Novel IRE1-dependent proinflammatory signaling controls tumor infiltration by myeloid cells. *bioRxiv.* 2020; 533018. <https://doi.org/10.1101/533018>
 34. Singh G.G., J. Dithiothreitol causes toxicity in C elegans by modulating the methionine–homocysteine cycle. *Elife.* 2022; 11: 76021. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.76021>
 35. Parkhitko A.A., Jouandin P., Mohr S.E., Perrimon N. Methionine metabolism and methyltransferases in the regulation of aging and lifespan extension across species. *Aging Cell.* 2019; 18. doi: 10.1111/ACEL.13034

Сведения об авторах:

Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ НИИОПП, доцент каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, e-mail: bioinf@mail.ru;

Иванов Александр Владимирович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ НИИОПП;

Зайченко Данила Михайлович, мл. науч. сотр. лаб. регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ НИИОПП, e-mail: danilamihailovich@mail.ru;

Микрюкова Анна Алексеевна, мл. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, e-mail: mikrianya96@gmail.com;

Суханова Ирина Федоровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ НИИОПП;

Соколовская Алиса Анатольевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. регуляции агрегатного состояния крови ФГБНУ НИИОПП, e-mail: alice.sokolovskaya@gmail.com;

Кожевникова Любовь Михайловна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ НИИОПП;

Кубатиев Аслан Амирханович, доктор мед. наук, акад. РАН, руководитель отдела молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП, зав. каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 618.173:616.36-003.826-06:616-056.52]-092:612.6.05:577.21

Булатова И.А.¹, Соболев А.А.², Гуляева И.Л.¹

Анализ ассоциации полиморфизма генов *VWF* (T2385C) и *VEGFA* (G634C) с развитием неалкогольного стеатоза печени у женщин с ожирением в период менопаузы

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

²«Клиника женского здоровья», 614000, Пермь, Россия, ул. Краснофлотская, д. 31

Введение. Неалкогольный стеатоз печени (НАСП) является наиболее распространенным клинико-морфологическим вариантом неалкогольной жировой болезни печени. Нарушения внутриспеченочной гемодинамики при патологии печени нередко связывают с повреждением эндотелиальной выстилки синусоидов и развитием эндотелиальной дисфункции (ЭД). В последние годы повышается интерес исследователей к оценке роли генетических факторов развития и прогрессирования заболеваний. **Цель работы** – исследование комбинации аллельных вариантов генов *VWF* в регионе -2385T/C, *VEGFA* в регионе -634G/C и определение концентрации васкулоэндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor - VEGF) и антигена фактора Виллебранда (vWFAg) в крови у женщин с неалкогольным стеатом печени и ожирением в периоде менопаузы, проживающих в Перми.

Методика. Обследовано 60 пациенток с НАСП и ожирением в менопаузе, средний возраст $50,9 \pm 1,1$ лет. Контрольная группа состояла из 60 здоровых женщин в менопаузе без ожирения. Методом иммуноферментного анализа на анализаторе «Stat-Fax 2100» (США) в крови исследовали концентрацию VEGF с применением набора «VEGF-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) и vWFAg с помощью набора «TECHNOZYM vWF:Ag ELISA» (США). Однонуклеотидные полиморфные варианты генов изучали с использованием аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени на детектирующем амплификаторе «CFX-96» («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) с применением праймеров «SNP-Скрин» (ЗАО «Синтол», Москва).

Результаты. Развитие неалкогольного стеатоза печени у женщин с ожирением в менопаузе сопровождается развитием ЭД и активацией процессов неоангиогенеза с повышением концентрации VEGF ($p=0,001$) и vWFAg ($p=0,041$). При анализе аллельных вариантов гена *VEGFA* (G-634C) гомозигота CC и рецессивный аллель C значимо чаще обнаруживались в когорте пациенток с НАСП в 21,67% ($p=0,04$) и 45% случаев ($p=0,04$), а у здоровых женщин лишь в 8,33% и 33,33% соответственно. У женщин с ожирением, имеющих рецессивные гомозиготы CC по гену *VWF* (T-2385C) в 3,04 раза увеличивается вероятность развития НАСП по рецессивной модели наследования. Была выявлена ассоциация полиморфизма гена *VWF* (T-2385C) с выработкой vWFAg ($p=0,041$).

Заключение. Носительство аллеля C генов *VWF* в регионе -2385T/C и *VEGFA* в регионе -634G/C в виде генотипа CC может являться фактором риска развития НАСП у женщин с ожирением в период менопаузы.

Ключевые слова: неалкогольный стеатоз печени; ожирение; дисфункция эндотелия; менопауза; полиморфизм генов

Для цитирования: Булатова И.А., Соболев А.А., Гуляева И.Л. Анализ ассоциации полиморфизма генов *VWF* (T2385C) и *VEGFA* (G634C) с развитием неалкогольного стеатоза печени у женщин с ожирением в период менопаузы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(3): 19-24.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.19-24

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Булатова И.А.; сбор и обработка материала – Соболев А.А.; статистическая обработка материала и подготовка иллюстративного материала – Соболев А.А., Булатова И.А.; написание текста, Булатова И.А., Гуляева И.Л. редактирование – Булатова И.А. . Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

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

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.06.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Bulatova I.A.¹, Sobol A.A.², Gulyaeva I.L.¹**The association of VWF (T2385C) and VEGFA (G634C) gene polymorphism with the development of non-alcoholic hepatic steatosis in obese women during menopause**¹Wagner Perm State Medical University,
Petropavlovskaya St. 26, Perm 614990, Russian Federation;²Women's Health Clinic,
Krasnoflotskaya St. 31, Perm 614000, Russian Federation

Non-alcoholic hepatic steatosis (NAHS) is the most common clinical and morphological variant of non-alcoholic fatty liver disease. The pathogenesis of NAHS is multifactorial. Alterations of intrahepatic hemodynamics associated with liver pathology often result in damage to the endothelial lining of sinusoids and endothelial dysfunction. In recent years, the interest of researchers in assessing the role of genetic factors in the development and progression of diseases has increased. **Aim:** To determine the blood concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) and Willebrand factor antigen (vWFAg) and to investigate combinations of allelic variants of the *VWF* genes in the region -2385T/C and *VEGFA* in the region -634G/C in menopausal women with NAHS and obesity. **Methods.** 60 patients, living in Perm, with NAHS and menopausal obesity aged 50.9 ± 1.1 yrs were examined. The control group consisted of 60 healthy, non-obese, menopausal women. By employing enzyme immunoassay (Stat-Fax 2100, USA), the blood concentrations of VEGF were measured using the VEGF-ELISA-BEST kit (ZAO Vector-Best, Novosibirsk) and of vWFAg using the TECHNOZYM vWF:Ag ELISA kit (USA). Single nucleotide polymorphic variants of genes were studied using allele-specific, real time polymerase chain reaction on a CFX-96 detecting amplifier (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) and using the SNP-Screen primers (ZAO Syntol, Moscow).

Results. The development of NAHS in obese menopausal women was accompanied by endothelial dysfunction and activation of neoangiogenesis, as indicated by increases in VEGF ($p=0.001$) and vWFAg ($p=0.041$). The CC homozygote and the recessive C allele allelic variants of the *VEGFA* gene (G-634C) were more often detected in the NAHS patients, 21.7% ($p=0.04$) and 45% ($p=0.04$), respectively. These values in healthy women were only 8.3% and 33.3%, respectively. Obese women who had recessive homozygotes of CC in the *VWF* gene (T-2385C) had a 3.04-fold higher probability of developing NAHS, according to the recessive inheritance model. Polymorphism of the *VWF* gene (T-2385C) was associated with the production of vWFAg ($p=0.041$).

Conclusion. Carrying the C allele of *VWF* genes in the region -2385T/S and *VEGFA* in the region -634G/C in the form of the CC genotype may be a risk factor for the development of NAHS in obese women during menopause.

Keywords: chronic nonalcoholic hepatic steatosis; cytokines; antioxidant enzymes; endothelial dysfunction; gene polymorphism

For citation: Bulatova I.A., Sobol A.A., Gulyaeva I.L. Analysis of the association of VW (T2385C) and VEGFA (G634C) gene polymorphism with the development of non-alcoholic liver steatosis in obese women during menopause. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological physiology and experimental therapy. Russian Journal)*. 2022; 66(3): 19-24. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.19-24

Author's contribution: research concept and design – Bulatova I.A.; collection and processing of the material – Sobol A.A.; statistical processing of the material and preparation of illustrative material – Sobol A.A., Bulatova I.A.; writing text – Bulatova I.A., Gulyaeva I.L.; editing – Bulatova I.A.

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

Financing. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:Bulatova I.A., <https://orcid.org/0000-0002-7802-4796>Gulyaeva I.L., <https://orcid.org/0000-0001-7521-1732>

Received 09.06.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Неалкогольный стеатоз печени (НАСП) является наиболее распространенным клинико-морфологическим вариантом и начальной стадией неалкогольной жировой болезни печени. При этом частота встречаемости стеатоза увеличивается с возрастом (особенно

у женщин), что объясняется снижением скорости кровотока в печени и нарушением клеточного цикла [1].

Патогенез НАСП многофакторный. Нарушения внутрипеченочной гемодинамики при патологии печени нередко связывают с повреждением эндотелиальной

выстилки синусоидов и развитием эндотелиальной дисфункции (ЭД). На экспериментальных моделях стеатоза печени была доказана взаимосвязь ЭД с накоплением липидов и нарушением толерантности к глюкозе [2, 3].

В последние годы повышается интерес исследователей к оценке роли генетических факторов развития и прогрессирования заболеваний. По мнению ряда ученых стеатоз печени является наследуемым признаком, эпигенетические особенности могут определять взаимодействие между генами и окружающей средой, оказывать патогенетическое влияние на развитие стеатоза и играть важную роль в фетальном программировании жировой ткани печени [4–7]. Есть данные, что полиморфизм генов ЭД определяет характер течения заболеваний печени [8–11].

Следует отметить, что определение региональных особенностей генетических мутаций при оценке риска развития заболеваний вносит вклад в популяцию в целом.

Цель исследования — определение концентрации васкулоэндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor – VEGF) и антигена фактора Виллебранда (vWFAg) в крови и исследование комбинации аллельных вариантов генов *VWF* в регионе -2385T/C и *VEGFA* в регионе -634G/C у женщин с НАСП и ожирением в периоде менопаузы, проживающих в Перми.

Методика

В исследовании приняли участие 60 пациенток ($50,9 \pm 1,1$ лет) с НАСП и ожирением в менопаузе (группа НАСП-О-М). В группу НАСП-О-М включались пациентки с избыточной массой тела или ожирением (индекс массы тела более 25 или окружность талии более 80 см), признаками стеатоза печени по данным ультразвукового исследования, без синдрома цитолиза. Контрольная группа состояла из 60 здоровых женщин в менопаузе без ожирения (Контроль-БО-М). Все участники исследования проживали в Перми. По национальной принадлежности обе группы были смешанными (европеоидная и монголоидная раса), с преобладанием лиц европеоидной расы, которая в группе пациенток с НАСП составляла примерно 80%, в группе контроля 70%.

Методом иммуноферментного анализа на анализаторе «Stat-Fax 2100» (США) в крови исследовали концентрацию VEGF с применением набора «VEGF-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) и vWFAg с помощью набора «TECHNOZYM vWF:Ag ELISA» (США).

Однонуклеотидные полиморфные варианты генов *VWF* (T2385C) позиции rs1063857 и *VEGFA* (G634C) в позиции rs2010963 изучали с использованием ал-

лель-специфической полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на детектирующем амплификаторе «CFX-96» («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) с применением праймеров SNP-Скрин» (ЗАО «Синтол», Москва). Для определения генотипов определенного гена у всех обследуемых лиц проводилось выделение ДНК из цельной венозной крови, предварительно стабилизированной динатриевой 3-солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА).

Амплификацию проводили на детектирующем термоциклере «CFX96» (BioRad, США). Результаты интерпретировались с использованием метода аллельной дискриминации в зависимости от характера кривых амплификации, отображаемых в программном обеспечении для амплификатора «CFX96».

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программы «Stat2015». Для анализа количественных признаков применялись медиана (Me) и квартили (Q1, Q3). Для сравнения двух групп между собой использовали критерий Манна-Уитни (U). Различия между выборками считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для описания соотношения частот генотипов и аллелей исследуемых полиморфизмов генов использовали метод χ^2 . Различия в двух популяциях рассчитывались по отношению шансов (OR) с использованием подхода «случай-контроль» для различных моделей наследования и считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки зависимости между количественным и качественным признаками количественные признаки преобразовывались в качественные. Определение зависимости проводилось по таблице сопряженности (кросстабуляции). Степень зависимости оценивалась с помощью коэффициента сопряженности (информативности) Пирсона (Ki). Величина Ki (степень зависимости): при $0,00 \leq Ki < 0,30$ – зависимость нет; $0,30 \leq Ki < 0,70$ – зависимость умеренная; $0,70 \leq Ki < 1,00$ – выраженная. Зависимость считалась статистически значимой при $p < 0,05$.

Результаты

У пациенток с НАСП и ожирением в менопаузе было установлено повышение показателей повреждения эндотелия VEGF и vWFAg в сравнении с группой практически здоровых женщин без ожирения в менопаузе ($p=0,001$ и $p=0,041$ соответственно) (табл. 1).

Полученные данные могут свидетельствовать об активации процессов неоангиогенеза и сосудистой перестройке в печени при стеатозе на фоне повреждения и дисфункции эндотелия.

При анализе аллельных вариантов гена *VEGFA* (G-634C) в позиции rs2010963 генотипы GG и GC в ис-

следуемых группах женщин встречались практически с одинаковой частотой: доминантная гомозигота GG составила 41,67% в контроле и 31,67% в группе с НАСП-О-М ($\chi^2=4,44; p=0,26; OR=0,65$), гетерозигота GC была найдена в 50% и 46,67% случаев соответственно ($\chi^2=4,44; p=0,72; OR=0,88$). При этом гомозигота CC исследуемого ОНП обнаруживалась значимо чаще в когорте пациенток с НАСП-О-М – в 21,67% случаев, а у здоровых женщин лишь в 8,33% ($\chi^2=4,18; p=0,04; OR=3,04$). Рецессивный аллель C гена VEGFA у женщин с НАСП и ожирением в менопаузе регистрировался в 45% наблюдений, что было значимо выше, чем в контроле 33,33% ($\chi^2=3,44; p=0,04; OR=1,64$) (табл. 2).

Следовательно, у женщин с ожирением, имеющих рецессивные гомозиготы CC по гену VEGFA (G-634C)

в 3,04 раза (ДИ 1,01-9,16) увеличивается вероятность развития НАСП по рецессивной модели наследования.

При изучении комбинаций аллельных вариантов гена VWF (T-2385C) в позиции rs1063857 у здоровых женщин в менопаузе без ожирения преобладал генотип TT в 50% и доминантный аллель T в 70,83%. В обеих исследуемых группах генотипы TC встречались с частотой в 41,67% в контроле и 33,33% у женщин с НАСП-О-М без значимых различий ($\chi^2=4,27; p=0,35; OR=0,70$). Однако генотип CC и рецессивный аллель C гена VWF в регионе -2385T/C значимо чаще регистрировался у пациенток с НАСП-О-М, чем в популяции здоровых женщин: генотип CC в 21,67% и 8,33% соответственно ($\chi^2=4,18; p=0,04; OR=3,04$) и аллель

Таблица 1/Table 1

Концентрация васкулоэндотелиального фактора роста и уровень антигена фактора Виллебранда у здоровых женщин без ожирения в менопаузе и у пациенток с неалкогольным стеатозом печени и ожирением в менопаузе, Ме (Q1 – Q3)

The concentration of vascular endothelial growth factor and the level of Willebrand factor antigen in healthy women without obesity in menopause and in patients with non-alcoholic liver steatosis and obesity in menopause, Me (Q1 – Q3)

Показатели Indicators	Контроль Control (n=30)	НАСП-О-М NASP-O-M (n=60)	p
VEGF, пг/мл (pg/ml)	76 (1,7-93,5)	195 (115-418)	0,001
vWFAg, МЕ/мл (IU/ml)	1 (0,9-1)	1,3 (1,0-1,4)	0,041

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

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

Таблица 2/Table 2

Аллельные варианты генов в группах контроля и пациенток с неалкогольным стеатозом печени и ожирением в менопаузе, %

Allele variants of genes in control groups and patients with non-alcoholic liver steatosis and menopausal obesity, %

Генотип/аллели генов		Контроль Control (n=60)	НАСП-О-М NASP-O-M (n=60)	OR	p
VEGFA -634G/C	GG, %	41,67±6,36	31,67±6,01	0,65	0,26
	GC, %	50±6,45	46,67±6,44	0,88	0,72
	CC, %	8,33±3,57	21,67±5,32	3,04	0,04
	G-аллель, %	66,67±4,3	55±4,54	0,61	0,04
	C-аллель, %	33,33±4,3	45±4,54	1,64	0,04
VWF -2385T/C	TT, %	50±6,45	45±6,42	0,82	0,58
	TC, %	41,67±6,36	33,33±6,09	0,70	0,35
	CC, %	8,33±3,57	21,67±5,32	3,04	0,04
	T-аллель, %	70,83±4,15	61,67±4,44	0,66	0,04
	C-аллель, %	29,17±4,15	38,33±4,44	1,51	0,04

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

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

С в 38,33% в группе НАСП-О-М и 29,17% в контроле ($\chi^2=2,25$; $p=0,04$; $OR=1,51$).

Это означает, что у женщин с ожирением, имеющих рецессивные гомозиготы СС по гену *VWF* (Т-2385С) в 3,04 раза (ДИ 1,01-9,16) увеличивается вероятность развития НАСП по рецессивной модели наследования.

При оценке зависимости по таблице сопряженности в группе женщин с НАСП и ожирением в менопаузе была выявлена взаимосвязь полиморфизма региона -2385Т/С гена *VWF* с выработкой vWFAg ($K_i=0,477$; $p=0,041$), что может приводить к прогрессированию синдрома ЭД в группе носителей.

Таким образом, риск развития НАСП у женщин с ожирением в период менопаузы ассоциирован с носительством генотипов СС генов *VWF* -2385Т/С и *VEGFA* -634Г/С.

Обсуждение

Большинство исследователей сходятся во мнении, что ЭД имеет место при гепатобилиарной патологии. Доказана взаимосвязь маркеров эндотелиальной дисфункции и фиброза при хроническом вирусном гепатите и циррозе печени [9, 11]. Есть данные о развитии ЭД при стеатогепатите. Однако, при стеатозе печени статистически значимое повышение маркеров ЭД подтверждено только в части исследований, в то время, как в других работах сообщается об отсутствии различий между пациентами со стеатозом печени и здоровыми людьми [12, 13].

При анализе маркеров ЭД у пациенток с НАСП и ожирением в менопаузе нами было установлено повышение уровней VEGF и vWFAg в сравнении с группой практически здоровых женщин без ожирения в менопаузе. Значимое увеличение выработки VEGF отражает выраженность повреждения эндотелия и характеризует активацию неоангиогенеза и стимуляцию фиброза, в том и числе и в экспериментальных моделях [14]. Известно, что плазменные уровни фактора Виллебранда (vWF) значительно варьируют в общей популяции от 30 до 70%, что может быть связано с генетическими факторами и факторами окружающей среды. Наследуемость уровней vWF колеблется по данным литературы от 40% до 60% [15, 16].

Поражения печени вирусного генеза также сопровождаются развитием ЭД и стимуляцией процессов неоангиогенеза, ведущим к перестройке сосудистой архитектоники в печени, что может способствовать прогрессированию заболевания вплоть до развития цирроза печени. В предыдущих наших исследованиях была показана роль VEGF в патогенезе НАСП и разви-

тии дислипидемии, а также увеличение функциональной активности vWF у пациентов со стеатозом и вирусным фиброзом печени [10, 17, 18].

На сегодняшний день наиболее изученными однонуклеотидными вариантами, расположенными в *VWF* являются rs1063856 (2365A>G) и rs1063857 (2385T>C). Было доказано как *in vitro*, так и *in vivo* на мышиных моделях, что оба полиморфизма напрямую повышают уровни vWF в плазме за счет активации его биосинтеза и клиренса и могут влиять на фенотип заболевания как при гемостатических, так и при тромботических нарушениях [19].

Проведенный нами анализ полиморфизма гена *VWF* (Т-2385С) в позиции rs1063857 показал, что генотип СС и рецессивный аллель С значимо чаще регистрировался у пациенток с НАСП-О-М, чем в популяции здоровых женщин. При этом была выявлена взаимосвязь данного генетического маркера с выработкой vWFAg, что может приводить к прогрессированию синдрома ЭД в группе носителей.

При анализе аллельных вариантов гена *VEGFA* (G-634C) в позиции rs2010963 гомозигота СС и рецессивный аллель С значимо чаще обнаруживались в когорте пациенток с НАСП-О-М в 21,67% и 45% случаев, а у здоровых женщин лишь в 8,33% и 33,33% соответственно. В наших ранних исследованиях была выявлена ассоциация носительства аллеля С данного генетического маркера с хронизацией гепатита вирусного генеза и взаимосвязь генотипа СС с риском развития стеатоза печени у мужчин и женщин [9–11].

Заключение

Развитие НАСП у женщин с ожирением в период менопаузы сопровождается развитием ЭД и активацией процессов неоангиогенеза с повышением уровня VEGF и vWFAg в крови.

Проведенный анализ отдельных полиморфизмов генов патогенетически значимых молекул: *VWF* в регионе -2385Т/С (rs1063857) и *VEGFA* в регионе -634Г/С (rs2010963) в группах здоровых женщин в менопаузе без ожирения и пациенток с НАСП и ожирением в менопаузе показал значимые различия по распределению генотипов. Рецессивные гомозиготы СС обоих генетических маркеров с высокой вероятностью встречались в группе пациенток с НАСП-О-М. Можно предположить, что риск развития НАСП у женщин с ожирением в период менопаузы ассоциирован с носительством рецессивного аллеля С в виде генотипа СС генов *VWF* -2385Т/С и *VEGFA* -634Г/С. При этом была выявлена взаимосвязь полиморфизма региона -2385Т/С гена *VWF* с выработкой vWFAg, что может приводить к прогрессированию синдрома ЭД в группе носителей.

Литература

(п.п. 4-7; 13-16; 19 см. References)

1. Маев И.В., Андреев Д.Н., Кучерявый Ю.А., Дичева Д.Т., Кузнецова Е.И. *Неалкогольная жировая болезнь печени с позиций современной медицины*. М.: Прима Принт; 2020.
2. Быкова Г.А., Хлынова О.В., Туев А.В. Особенности функции внешнего дыхания и состояния эндотелия у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени. *Здоровье семьи – 21 век*. 2018; 1(1): 16–24.
3. Мифтахова А.М. Показатели гемостаза при неалкогольном стеатозе печени (экспериментально-клиническое исследование). *Медицинская наука и образование Урала*. 2021; 3(107): 17–21.
4. Таратина О.В., Краснова Т.Н., Самоходская Л.М., Лопаткина Т.Н., Ткачук В.А., Мухин Н.А. Полиморфизм генов дисфункции эндотелия и скорость прогрессирования фиброза печени при хроническом гепатите С. *Терапевтический архив*. 2014; 4(86): 45–51.
5. Булатова И.А., Шевлюкова Т.П., Шёкотова А.П., Кривцов А.В. Генетический профиль больных хроническим гепатитом С. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(1): 35–43.
6. Булатова И.А., Пестренин Л.Д., Шевлюкова Т.П., Мифтахова А.М., Кривцов А.В., Гуляева И.Л. К оценке риска развития и прогрессирования неалкогольного стеатоза печени с использованием факторов TNF-α, IL-6, VEGF и полиморфизмов их генов. *Анализ риска здоровью*. 2022; 1: 114–22.
7. Шёкотова А.П., Булатова И.А. Роль васкулоэндотелиального фактора роста и его гена в патогенезе гепатобилиарной патологии. *Пермский медицинский журнал*. 2020; 4(37): 36–45.
8. Гейвандова Н.И., Нигиян З.В., Бабашева Г.Г. Роль эндотелиальной дисфункции в формировании неалкогольного стеатогепатита. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2015; 2(10): 183–7.
9. Гуляева И.Л., Булатова И.А., Пестренин Л.Д. Роль васкулоэндотелиального фактора роста в патогенезе стеатоза печени и дислипидемии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 4(64): 31–6.
10. Булатова И.А., Мифтахова А.М., Гуляева И.Л., Булатова И.А. Выраженность воспалительного ответа и эндотелиальной дисфункции при неалкогольном стеатозе и фиброзе печени вирусного генеза. *Пермский медицинский журнал*. 2021; 4(38): 54–61.

References

1. Maev I.V., Andreev D.N., Kucheryavy Yu.A., Dicheva D.T., Kuznetsova E.I. *Non-alcoholic fatty liver disease from the standpoint of the modern medicine. [Nealkogol'naya zhirovaya bolezni' pečeni s pozitsiyi sovremennoj]*. Moscow: Prima Print; 2020. (in Russian)
2. Bykova G.A., Khllynova O.V., Tuev A.V. Features of the function of external respiration and the state of the endothelium in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Zdorov'e sem'i – 21 vek*. 2018; 1(1): 16–24. (in Russian)
3. Miftakhova A.M. Indicators of hemostasis in non-alcoholic liver steatosis (experimental clinical study). *Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala*. 2021; 3(107): 17–21. (in Russian)

4. De Chiara F., Heeboll S., Marrone G., et al. Urea cycle dysregulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol*. 2018; 4(69): 905–15.
5. Hardy T., Zeybel M., Day C.P., et al. Plasma DNA methylation: a potential biomarker for stratification of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2017; 7(66): 1321–8.
6. Sookoian S., Pirola C.I. Genetics of nonalcoholic fatty liver disease: from pathogenesis to therapeutics. *Seminars in Liver Disease*. 2019; 2(39): 124–40.
7. Kovalic A.J., Banerjee P., Tran Q.T., Singal A.K., Satapathy S.K. Genetic and Epigenetic Culprits in the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Clinical Experimental Hepatology*. 2018; 4(8): 390–402.
8. Taratina O.V., Krasnova T.N., Samokhodskaya L.M., Lopatkina T.N., Tkachuk V.A., Mukhin N.A. Polymorphism of endothelial dysfunction genes and the rate of progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Terapevicheskij arkhiv*. 2014; 4(86): 45–51. (in Russian)
9. Bulatova I.A., Shevlyakova T.P., Shchekotova A.P., Krivtsov A.V. Genetic profile of patients with chronic hepatitis C. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2022; 66(1): 35–43. (in Russian)
10. Bulatova I.A., Pestrenin L.D., Shevlyukova T.P., Miftakhova A.M., Krivtsov A.V., Gulyaeva I.L. To assess the risk of development and progression of non-alcoholic liver steatosis using TNF-α, IL-6, VEGF factors and polymorphisms of their genes. *Analiz riska zdorov'yu*. 2022; (1): 114–22. (in Russian)
11. Shchekotova A.P., I.A. Bulatova. The role of vascular endothelial growth factor and its gene in the pathogenesis of hepatobiliary pathology. *Permskiy meditsinskiy zhurnal*. 2020; 4(37): 36–45. (in Russian)
12. Geyvandova N.I., Nigiyan Z.V., Babasheva G.G. The role of endothelial dysfunction in the formation of non-alcoholic steatohepatitis. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza*. 2015; 2(10): 183–7. (in Russian)
13. Coulon S., Francque S., Colle I., et al. Evaluation of inflammatory and angiogenic factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine*. 2012; 59: 442–9.
14. Yang Liu., Junghee Kwon., Popov Y., Gabriella B. Gajdos., Tamas Ordog, et al. Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice [Electronic resonance]. *Gastroenterology*. 2014; 146(5): 1339.
15. Souto J.C., Almasy L., Borrell M., Gari M., Martinez E., et al: Genetic determinants of hemostasis phenotypes in Spanish families. *Circulation*. 2000; 101: 1546–51.
16. Morange P.E., Tregouet D.A., Frere C., Saut N., Pellegrina L., Alessi M.C., et al. Biological and genetic factors influencing plasma factor VIII levels in a healthy family population: results from the Stanislas cohort. *Br J Haematol*. 2005; 128: 91–9.
17. Gulyaeva I.L., Bulatova I.A., Pestrenin L.D. The role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of liver steatosis and dyslipidemia. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2020; 4(64): 31–6. (in Russian)
18. Bulatova I.A., Miftakhova A.M., Gulyaeva I.L., Bulatova I.A. The severity of the inflammatory response and endothelial dysfunction in non-alcoholic steatosis and liver fibrosis of viral genesis. *Permskiy meditsinskiy zhurnal*. 2021; 4(38): 54–61. (in Russian)
19. Mufti A.H., Ogiwara K., Swystun L.L., Eikenboom J.C.J., Budde U., Hopman W.M., et al. The common VWF single nucleotide variants c.2365A>G and c.2385T>C modify VWF biosynthesis and clearance. *Blood Adv*. 2018; 2(13): 1585–94.

Сведения об авторах:

Булатова Ирина Анатольевна, доктор мед. наук, зав. каф. нормальной физиологии, проф. каф. факультетской терапии № 2, профессиональной патологии и клин. лаб. диагностики ФГБОУ ВО «ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, e-mail: bula.1977@mail.ru;

Соболь Александр Андреевич, врач терапевт, гастроэнтеролог, «Клиника женского здоровья», e-mail: profdobro@mail.com;

Гуляева Инна Леонидовна, доктор мед. наук, зав. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО «ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, pimenova774@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-006.441

Жуковская Е.В.¹, Коробейникова Т.В.², Карелин А.Ф.¹, Гончаров А.П.², Рахаев Д.С.², Литвицкий П.Ф.²

Изменение содержания в сыворотке крови свободных аминокислот у детей с острым лимфобластным лейкозом и лимфомами после химиотерапии

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России,

117997, Москва ул. Саморы Машела, д. 1;

²ФГАОУ ВО «Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет),

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

Введение. Гемобластозы составляют треть всех видов опухолей у детей. В патогенезе многих злокачественных новообразований все чаще выявляется существенная роль изменений аминокислотного профиля у пациентов. **Цель работы** – изучение содержания свободных аминокислот в сыворотке крови у детей после курса химиотерапии острого лимфобластного лейкоза и лимфом агрессивного течения.

Методика. В исследование включено 155 детей и подростков – 59 девочек и 96 мальчиков в возрасте от 4 до 17 лет. Все пациенты находились в состоянии стойкой ремиссии острого лимфобластного лейкоза и лимфом (коды заболеваний по МКБ-10: С 91, С 81-84, соответственно). В сыворотке крови определяли концентрацию 25 свободных аминокислот методом ВЭЖХ.

Результаты. Установлено статистически значимое снижение в сыворотке крови уровня цитруллина (у 23% пациентов) и метионина (у 42 %). Избыток содержания аспарагиновой кислоты в сыворотке крови отмечен у 69% детей. У 42% был повышен уровень глутаминовой кислоты. Содержание серина значительно превышало норму у 96% пациентов; пролина и тирозина у 31 и 81%, соответственно.

Заключение. Существенное повышение в сыворотке крови уровней аспарагиновой и глутаминовой кислот, серина, пролина и тирозина свидетельствует о дисбалансе соотношения аминокислот у пациентов с гемобластозами и лимфомами в анамнезе. В связи с этим, требуется дальнейшая оптимизация стратегии антибластомной терапии, в том числе направленной на нормализацию содержания в крови указанных аминокислот. Снижение концентрации аминокислоты цитруллина, вырабатываемой энтероцитами тонкой кишки, связано, как правило, с токсическим поражением слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта в результате химиотерапии.

Ключевые слова: аминокислоты; гемобластозы; лимфобластный лейкоз; лимфомы; химиотерапия

Для цитирования: Жуковская Е.В., Коробейникова Т.В., Карелин А.Ф., Гончаров А. П., Рахаев Д.С., Литвицкий П.Ф. Изменение содержания в сыворотке крови свободных аминокислот у детей с острым лимфобластным лейкозом и лимфомами после химиотерапии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(3): 25-33.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.25-33

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Жуковская Е.В., Карелин А.Ф.; сбор материала – Гончаров А.П.; техническая подготовка материала к публикации – Рахаев Д.С.; написание текста – Коробейникова Т.В.; редактирование – Литвицкий П.Ф. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Жуковская Елена Вячеславовна, e-mail: elena_zhukovskay@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственной поддержки создания и развития исследовательских центров мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» 075-15-2020-926.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.06.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Zhukovskaja E.V.¹, Korobejnikova T.V.², Karelin A.F.¹, Goncharov A.P.², Rahaev D.S.², Litvickiy P.F.²

Changes in free amino acid concentrations in blood serum of children with acute lymphoblastic leukemia and lymphomas after chemotherapy

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Samory Mashela St. 1, Moscow 117997, GSP-7, Russian Federation;

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

Hemoblastosis comprises a third of all tumors in children. Changes in the amino acid profile play a huge role in the pathogenesis of various malignant neoplasms, as recent research has demonstrated.

Aim: To study free amino acid concentrations in blood serum of children with acute lymphoblastic leukemia and lymphomas after chemotherapy.

Methods. 155 children and teenagers, 59 females and 96 males, 4 to 17 years old, were included in the study. All patients were in sustained remission of acute lymphoblastic leukemia and lymphoma (ICD-10 disease codes: C 01, C 81-84. The serum concentration of 25 free amino acids was analyzed with HPLC.

Results. There was a significant decrease in some free amino acid concentrations in serum compared to reference values, specifically citrulline (23% of cases) and methionine (42% of cases). Excess serum aspartic acid was observed in 69% of patients, and 42% had elevated glutamic acid. Serum serine exceeded its normal values in 96% of patients, and proline and tyrosine exceeded normal values in 31% and 81% of patients, respectively.

Conclusion. The increases in serum concentrations of aspartic and glutamic acids, serine, proline, and tyrosine indicate disbalance of the amino acid profile of patients with hemoblastosis. Further research on chemotherapy effectiveness is required with the exclusion of these amino acids from the diet. A decrease in the concentration of citrulline, an amino acid produced by enterocytes of small intestine, is more likely related to toxic damage of the gastrointestinal tract mucosa after chemotherapy.

Keywords: amino acids; hemoblastosis; lymphoblastic leukemia; lymphomas; chemotherapy

For citation: Zhukovskaja E.V., Korobejnikova T.V., Karelin A.F., Goncharov A. P., Rahaev D.S., Litvickiy P.F. Changes in free amino acids content in blood serum of children with acute lymphoblastic leukemia and lymphomas after chemotherapy. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(3): 25-33. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.25-33

Author's contribution: research concept and design – Zhukovskaja E.V., Karelin A.F.; Data collection – Goncharov A.P.; Technical data preparation for publication – Rahaev D.S.; text writing – Korobejnikova T.V.; editing – Litvickiy P.F. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Elena V. Zhukovskaja*, Doctor of Medical Sciences, professor, head of «late anticancer treatment effects research department» in therapeutic rehabilitation center «Russkoe pole», Dmitry Rogachev National Medical Research Center; 1 Samory Mashela str., 117997, Moscow, Russia, e-mail: elena_zhukovskay@mail.ru

Information about authors:

Zhukovskaja E.V., <https://orcid.org/0000-0002-6889-7105>

Korobejnikova T.V., <https://orcid.org/0000-0002-1373-6354>

Goncharov A. P., <https://orcid.org/0000-0001-5779-5463>

Rahaev D.S., <https://orcid.org/0000-0003-0124-5897>

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

Financing. This work was financed by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the framework of state support for the creation and development of World-Class Research Centers "Digital biodesign and personalized healthcare" 075–15-2020–926.

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

Received 01.06.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Введение

Для злокачественных клеток характерен атипизм метаболизма, что способствует их выживанию, пролиферации, инвазии и метастазированию. Метаболические изменения включают активацию аэробного гликолиза, снижение эффективности окислительного

фосфорилирования, повышенное образование промежуточных продуктов биосинтеза и многие другие. Это обеспечивает для опухоли различные преимущества в сравнении с нормальными клетками [1].

В настоящее время в литературе обсуждается положение о существенной роли аминокислот и как метаболитов, и как регуляторов обмена веществ для обе-

спечения онкогенеза. В патогенезе многих злокачественных новообразований, в том числе гемобластозов и лимфом, выявлена важная роль изменений метаболизма аминокислот [2-4]. Известно, что клетки новообразований обладают повышенными потребностями в таких веществах как глюкоза и аминокислоты, которые позволяют им поддерживать высокую пролиферативную активность. С учетом этой особенности опухолей, в качестве одного из направлений антибластомной терапии используют ограничение нутриентов, необходимых для развития опухолей [5]. Увеличение удельного веса гликолиза в энергообеспечении злокачественных клеток и, следовательно, потребления ими глюкозы, характерно для многих из них (эффект Варбурга). В связи с этим фактом, лимитирование поступления глюкозы в организм используют для торможения опухолевого роста. Однако, при этом выявлено негативное действие и на нормальные клетки, которые лишаются основного энергетического субстрата [6].

У пациентов с новообразованиями синтез заменимых аминокислот обычно сохраняется в здоровых клетках, но утрачивается или подавлен в малигнизированных, что позволяет использовать этот факт при разработке стратегии противоопухолевой терапии [7].

Считается, что именно аминокислоты, а не глюкоза, составляют основной источник углерода в пролиферирующих клетках, что подчеркивает значимую роль аминокислот для развития опухолей [8]. В злокачественных клетках выявлено повышенное потребление заменимых аминокислот, превышающее их реальное наличие в организме, что приводит к зависимости от поступления таких аминокислот из экзогенных источников и изменению уровня и/или активности ферментов, которые катализируют синтез аминокислот и/или их катаболизм [8, 9]. Многие малигнизированные клетки не продуцируют достаточного количества заменимых аминокислот для поддержания своего роста, что ведет к использованию их внеклеточных источников. Истощение запасов нутриентов приводит к аминокислотному голоданию, торможению роста и гибели клеток новообразования [10]. Снижение, с лечебной целью, уровня аминокислот в организме онкологических больных достигается в результате усиления их катаболизма с использованием рекомбинантных или синтезированных ферментов человека [10, 11].

Одним из способов направленного усиления катаболизма аминокислот является применение аспарагиназы, которое началось еще в 1970-х годах и является до настоящего времени важным компонентом полихимиотерапии у детей с острым лимфобластным лейкозом. Аспарагиназа обеспечивает антилейкемиче-

ский эффект за счет снижения концентрации аспарагина, катализируя его гидролиз с образованием аспарагиновой кислоты и аммиака, лишая раковые клетки этой аминокислоты. Длительный дефицит аспарагина ведет к снижению синтеза белка и, в конечном итоге, к инициации апоптоза клеток новообразования. В ряде лейкозных бластов отмечено также отсутствие или очень низкий уровень аспарагин-синтетазы: фермента, который катализирует синтез аспарагина *de novo* [12, 13]. Кроме противоопухолевой терапии ферментными препаратами, активно изучается также возможность исключения аминокислот из нутритивной поддержки с использованием элиминационных подходов в диетотерапии [14].

По данным Международной ассоциации раковых регистров лейкозы и лимфомы в совокупности находятся на первом месте среди всех диагностированных злокачественных новообразований у детей и молодых людей в возрасте до 20 лет [15]. Рост числа заболевших и значительные успехи противоопухолевой терапии приводят к существенному увеличению численности населения, излеченного в детстве от новообразований. Вместе с тем, учитывая ограниченную селективность цитотоксических препаратов, практически невозможно избежать нежелательных – токсических эффектов лечения. Выявление нарушений метаболического гомеостаза и их коррекция являются важной составляющей реабилитационных мероприятий по обеспечению оптимального качества жизни пациентов с гемобластомами.

В настоящей работе поставлена цель – исследование изменения уровня свободных аминокислот в сыворотке крови у детей, перенесших химиотерапию при остром лимфобластном лейкозе и лимфомах.

Методика

Моноцентровое поперечное исследование выполнено в 2019-2021 гг. Обследуемая группа включала 59 девочек и 96 мальчиков в возрасте от 4 до 17 лет. Всем им проводили реабилитационные мероприятия в лечебно-реабилитационном научном центре «Русское поле» НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева МЗ России. Все пациенты находились в стойкой ремиссии острого лимфобластного лейкоза и лимфом (коды заболеваний по МКБ-10 С 91, С 81-84, соответственно). Продолжительность ремиссии составляла $2 \pm 0,7$ года. Лечение пациентов проводили в соответствии с протоколами МБ (Москва-Берлин) и БФМ (Берлин-Франкфурт-Мюнстер). Учитывая, что опухолевым субстратом гемобластозов и лимфом являются трансформированные

гемопозитические клетки лимфоидной линии дифференцировки, независимо от варианта протокола противоопухолевой терапии у пациентов применяли комбинацию таких препаратов, как винкристин, кортикостероиды, антрациклины, метотрексат, аспарагиназа, цитозар, циклофосфан, 6-меркаптопурин.

У всех пациентов определяли в сыворотке крови содержание 25 свободных аминокислот [аланин (Ala), альфа-аминоасляная к-та (Aab), аргинин (Arg), аспарагин (Asn), аспарагиновая к-та (Asp), валин (Val), гидроксипролин (Hupro), гистидин (His), глицин (Gly), глутаминовая к-та (Glu), глутамин (Gln), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), лизин (Lys), метионин (Met), орнитин (Orn), пролин (Pro), серин (Ser), таурин (Tau), тирозин (Tyr), треонин (Thr), триптофан (Trp), фенилаланин (Phe), фосфосерин (Pser), цитруллин (Cit)]. Исследование методом ВЭЖХ выполняли на хроматографе Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies Ltd., Германия) со спектрофотометрическим детектором при длине волны 254 нм по методике Waters PicoTag с использованием колонки C18 300x4.6 мм (Waters Corporation, США). Технология PicoTag основана на методе предколоночной дериватизации аминокислот фенилизотиоцианатом (PITC) с последующим разделением производных при использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой. Результаты исследования сравнивали с референтными, которые были получены путем обработки результатов анализов 1200 детей без онкологических заболеваний в анамнезе (25–75 процентиля), прошедших обследование в АНО «Центр биотической медицины» в период с 2017 по 2021 гг. Исследование выполнено по международным правилам работы с биоматериалом людей.

Статистический анализ данных осуществляли с использованием программного обеспечения Statistica 12.0 (Statsoft, ОК, США). Статистическую значимость межгрупповых различий оценивали с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test) для данных, характеризующихся отличным от нормального распределением.

Результаты

Аминокислотный статус детей с гемобластозами в анамнезе представлен в **таблице 1**.

Из данных таблицы 1 видно наличие более высокой концентрации в сыворотке крови у больных гемобластозами аспарагиновой кислоты, серина и тирозина, что согласуется с данными литературы [8, 16].

В **таблице 2** приведены данные об отклонении от референтных значений содержания свободных

аминокислот в сыворотке крови у пациентов с гемобластозами.

Установлено, что у детей с гемобластозами наблюдалось статистически значимое, по сравнению с референтными интервалами, снижение в сыворотке крови уровня аминокислот цитрулина (в 23% случаев, $p < 0,000045$) и метионина (42 %, $p < 0,043$).

Избыток аспарагиновой кислоты в сыворотке крови выявлен у 69% детей ($p < 0,0000001$). У 42% обследованных был существенно ($p < 0,0000001$) повышен уровень глутаминовой кислоты. Содержание серина превышало норму у 96% ($p < 0,000003$); пролина ($p < 0,0073$) и тирозина ($p < 0,00053$) у 31 и 81% исследуемых, соответственно.

Обсуждение

Полученные в настоящей работе данные согласуются с результатами исследований, указывающих на повышение содержания в сыворотке крови онкологических пациентов перечня аминокислот, снижение концентрации которых может привести к гибели опухолевых клеток. Это положение является основанием для рекомендации по использованию указанных данных при лечении пациентов с гемобластозами.

Нами не выявлено у пациентов с гемобластозами повышения в сыворотке крови уровня аспарагина, однако зарегистрирован повышенный уровень предшественника аспарагина – аспарагиновой кислоты (аспартата) у 69% детей. Известно, что аспартат – форма аспарагиновой кислоты, которая необходима для синтеза белка и нуклеиновых кислот, а также используется в цикле образования мочевины. Синтез аспартата связан с процессом клеточного дыхания и низкие уровни этой аминокислоты могут ограничивать рост опухолей в условиях гипоксии [16].

В настоящем исследовании установлено также повышение в сыворотке крови концентрации глутаминовой кислоты (глутамата). Известно, что глутамин и его непосредственный метаболит глутамат, способны к стимуляции процесса пролиферации опухолевых клеток посредством биохимических превращений и участия в цикле Кребса. Глутаминаза – фермент, участвующий в катаболизме глутамина, превращает глутамин в глутамат. При этом, ингибирование активности глутаминазы тормозит рост новообразований [17]. Глутаминазы катализируют глутаминализ в митохондриях, регулируя окислительное фосфорилирование, редокс-потенциал и клеточный метаболизм в опухолях. Глутамин и глутамат могут работать как сигнальные молекулы, влияющие на окислительно-восстановительные и биоэнергетические пути в новообразова-

ниях [18]. Показано, что глутамин является ключевым компонентом биосинтеза нуклеотидов, а также необходим для образования глутатиона в клетках [16]. Глутатион является ключевым компонентом антиоксидантной системы клеток, защищающей от эффектов избытка цитотоксических активных форм кислорода, а также служит кофактором ферментов глутатионпероксидаз, которые катализируют разрушение неорганических и органических перекисей [19, 20]. В ряде работ показана положительная связь между повышенным уровнем глутатиона и хеморезистентностью при остром миелоидном и лимфобластном лейкозе у детей и взрослых [21, 22]. В условиях гипоксии глутамин и глутамат способствуют синтезу липидов [16].

Кроме того, глутамин способствует синтезу de novo ряда заменимых аминокислот, таких как аспарагин, глутамат, пролин, аспарат, серин, аланин и орнитин [23].

В настоящее время установлено, что метаболизм таких аминокислот как глутамин и аспарагин тесно взаимосвязан. Раковые клетки, лишенные глутамина, способны к его образованию путем использования экзогенного аспарагина [24]. Аспарагинсинтетаза – фермент, катализирующий АТФ-зависимый синтез аспарагина и глутамата из аспартата и глутамина. При гемобластозах наблюдается повышение активности этого фермента, что делает раковые клетки устойчивыми к лечению L-аспарагиназой [8]. Следовательно, выявленное в нашей работе повышение уровня аспарта-

Таблица 1/ Table 1

Концентрация аминокислот в сыворотке крови детей с гемобластозами в анамнезе**Amino acids serum concentration in children with hemoblastoses in anamnesis**

Аминокислоты Amino acids	Медиана (min/max), ммоль/л Median (min/max), $\mu\text{mol/l}$	25-процентиль 25-percentile	75-процентиль 75-percentile	Референтный интервал Reference interval
Aab	24,5 (6,5-42)	18	33	10-40
Ala	308 (128-766)	290	460	200-600
Arg	93 (45-218)	74	114	45-200
Asn	57 (33-101)	53	72	40-120
Asp	27 (11-42)	15	31	5-30
Cit	47 (24-74)	40	55	35-65
Gln	421 (247-920)	375	488	300-700
Glu	90 (40-200)	61	106	25-120
Gly	372 (249-700)	344	388	250-500
His	58 (23-104)	49	65	35-100
Hypro	19 (10-46)	16	25	6-35
Ile	70 (39-154)	59	86	35-100
Leu	127 (65-205)	113	152	75-190
Lys	214 (83-337)	161	263	100-275
Met	46 (37-70)	43	49	45-65
Orn	72 (39-173)	62	87	40-130
Phe	71 (28-149)	58	87	35-100
Pro	218 (141-505)	178	388	110-350
Pser	83 (33-154)	64	95	25-95
Ser	107 (70-182)	93	120	60-110
Tau	78 (51-120)	70	92	50-100
Thr	117 (66-217)	92	131	80-200
Trp	69 (26-124)	58	80	30-80
Tyr	109 (53-166)	99	124	50-120
Val	146 (57-274)	124	193	95-225

та может быть связано с взаимными метаболическими превращениями глутамина и аспартата.

Пролин, глутамин, аспарагин и аргинин являются условно незаменимыми аминокислотами. Они могут синтезироваться в организме человека, но обладают эссенциальностью для интенсивно пролиферирующих клеток, таких как раковые. Метаболические пути этой группы условно незаменимых аминокислот (Pro, Gln, Asn и Arg) взаимосвязаны и их обозначают как «метаболическая ось или петля Pro–Gln–Asn–Arg».

В результате реакций в этой «оси» происходит биосинтез многих незаменимых аминокислот и метаболитов, в том числе и в злокачественных новообразованиях. Указанные закономерности согласуются с полученными нами ранее результатами: уровни Pro, Gln, Asn и Arg были повышены у обследуемых пациентов [25].

В ходе настоящего исследования установлено также превышение содержания серина в сыворотке крови у 96% пациентов с острым лимфобластным лейкозом и лимфомами. Серин – заменимая аминокислота,

Таблица 2/Table 2

Отклонения от референтных значений (в %) содержания аминокислот в сыворотке крови у детей с гемобластозами

Amino acids serum concentration deviations from the reference values (%) in children with hemoblastoses

Аминокислота Amino acid	Отклонения от нижней границы референтного интервала, % Deviations from the lower limit of the reference range, %	Отклонения от верхней границы референтного интервала, % Deviations from the upper limit of the reference range, %	p-value
Aab	7,7	3,8	
Ala	15,4	19,2	
Arg	3,8	3,8	**
Asn	7,7	3,8	**
Asp	0,0	69,2	***
Cit	23,1	3,8	***
Gln	15,4	11,5	
Glu	0,0	42,3	***
Gly	3,8	15,4	*
His	3,8	11,5	
Hypro	0,0	15,4	**
Ile	0,0	23,1	**
Leu	7,7	15,4	
Lys	11,5	23,1	
Met	42,3	26,9	*
Orn	3,8	19,2	**
Phe	7,7	15,4	*
Pro	0,0	30,8	**
Pser	7,7	61,5	***
Ser	0,0	96,2	***
Tau	0,0	15,4	***
Thr	19,2	7,7	
Trp	7,7	30,8	
Tyr	0,0	80,8	**
Val	23,1	15,4	*

Примечание/Note. * – p <= 0,05; ** – p <= 0,01; *** – p <= 0,001.

так как многие клетки способны ее синтезировать *de novo* из глюкозы или глицина [16]. Основная роль Ser заключается в обеспечении атомами углерода фолатного цикла при синтезе нуклеотидов. Серин является действующим предшественником широкого спектра биосинтетических реакций, способствует синтезу липидов в качестве головной группы и служит праймером синтеза сфинголипидов [23]. Доступность серина является лимитирующим фактором для этих процессов, поскольку его недостаток тормозит синтез сфинголипидов и пролиферацию раковых клеток у человека [8]. Метаболизм серина часто нарушается у пациентов с новообразованиями, однако влияние этой аминокислоты на рост и развитие опухолей остается спорным [7, 26]. В ряде исследований показано, что пролиферация клеток новообразования зависит от присутствия экзогенного серина. Это позволяет считать серин важной мишенью при разработке стратегии антибластомной терапии [16].

В нашей работе у 81% обследуемых с острым лимфобластным лейкозом и лимфомами выявлено повышение уровня аминокислоты тирозина. Нарушение обмена тирозина также характерно для детей раннего возраста с онкопатологией [27]. Тирозин – это заменимая ароматическая аминокислота, синтезируемая из незаменимой аминокислоты фенилаланина. Известно, что в клетках млекопитающих фосфорилирование тирозина участвует в формировании внутриклеточных сигналов и в регуляции активности ряда ферментов [28]. Проведенный М. Taddei и соавт. в 2020 г. анализ литературных данных, показал, что фосфорилирование тирозина является часто реализуемой реакцией посттрансляционной модификации, способствующей формированию метаболического атипизма раковых клеток [29].

Трансмембранные рецепторные тирозинкиназы представляют особый интерес с позиций лечебной онкологической практики [30]. Большое количество препаратов для таргетной антибластомной терапии – это средства, ингибирующие тирозинкиназы [31]. При лечении гемобластозов все чаще находят применение высокоселективные целевые ингибиторы тирозинкиназ. Это показано для острого и хронического миелолейкоза [32], а также лимфобластного лейкоза [33]. Высокоселективные ингибиторы тирозинкиназ подавляют клеточные аберрантные сигнальные пути, регулируемые тирозинкиназами, участвующими в процессах пролиферации, метастазирования и роста злокачественных клеток [34].

В нашем исследовании у пациентов с гемобластомами обнаружен также дефицит незаменимой ами-

нокислоты метионина. Т. Sugimura и соавт. в 1959 г. впервые описали метиониновую зависимость роста карциносаркомы Walker-256 у крыс с пониженным содержанием метионина в их рационе [35]. Метиониновая зависимость [или эффект Хоффмана (Hoffman effect)] свойственна и ряду опухолей человека: лейкозов, аденокарциномы молочной железы, нейробластом и некоторых других [36]. Эта зависимость связана с повышенной чувствительностью указанных новообразований к дефициту метионина. Это явление характеризуется неспособностью клеток ряда опухолей пролиферировать в присутствии его метаболического предшественника – гомоцистеина, в то время как на пролиферацию неопухолевых клеток эти условия не влияют [37, 38]. *In vitro* получены прямые доказательства того, что ограничение содержания метионина в рационе питания закономерно приводит к избирательной гибели клеток новообразования по сравнению с нормальными, что в комбинации с определенными химиопрепаратами рассматривается как многообещающая противоопухолевая стратегия [39, 40].

Известно, что цитруллин – аминокислота, вырабатываемая в основном энтероцитами тонкой кишки [41]. Вместе с тем, доказана высокая цитотоксичность многих, в том числе антибластомных, химиопрепаратов и лучевой терапии на слизистую оболочку ЖКТ [42]. Обнаруженный в нашем исследовании дефицит цитруллина сочетается с признаками альтерации слизистой оболочки тонкой кишки после цикла противоопухолевой терапии [43].

Заключение

Полученные в настоящем исследовании фактические данные свидетельствуют о закономерном повышении уровня ряда свободных аминокислот (аспарагиновой, глутаминовой, серина, пролина и тирозина) в сыворотке крови пациентов с гемобластомами. Это дает основания считать актуальными исследования эффективности антибластомной терапии с применением, например, диетологической депривации [44] указанных аминокислот в комплексном лечении гемобластозов. Устранение дисбаланса аминокислот у таких пациентов после достижения ими ремиссии может рассматриваться в качестве профилактики рецидива заболевания. В целом, для установления причин и последствий указанных выше особенностей обмена аминокислот у детей с гемобластомами, находящимися в длительной ремиссии, необходима тщательная оценка их метаболического гомеостаза.

Литература

(п.п. 1; 3–18; 20–26; 28–36; 38–40; 42; 43

см. References)

2. Тарханов А.А., Дорощев А.В., Ковальчук Л.А. Региональные особенности дисбаланса биогенных макро- и микроэлементов, и свободных аминокислот в сыворотке крови у женщин с доброкачественными заболеваниями молочных желез. *Вестник ОГУ*. 2011; 15: 136–40.
19. Борисенко О.А., Бушма М.И., Басалай О.Н., Радковец А.Ю. Биологическая роль глутатиона. *Медицинские новости*. 2019; 7(298): 3–8.
27. Байкова В.Н., Сотникова Е.Н., Дурнов Л.А., Раушенбах М.О. Значение нарушений обмена тирозина в развитии врожденных опухолей. 1991. Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/znachenie-narusheniy-obmena-tirozina-v-razvitiy-vrozhdennyh-opuholey> (Accessed 31 May 2022).
37. Покровский В.С., Давыдов Д.Ж., Ануфриева Н.В., Жданов Д.Д., Ревтович С.В., Морозова Е.А. и др. Нарушенный метаболизм метионина в злокачественных клетках - потенциальная мишень для противоопухолевой терапии. Клиническая онкогематология. *Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2017; 10(3): 324–32.
41. Быкова С.В., Сабельникова Е.А., Новиков А.А., Бабанова А.А., Бауло Е.В., Парфенов А.И. Роль неинвазивных маркеров повреждения энтероцитов и повышенной проницаемости в патогенезе целиакии. *Эффективная фармакотерапия*. 2021; 17(4): 68–75
44. Семенова В.В., Лисица Т.С., Наседкина Т.В. Роль клинической генетики в диагностике, лечении и профилактике онкологических заболеваний у пациентов детского возраста. *Педиатрический вестник Южного Урала*. 2020; 2: 59–69.
10. Tabe Y., Lorenzi P.L., Konopleva M. Amino acid metabolism in hematologic malignancies and the era of targeted therapy. *Blood*. 2019; 134(13): 1014–23.
11. Pokrovsky V.S., Chepikova O.E., Davydov D.Z., Zamyatin A.A., Lukashev A.N., Lukasheva E.V. Amino Acid Degrading Enzymes and their Application in Cancer Therapy. *Curr Med Chem*. 2019; 26(3): 446–64.
12. Salzer W., Bostrom B., Messinger Y., Perissinotti A.J., Marini B. Asparaginase activity levels and monitoring in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018; 59(8): 1797–806.
13. Freire D.A., Lisboa Magalhaes I.C., Tramontina Florean E.O.P., Florindo Guedes M.I. A Patent Review on the Use of L-Asparaginase in the Treatment of Acute Lymphocytic Leukemia. *Recent Adv Drug Deliv Formul*. 2021; 15(1): 37–45.
14. Weber D.D., Aminazdeh-Gohari S., Kofler B. Ketogenic diet in cancer therapy. *Aging*. 2018; 10(2): 164–5.
15. Steliarova-Foucher E., Colombet M., Ries L.A.G., Moreno F., Dolya A., Bray F., et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *Lancet Oncol*. 2017; 18(6): 719–31.
16. Kanarek N., Petrova B., Sabatini D.M. Dietary modifications for enhanced cancer therapy. *Nature*. 2020; 579(7800): 507–17.
17. Akins N.S., Nielson T.C., Le H.V. Inhibition of Glycolysis and Glutaminolysis: An Emerging Drug Discovery Approach to Combat Cancer. *Curr Top Med Chem*. 2018; 18(6):494–504.
18. Mates J.M., Campos-Sandoval J.A., de Los Santos-Jimenez J., Marquez J. Glutaminases regulate glutathione and oxidative stress in cancer. *Arch Toxicol*. 2020; 94(8): 2603–23.
19. Borisenok O.A., Bushma M.I., Basalaj O.N., Radkovec A.Ju. The biological role of glutathione. *Medicinskie novosti*. 2019; 7(298): 3–8. (in Russian)
20. Zhou C., Hu H., Zheng Z., Chen C., Li Y., Li B., et al. Association between GPX3 promoter methylation and malignant tumors: A meta-analysis. *Pathol Res Pract*. 2019; 215(7): 152443.
21. Kearns P.R., Pieters R., Rottier M.M., Pearson A.D., Hall A.G. Raised blast glutathione levels are associated with an increased risk of relapse in childhood acute lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001; 97(2): 393–8.
22. Maung Z.T., Hogarth L., Reid M.M., Proctor S.J., Hamilton P.J., Hall A.G. Raised intracellular glutathione levels correlate with in vitro resistance to cytotoxic drugs in leukaemic cells from patients with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1994; 8(9): 1487–91.
23. Garcia-Bermudez J., Williams R.T., Guarecuco R., Birsoy K. Targeting extracellular nutrient dependencies of cancer cells. *Mol Metab*. 2020; 33: 67–82.
24. Pavlova N.N., Hui S., Ghergurovich J.M., Fan J., Intlekofer A.M., White R.M., et al. As Extracellular glutamine levels decline, asparagine becomes an essential amino acid. *Cell Metab*. 2018; 27(2): 428–438.e5.
25. Kuo M.T., Chen H.H.W., Feun L.G., Savaraj N. Targeting the proline-glutamine-asparagine-arginine metabolic axis in amino acid starvation cancer therapy. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021; 14(1): 72.
26. Choi B.H., Coloff J.L. The Diverse Functions of Non-Essential Amino Acids in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(5): 675.
27. Bajkova V.N., Sotnikova E.N., Durnov L.A., Raushenbah M.O. The significance of tyrosine metabolism disorders in the development of congenital tumors. 1991. Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/znachenie-narusheniy-obmena-tirozina-v-razvitiy-vrozhdennyh-opuholey> (Accessed 31 May 2022). (in Russian)

References

1. Li M., Teater M.R., Hong J.Y., Park N.R., Duy C., Shen H., et al. Translational Activation of ATF4 through Mitochondrial Anaplerotic Metabolic Pathways Is Required for DLBCL Growth and Survival. *Blood Cancer Discov*. 2022; 3(1): 50–65.
2. Tarhanov A.A., Doroshchev A.V., Koval'chuk L.A. Regional features of the imbalance of biogenic macro- and microelements, and free amino acids in the blood serum of women with benign breast diseases. *Vestnik OGU*. 2011; 15: 136–40. (in Russian)
3. Jones C.L., Stevens B.M., D'Alessandro A., Reisz J.A., Culp-Hill R., Nemkov T., et al. Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells. *Cancer Cell*. 2018; 34(5): 724–40.
4. Ananieva E.A., Wilkinson A.C. Branched-chain amino acid metabolism in cancer. *Curr Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2018; 21(1): 64.
5. Wang Z., Xie Q., Zhou H., Zhang M., Shen J., Ju D. Amino Acid Degrading Enzymes and Autophagy in Cancer Therapy. *Front Pharmacol*. 2021; 11: 582587.
6. Endicott M., Jones M., Hull J. Amino acid metabolism as a therapeutic target in cancer: a review. *Amino Acids*. 2021; 53(8): 1169–79.
7. Vettore L., Westbrook R.L., Tennant D.A. New aspects of amino acid metabolism in cancer. *Br J. Cancer*. 2020; 122(2): 150–6.
8. Lukey M.J., Katt W.P., Cerione R.A. Targeting amino acid metabolism for cancer therapy. *Drug Discov Today*. 2017; 22(5): 796–804.
9. Fung M.K.L., Chan G.C. Drug-induced amino acid deprivation as strategy for cancer therapy. *J Hematol Oncol*. 2017; 10(1): 144.

28. Esteban-Villarrubia J., Soto-Castillo J.J., Pozas J., San Román-Gil M., Orejana-Martín I., Torres-Jiménez J., et al. Tyrosine Kinase Receptors in Oncology. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(22): 8529.
29. Taddei M.L., Pardella E., Pranzini E., Raugèi G., Paoli P. Role of tyrosine phosphorylation in modulating cancer cell metabolism. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2020; 1874(2): 188442.
30. Hunter T. The genesis of tyrosine phosphorylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 6(5): a020644.
31. Saraon P., Pathmanathan S., Snider J., Lyakisheva A., Wong V., Stagljar I. Receptor tyrosine kinases and cancer: oncogenic mechanisms and therapeutic approaches. *Oncogene.* 2021; 40(24): 4079-93.
32. Luciano L., Annunziata M., Attolico I., Di Raimondo F., Maggi A., Malato A., et al. The multi-tyrosine kinase inhibitor ponatinib for chronic myeloid leukemia: Real-world data. *Eur J Haematol.* 2020; 105(1): 3-15.
33. Chiaretti S., Messina M., Foa R. BCR/ABL1-like acute lymphoblastic leukemia: How to diagnose and treat? *Cancer.* 2019; 125(2): 194-204.
34. Poliakova M., Aebersold D.M., Zimmer Y., Medova M. The relevance of tyrosine kinase inhibitors for global metabolic pathways in cancer. *Mol Cancer.* 2018; 17(1): 27.
35. Sugimura T., Birnbaum S.M., Winitz M., et al. Quantitative nutritional studies with water-soluble, chemically defined diets. VIII. The forced feeding of diets each lacking in one essential amino acid. *Arch Biochem Biophys.* 1959; 81(2): 448-55.
36. Hoffman R.M., Stern P.H., Coalson D.W., Douglas W.C., Erbe R.W. Altered Methionine Metabolism in Cancer Cells. In: Hoffman, R. (eds) Methionine Dependence of Cancer and Aging. *Methods in Molecular Biology.* 2019; 1866: 13-26.
37. Pokrovskij V.S., Davydov D.Zh., Anufrieva N.V., Zhdanov D.D., Revtovich S.V., Morozova E.A., et al. Impaired methionine metabolism in malignant cells is a potential target for antitumor therapy. *Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika.* 2017; 10(3): 324-32. (In Russian)
38. Hoffman R.M. Is the Hoffman Effect for Methionine Overuse Analogous to the Warburg Effect for Glucose Overuse in Cancer? *Methods Mol Biol.* 2019; 1866: 273-8.
39. Chaturvedi S., Bertino J.R. Methods to Study the Role of Methionine-Restricted Diet and Methioninase in Cancer Growth Control. *Methods Mol Biol.* 2019; 1866: 1-12.
40. Kaiser P. Methionine Dependence of Cancer. *Biomolecules.* 2020; 10(4): 568.
41. Bykova S.V., Sabel'nikova E.A., Novikov A.A., Babanova A.A., Baulo E.V., Parfenov A.I. The role of noninvasive markers of enterocyte damage and increased permeability in the pathogenesis of celiac disease. *Effektivnaya farmakoterapiya.* 2021; 17(4): 68-75. (In Russian)
42. Ouaknine K.J., Helly de Tauriers P., Duménil C., Neveux N., Dumoulin J., Giraud V., et al. Role of antibiotic use, plasma citrulline and blood microbiome in advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab. *J Immunother Cancer.* 2019; 7(1): 176.
43. Barzal J.A., Szczylik C., Rzepecki P., Jaworska M., Anuszkowska E. Plasma citrulline level as a biomarker for cancer therapy-induced small bowel mucosal damage. *Acta Biochim Pol.* 2014; 61(4): 615-31.
44. Semenova V.V., Lisica T.S., Nasedkina T.V. The role of a clinical geneticist in the diagnosis, treatment and prevention of oncological diseases in children's patients. *Pediatricheskij vestnik Yuzhnogo Urala.* 2020; 2: 59-69. (In Russian)

Сведения об авторах:

Литвицкий Петр Францевич, доктор мед. наук, член-корр. РАН, проф., зав. каф. патофизиологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), e-mail: lisovikp@mail.ru;
Жуковская Елена Вячеславовна, доктор мед. наук, проф., зав. отделом изучения поздних эффектов противоопухолевой терапии лечебно-реабилитационного центра «Русское поле» НМИЦ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, e-mail: elena_zhukovskaya@mail.ru;
Карелин Александр Федорович, канд. мед. наук, гл. врач лечебно-реабилитационного центра «Русское поле» НМИЦ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, e-mail: alexander.karelin@fccho-moscow.ru;
Коробейникова Татьяна Викторовна, канд. тех. наук, науч. сотр. Института персонализированной онкологии Центра «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение», ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), e-mail: korobeynikova_t_v@staff.sechenov.ru;
Рахаев Дмитрий Сергеевич, студент ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), e-mail: rakhaevdmitriy@yandex.ru;
Гончаров Антон Павлович, студент ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), e-mail: gony280898@gmail.com

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Лебедева М.А.^{1,2}, Медведева Ю.С.², Баранов М.В.¹, Золотов Н.Н.³, Арутюнян А.В.⁴, Карганов М.Ю.^{1,2}

Особенности развития экспериментального инфаркта миокарда в течении месяца после действия моделированной микрогравитации

¹ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр космической медицины» ФМБА России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 23, к. 2;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8;

⁴ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» научно-исследовательский центр «Курчатовский Институт»

Введение. Во время космических полетов важную роль в изменении функционирования сердечно-сосудистой системы (ССС) играет микрогравитация, активирующая каскадные реакции со стороны всех систем организма, направленные на поддержание гомеостаза в качественно новых условиях. Действие микрогравитации может приводить к изменениям функциональной активности миокарда, снижению потребности ткани в кислороде и другим последствиям, вызывая декондиционирование ССС. Последнее проявляется уменьшением объема циркулирующей крови, снижением диастолического давления и ударного объема, изменением геометрии и массы сердца, что увеличивает риск развития сердечно-сосудистой патологии. **Цель** – исследование влияния моделированной микрогравитации на развитие и особенности течения экспериментального инфаркта миокарда у крыс на протяжении 4 нед наблюдений.

Методика. Исследование выполнено на 154 самцах крыс Wistar. Микрогравитацию моделировали методом двухнедельного антиортостатического вывешивания. Инфаркт миокарда воспроизводили двукратным (интервал 24 ч) подкожным введением изопротеренола («Sigma-Aldrich», China, доза 80 мг/кг). Часть животных через 1 сут выводили из эксперимента декапитированием для проведения гистологического исследования миокарда. У остальных крыс в течение 1 мес еженедельно анализировали изменения массы тела и миокарда, данные ЭКГ и лейкограммы. Определяли уровень сывороточного кортикостерона методом спектрофотометрии и субфракционного состава сыворотки крови методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС).

Результаты. Действие микрогравитации и последующая катехоламиновая нагрузка привели к более отсроченной нормализации массы тела, чем в группе без введения изопротеренола, и более длительному сохранению ЭКГ-изменений, характерных для изопротеренол-индуцированного инфаркта: отрицательного зубца Q, увеличения длительности интервала QTc и комплекса QRS. Для данной группы был характерен сдвиг автономного баланса в сторону симпатикотонии. В группах с инфарктом выявили увеличение индекса сдвига лейкоцитов крови через 1 нед и нормализацию лейкоцитарной формулы к концу 2-й нед наблюдений, повышенное содержание сывороточного кортикостерона в течение месяца. По данным ЛКС в опытных группах выявили анаболически-подобные сдвиги субфракционного состава сыворотки крови через 1 и 3 нед после воздействия.

Заключение. Развитие инфаркта миокарда после действия моделируемой микрогравитации характеризовалось более тяжелыми повреждениями ткани миокарда на ранних стадиях, более длительными изменениями электрической проводимости сердца и преобладанием симпатических влияний на сердечный ритм на поздних сроках эксперимента.

Ключевые слова: микрогравитация; изопротеренол-индуцированный инфаркт миокарда; ЭКГ; лазерная корреляционная спектроскопия

Для цитирования: Лебедева М.А., Медведева Ю.С., Баранов М.В., Золотов Н.Н., Арутюнян А.В., Карганов М.Ю. Особенности развития экспериментального инфаркта миокарда в течении месяца после действия моделированной микрогравитации. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(3): 34-44.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.34-44

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Карганов М.Ю., Баранов М.В.; сбор и обработка материала – Лебедева М.А., Медведева Ю.С., Золотов Н.Н., Арутюнян А.В.; подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка – Медведева Ю.С.; написание текста – Лебедева М.А., Медведева Ю.С.; редактирование – Карганов М.Ю. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Лебедева Марина Андреевна, e-mail: ma_lebedeva@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 13.06.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Lebedeva M.A.^{1,2}, Medvedeva Yu.S.², Baranov M.V.¹, Zolotov N.N.³, Arutyunyan A.V.⁴, Karganov M.Yu.^{1,2}

Peculiarities of experimental myocardial infarction development during one month after simulated microgravity

¹Federal Research and Clinical Center of Space Medicine, Gamalei St. 23, Bldg. 2, Moscow 123098, Russian Federation;

²Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation;

³Zakusov Institute of Pharmacology, Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation;

⁴Konstantinov Petersburg Institute of Nuclear Physics, National Research Center "Kurchatov Institute", Orlova Roshcha Microdistrict, 1, Gatchina 188300, Russian Federation

Background. During space flights, microgravity plays an important role in modifying functioning of the cardiovascular system (CVS) by activating cascade reactions of all body systems aimed at maintaining the homeostasis under qualitatively different conditions. The action of microgravity may change the functional activity of the myocardium, decrease the tissue oxygen demand, and cause other effects that result in CVS deconditioning. The deconditioning is evident as reduced volume of circulating blood, decreased diastolic pressure and stroke volume, and changes in the geometry and mass of the heart, which all increase the risk of cardiovascular diseases. **Aim.** To study the contribution of simulated microgravity to the development of experimental myocardial infarction in rats.

Methods. The study was performed on 154 male Wistar rats. Microgravity was simulated by 2-week hindlimb unloading (HU). Myocardial infarction (MI) was modeled by 2 administrations of isoproterenol (Sigma-Aldrich, China, 80 mg/kg, s.c.) with an interval of 24 h. One day later, a part of animals was used for a histological study of the myocardium. The rest of the rats were used for weekly measurements of the body weight, myocardial mass, ECG recording, leukogram analysis, serum corticosterone measurements, and analysis of the subfractional composition of blood serum by laser correlation spectroscopy (LCS).

Results. The action of microgravity followed by the catecholamine load led to a slower normalization of body weight than in the group without isoproterenol administration, and a longer preservation of ECG changes characteristic of isoproterenol-induced MI, including a negative Q wave and prolongations of the QTc interval and the QRS complex. This group was characterized by a shift in the autonomic balance towards sympathicotonia. The groups with MI were characterized by an increase in the index of blood leukocyte shift at one week, normalization of the leukocyte count by the end of the second week of observation, and an increase in the serum concentration of corticosterone at one month. The LCS study detected anabolic-like shifts in the subfractional composition of blood serum in the experimental groups 1 and 3 weeks after the exposure.

Conclusions. The development of MI after anti-orthostasis was characterized by more severe damage to the myocardial tissue at early stages, more prolonged changes in the cardiac electrical conduction, and predominance of sympathetic influences on the heart rhythm at late stages of the experiment.

Keywords: microgravity; isoproterenol-induced myocardial infarction; ECG; laser correlation spectroscopy

For citation: Lebedeva M.A., Medvedeva Yu.S., Baranov M.V., Zolotov N.N., Arutyunyan A.V., Karganov M.Yu. Peculiarities of experimental myocardial infarction development during one month after simulated microgravity. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(3): 34-44. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.34-44

Author's contribution: the concept and design of the study – Karganov M.Yu., Baranov M.V.; collection and processing of material – Lebedeva M.A., Medvedeva Yu.S., Zolotov N.N., Arutyunyan A.V.; preparing illustrative material, statistical processing – Medvedeva Yu.S.; writing a text – Lebedeva M.A., Medvedeva Yu.S.; editing – Karganov M.Yu. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

For correspondence: **Lebedeva M.A.**, PhD of Biological Sciences, Chief Researcher, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: ma_lebedeva@mail.ru

Information about the authors:

Lebedeva M.A., <https://orcid.org/0000-0002-4601-8762>

Medvedeva Yu.S., <https://orcid.org/0000-0003-0414-8427>

Baranov M.V., <https://orcid.org/0000-0002-6300-6392>

Zolotov N.N., <https://orcid.org/0000-0003-3528-4659>

Karganov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5862-8090>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 13.06.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Введение

Во время космического полета (КП) важную роль в изменении функционирования сердечно-сосудистой системы (ССС) играет снятие гравитационной нагрузки – микрогравитация, которая приводит к перераспределению жидких сред организма в краниальном направлении, активируя каскадные реакции со стороны всех систем организма, направленные на поддержание гомеостаза в качественно иных условиях, вызывая рост напряжения этих систем, что повышает вероятность развития дизрегуляторных нарушений. Особое значение в формировании адаптационно-компенсаторных реакций принадлежит изменениям со стороны ССС и ее нейроэндокринной регуляции, вызывающим декондиционирование ССС, проявляющееся неспособностью поддерживать адекватное артериальное давление, уменьшением объема циркулирующей крови, снижением диастолического давления и ударного объема, изменением геометрии и массы сердца, дисфункцией барорецепторов, что может приводить к ортостатической неустойчивости и другим негативным последствиям в постполетный период [1].

Увеличение продолжительности КП приводит к развитию более тяжелого острого гравитационного стресса при возвращении к земной гравитации. По немногочисленным результатам экспериментальных работ с имитацией эффектов микрогравитации, можно сделать предположение о существенных особенностях развития и течения различных заболеваний в условиях КП и в послеполетный период [2]. Воздействие микрогравитации может повышать риск развития сердечно-сосудистой патологии [3] и нарушать механизмы кардиопротекции [4], опубликованы доказательства повышенной смертности от сердечно-сосудистых заболеваний у астронавтов в послеполетный период [5]. В условиях микрогравитации были выявлены различные изменения массы и объема миокарда, снижение метаболических потребностей, величины сердечного выброса, что приводило к изменениям функциональной активности миокарда [6].

Цель исследования – изучение влияния моделированной микрогравитации на развитие и особенности течения экспериментального инфаркта миокарда у крыс на протяжении 4 нед наблюдений.

Методика

Работа выполнена на 154 трехмесячных крысах-самцах Wistar (питомник ФГБНУ «НИИОПП»: система «Меркурий» № RU 1487336), массой 263 ± 20 г. Животные были разделены на 4 группы: Контроль – интактная группа крыс, ($n=38$); АОВ – группа, подвергшаяся двухнедельному антиортостатическому вывешиванию, $n=40$; группа Iso – крысы с изопротеренол-индуцированным инфарктом миокарда ($n=39$); АОВ+Iso, группа с экспериментальным ИМ после двухнедельного антиортостатического вывешивания ($n=37$).

Для моделирования эффектов микрогравитации осуществляли вывешивание животных в антиортостатическом положении (АОВ) под наклоном -30° в течение 2 нед. Развитие диффузно-очагового ИМ крыс моделировали путем введения агониста β -адренорецепторов изопротеренола («Sigma-Aldrich», China) подкожно в дозе 80 мг/кг по схеме: две инъекции с перерывом в 24 ч. Массу тела крыс измеряли до воздействия и далее еженедельно. За 2 ч до взвешивания крыс лишали корма. ЭКГ крыс (наркоз Золетил-100, 55 мг/кг, в/бр) регистрировали в стандартных отведениях от конечностей на компьютерном электрокардиографе «Полиспектр-8/В» на 1-й, 2-й и 4-й нед эксперимента. Спектральный анализ variability сердечного ритма (BCP) проводили в следующих диапазонах: VLF 0,06-0,2, LF 0,2-0,8, HF 0,8-3,5 [7]. После регистрации ЭКГ осуществляли взятие крови из хвостовой вены. Относительное количество лейкоцитов крови оценивали стандартным методом, по результатам лейкограммы вычисляли индекс сдвига лейкоцитов крови (ИСЛК). Эвтаназию осуществляли еженедельно путем декапитации части наркотизированных животных с последующим забором крови для проведения лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) [8] на 1-й, 3-й и 4-й нед, для измерения содержания сывороточного кортикостерона (КС), и выделением миокарда для определения его массы. В течение 1-х сут после завершения моделирования часть животных была подвергнута эвтаназии для проведения гистологического исследования ткани миокарда и измерения содержания лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови. Представленные методики подробно описаны ранее [9–11]. Определенные активности ЛДГ в сыворотке крови крыс прово-

дили в кинетическом режиме при длине волны 340 нм на спектрофотометре DU-50 (Beckman-Coulter, США).

Этическая экспертиза исследования проведена Комиссией по биомедицинской этике НИИ космической медицины ФНKC ФМБА России (протокол №3 от 16 апреля 2019 г).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «Statistica. 8.0». Применяли непараметрический анализ множественного сравнения (Z^2 -критерий), позволяющий определить значимые различия по уровню распределения признака между тремя и более группами. Для оценки статистической значимости различий между долями выбора применяли точный критерий Фишера. Основные данные представлены в виде медиан и квартилей (Q25; Q75). Данные по ЛКС представлены в виде средних значений.

Результаты

В 1-е сут после завершения моделирования микрогравитации в миокарде крыс (группа АОВ) отмечается неравномерность кровенаполнения, обнаруживаются нерезко выраженные признаки волнообразной деформации мышечных волокон, что возможно является отражением нарушения ритма сердечных сокращений, и несколько увеличивается площадь поперечного сечения кардио-миоцитов (КМЦ) (рис. 1, А, Б; рис. 3, А).

В группах с введением изопротеренола присутствовали специфические диффузно-очаговые изменения. Так, в группе Iso (рис. 2, А, Б) встречались участки клеток с признаками выраженной белковой дистрофии, связанной с нарушением проницаемости сосудистой стенки, и субтотальной умеренно-выраженной гипертрофии, КМЦ в состоянии некробиоза, волнообраз-

ную деформацию мышечных волокон, контрактуры, диффузно расположенные немногочисленные клетки мезенхимального и миелоидного происхождения с преобладанием первых (рис. 3, Б). Эндотелий сосудов иногда имел признаки повреждения в виде набухания клеток. В просвете крупных сосудов наблюдали скопление большого количества эритроцитов в состоянии агрегации, количество капилляров было увеличено.

Морфологическая картина миокарда группы АОВ+Iso показала более тяжелую степень повреждения ткани (рис. 2, В, Г), чем в группе Iso. Фиксировали более выраженные дистрофию и гипертрофию клеток, умеренный интерстициальный отек и обширную лейкоцитарную инфильтрацию (рис. 3, Б), локализирующуюся рядом с очагами КМЦ в состоянии дистрофии, некробиоза, фрагментации и диссоциации. Сохранена характерная особенность для групп после АОВ – увеличение площади поперечного сечения КМЦ (рис. 3, А). Капилляры находились в состоянии резкого полнокровия, их число увеличено, наблюдали плазматическое пропитывание стенки артерий. Еще одним доказательством развития ИМ было увеличение одного из маркеров тканевой деструкции – ЛДГ в крови крыс двух групп после введения изопротеренола (рис. 3, В).

Морфологические изменения, зафиксированные через 1 сут после завершения воздействия, были наиболее выражены в группе АОВ+Iso, что указывает на большую уязвимость ткани сердца к катехоламиново-му стрессу после АОВ. В ранее проведенной нами работе [10] было показано, что изопротеренол-индуцированный ИМ после моделирования микрогравитации приводит к более выраженным нарушениям электри-

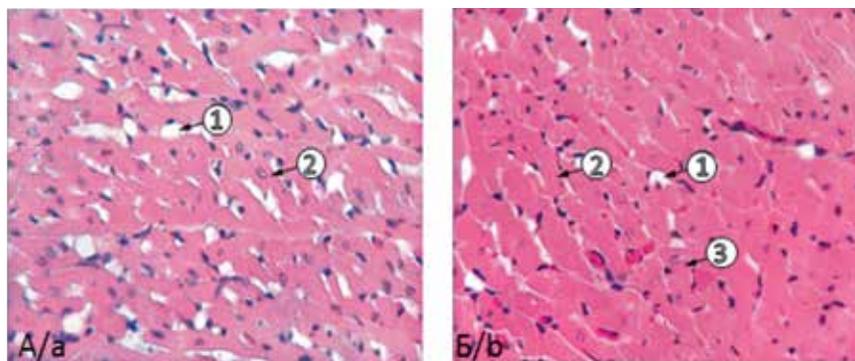


Рис. 1. Репрезентативные микрофотографии срезов ткани миокарда. Окраска гематоксилин и эозин, $\times 400$. А – группа контроль. Б – группа АОВ. 1 – капилляр, 2 – КМЦ, 3 – большой КМЦ.

Fig. 1. Representative photomicrographs of sections of myocardial tissue, stained with hematoxylin and eosin, $\times 400$. a – control group. b – HU group. 1 – capillary, 2 – cardiomyocyte, 3 – large CMC.

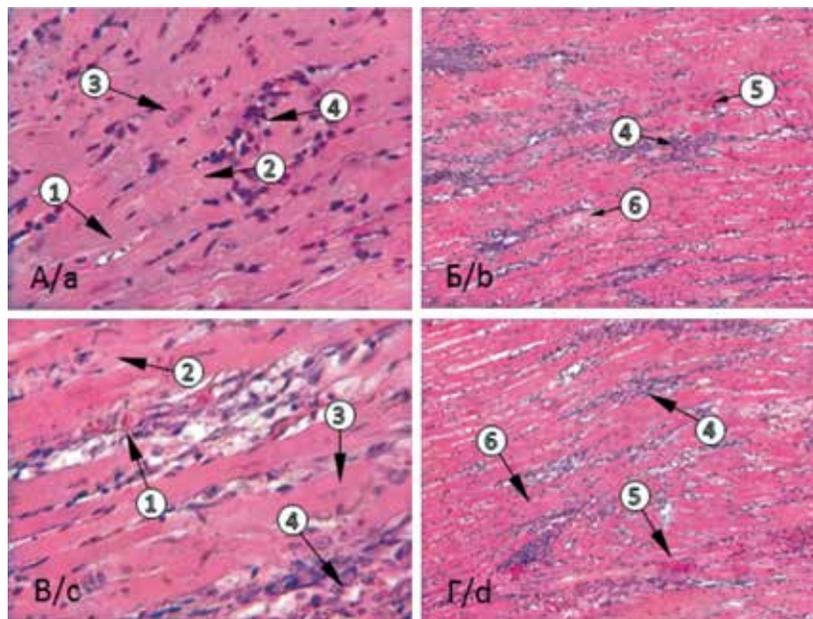


Рис. 2. Репрезентативные микрофотографии срезов ткани миокарда групп с ИМ. Окраска гематоксилин и эозин. А – группа Iso, ×400; Б – группа Iso, ×100; В – группа АОВ+Iso, ×400; Г – группа АОВ+Iso, ×100. 1 – капилляры в состоянии резкого кровенаполнения, 2 – дистрофия КМЦ, 3 – гипертрофия КМЦ, 4 – лейкоцитарная инфильтрация 5 – участок контрактуры, 6 – КМЦ в состоянии некробиоза.

Fig. 2. Representative photomicrographs of myocardial tissue sections of groups with MI, stained with hematoxylin and eosin stain. а –Iso group, ×400. b –Iso group, ×100. с – HU+Iso group, ×400. d – HU+Iso group, ×100. 1 – capillaries in a state of sharp blood filling, 2 – CMC dystrophy, 3 – CMC hypertrophy, 4 – leukocytic infiltration, 5 – contracture site, 6 – CMC in a state of necrobiosis.

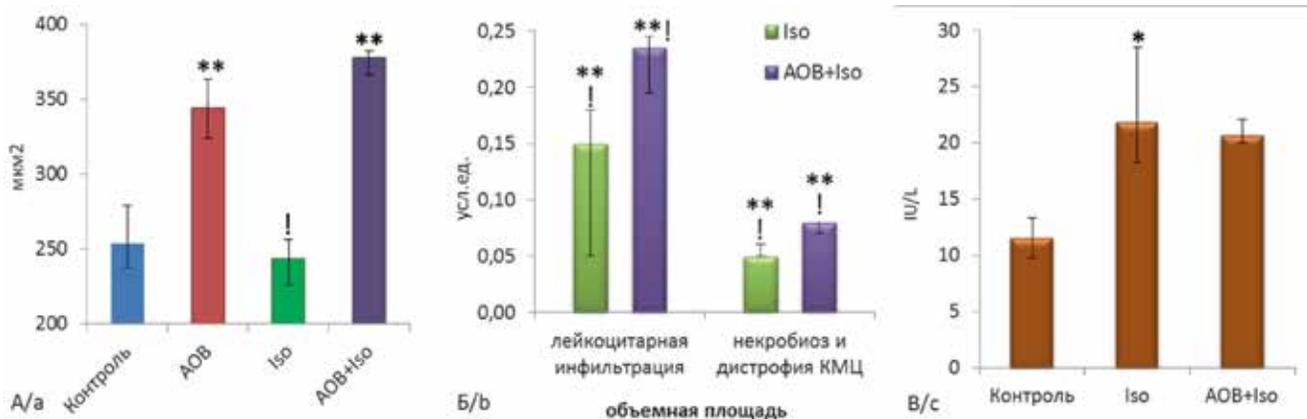


Рис. 3. Изменения морфометрических показателей и ЛДГ на ранних сроках. А – средняя площадь сечения КМЦ. Б – объемные площади лейкоцитарной инфильтрации и поврежденных КМЦ. В – концентрация ЛДГ в сыворотке крови. Количество животных: А-Б: Контроль (n=13), АОВ (n=10), Iso (n=13), АОВ+Iso (n=4); В: Контроль (n=5), Iso (n=4), АОВ+Iso (n=2). *p<0,05, **p<0,01 – сравнение с группой Контроль; !p<0,01 – сравнение с группой АОВ, Z'-критерий.

Fig. 3. Changes in morphometric parameters and LDH in the early stages. а – CMC’s average cross-sectional area. б – volumetric areas of leukocyte infiltration and damaged CMC. с – LDH concentration in blood serum. Number of animals: А-В: Control (n=13), HU (n=10), Iso (n=13), HU+Iso (n=4); С: Control (n=5), Iso (n=4), HU+Iso (n=2). *p<0.05, **p<0.01 – comparison with the Control group;

!p<0.01 – comparison with the HU group, Z'-test.

ческой проводимости миокарда на ранних сроках, что подтверждают данные проведенного гистологического исследования.

На рис. 4 представлена динамика изменения массы тела крыс экспериментальных групп в течение 4 нед. После АОВ наблюдали восстановление массы тела

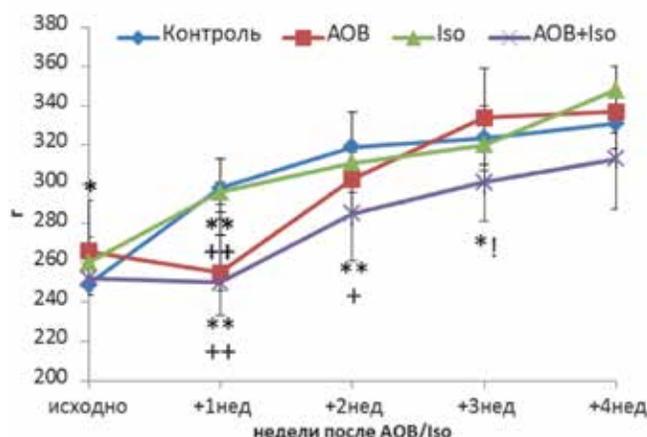


Рис. 4. Изменения массы тела крыс (г) в динамике. Количество животных: Контроль: исходно, 1-4 нед (n=29; 27; 21; 14; 17), AOB: исходно, 1-4 нед (n=30; 24; 16; 3; 13), Iso: исходно, 1-4 нед (n=29; 22; 17; 9; 7), AOB+Iso: исходно, 1-4 нед (n=30; 27; 21; 21; 13). *p<0,05, **p<0,001 – сравнение с группой Контроль; !p<0,05 – сравнение с группой AOB; +p<0,05, ++p<0,001 – сравнение с группой Iso, Z'- критерий.

Fig. 4. Changes in rats body weight (g) in dynamics. Number of animals: Control: initial, 1-4 weeks (n=29; 27; 21; 14; 17), HU: initial, 1-4 weeks (n=30; 24; 16; 3; 13), Iso: initial, 1-4 weeks (n=29; 22; 17; 9; 7), HU+Iso: initial, 1-4 weeks (n=30; 27; 21; 21; 13). *p<0.05, **p<0.001 – comparison with the Control group; !p<0.05 – comparison with the HU group; +p<0.05, ++p<0.001 – comparison with the Iso group, Z'-test.

крыс до контрольных значений к 2-й нед, в группе AOB+Iso – только к 4-й нед. Введение изопротеренола на изменение массы тела животных без AOB значительно не повлияло. Снижение массы фиксируют после КП [12] и при моделировании эффектов микрогравитации как у людей [13], так и у лабораторных животных [14], связывая данное изменение с потерей костной, мышечной, жировой массы, отрицательным водным балансом, изменением метаболизма.

Наиболее показательные результаты, полученные при анализе ЭКГ, представлены на рис. 5. В группах Iso и AOB+Iso наблюдали увеличение продолжительности интервала QTс (рис. 5, А) после введения изопротеренола: в группе Iso через 2 нед, и в течение 2 нед в группе AOB+Iso. Уширение комплекса QRS (рис. 5, Б) регистрировали в группе Iso через 2 нед, в группе AOB+Iso – тенденцию к такому изменению через 1 мес после развития экспериментального ИМ. В обеих группах с изопротеренол-индуцированным ИМ наблюдали снижение ЧСС (рис. 5, В), при этом в группе крыс AOB+Iso на более отдаленных сроках (до 1 мес), чем в группе Iso (2 нед).

В течение 1 мес выявляли аритмии различного генеза и появление отрицательного зубца Q в одном из трех стандартных отведений (табл. 1). Через 2 нед

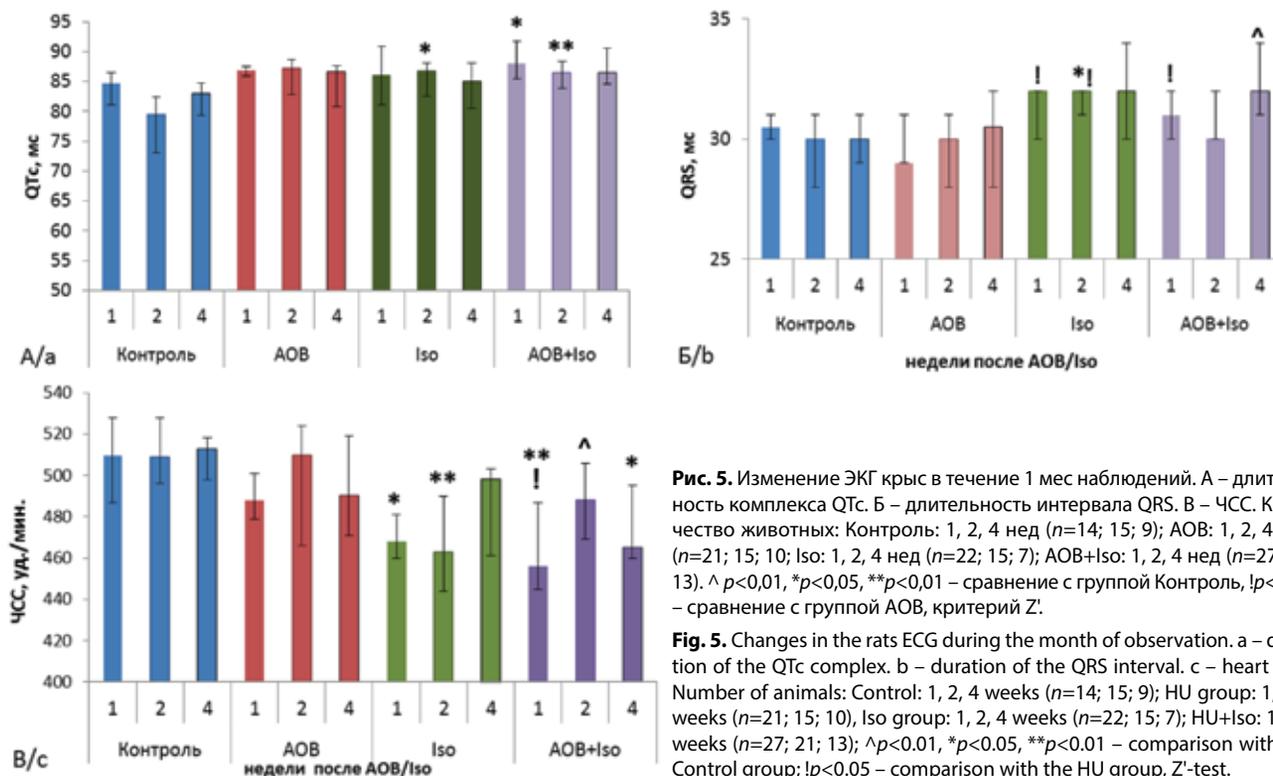


Рис. 5. Изменение ЭКГ крыс в течение 1 мес наблюдений. А – длительность комплекса QTс. Б – длительность интервала QRS. В – ЧСС. Количество животных: Контроль: 1, 2, 4 нед (n=14; 15; 9); AOB: 1, 2, 4 нед (n=21; 15; 10); Iso: 1, 2, 4 нед (n=22; 15; 7); AOB+Iso: 1, 2, 4 нед (n=27; 21; 13). ^ p<0,01, *p<0,05, **p<0,01 – сравнение с группой Контроль, !p<0,05 – сравнение с группой AOB, критерий Z'.

Fig. 5. Changes in the rats ECG during the month of observation. a – duration of the QTc complex. b – duration of the QRS interval. c – heart rate. Number of animals: Control: 1, 2, 4 weeks (n=14; 15; 9); HU group: 1, 2, 4 weeks (n=21; 15; 10); Iso group: 1, 2, 4 weeks (n=22; 15; 7); HU+Iso: 1, 2, 4 weeks (n=27; 21; 13); ^p<0.01, *p<0.05, **p<0.01 – comparison with the Control group; !p<0.05 – comparison with the HU group, Z'-test.

было обнаружено статистически значимое увеличение (в %) частоты развития аритмий в группе АОВ. В группах Iso и АОВ+Iso регистрировали увеличение встречаемости аритмий с течением времени, достигавшего к 4-й нед стойкой тенденции, как и в случае возникновения отрицательного зубца Q.

Увеличение длительности интервала QTс и комплекса QRS, выявляющиеся при нарушении распространения возбуждения в желудочках, и возникновение отрицательного зубца Q, отражающего наличие поврежденных участков ткани миокарда [15], характерны для изопротеренол-индуцированного ИМ и могли увеличивать частоту появления аритмий, наблюдаемых нами через месяц. Введение большой дозы неселективного адреномиметика приводило к отрицательному хронотропному эффекту вследствие нарушения электрической проводимости миокарда [16]. Таким образом, мы видим потенцирование эффекта изопротеренола в группе с сочетанным действием АОВ+Iso, с удлинением эффекта по времени, но без увеличения степени нарушений PQRS-комплекса. Масса миокарда крыс опытных групп не имела отличий от контрольных значений.

На данный момент не сложилось однозначного представления о механизмах деятельности автономной нервной системы в ходе КП и после приземления [17]. У экспериментальных животных действие моделированной микрогравитации вызывало тахикардию и дисфункцию барорефлекса [18]. Другие исследователи предположили, что микрогравитация вызывает состояние повышенной активности блуждающего нерва [19]. В наших исследованиях обнаружено повышение высокочастотных колебаний через 1 нед после окончания «вывешивания» в группе АОВ (рис. 6, А)

что может отражать компенсаторное увеличение вклада вагусной составляющей в структуре спектра ВСР. Через 2 нед в группах после АОВ регистрировали повышение уровня мощности волн VLF (рис. 6, А) и снижение относительного уровня активности парасимпатического звена вегетативной регуляции, достигающего статистической значимости в группе АОВ+Iso (рис. 6, Б), что может быть связано с активацией гуморально-метаболических механизмов [13]. Дальнейшие изменения автономной регуляции сердечного ритма крыс, подвергшихся влиянию микрогравитации и катехоламиновой нагрузки, были направлены в сторону повышения симпатической активности, демонстрирующие такую тенденцию в группе АОВ и достигающие уровня статистической значимости в группе АОВ+Iso к 4-й нед наблюдений (рис. 6, А, Б). На добровольцах при семисуточной сухой иммерсии были обнаружены изменения вегетативной регуляции, которые проявлялись в росте активности симпатического звена и снижении функционального резерва регуляторных систем [20]. Во время и после действия микрогравитации наблюдают разнонаправленные изменения вегетативных показателей. Д. Экберг и соавт. [21] считают, что КП активирует длительные симпатические и парасимпатические нейропластические изменения. Хотя изопротеренол и не оказал значимого влияния на показатели спектрального анализа ВСР, именно в группе АОВ+Iso, через месяц наблюдений было обнаружено повышение вклада низкочастотного компонента при одновременном снижении высокочастотного компонента спектра ВСР, приводящем к сдвигу автономного баланса в сторону симпатикотонии (рис. 6, В).

Таблица 1/Table 1

Частота (в %) развития аритмий и появление отрицательного зубца Q
Frequency (%) of development of arrhythmias and negative Q wave appearance

Недели weeks	1			2			4		
	АОВ	Iso	АОВ+Iso	АОВ	Iso	АОВ+Iso	АОВ	Iso	АОВ+Iso
Аритмии arrhythmias	10	9	11	36*	13	19	0	29^	23 ^
Q (<-0,02)	0	14	7	0	20	19	0	29^	23 ^

Примечание. В группе Контроль аритмии и отрицательный зубец Q не зафиксированы. Количество животных: Контроль 1, 2, 4 нед (n=14; 15; 19); АОВ: 1, 2, 4 нед (n=21; 15; 10); Iso: 1, 2, 4 нед (n=22; 15; 7); АОВ+Iso: 1, 2, 4 нед (n=27; 21; 13); ^p<0,1, *p<0,05 – сравнение с группой Контроль, F-критерий.

Note. Arrhythmias and negative Q wave were not found in the Control group. Number of animals: Control: 1, 2, 4 weeks (n=14; 15; 19); HU: 1, 2, 4 weeks (n=21; 15; 10); Iso: 1, 2, 4 weeks (n=22; 15; 7); HU+Iso: 1, 2, 4 weeks (n=27; 21; 13); ^p<0.1, *p<0.05 – comparison with the Control group, F-test.

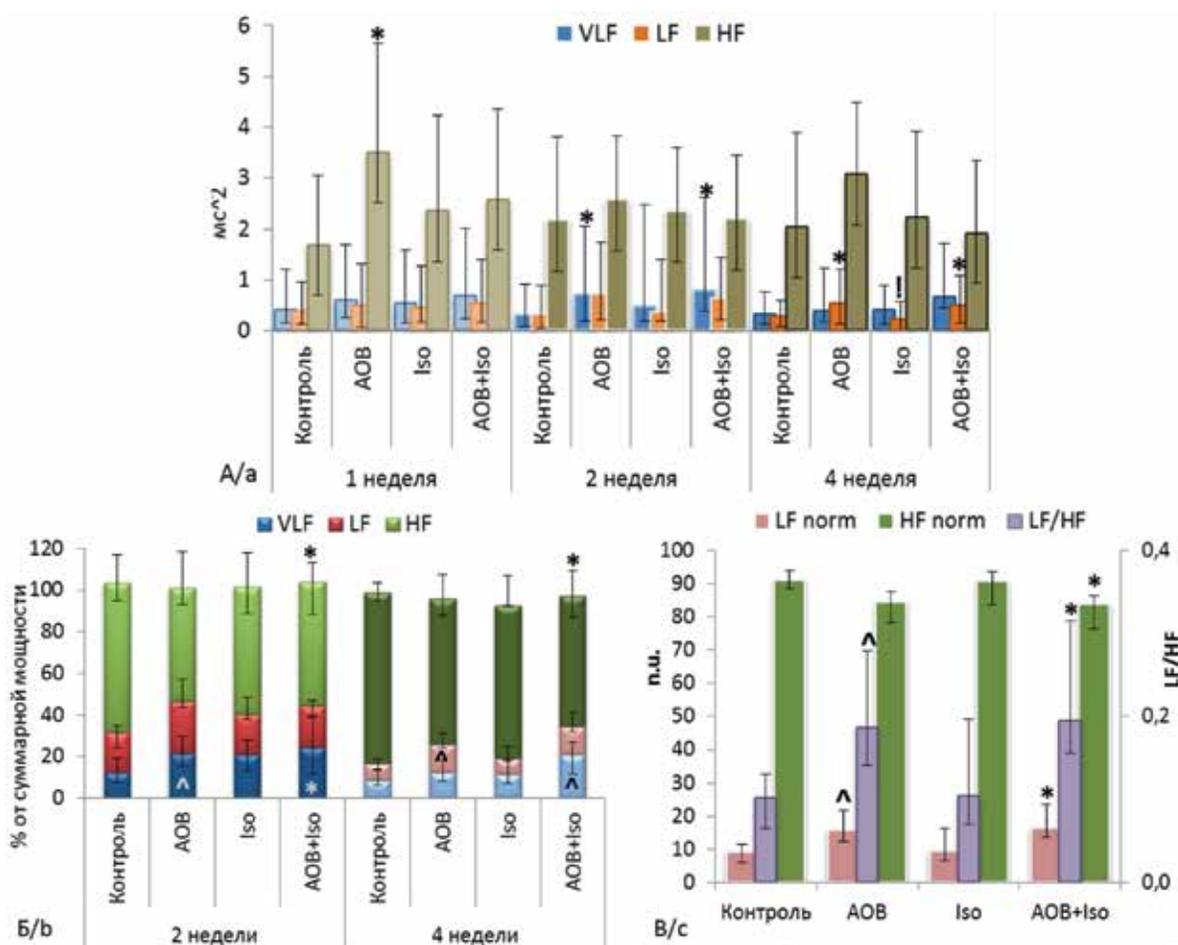


Рис. 6. Изменение спектральных показателей variability сердечного ритма. А – абсолютные значения. Б – относительные значения. В – нормализованные единицы и индекс вегетативного баланса через 4 нед. Количество животных: Контроль: 1, 2, 4 нед (n=12; 15; 8); АОВ: 1, 2, 4 нед (n=15; 14; 10); Iso: 1, 2, 4 нед (n=21; 15; 5); АОВ+Iso: 1, 2, 4 нед (n=25; 19; 12); $\wedge p < 0,1$, $*p < 0,05$ – сравнение с группой Контроль, $!p < 0,05$ – сравнение с группой АОВ, Z'-критерий.

Fig. 6. Changes in the spectral parameters of heart rate variability. a – absolute values. b – relative values. c – normalized units and autonomic balance index after 4 weeks. Animal number: Control: 1, 2, 4 weeks (n=12; 15; 8); HU: 1, 2, 4 weeks (n=15; 14; 10); Iso: 1, 2, 4 weeks (n= 21; 15; 5); HU+Iso: 1, 2, 4 weeks (n=25; 19; 12); $\wedge p < 0.1$, $*p < 0.05$ – comparison with the Control group, $!p < 0.05$ – comparison with the HU group, Z'-test.

Действие микрогравитации и ее моделирование могут приводить к изменению иммунологической реактивности организма, о чем свидетельствует увеличение ИСЛК, развитию временной дисрегуляционной патологии крови в сторону активации провоспалительного звена иммунитета [22], при котором наблюдают лимфопению и нейтрофилез [11]. В группах с изопротеренол-индуцированным ИМ наблюдали схожие изменения, которые привели к увеличению ИСЛК (табл. 2), их нивелирование происходило быстрее, чем в группе АОВ. Такая нормализация клеточного состава крови, после подъема нейтрофилов крови в течение суток, может быть мнимой. После выхода в кровеносное русло большого количества нейтрофилов происходит миграция иммунных кле-

ток в очаг воспаления, к зонам некроза миокарда, с чем и может быть связано снижение количества нейтрофилов в периферической крови. И все же, нормализацию процентного содержания лейкоцитов крови относят к положительной динамике, подразумевающей минимальный риск развития осложнений после ИМ [23].

Стрессогенные факторы, наряду с развитием патологического процесса в организме, активируют синтез КС, основного гормона стресса крыс. В группе АОВ наблюдали повышение уровня сывороточного КС на ранних сроках с нормализацией к 2-й нед [10]. Введение изопротеренола приводило к нарастанию уровня гормона в течение 1 мес в опытных группах (рис. 7), что может рассматриваться как неблагоприятный прогно-

стический признак ИМ. Длительное повышение КС увеличивает синтез эндогенных катехоламинов, артериальное давление и частоту развития аритмий, может нарушать микроциркуляцию и репаративные процессы в миокарде, вызывать иммунодепрессию [24].

На ранних сроках, после моделирования экспериментального ИМ, методом ЛКС фиксировали катболическиподобные сдвиги сывороточного гомеостаза, свидетельствующие о наличии воспалительных, дистрофических и некротических процессов.

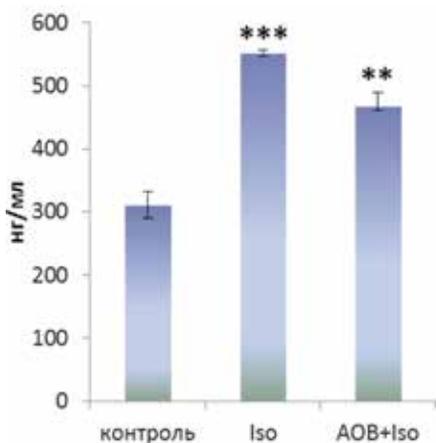


Рис. 7. Уровень кортикостерона в сыворотке крови крыс через 1 мес после ИМ. Группы: контроль (n=12), Iso (n=4), AOB+Iso (n=7); ***p<0,001, **p<0,01 – сравнение с группой Контроль, Z'-критерий.

Fig. 7. The level of corticosterone in the rats blood serum in 1 month after MI. Groups: Control (n=12), Iso (n=4), HU+Iso (n=7); ***p<0.001, **p<0.01 – comparison with the Control group, Z'-test.

Моделирование микрогравитации приводило к увеличению процентного вклада в светорассеяние как малых, так и крупных частиц сыворотки крови [10]. В дальнейшем происходило накопление доли более крупных частиц: через 1 нед (рис. 8, А) в группе АОВ фиксировали сдвиг субфракционного состава сыворотки крови в сторону нарастания процента частиц радиусом 122-300 нм, в группе Iso – около 165 нм, в группе АОВ+Iso – 67-122 нм. Через 3 нед (рис. 8, Б) в данной группе выявили сдвиг вправо с увеличением процентного содержания частиц радиусом 91-165 нм. В группах АОВ и Iso был увеличен процентный вклад частиц в близком диапазоне 67-165 нм. Факторы КП [25], как и моделирование эффектов микрогравитации [22], приводят к аналогичным изменениям уровня определенных плазматических белков крови, как и при развитии некоторых патологий ССС. Через 4 нед гомеостатические сдвиги сыворотки крови были нормализованы и не имели значимых различий между группами. Схожие по направленности гомеостатические сдвиги были зафиксированы при моделировании ИМ путем окклюзии левой коронарной артерии [9]. Антиортостаз и последующий гравитационный стресс влияют на состав белков крови на ранних сроках реадaptации, направленных на активацию системы комплемента, антипротеолиза, прооксидативной системы, системы свертывания крови [22], что и могло привести к изменению субфракционного состава сыворотки крови и образованию супрамолекулярных полимерных комплексов через 1 и 3 нед после АОВ. Преобладание частиц радиусом 80-100 нм

Таблица 2/ Table 2

Изменение лейкоцитарной формулы крови крыс через 1 неделю после ИМ

Leukocyte blood count change in 1 week after MI

Показатели/ Indicators	Контроль	Iso	AOB+Iso
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	77,5 [75;80]	71,5 [60;75]	62,0** [57;67]
Нейтрофилы, % Neutrophils, %	17,5 [16;20,5]	25,3 [22;36,5]	27,5 [20;31]
Моноциты, % Monocytes, %	3,5 [2,5;5,5]	1,0* [0;2]	6,5 [5;8]
Эозинофилы, % Eosinophils, %	1,0 [0,5;2,5]	2,0 [1,5;5]	3,0 [1;3,5]
Индекс сдвига лейкоцитов крови (ИСЛК) Blood Leukocyte Shift Index (BSLI)	0,23 [0,22;0,26]	0,40* [0,32;0,67]	0,44^ [0,3;0,47]

Примечание. Количество животных: Контроль (n=13), Iso (n=6), AOB+Iso (n=7); ^p<0,1, *p<0,05, **p<0,01 – сравнение с группой Контроль, критерий Z'. Данные представлены в виде медиан с межквартильным размахом [Q25;Q75].

Note. Number of animals: Control (n=13), Iso (n=6), HU+Iso (n=7); ^p<0.1, *p<0.05, **p<0.01 – comparison with group Control, Z'-test. Data are presented as medians with an interquartile range [Q25;Q75].

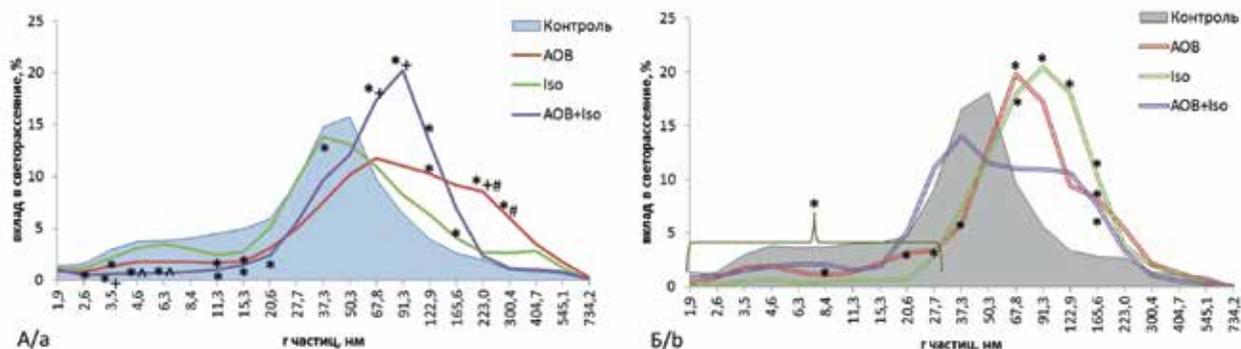


Рис. 8. Изменения субфракционного состава сыворотки крови крыс. А – через 1 нед. Б – через 3 нед. Количество животных: Контроль: 1, 3 нед ($n=10; 14$); AOB: 1, 3 нед ($n=11; 6$); Iso: 1, 3 нед ($n=11; 5$); AOB+Iso: 1, 3 нед ($n=9; 8$); * $p<0,05$ – сравнение с группой Контроль, + $p<0,05$ – сравнение с группой Iso, # $p<0,05$ – сравнение с группой AOB+Iso, Z'-критерий.

Fig. 8. Subfractional composition of the rats blood serum changes. a – in 1 week. b – in 3 weeks. Number of animals: Control: 1, 3 weeks ($n=10; 14$); HU: 1, 3 weeks ($n=11; 6$); Iso: 1, 3 weeks ($n=11; 5$); HU+Iso: 1, 3 weeks ($n=9; 8$); * $p<0.05$ – comparison with the Control group, + $p<0.05$ – comparison with the Iso group, # $p<0.05$ – comparison with the HU+Iso group, Z'-test.

может быть следствием выхода в кровь частиц нуклеопротеинов в результате деструкции клеток, появление доли высокомолекулярных фракций (165–200 нм) может быть связано с развитием воспаления, активирующего синтез цитокинов и образование аутоантител [8] или с увеличенным синтезом белков, вызывающих анаболическиподобный сдвиг субфракционного состава сыворотки крови.

Выводы:

1. Морфологические повреждения миокарда, зафиксированные на ранних сроках, были наиболее выражены в группе с ИМ после антиортостатического вывешивания.

2. Моделирование микрогравитации с последующей катехоламиновой нагрузкой характеризовалось отсроченной нормализацией массы тела.

3. В группах с изопротеренол-индуцированным ИМ наблюдали увеличение продолжительности интервала QTc и снижение ЧСС, с более длительным эффектом в группе после антиортостатического вывешивания.

4. В группе с воздействием микрогравитации и изопротеренола через месяц наблюдений был обнаружен сдвиг автономного баланса в сторону симпатикотонии.

5. Введение изопротеренола крысам двух опытных групп привело к повышению уровня кортикостерона в сыворотке крови в течение 1 мес.

6. Лазерная корреляционная спектроскопия позволила выявить в опытных группах анаболическиподобные сдвиги субфракционного состава сыворотки крови через 1 и 3 недели после воздействия.

Литература

(п.п. 1–7; 14–19; 21 см. References)

- Бажора Ю.И., Носкин Л.А. *Лазерная корреляционная спектроскопия в медицине: Монография*. Одесса: «Друк», 2002.
- Лебедева М.А., Медведева Ю.С., Алчинова И.Б., Полякова М.В., Яковенко Е.Н., Арутюнян А.В. и др. Молекулярные корреляты острого инфаркта миокарда в эксперименте и клинике. *Патогенез*. 2018; 16(3): 50–6.
- Лебедева М.А., Медведева Ю.С., Золотов Н.Н., Баранов М.В., Карганов М.Ю. Ранние эффекты действия моделированной микрогравитации на развитие экспериментального инфаркта миокарда. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2020; 22(1): 91–103.
- Лебедева М.А., Медведева Ю.С., Баранов М.В., Арутюнян А.В., Золотов Н.Н., Карганов М.Ю. Оценка отсроченных эффектов моделируемых факторов космического полета. *Патогенез*. 2021; 19(1): 37–49.
- Баранов В.М., Катунцев В.П., Баранов М.В., Шпаков А.В., Тарасенков Г.Г. Вызовы космической медицине при освоении человеком Луны: риски, адаптация, здоровье, работоспособность. *Ульяновский медико-биологический журнал*. 2018; 3: 109–23.
- Томиловская Е.С., Рукавишников И.В., Амирова Л.Е., Шигуева Т.А., Савеко А.А., Китов В.В. и др. 21-суточная «сухая» иммерсия: особенности проведения и основные итоги. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2020; 54(4): 5–14.
- Ларина И.М., Баевский Р.М., Пастушкова Л.Х., Новоселова Н.М., Кусто М.-А., Ешманова А.К. и др. Взаимосвязь между изменениями водно-электролитного баланса и реакциями сердечно-сосудистой системы в эксперименте с 7-суточной «сухой» иммерсией. *Физиология человека*. 2011; 37(5): 100–7.
- Ларина И.М., Пастушкова Л.Х., Гончарова А.Г., Васильева Г.Ю., Каширина Д.Н., Колотева М.И. и др. Направленность процессов, связанных с достоверно изменяющимися белками протеома крови, в условиях 21-суточной «сухой» иммерсии. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2020; 54(4): 93–100.
- Башигов Х.А., Сайфутдинов Р.Г. Лейкоцитоз при инфаркте миокарда. *Казанский медицинский журнал*. 2010; 91(3): 398–400.
- Холматова К.К., Поляруш Н.А., Юрьева М.Ю., Иванова С.Н., Дворяшина И.В. Влияние кортизола на отдаленный прогноз

- пациентов с острым инфарктом миокарда. *Практическая медицина*. 2018; 16(9): 97-101.
- Каширина Д.Н., Пастушкова Л.Х., Перси Э.Дж., Борчерс К.Х., Бржозовский А.Г., Ларина И.М. Изменение белкового состава плазмы космонавтов после космического полета и его значение для функций эндотелия. *Физиология человека*. 2019; 45(1): 88-96.
 - Baranov V.M., Katuncev V.P., Baranov M.V., Shpakov A.V., Tarasenkov G.G. Challenges for space medicine in human development of the moon: risks, adaptation, health, workability. *Ul'yanovskiy mediko-biologicheskii zhurnal*. 2018; 3: 109-23. (in Russian)
 - Tomilovskaya E.S., Rukavishnikov I.V., Amirova L.E., Shigueva T.A., Saveko A.A., Kitov V.V., et al. 21-day dry immersion: design and primary results. *Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina*. 2020; 54(4): 5-14. (in Russian)
 - Farley A., Gnyubkin V., Vanden-Bossche A., Laroche N., Neefs M., Baatout S., et al. Unloading-induced cortical bone loss is exacerbated by low-dose irradiation during a simulated deep space exploration mission. *Calcif. Tissue Int*. 2020; 107(2): 170-9.
 - Farraj A., Hazari M., Cascio W. The utility of the small rodent electrocardiogram in toxicology. *Toxicol Sci*. 2011; 121(1): 11-30.
 - Krářová E., Mokráň T., Murín J., Stankovičová T. Electrocardiography in two models of isoproterenol-induced left ventricular remodeling. *Physiol Res*. 2008; 57(2): 83-9.
 - Mandsager K.T., Robertson D., Diedrich A. The function of the autonomic nervous system during spaceflight. *Clin Auton Res*. 2015; 25: 141-51.
 - Mueller P.J., Foley C.M., Hasser E.M. Hindlimb unloading alters nitric oxide and autonomic control of resting arterial pressure in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 289: 140-47.
 - Aubert A.E., Beckers F., Verheyden B. Cardiovascular function and basics of physiology in microgravity. *Acta Cardiol*. 2005; 60(2): 129-51.
 - Larina I.M., Baevsky R.M., Pastushkova L.K., Eshmanova A.K., Luchitskaya E.S., Navasiolava N.M., et al. Seven-day dry immersion: interrelationship between the changes in the water-electrolyte balance and cardiovascular responses. *Fiziologiya cheloveka*. 2011; 37(5): 100-7. (in Russian)
 - Eckberg D.L., Diedrich A., Cooke W.H. Respiratory modulation of human autonomic function: long-term neuroplasticity in space. *J. Physiol*. 2016; 594(19): 5629-46.
 - Larina I.M., Pastushkova L.K., Goncharova A.G., Vasilieva G.Yu., Kashirina D.N., Koloteva M.I., et al. Direction of the processes related to the significantly changing proteins in the blood proteome during 21-day dry immersion. *Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina*. 2020; 54(4): 93-100. (in Russian)
 - Batsigov Kh.A., Saifutdinov R.G. Leukocytosis in myocardial infarction. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2010; 91(3): 398-400. (in Russian)
 - Kholmatova K.K., Polyarush N.A., Yuryeva M.Yu., Ivanova S.N., Dvoryashina I.V. Influence of cortisol with long-term prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Prakticheskaya medicina*. 2018; 16(9): 97-101. (in Russian)
 - Kashirina D.N., Pastushkova L.K., Brzhozovsky A.G., Larina I.M., Percy A.J., Borchers C.H. Changes in the plasma protein composition in cosmonauts after space flight and its significance for endothelial functions. *Fiziologiya cheloveka*. 2019; 45(1): 88-96. (in Russian)

References

- Antonutto G., di Prampero P.E. Cardiovascular deconditioning in microgravity: some possible countermeasures. *Eur J Appl Physiol*. 2003; 90: 283-91.
- Lu Y.M., Jiao B., Lee J., Zhang L., Yu Z.B. Simulated microgravity increases myocardial susceptibility to ischemia reperfusion injury via a deficiency of AMP activated protein kinase. *Can. Journal of Physiology and Pharmacology*. 2017; 95: 59-71.
- Herauld S., Fomina G., Alferova I., Kotovskaya A., Poliakov V., Arbeille P. Cardiac, arterial and venous adaptation to weightlessness during 6-month MIR spaceflights with and without thigh cuffs (bracelets). *Eur J Appl Physiol*. 2000; 81: 384-90. <https://doi.org/10.1007/s004210050058>
- Jiang S., Zhao X.C., Jiao B., Yue Z.J., Yu Z.B. Simulated microgravity hampers Notch signaling in the fight against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Mol Med Rep*. 2018; 17(4): 5150-58.
- Delp M.D., Charvat J.M., Limoli C.L., Globus R.K., Ghosh P. Apollo lunar astronauts show higher cardiovascular disease mortality: possible deep space radiation effects on the vascular endothelium. *Sci Rep*. 2016; 6:29901. <https://doi.org/10.1038/srep29901>
- Ling S., Li Y., Zhong G., Zheng Y., Xu Q., Zhao D., et al. Myocardial CKIP-1 overexpression protects from simulated microgravity-induced cardiac remodeling. *Front. Physiol*. 2018; 9: 40. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00040>
- Wong E.M., Tablin F., Schelegle E.S. Comparison of nonparametric and parametric methods for time-frequency heart rate variability analysis in a rodent model of cardiovascular disease. *PLoS ONE*. 2020; 15(11): e0242147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242147>
- Bazhora Yu. I., Noski L. A. *Laser correlation spectroscopy in medicine. [Lazernaya korrelyatsionnaya spektroskopiya v meditsine]*. Odessa: Druk, 2002. (in Russian)
- Lebedeva M.A., Medvedeva Yu.S., Alchinova I.B., Polyakova M.V., Yakovenko E.N., Arutyunyan A.V., et al. Molecular correlates of acute myocardial infarction in experiments and clinical setting. *Patogenez*. 2018; 16(3): 50-6. (in Russian)
- Lebedeva M.A., Medvedeva Yu.S., Zolotov N.N., Baranov M.V., Karganov M.Yu. The early effects of simulated microgravity on the development of experimental myocardial infarction. *Meditsina ekstremal'nykh situatsiy*. 2020; 22(1): 91-103. (in Russian)
- Lebedeva M.A., Medvedeva Yu.S., Baranov M.V., Arutyunyan A.V., Zolotov N.N., Karganov M.Yu. Delayed effects of simulated space flight factors. *Patogenez*. 2021; 19(1): 37-49. (in Russian)

Сведения об авторах:

Лебедева Марина Андреевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП; вед. науч. сотр. лаб. космической патофизиологии ФГБУ «ФНКЦ КМ» ФМБА России, e-mail: ma_lebedeva@mail.ru;

Медведева Юлия Сергеевна, канд. биол. наук, науч. сотр., лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Баранов Михаил Викторович, канд. мед. наук, директор ФГБУ «ФНКЦ КМ» ФМБА России;

Золотов Николай Николаевич, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., лаб. психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»;

Арутюнян Александр Владимирович, науч. сотр. лаб. медицинской биофизики ФГБУ НИЦ «Курчатовский Институт» - ПИЯФ;

Карганов Михаил Юрьевич, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. физико-химической и экологической патофизиологии ФГБНУ НИИОПП; зав. отделом экспериментальной биологии и клеточной физиологии ФГБУ «ФНКЦ КМ» ФМБА России.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 612.115.3:612.115.064

Сороколетов С.М.¹, Ляпина Л.А.², Григорьева М.Е.²

Антитромботические эффекты комплексных препаратов низкомолекулярного гепарина с аспирином в норме и при гиперкоагуляции

¹ГБУЗ «ГКБ им. С. П. Боткина» ДЗМ,

125284, Москва, Россия, 2-й Боткинский проезд, д. 5, к. 22;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»,

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

Введение. Актуальной проблемой физиологии и медицины является создание безопасных антитромботических препаратов. Обычно применяют антикоагулянты гепариновой природы. **Цель работы** – изучение противосвертывающего эффекта комплекса низкомолекулярного гепарина с аспирином (КГА) при его пероральном применении.

Методика. КГА создан при весовом соотношении гепарина и аспирина 1:6. Определены агрегация тромбоцитов, антикоагулянтная, фибринолитическая и фибриндеполимеризационная активности плазмы при ежедневном в течение 7 сут пероральном применении КГА в дозе 1 мг/кг массы тела здоровым крысам и при моделировании у них гиперкоагуляции введением тканевого тромбопластина.

Результаты. Через 20 ч после седьмого введения здоровым крысам КГА в плазме крови установлено повышение антикоагулянтной активности (АЧТВ) на 20%, суммарной фибринолитической активности (СФА) на 30%, фибриндеполимеризационной активности (ФДПА) на 45% и снижение агрегации тромбоцитов на 16 % по сравнению с нормой. Через 60 мин после последней трехкратной через каждые 30 мин инъекции тканевого тромбопластина (модель гиперкоагуляции) на фоне предварительного в течение 7 сут поступления КГА в организм крыс (опыт) отмечались нормальные значения параметров гемостаза в отличие от показателей у контрольных крыс, получавших тромбопластин на фоне семикратно вводимого физиологического раствора (вместо комплекса).

Заключение. Впервые установлена способность КГА проявлять антикоагулянтные, фибринолитические, фибриндеполимеризационные свойства и снижать агрегацию тромбоцитов при пероральном введении здоровым крысам, а также животным с гиперкоагуляцией. Делается вывод о перспективности исследования КГА в качестве антитромботического перорального средства, что в дальнейшем следует учитывать при разработке подходов к терапии гиперкоагуляционных состояний.

Ключевые слова: низкомолекулярный гепарин; аспирин; комплекс; фибринолиз; тромбопластин; многократное пероральное введение

Для цитирования: Сороколетов С.М., Ляпина Л.А., Григорьева М.Е. Антитромботические эффекты комплексных препаратов низкомолекулярного гепарина с аспирином в норме и при гиперкоагуляции. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(3): 45-51.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.45-51

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Сороколетов С.М., написание текста и редактирование – Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., определение параметров крови – Григорьева М.Е., Ляпина Л.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

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

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 31.03.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Sorokoletov S.M.¹, Lyapina L.A.², Grigorjeva M.E.²

Antithrombotic effects of low molecular weight heparin-aspirin combination therapy in normal condition and hypercoagulation

¹Botkin Municipal Clinical Hospital,2nd Botkinsky Proezd 5, Moscow 125284, Russian Federation;²Lomonosov Moscow State University,

Leninskie Gory 1/12, Moscow 119234, Russian Federation

Creation of safe antithrombotic drugs is a relevant problem of physiology and medicine. Generally, heparin anticoagulants are used. **The aim** of this work was to study the anticoagulant effect of an oral combination drug including a low molecular weight heparin and aspirin (CHA).

Methods. CHA was formulated with a 1:6 w/w ratio of heparin and aspirin. Platelet aggregation, anticoagulant, fibrinolytic, and fibrin-depolymerization activities of plasma were determined with daily oral administration of CHA (1 mg/kg body weight, daily, for 7 days) to intact rats and to rats with hypercoagulation modeled by administration of tissue thromboplastin.

Results. 20 h after the 7th administration of CHA to control rats, increases in plasma anticoagulant activity (activated partial thromboplastin time, aPTT) by 20%, total fibrinolytic activity (TFA) by 30%, and the fibrin-depolymerization activity (FDPA) by 45%, and a decrease in platelet aggregation by 16% as compared to the intact rats were observed. 60 min after the last of three tissue thromboplastin injections administered every 30 minutes (hypercoagulation model) following the CHA administration for 7 days (experiment), hemostasis parameters were normal as distinct from the control rats treated with thromboplastin following 7 administrations of a saline solution (instead of CHA).

Conclusion. This study was the first to demonstrate that CHA has anticoagulant, fibrinolytic, and fibrin-depolymerizing activities and reduces platelet aggregation when administered orally both to intact rats and rats with hypercoagulation. Thus, we concluded that CHA is promising as an oral antithrombotic drug, which should be taken into account in future development of the treatment of hypercoagulation conditions.

Keywords: low molecular weight heparin; aspirin; complex; fibrinolysis; thromboplastin; multiple administration

For citation: Sorokoletov S.M., Lyapina L.A., Grigorjeva M.E. Antithrombotic effects of low molecular weight heparin-aspirin combination therapy in normal condition and hypercoagulation. *Patologicheskaya Fiziologiya Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(3): 45-51.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.45-51

Author's contribution: the concept and design of the research – Sorokoletov S.M.; writing the text – Lyapina L.A., Grigorjeva M.E.; editing – Grigorjeva M.E.; blood parameters definitions – Lyapina L.A., Grigorjeva M.E. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Ludmila A. Lyapina*, Doctor of Biological Sciences, Principal Researcher Laboratory of blood coagulation "Lomonosov Moscow State University", Leninskie Gory, 1, p. 12, 119234, Moscow, e-mail: lyapinal@mail.ru

Financing. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:

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

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

Received 31.03.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Введение

Известно, что естественный гликозаминогликан крови гепарин проявляет антикоагулянтную активность вследствие блокады свертывающей активности тромбина, фактора X и других факторов свертывания крови [1, 2]. Особый интерес представляет низкомолекулярный гепарин (НМГ), который обладает рядом преимуществ перед нефракционированным гепарином (НФГ), а именно безопасностью применения, отсутствием необходимости проведения ла-

бораторного контроля и отсутствием побочных геморрагических эффектов [3]. Гепарин в организме в свободном виде не встречается, так как благодаря наличию электроотрицательного заряда взаимодействует через свои сульфатные и карбоксильные группы с различными аминокислотами, пептидами, белками с образованием комплексных соединений [4–6]. Имеются различия и в действии НФГ и НМГ [7]. До настоящего времени нет четких данных о механизмах действия комплексов НМГ с различными агентами [8]. Известно, что такое средство, как

аспирин участвует в снижении агрегации тромбоцитов за счет уменьшения образования тромбосана А2 и ингибирования циклооксигеназы [9, 10]. В сравнительном исследовании НМГ и аспирина, применяемых для профилактики тромбоза глубоких вен (ТГВ) в ортопедической хирургии, показано, что НМГ более эффективен, чем аспирин, для пациентов с ТГВ после хирургического вмешательства [11]. Отмечено, что локально эффективный гепариновый комплекс с ацетилсалициловой кислотой и тикагрелором (антагонистом P2Y₁₂ рецепторов) в эксперименте значительно снижает тромбообразование в венозных трансплантатах. Местное введение этих препаратов может предотвращать развитие тромбоза в венозных трансплантатах [12]. Учитывая, что аспирин способен участвовать в комплексообразовании с гепарином, можно предположить, что он оказывает защитный антитромботический эффект на процессы как тромбоцитарного, так и плазменного гемостаза.

Цель работы – создание соединения НМГ с аспирином и исследование его влияния на агрегацию тромбоцитов, антикоагулянтные, фибринолитические свойства крови и степень полимеризации фибрина при атравматичном пероральном его применении у здоровых крыс и животных с гиперкоагуляцией.

Методика

В работе использовали препараты НМГ (Logiparin) (Дания, «Лео Фармасьютикал Продактс Лтд А/С») и аспирин-экспресс («Вауег» Германия). Готовили комплексный препарат из НМГ и аспирина в весовом соотношении, равном 1: 6.

В условиях *in vitro* при концентрации комплекса 10⁻³ мг/мл определяли антикоагулянтную (по тестам АЧТВ и тромбиновому времени – ТВ), фибринолитическую суммарную активность (СФА), активность тканевого активатора плазминогена (ТАП) и фибриндеполимеризационную (ФДПА) активность [13].

Эксперимент выполнен на 60 белых крысах-самцах с массой тела 180-200 г. Животных содержали в пластиковых клетках в стандартных лабораторных условиях при искусственном освещении (12 ч/12 ч – светлое/темное время), принудительной 12-кратной в час вентиляции, температуре 22-26 °С и относительной влажности 50-70%. Проведение работ осуществлялось в соответствии с приказом Минздрава России №199 от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и в соответствии с регламентом декларации ЕС от 2010 г. об использовании лабораторных животных. Исследование одобрено Этической комиссией университета.

Проведено 2 серии экспериментов: на здоровых животных и крысах, у которых моделировали гиперкоагуляцию 3-х-кратным (через каждые 30 мин) внутривенным введением тканевого тромбопластина 30 мг/кг (в объеме 0.6 мл на 200 г) массы тела.

В I серии животные были разделены на 4 группы: 1-я группа (Опыт) – введение КГА (1 мг/кг массы тела), 2-я группа (Контроль 1) – введение гепарина, 3-я (Контроль 2) – введение аспирина, 4-я группа (Контроль 3) – введение 0.85%-го NaCl. Гепарин и аспирин применяли в дозах, эквивалентных их содержанию в комплексе. Все препараты вводили перорально в течение 7 сут ежедневно через каждые 24 ч. Взятие крови осуществляли из *v. jugularis* через 20 ч после завершающего введения препаратов с использованием в качестве консерванта 3.8%-го цитрата натрия.

Во II серии (моделирование состояния гиперкоагуляции) использовали те же группы животных. Через 20 ч после завершающего перорального введения соответствующих препаратов крысам трижды с промежутками в 30 мин вводили тканевой тромбопластин (30 мг/кг) и через 60 мин после завершающего введения забирали кровь для исследования.

В плазме крови определяли антикоагулянтную активность по тестам АЧТВ и тромбинового времени (ТВ) на анализаторе АСКа 201-Астра; ферментативную (ФФ) и суммарную фибринолитическую (СФА) и фибриндеполимеризационную (ФДПА) активность, активность тканевого активатора плазминогена (ТАП), агрегацию тромбоцитов с использованием в качестве индуктора АДФ на анализаторе Биола [13, 14]. Статистический анализ данных осуществляли, используя пакет статистических программ Statistica 8 (StatSoft Inc., США). Для полярного сравнения независимых групп применяли непараметрический критерий Манна Уитни. Полученные данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Нами установлено, что в условиях *in vitro* при концентрации в системе 10⁻³ мг/мл КГА проявляет антикоагулянтный эффект (по тесту АЧТВ увеличение на 30%, по тесту ТВ – на 10%), в то время как из составных частей только НМГ в эквивалентной концентрации повышает антикоагулянтную активность на 20% по тесту АЧТВ. Агрегация тромбоцитов статистически значимо снижается (на 16.4%) как после добавления в систему комплекса, так и после применения эквивалентной концентрации аспирина (табл. 1).

Комплекс КГА оказывает также и фибринолитический эффект. Так, СФА повышалась на 25%, ФФ на 17% после воздействия комплекса, при этом гепарин и аспирин повышали только СФА на 18-23%. Следует отметить, что КГА препятствует полимеризации фибрина, усиливая ФДПА на 50%. Из составных частей комплекса только аспирин оказывает аналогичный эффект, повышая ФДПА на 32% по сравнению с контролем.

По тесту ТВ у КГА и гепарина выявлена тенденция к ингибированию активности тромбина. Следовательно, в условиях *in vitro* КГА по антикоагулянтной активности отличался только от аспирина, обладая в то же время более выраженным эффектом по сравнению с гепарином. Заметные отличия действия комплекса от составляющих его частей наблюдались по ФДПА и ФФ.

В экспериментах на животных установлено, что при многократном в течение 7 сут пероральном введении крысам комплекса ГА (1 мг/кг ежедневно) и его составных частей в эквивалентных дозах через 20 ч после завершающего введения антикоагулянтная активность возрастала под влиянием КГА на 20% и 16% (АЧТВ и ТВ соответственно). Как комплекс, так и аспирин в одинаковой степени при пероральном применении снижали агрегацию тромбоцитов на 16-17%. Такой же вывод можно сделать по поводу влияния комплекса и аспирина на фибринолитический процесс, отмечая наиболее значительный эффект после применения комплексного соединения КГА (табл. 2).

Таким образом, комплекс КГА при пероральном поступлении в организм крыс способствовал повышению противосвертывающих свойств плазмы крови, о чем свидетельствовали статистически значимое увеличение антикоагулянтной, СФА и ФДПА активности, а также снижение агрегации тромбоцитов, в то время как аспирин в эквивалентной дозе значимо повышал только СФА и ФДПА, но в меньшей степени, чем комплекс, и подавлял агрегацию тромбоцитов.

В последующих экспериментах моделировали у крыс состояние гиперкоагуляции путем 3-х-кратного внутривенного введения тромбопластина (30 мг/кг) на фоне предварительного многократного (в течение 7 сут) перорального применения КГА (1 мг/кг) и его составных частей в эквивалентных дозах, т.е. исследовалось профилактическое действие комплекса ГА на процессы тромбообразования. Следует отметить, что через 60 мин после последнего введения тромбопластина резко и статистически значимо повышается свертываемость крови по данным АЧТВ, АТ и СФА.

Комплекс ГА оказывает профилактический эффект при тромбообразовании, так как его предварительное введение до моделирования тромбообразования (введение тканевого тромбопластина) способствовало значимому восстановлению параметров гемостаза до нормального уровня. Следует обратить внимание, что показатели фибринолиза (СФА и ФДПА) в этих условиях значимо превышали нормаль-

Таблица 1 / Table 1

Показатели гемостаза после действия комплекса КГА в дозе 10⁻³ мг/мл в плазме крови здоровых крыс *in vitro*, (M±m)
Hemostasis indices after the action of complex GA at a dose of 10⁻³ mg/ml in blood plasma of healthy rats *in vitro*, (M±m)

Показатели гемостаза Hemostasis indicators	Исследуемые препараты Investigational drugs			
	КГА	Гепарин heparin	Аспирин aspirin	0.85% NaCl control
АЧТВ, %	130 ± 3.3**	120 ± 2.7**	103 ± 2.2	100 ± 1.0
ТВ, %	110 ± 0.8*	109 ± 1.0*	102 ± 2.2	100 ± 0.9
АТ, %	83.6 ± 1.7**	100 ± 1.1	83.6 ± 1.7**	100 ± 1.0
СФА, %	125 ± 7.6**	118 ± 2.0**	123 ± 1.9**	100 ± 1.8
ФФ, %	117 ± 1.1**	101 ± 3.0	109 ± 5.2	100 ± 1.1
ФДПА, %	150 ± 1.1**	110 ± 2.5*	132 ± 4.1**	100 ± 2.8

Примечание. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с соответствующими пробами с NaCl (контроль). КГА – комплекс гепарин-аспирин; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время; ТВ – тромбиновое время; АТ – агрегация тромбоцитов; СФА – суммарная фибринолитическая активность; ФФ – ферментативная фибринолитическая активность, ФДПА – фибриндеполимеризационная активность.
Note. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ compared to the corresponding samples with NaCl (control). КГА – heparin-aspirin complex; АЧТВ – activated partial thromboplastin time; ТВ – thrombin time; АТ – platelet aggregation; СФА – total fibrinolytic activity; ФФ – enzymatic fibrinolytic activity; ФДПА – fibrin – depolymerization activity.

ные значения, в то время как гепарин и аспирин таким действием не обладали (табл. 3).

Анализируя полученные нами результаты, необходимо отметить значительный положительный эффект в отношении предотвращения тромбообразования в кровотоке пероральным многократным введением комплекса гепарин-аспирин. Об этом свидетельствуют результаты настоящего исследования, когда только при взаимодействии гепарина с аспирином возникало новое соединение, обладающее одновременно антикоагулянтным, антиагрегационным в отношении тромбоцитов, фибринолитическим и фибриндеполимеризационным действием.

Полученные данные согласуются с показателями по другим комплексам гепарина с аминокислотами, например, с глутаминовой кислотой или глицином [6]. Механизм антикоагулянтного действия исследуемого комплексного соединения гепарина с аспирином обусловлен блокирующим влиянием на факторы внутреннего пути свертывания крови и небольшим ингибированием тромбина, что показано в настоящем исследовании в условиях *in vitro* при определении АЧТВ и ТВ. Что касается влияния комплекса на процессы фибринолиза, то он проявляет и ферментативную фибринолитическую, и фибриндеполимеризационную активность, препятствуя процессам

Таблица 2/ Table 2

Параметры гемостаза через 20 ч после 7-суточного перорального введения здоровым крысам комплекса ГА в дозе 1 мг/кг массы тела крыс и его составных частей в эквивалентных дозах, (M±m)

Hemostasis parameters 20 hours after 7-day oral administration to healthy rats of the HA complex at a dose of 1 mg/kg of rat body weight and its components in equivalent doses, (M ± m)

Показатели гемостаза Hemostasis indicators	Исследуемые препараты Investigational drugs			
	КГА	Гепарин heparin	Аспирин aspirin	0.85% NaCl control
АЧТВ, %	120 ± 3.0**	105 ± 1.0*	100 ± 2.2	100 ± 1.0
ТВ, %	116 ± 2.0**	108 ± 1.0*	102 ± 1.7	100 ± 0.9
АТ, %	84 ± 1.0**	100 ± 1.1	83 ± 1.7*	100 ± 1.0
СФА, %	130 ± 7.6**	108 ± 2.0	123 ± 1.9**	100 ± 1.8
ФФ, %	112 ± 1.1*	101 ± 3.0	109 ± 5.2	100 ± 1.1
ФДПА, %	145 ± 1.1**	110 ± 2.5*	132 ± 4.1**	100 ± 2.8

Примечание. Примечания те же, что в табл. 1.

Note. The notes are the same as in Table 1.

Таблица 3/ Table 3

Параметры гемостаза через 60 мин после трехкратного внутривенного введения крысам тканевого тромбoplastина (30 мг/кг) на фоне 7-суточного перорального введения КГА (1 мг/кг) и его составных частей в эквивалентном количестве, (M±m)

Hemostasis parameters 60 min after threefold intravenous administration of tissue thromboplastin (30 mg/kg) to rats on the background of 7-day oral administration of CGA (1 mg/kg) and its components in equivalent amounts, (M±m)

Параметры гемостаза Hemostasis indicators	Исследуемые препараты (+ тромбoplastин) Study drugs (+ thromboplastin)			
	КГА	Гепарин heparin	Аспирин aspirin	0.85% NaCl control
АЧТВ, %	110 ± 1.0*	88 ± 2.0	100 ± 2.2	79 ± 3.7**
АТ, %	100 ± 1.0	88 ± 1.1	101 ± 1.3	119 ± 1.0**
СФА, %	112 ± 3.6*	94 ± 2.0	99 ± 1.9	86 ± 2.8*
ФФ, %	100 ± 1.1	101 ± 2.0	93 ± 3.2	90 ± 1.1
ФДПА, %	118 ± 1.1**	98 ± 1.5	100 ± 2.1*	95 ± 2.8

Примечание. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ по сравнению с параметрами у здоровых крыс, принятыми за 100%. Остальные обозначения те же, что в табл. 1.

Note. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ compared with the parameters in healthy rats taken as 100%. The other designations are the same as in table 1.

полимеризации фибрина, в отличие от эквивалентной дозы гепарина, входящей в его состав.

В данной работе впервые показано, что в соединении с гепарином аспирин оказывает противосвертывающие эффекты в организме, препятствуя процессам полимеризации фибрина (по тесту ФДПА). Гепарин, как это следует из данных литературы [3], при пероральном введении не проявляет антикоагулянтного действия, так как разрушается ферментами желудочно-кишечного тракта. Однако, доказывается, что в комплексных соединениях с аминокислотами и некоторыми низкомолекулярными веществами гепарин приобретает устойчивость против протеолитических ферментов [6]. Кроме того, установлено, что аспирин сам по себе или в комбинации с гепарином [15] приводит к значительному увеличению лизиса тромба и является синергичным при применении низкочастотного ультразвука, что может иметь важное значение для возможного использования низкочастотного ультразвука в алгоритмах лечения острых коронарных синдромов [16].

Согласно полученным в настоящем исследовании результатам, в комплексе гепарин-аспирин сочетаются свойства как антикоагулянта гепарина, так и антиагреганта аспирина, одновременно влияющего на фибринолиз крови и полимеризацию фибрина.

Таким образом, поскольку комплекс низкомолекулярного гепарина с аспирином оказывал выраженные противосвертывающие эффекты на систему гемостаза, защищая организм животных от фибрино- и тромбообразования в кровотоке, то он является перспективным средством от тромбозов, что требует дальнейшего детального изучения этих процессов.

Выводы:

1. Создано комплексное соединение гепарина с аспирином, обладающее в условиях *in vitro* антикоагулянтной, антиагрегационной в отношении тромбоцитов и фибриндеполимеризационной активностью.

2. Пероральное семикратное введение комплекса гепарин-аспирин здоровым животным (крысам) приводило через 20 ч после завершающего введения к антикоагулянтным, фибринолитическим и антитромбоцитарным эффектам в кровотоке крыс.

3. В условиях моделирования гиперкоагуляции у крыс путем введения тромбопластина предварительно вводимый комплекс гепарин-аспирин проявляет защитное профилактическое действие, восстанавливая нарушенные регуляторные взаимоотношения свертывающей и противосвертывающей систем организма, препятствуя процессам фибрино- и тромбообразования.

Литература

(п.п. 1; 2; 4; 5; 7–12; 15; 16 см. References)

3. Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В. и др. *Методы определения активности гепарина: учебно-методическое пособие*. М.; ГБОУ ДПО РМАПО; 2015.
6. Николаева Л.С., Ляпина Л.А. *Метод создания новых высокоактивных антикоагулянтов крови на основе термодинамических моделей химических равновесий и коагуляционного анализа in vivo и in vitro*. М.; КИМ Л.А. Alicegroup; 2018.
13. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. *Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови*. Москва; ООО Адвансед Солюшнз; 2012.
14. Баркаган З.С., Момот А.П. *Диагностика и контролируемая терапия системы гемостаза*. М.; Ньюдиамед; 2008.

References

1. Onishi A., St Ange K., Dordick J.S., Linhardt R.J. Heparin and anticoagulation. *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. 2016; 1(21): 1372–92.
2. Stief T.W. Inhibition of thrombin in plasma by heparin or arginine. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2007; 13(2): 146–53.
3. Berkovsky A.L., Sergeeva E.V., Suvorov A.V., et al. *Methods for determining the activity of heparin: an educational and methodological manual*. [Metody opredeleniya aktivnosti geparina; uchebno-metodicheskoe posobie]. Moscow; GBOU DPO RMAPO; 2015. (In Russian)
4. Gray E., Hogwood J., Mulloy B. The anticoagulant and antithrombotic mechanisms of heparin. *Handb Exp Pharmacol*. 2012; 207: 43–61.
5. Bertini S., Fareed J., Madaschi L., Risi G., Torri G., Naggi A. Characterization of PF4-Heparin Complexes by Photon Correlation Spectroscopy and Zeta Potential. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2017; 23(7): 725–34.
6. Nikolaeva L.S., Lyapina L.A. *A method for creating new highly active blood anticoagulants based on thermodynamic models of chemical equilibria and coagulation analysis in vivo and in vitro*. [Metod sozdaniya novikh visokoaktivnykh antikoagulantov krvi na osnove termodinamicheskikh modeley khimicheskikh ravnovesiy I analiza koagulazii in vitro i in vivo]. Moscow; KIM L.A. Alicegroup; 2019. (in Russian)
7. Olynyk O., Barg W., Slifirczyk A., Olynyk Y., Dubrov S., Gurianov V., Rorat M. Comparison of the Effect of Unfractionated Heparin and Enoxaparin Sodium at Different Doses on the Course of COVID-19-Associated Coagulopathy. *Life (Basel)*. 2021; 11(10): 1032.
8. Robertson L., Jones L.E. Fixed dose subcutaneous low molecular weight heparins versus adjusted dose unfractionated heparin for the initial treatment of venous thromboembolism. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017; 2(2): CD001100.
9. Perier D.M., Seret D.G., Huang D.F., Dillinger D.J., Henry P.P., Drouet P.L., Benamer D.H. Resistance à l'aspirine: l'ennemi de mon ami est mon ennemi. *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris)*. 2021; 70(6): 401–09.
10. Fernandez-Moreno M.C., Navas-Alcantara M.S., Jimenez-Gonzalo F. Switching from aspirin to clopidogrel in patients with aspirin resistance after an ischemic stroke. Is it a good solution? *Eur. J. Intern. Med.* 2014; 25(3): e40–e41.
11. Chen B., Hu N. Low molecular weight heparin and aspirin for prevention of deep vein thrombosis after orthopaedic surgery: a systematic review and meta-analysis. *Thromb. Thrombolysis. J.* 2021; 52(2): 553–59.

12. Akşit E., Kurt T., Büyük B., Çokkalender Ö. Drug-eluting Vein Graft with Acetylsalicylic Acid-Ticagrelor-Unfractionated Heparin Complex Inhibits Early Graft. *Thrombosis. Balkan. Med. J.* 2020; 37(5): 269-75.
13. Lyapina L.A., Grigorieva M.E., Obergan T.Yu., Shubina T.A. *Theoretical and practical issues of studying the functional state of the anti-coagulation system of the blood. [Teoreticheskie i prakticheskie problemi isucheniya funktsionalnogo sostoaniya protivosvertivauchei sistemi krovi].* Moscow; OOO Advansed Solutions; 2012. (in Russian)
14. Barkagan Z.S., Momot A.P. *Diagnostics and controlled therapy of the hemostatic system. [Diagnostika i kontroliruemaya terapiya sistemy gemostaza].* Moscow; Newdiamed; 2008. (in Russian)
15. Meyer Samama M. The new antithrombotic agents. *Presse Med.* 2005; 34(18): 1309-14.
16. Atar S., Neuman Y., Miyamoto T., Chen M., Birnbaum Y., Luo H., et al. Synergism of aspirin and heparin with a low-frequency non-invasive ultrasound system for augmentation of in-vitro clot lysis. *J. Thromb. Thrombolysis.* 2003; 15(3): 165-69.

Сведения об авторах:

Сороколетов Сергей Михайлович, доктор мед. наук, проф., зам. гл. врача по мед. части (по терапевтической помощи), ГБУЗ ГКБ им. С.П. Боткина ДЗМ, действительный член Академии национальной безопасности, кардиолог, терапевт;

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

Б.А. Кудряшова, каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова;

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

проф. Б.А. Кудряшова, каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 617-089.844:612

Кузник Б.И.^{1,2}, Смоляков Ю.Н.^{1,2}, Давыдов С.О.², Партс Д.С.¹

Состояние микроциркуляторной гемодинамики при операции трансплантации коленного и тазобедренного суставов

¹Читинская государственная медицинская академия,

672000, Чита, ул. Горького, д.39 а;

²Инновационная клиника «Академия здоровья»,

672000, Чита, ул. Коханского, д. 13

Актуальность. Изучение особенностей гемодинамики в зоне пораженного артрозом коленного или тазобедренного сустава при трансплантации является актуальной задачей, так как позволяет уже на ранних стадиях послеоперационного периода корригировать терапевтические вмешательства направленные на улучшение кровоснабжения и предупреждение развития тромбоэмболических осложнений. **Цель исследования** – изучение микроциркуляторных гемодинамических нарушений в зоне пораженных артрозом суставов в до и послеоперационном периоде.

Методика. Исследования проведены на 136 пациентах, разделенных на 2 группы: в 1-ю группу вошли 46 больных с артрозами тазобедренного или коленного суставов I-II стадии, 2-ю группу составили 90 больных с аналогичными артрозами III-IV степени. Исследования проводились в предоперационном периоде и на 6-е сут после эндопротезирования. Состояние кровотока изучали с помощью датчика mDLS. Использовали авторскую методику спектрального разложения сигнала на частотные компоненты, связанные с гемодинамическими источниками различной скорости сдвига слоев крови. Для интерпретации результатов многочастотного анализа использовали гемодинамический индекс (Hemodynamic Index, HI): низкочастотный (HI1), определяемый медленным межслоевым взаимодействием, высокочастотный (HI3), характеризующий быстрые процессы сдвига слоев и HI2 занимающий промежуточное положение (прекапиллярный и капиллярный кровотоки). Рассчитывали относительные индексы RHI1, RHI2 и RHI3 обозначающие нормированный (относительный) вклад каждой компоненты индекса в общие динамические процессы. Для каждого компонента HI (HI1, HI2, HI3) использовали дополнительную меру медленных колебаний кровотока – осцилляторный гемодинамический индекс (OHI). Определяли следующие OHI, характеризующие движение крови: ассоциированное с эндотелием (NEUR), вызываемое мышечным слоем сосудов (MAYER), задаваемое дыхательным циклом (RESP) и пульсовыми толчками (PULSE).

Результаты. В зоне проекции больного сустава по сравнению со здоровым резко снижены гемодинамические индексы HI1 и HI2, а также RHI1 и RHI2. Одновременно в зоне пораженного сустава резко возрастает величина гемодинамических индексов HI3 и RHI3, что свидетельствует об усилении сдвига в осевом потоке, а также значительно увеличивается осцилляторный индекс MAYER1. После трансплантации сустава в зонах проекции здорового и пересаженного сустава практически сохраняются те же различия, что и в дооперационном периоде. Одновременно в послеоперационном периоде уменьшаются индексы PULSE1 и PULSE3. В зоне проекции здорового сустава после операции отмечается увеличение осцилляторных индексов MAYER1 и MAYER2 и снижение индекса PULSE1. В зоне пораженного сустава в послеоперационном периоде увеличивается соотношение HI1/HI3, что может быть связано с усилением эндотелиальной дисфункции.

Заключение. Представленные данные свидетельствуют о том, что в зоне пораженного сустава развиваются значительные нарушения микрогемодинамики, что не может не сказаться на течении патологического процесса.

Ключевые слова: гемодинамические индексы; эндопротезирование суставов; послеоперационный период

Для цитирования: Кузник Б.И., Смоляков Ю.Н., Давыдов С.О., Партс Д.С. Состояние микроциркуляторной гемодинамики при операции трансплантации коленного и тазобедренного суставов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(3): 52-58.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.52-58

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Кузник Б.И., Давыдов С.О.; сбор и обработка материала – Партс Д.С., Смоляков Ю.Н.; подготовка иллюстративного материала – Смоляков Ю.Н.; статистическая обработка – Смоляков Ю.Н.; написание текста – Кузник Б.И. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Кузник Борис Ильич, e-mail: bi_kuznik@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 08.04.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Kuznik B.I.^{1,2}, Smolyakov Y.N.^{1,2}, Davydov S.O.², Parts D.S.¹**State of microcirculatory hemodynamics during knee and hip joint transplantation surgery**¹Chita State Medical Academy,
Chita, Russian Federation;²Innovative Clinic "Academy of Health",
Chita, Russian Federation

Studying hemodynamics in the area of the knee or hip joint affected by arthrosis during transplantation is a significant task. Such studies would allow adjustment of the treatments aimed at improving the blood supply and preventing thromboembolic complications already in early postoperative period. **Aim.** To study microcirculatory hemodynamic disorders in the area of joints affected by arthrosis in the pre- and postoperative periods.

Methods. The study included 136 patients divided into 2 groups: the first group consisting of 46 patients with stage 1-2 arthrosis of the hip or knee joint and the second group consisting of 90 patients with stage 3-4 arthrosis of the same kind. The study was performed in the preoperative period and on Day 6 after joint arthroplasty. The state of blood flow was evaluated with a mDLS transducer using the authors' method of spectral signal decomposition into the frequency components related with hemodynamic sources of different shear rates of blood layers. For interpretation of results of the multifrequency analysis, the hemodynamic index (HI) was used: low-frequency HI (HI1) determined by the slow interlayer interaction, high-frequency HI (HI3) that characterizes fast processes of the shear of layers, and HI2 that is intermediate (precapillary and capillary blood flow). Relative indexes, RH1, RH2, and RH3, were calculated, which designate a normalized (relative) contribution of each component of the index to overall hemodynamic processes. For each HI component (HI1, HI2, HI3), an additional measure of slow circulatory fluctuations was used, the oscillatory hemodynamic index (OHI). The following OHIs, that characterize the blood flow, were determined: endothelium-associated (NEUR), determined by the vascular muscular layer (MAYER), respiratory cycle-driven (RESP), and pulse impulses (PULSE).

Results. In the projection zone of the affected joint as compared with the healthy one, the hemodynamic indices HI1 and HI2, as well as RHI1 and RHI2, were sharply reduced. At the same time, the hemodynamic indices HI3 and RHI3 were sharply increased in the area of the affected joint, which indicated an increase in the axial flow shear; the oscillatory index MAYER1 was also significantly increased. After joint transplantation, practically the same differences as in the preoperative period were maintained in the projection zones of the healthy and the transplanted joints. At the same time, the PULSE1 and PULSE3 indices decreased in the postoperative period. In the projection area of the healthy joint after surgery, the oscillatory indices MAYER1 and MAYER2 were increased whereas the PULSE1 index was decreased. In the area of the affected joint in the postoperative period, the HI1/HI3 ratio was increased, which could have been due to aggravated endothelial dysfunction.

Conclusion. Significant microhemodynamic disorders develop in the area of the affected joint, which must affect the course of the pathological process.

Keywords: hemodynamic indexes; joint endoprosthesis; postoperative period

For citation: Kuznik B.I., Smolyakov Y.N., Davydov S.O., Parts D.S. State of microcirculatory hemodynamics during knee and hip joint transplantation surgery. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya (Pathological physiology and experimental therapy. Russian Journal)*. 2022; 66(3): 52-58. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.52-58

Author's contribution: research concept and design – Kuznik B.I., Davydov S.O.; collection and processing of the material – Parts D.S., Smolyakov Y.N.; statistical processing of the material and preparation of illustrative material – Smolyakov Y.N.; writing text – Kuznik B.I.; editing – all authors. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

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

Financing. The study was not sponsored.

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

Information about the authorsKuznik B.I., <https://orcid.org/0000-0002-2502-9411>Smolyakov Y.N., <https://orcid.org/0000-0001-7920-7642>Davydov S.O., <https://orcid.org/0000-0001-6690-7391>Parts D.S., <https://orcid.org/0000-0003-2661-0862>

Received 08.04.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Эндопротезирование тазобедренного или коленного сустава является одним из современных методов оперативного лечения заболеваний опорно-двигатель-

ного аппарата, в ходе которого патологически измененные тканевые структуры, входящие в состав сочленения, заменяются на искусственные протезы. При этом тече-

ние послеоперационного периода будет во многом зависеть от кровоснабжения операционной зоны и, в частности, от процесса микроциркуляции. Известно, что во время процедур эндопротезирования механическое и медиаторное повреждение интимы крупных вен в сочетании с венозным застоем и гиперкоагуляцией может быть причиной высокой частоты проксимального тромбоза бедренных вен и артерий [10, 20], и даже эмболии легочной артерии [3, 4]. Вместе с тем, процессы микроциркуляции в зоне пораженного сустава в дооперационном и послеоперационном периоде при эндопротезировании коленных и тазобедренных суставов практически не изучались. Решение же этого вопроса могло бы помочь практическому здравоохранению не только прогнозировать возможность развития тромбоэмболических осложнений и своевременно принимать профилактические меры для предупреждения указанных осложнений, но и судить о течении послеоперационного периода. Вот почему мы задались целью изучить, как изменяется микроциркуляторная гемодинамика в до- и послеоперационном периоде в зоне здорового и подлежащего замене сустава.

Клиническая характеристика больных и методы исследования. Исследования проведены на 90 больных (артроз тазобедренного сустава – 53, коленного – 37). Возраст больных 60.8 ± 9.2 . Все пациенты давали письменное согласие на участие в исследовании. У большинства исследуемых (86%) отмечено наличие сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний (ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь, атеросклероз аорты и мозговых сосудов и др.). Для всех больных терапия в дооперационном и послеоперационном периоде носила стандартный характер и осуществлялась согласно «Российскому консенсусу по профилактике тромбоэмболических осложнений» и «Протоколу ведения больных по профилактике тромбоэмболии легочной артерии при хирургических и иных инвазивных вмешательствах». Все проводимые мероприятия соответствовали этическим стандартам, разработанным на основе Хельсинкской декларации всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2008 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 №266.

Исследования проводились всегда в одни и те же часы в предоперационном периоде и на 6-е сут после эндопротезирования тазобедренного или коленного сустава. Состояние кровотока изучали с помощью датчика mDLS с использованием оригинального алгоритмического подхода. С этой целью была разрабо-

тана методика спектрального разложения сигнала на частотные компоненты, связанные с гемодинамическими источниками различной скорости сдвига слоев крови [5–7]. Ввиду его новизны мы считаем необходимым остановиться на исследуемых нами параметрах гемодинамики.

Состояние кровотока изучали с помощью датчика mDLS с использованием оригинального алгоритмического подхода. С этой целью была разработана методика спектрального разложения сигнала на частотные компоненты, связанные с гемодинамическими источниками различной скорости сдвига слоев крови [5, 7]. Ввиду его новизны мы считаем необходимым остановиться на исследуемых нами параметрах гемодинамики.

Для облегчения интерпретации многочастотного анализа нами введен гемодинамический индекс – HI (Hemodynamic Index). HI определяется как интенсивность колебаний отраженного лазерного излучения в полосе частот, соответствующей объему движения крови с определенной скоростью сдвига. Низкочастотный индекс (HI1) определяется медленным межслоевым взаимодействием, высокочастотная область (HI3) характеризует быстрые процессы сдвига слоев. HI2 занимает промежуточное положение (прекапиллярный и капиллярный кровоток). Относительные индексы RHI1, RHI2, RHI3 обозначают нормированный (относительный) вклад каждой компоненты в общие динамические процессы: $RHI1 = HI1 / (HI1 + HI2 + HI3)$, $RHI2 = HI2 / (HI1 + HI2 + HI3)$, $RHI3 = HI3 / (HI1 + HI2 + HI3)$. Для оценки тенденций перераспределения кровотока между быстрыми и медленными процессами введены показатели разницы (HI1-HI3) и отношения (HI1/HI3). Для каждого HI (HI1, HI2, HI3) используется дополнительная мера медленных колебаний кровотока – осцилляторный гемодинамический индекс (ОНИ). Определены следующие ОНИ: 0.005–0.05 Гц – движение крови, ассоциированное с эндотелием (NEUR), 0.05–0.15 Гц – движение крови, определяемое мышечным слоем сосудов (MAYER), 0.15–0.6 Гц – движение крови, задаваемое дыхательным циклом (RESP) и 0.6–3 Гц – пульсовые толчки (PULSE) [80].

Статистический анализ выполнен с помощью языка R (<http://cran.r-project.org>) версии 4.1.0 [9]. Групповые данные представлены в формате Медиана (Me), 25% перцентиль (P25), 75% перцентиль (P75). Для сравнения групп использовался парный критерий Вилкоксона для зависимых выборок (Wilcoxon signed rank test). Нулевая гипотеза об отсутствии различий отвергалась на уровне значимости 0.05.

Результаты и обсуждение

В 1-й серии исследований мы решили проверить существует ли разница в гемодинамических и осцилляторных показателях на проекции здорового и больного сустава (табл. 1).

Как видно из представленных данных, в зоне проекции больного сустава по сравнению со здоровым резко уменьшены гемодинамические индексы Н11 и Н12, а также RH11 и RH12. Полученные сведения говорят о снижении сдвига пристеночного (эндотелиального) и промежуточного кровотока. Приведенные данные, бесспорно, свидетельствуют о том, что в зоне пораженного сустава значительно усилены эндотелиальная дисфункция [11–13] и резко активирован процесс свёртывания крови и адгезии форменных элементов к стенкам поврежденного эндотелия [14–16]. Следует напомнить, что эндотелиальная дисфункция в настоящее время считается ключевым этапом в раннем атерогенезе и одним из факторов прогрессирования атеромных бляшек на более поздних стадиях, а также развития тромбозомболических осложнений [12]. В то же время гемонамические индексы Н13 и RH13 резко возрастают, что свидетельствует об усилении сдвига в осевом потоке. По всей видимости эта реакция носит компенсаторный характер и направлена на улучшение кровоснабжения в пораженном суставе. Вместе с тем, соотношение Н11/Н13 уменьшается более чем в 3 раза, что свидетельствует о преобладании сдвиговых потоков в области медленных процессов.

Следует обратить особое внимание на то, что в зоне проекции пораженного сустава значительно увеличивается осцилляторный индекс MAYER1. Установлено, что волны MAYER являются переходными колебательными реакциями на гемодинамические возмущения. Более того, амплитуда волн MAYER связана как с силой возбуждающих возмущений, так и чувствительностью симпатического компонента барорецепторного рефлекса, тогда как парасимпатические воздействия оказывают отрицательные влияния на их частоту и амплитуду [10]. Столь значительное снижение осцилляторного индекса MAYER1 свидетельствует о нарушении регуляторных механизмов, осуществляемых автономной нервной системой и направленных на восстановление нормального кровотока в области пораженного сустава. Об этом же может свидетельствовать снижение осцилляторного индекса PULSE3, отражающего степень участия автономной нервной системы в регуляции кровотока на заключительном этапе выброса крови из сердца в момент систолического сокращения.

В следующей серии исследований мы выясняли, как изменяются гемодинамические показатели в трансплантированном суставе на 6-е сут после операции (табл. 2).

Как следует из приведенных данных, после трансплантации в зонах проекции здорового и трансплантированного сустава практически сохраняются те же различия, что и в дооперационном периоде. Следует лишь указать, что в послеоперационном пе-

Таблица 1/ Table 1

Показатели гемодинамики и осцилляторные индексы в зоне проекции здорового и больного сустава в дооперационном периоде Hemodynamic parameters and oscillatory indexes in zone of a healthy and diseased joint in the preoperative period

Показатели Indicators	Здоровый сустав Healthy joint	Пораженный сустав Damaged joint	<i>p</i>
Н11	143 [119-162]	80.4 [52.5-148]	<0.0001
Н12	356 [297-418]	243 [188-361]	<0.0001
Н13	171 [142-210]	291 [264-339]	<0.0001
Н11/Н13	0.818 [0.633-0.91]	0.278 [0.172-0.447]	<0.0001
RН11	0.207 [0.191-0.225]	0.129 [0.0947-0.176]	<0.0001
RН12	0.516 [0.496-0.537]	0.406 [0.354-0.443]	<0.0001
RН13	0.266 [0.239-0.305]	0.444 [0.391-0.549]	<0.0001
MAYER1	0.033 [0.022-0.047]	0.057 [0.039-0.078]	<0.0001
PULSE3	0.707 [0.66-0.746]	0.671 [0.621-0.724]	0.015

Примечание. Представление данных Me [P25-P75]. Сравнение групп по парному критерию Вилкоксона, здесь и в табл. 1-4.
Note. Representation of Me data [P25-P75]. Comparison of groups by Wilcoxon signed rank test.

риоде уменьшается не только осцилляторный индекс PULSE3, но и PULSE1, что свидетельствует о более глубоких нарушениях регуляции кровотока в момент сокращения сердца. Отсюда следует вывод, что к моменту выписки больного из стационара после операции сохраняются значительные изменения микроциркуляции в зоне трансплантированного сустава. Всё это, безусловно, может отразиться не только на приживлении последнего, но и привести в дальнейшем к тромбоэмболическим осложнениям.

Одной из задач исследования являлось решение вопроса, как изменяется состояние гемодинамики в здоровом и трансплантированном суставах в послеоперационном периоде. С этой целью проведено сравнение исследуемых гемодинамических функций в проекционных зонах здорового и больного суставах в дооперационном и послеоперационном периодах. Полученные данные представлены в **таблицах 3 и 4**.

Как видно из **табл. 3**, в зоне проекции здорового сустава в послеоперационном периоде никаких изме-

Таблица 2/ Table 2

Гемодинамические и осцилляторные индексы в зоне проекции здорового и трансплантированного сустава
Hemodynamic and oscillatory indices in zone of a healthy and transplanted joint

Показатели Indicators	Здоровый сустав Healthy joint	Трансплантированный сустав transplanted joint	<i>p</i>
HI1	140 [120-161]	86.5 [58.1-134]	<0.0001
HI2	341 [286-411]	253 [187-330]	0.0001
HI3	172 [142-217]	291 [251-351]	<0.0001
HI1/HI3	0.819 [0.698-0.941]	0.318 [0.188-0.462]	<0.0001
RHI1	0.214 [0.196-0.23]	0.136 [0.103-0.173]	<0.0001
RHI2	0.52 [0.503-0.541]	0.395 [0.352-0.453]	<0.0001
RHI3	0.258 [0.243-0.291]	0.439 [0.377-0.545]	<0.0001
MAYER1	0.040 [0.029-0.062]	0.060 [0.043-0.088]	0.002
PULSE 1	0.735 [0.699-0.757]	0.723 [0.665-0.748]	0.016
PULSE 3	0.69 [0.654-0.738]	0.66 [0.62-0.705]	0.001

Примечание. То же, что в табл. 1.
Note. The same as in Table 1.

Таблица 3/ Table 3

Гемодинамические и осцилляторные индексы в зоне проекции здорового сустава в дооперационном и послеоперационном периодах
Hemodynamic and oscillatory indices in the projection area a healthy joint in the preoperative and postoperative periods

Показатели Indicators	До операции Before operation	После операции After operation	<i>p</i>
HI1	144 [122-163]	142 [125-162]	0.83
HI2	356 [297-418]	343 [288-411]	0.90
HI3	167 [142-203]	171 [142-210]	0.82
HI1/HI3	0.816 [0.632-0.91]	0.819 [0.704-0.939]	0.72
RHI1	0.208 [0.192-0.225]	0.214 [0.196-0.229]	0.90
RHI2	0.516 [0.497-0.537]	0.52 [0.503-0.541]	0.42
RHI3	0.266 [0.239-0.301]	0.258 [0.243-0.287]	0.32
MAYER1	0.032 [0.021-0.046]	0.040 [0.029-0.060]	0.014
MAYER2	0.035 [0.019-0.051]	0.042 [0.028-0.066]	0.009
PULSE1	0.743 [0.711-0.78]	0.735 [0.699-0.757]	0.019

Примечание. То же, что в табл. 1.
Note. The same as in Table 1.

Гемодинамические и осцилляторные индексы в зоне проекции трансплантированного сустава в дооперационном и постоперационном периодах**Hemodynamic and oscillatory indices in the projection area of the transplanted joint in preoperative and postoperative periods**

Показатели Indicators	До операции Before operation	После операции After operation	<i>p</i>
HI1	80.4 [52.5-148]	86.5 [58.1-134]	0.75
HI2	237 [188-341]	251 [187-330]	0.96
HI3	292 [267-339]	291 [252-351]	1.00
HI1/HI3	0.277 [0.172-0.444]	0.315 [0.187-0.462]	0.013
RHI1	0.129 [0.095-0.176]	0.136 [0.103-0.173]	0.088
RHI2	0.406 [0.354-0.443]	0.391 [0.352-0.452]	0.54
RHI3	0.444 [0.391-0.549]	0.439 [0.377-0.545]	0.032
PULSE1	0.74 [0.701-0.758]	0.723 [0.665-0.748]	0.021

Примечание. То же, что в таблице 1.

Note. The same as in Table 1.

нений в гемодинамических индексах не наблюдалось. В то же время следует отметить, что в послеоперационном периоде отмечалось увеличение осцилляторных индексов MAYER1 и MAYER2, что, по всей видимости, является компенсаторной реакцией, способствующей нормализации микроциркуляторных процессов. Одновременно наблюдается незначительное снижение осцилляторного индекса PULSE1, что предположительно связано с уменьшением нагрузки на сердце.

Как и в наблюдениях на здоровом суставе, практически никаких изменений в проекционной зоне трансплантированного сустава не произошло (**табл. 4**). Исключение составляет увеличение в послеоперационном периоде соотношения HI1/HI3. Последний факт свидетельствует об увеличении доли пристеночного (эндотелиального) кровообращения, что лишний раз свидетельствует об усилении эндотелиальной дисфункции в зоне трансплантированного сустава.

Все представленные данные свидетельствуют о том, что в зоне пораженного сустава развиваются значительные нарушения микрогемодинамики, что не может не сказаться на течении патологического процесса. В первую неделю после замены сустава эти сдвиги не только не ликвидируются, но могут даже усугубляться. Следует обратить особое внимание на то, что в послеоперационном периоде после замены сустава всегда применяются лекарственные препараты, обладающие антикоагулянтным действием (прадакса и др.), что требует контроля за состоянием процесса свёртывания крови [17]. В то же время неинвазивный метод определения гемодинамических функций с нашей точки зрения может в экстренных случаях составить ори-

ентировочное представление о состоянии процесса гемокоагуляции в зоне пораженного сустава и даже помочь отрегулировать дозу применяемых антикоагулянтов. Об этом, в частности, говорят наши наблюдения [14–16], свидетельствующие о высоких корреляционных отношениях между показателями гемодинамики, тромбодинамики и отдельных стадий процесса свёртывания крови. Метод определения гемодинамики неинвазивен, требует наличия несложного оборудования и небольшой затраты времени (до 5 мин). Однако для подобного заключения необходимо проведение дополнительных исследований на значительно большем количестве больных, что и является основной задачей нашей дальнейшей работы.

Литература

(п.п. 1; 3–7; 9–13; 16; 17 см. References)

- Ахтямов И.Ф., Гарифуллов Г.Г., Миронова И.В., Юсеф А.И., Коваленко А.Н. Изменение свертывающей системы крови при эндопротезировании тазобедренного сустава. *Травматология и ортопедия России*. 2006; 42(4): 38-42.
- Смоляков Ю.Н., Кузник Б.И., Романюк С.В. Адаптационная реакция показателей микроциркуляторной гемодинамики на состояние общей дегидратации. *Забайкальский медицинский вестник*. 2019; (2): 83-9.
- Давыдов С.О., Парте Д.С., Смоляков Ю.Н., Кузник Б.И., Кошкин О.А. Состояние гемодинамики, вариабельности сердечной деятельности и системы гемостаза в процессе замены суставов у пожилых и старых пациентов. *ЕСОПРАМ-2019. Европейский конгресс по превентивной регенеративной и антивозрастной медицине*. 2019: 67-9.
- Давыдов С.О., Кошкин О.А., Парте Д.В., Смоляков Ю.Н., Кузник Б.И. *Состояние системы гемостаза и гемодинамики при замене суставов. Объединенный международный конгресс «Congress*

on *Open Issues in Thrombosis and Hemostasis совместно с 9-й Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии*. 2018: 58-9.

16. Партс Д.В., Давыдов С.О., Кузник Б.И., Смоляков Ю.Н. Кошкин О.А. *Состояние системы гемостаза и гемодинамики при замене суставов. 12-я международная конференция «Микроциркуляция и гемореология: от фундаментальных исследований в клиническую практику»*. 2019.

References

- Hofmann S., Huemer G., Kratochwill C., Koller-Strametz J., Hopf R., Schlag G., Salzer M. Pathophysiology of fat embolisms in orthopedics and traumatology M. *Orthopade*. 1995; 24(2): 84-93.
- Akhtyamov I.F., Garifullov G.G., Mironova I.V., Yosef A.I., Kovalenko A.N. Changes in the blood coagulation system during hip arthroplasty. *Travmatologiya i ortopediya Rossii*. 2006; 42 (4): 38-42. (In Russian)
- Van den Oever I.A., Sattar N., Nurmohamed M.T. Thromboembolic and cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: role of the haemostatic system. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73(6): 954-7. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204767
- Gibson H.Y., Duvernoy M.T., Moore-Lotridge S.N., Flick M.J., Schoenecker J.G. Plasminogen activation in the musculoskeletal acute phase response: Injury, repair, and disease. *Res Pract Thromb Haemost*. 2020; 4(4): 469-80. doi: 10.1002/rth2.12355
- Fine I., Kuznik B., Kaminsky A. et al. New noninvasive index for evaluation of the vascular age of healthy and sick people. *J Biomed Opt*. 2012; 17(8): 2-7. doi: 10.1117/1.JBO.17.8.087002
- Fine I., Kaminsky A.V., Shenkman L. A new sensor for stress measurement based on blood flow fluctuations. *Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics XII*. 2016; 9707: 970705. doi: 10.1117/12.2212866
- Fine I., Kuznik B.I., Kaminsky A.V., Shenkman L., Kustovsya E.M., Maximova O.G. Errata: New noninvasive index for evaluation of the vascular age of healthy and sick people. *Journal of Biomedical Optics*. 2012; 17(8): 089803. doi: 10.1117/1.JBO.17.8.089803
- Smolyakov Y.N., Kuznik B.I., Romanyuk S.V. Adaptive response of indicators of microcirculatory hemodynamics to the state of general dehydration. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2019; (2): 83-9. (In Russian)

- Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplantation*. 2013; 48: 452-8. doi: 10.1038/bmt.2012.244
- Julien C. The enigma of Mayer waves: Facts and models. *Cardiovascular research*. 2006; 70(1): 12-21. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.11.008
- Yang X., Chang Y., Wei W. Endothelial Dysfunction and Inflammation: Immunity in Rheumatoid Arthritis Mediators Inflamm. 2016; 2016: 6813016. doi: 10.1155/2016/6813016
- Prati C., Demougeot C., Guillot X., Godfrin-Valnet M., Wendling D. Endothelial dysfunction in joint disease. *Joint Bone Spine*. 2014; 81(5): 386-91. doi: 10.1016/j.jbspin.2014.01.014
- Mokotedi L, Millen AME, Mogane C, Gomes M, Woodiwiss AJ, Norton GR, Michel FS. Eur J Associations of inflammatory markers and vascular cell adhesion molecule-1 with endothelial dysfunction in collagen-induced arthritis. *Pharmacol*. 2019; 865: 172786. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172786
- Davydov S.O., Parts D.S., Smolyakov Y.N., Kuznik B.I., Koshkin O.A. The state of hemodynamics, cardiac variability and the hemostatic system in the process of joint replacement in elderly and old patients. ECOPRAM-2019. European Congress on Preventive Regenerative and Anti-Aging Medicine. [*Evropeyskiy kongress po preventivnoy regenerativnoy i antivozrastnoy meditsine*]. 2019: 67-9. (In Russian)
- Davydov S.O., Koshkin O.A., Parts D.V., Smolyakov Y.N., Kuznik B.I. State of the hemostasis and hemodynamic system during joint replacement. *Joint International Congress «Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis in conjunction with the 9th All-Russian Conference on Clinical Hemostasiology and Hemorheology»*. 2018: 58-9. (In Russian)
- Parts D.V., Davydov S.O., Kuznik B.I., Smolyakov Y.N., Koshkin O.A. Conditions of hemostasis and hemodynamics in patients with replacement of joints. *12th international conference "Microcirculation and hemorheology: from fundamental research to clinical practice"*. [*12th mezhdunarodnaya konferentsiya "Mikrotsirkulyatsiya i gemoreologiya: ot fundamental'nykh issledovaniy v klinicheskuyu praktiku"*]. 2019. (In Russian)
- Cohen-Rosenblum A, Cui Q. Orthop. Osteonecrosis of the Femoral Head. *Clin North Am*. 2019; 50(2): 139-149. doi: 10.1016/j.ocl.2018.10.001.

Сведения об авторах:

Кузник Борис Ильич, доктор мед. наук, проф., каф. нормальной физиологии ФГБОУ ВО ЧГМА, научный консультант инновационной клиники «Академия Здоровья», e-mail: bi_kuznik@mail.ru;

Смоляков Юрий Николаевич, канд. мед. наук, доцент, зав. каф. медицинской физики и информатики ФГБОУ ВО ЧГМА, научный консультант инновационной клиники «Академия Здоровья», e-mail: smolyakov@rambler.ru;

Давыдов Сергей Олегович, доктор мед. наук, руководитель инновационной клиники «Академия Здоровья», e-mail: davydov-so@mail.ru;

Партс Дмитрий Сергеевич, ординатор каф. анестезиологии и реаниматологии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: partsds@mail.ru

© Проценко А.М., 2022

УДК 616-092

Проценко А.М.

Влияние аутоантител к инсулину у беременных с сахарным диабетом I типа на состояние новорожденных

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

Цель исследования – оценка роли антител 1, 2 и 3-го порядков к инсулину у беременных с сахарным диабетом I типа (СД1) в перинатальных исходах.

Методика. Разработаны иммуноферментные тест-системы для определения антител различных порядков (АТ1, АТ2 и АТ3) к инсулину. Обследованы 188 женщин с диагнозом СД1 в возрасте от 19 до 34 лет во время беременности, которая у всех завершилась родами. Все женщины были разделены на группы, в зависимости от содержания АТ различных порядков к инсулину во время беременности. Клинически обследованы 188 новорожденных этих женщин.

Результаты. Наиболее благоприятной в плане показателей здоровья новорожденных оказалась группа женщин с преимущественным повышением АТ1 к инсулину. Детей в относительно удовлетворительном состоянии у них было статистически значимо ($p < 0,05$) больше по сравнению со всеми остальными группами. Наиболее неблагоприятной в отношении состояния новорожденных оказалась группа пациенток с преимущественным повышением АТ2 к инсулину. Среди них было 22,8% детей, родившихся в тяжелом состоянии и 45,7% детей в состоянии средней тяжести (в сумме – 68,5%, что значимо больше, чем в других группах, $p < 0,05$). АТ3 к инсулину частично нивелировали патогенное действие соответствующих АТ2.

Заключение. Преимущественное повышение АТ1, АТ2 или АТ3 к инсулину во время беременности у женщин с СД1 оказывает существенное влияние на перинатальные исходы.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 типа; беременность; новорожденные; антитела к инсулину; антиидиотипические антитела

Для цитирования: Проценко А.М. Влияние аутоантител к инсулину у беременных с сахарным диабетом I типа на состояние новорожденных. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(3): 59-68.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.59-68

Для корреспонденции: Проценко Анна Мергеновна, e-mail: ahummedova@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках темы госзадания FGFU-2022-0011.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.06.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Protsenko A.M.

Effects of insulin autoantibodies of different orders in pregnant women with type 1 diabetes mellitus on the condition of the newborn

Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315

Aim. To assess the effect of insulin antibodies of 1, 2 and 3 orders in pregnant women with type 1 diabetes mellitus (DM1) on perinatal outcomes.

Methods. ELISA test systems had been developed to detect insulin antibodies of various orders (AT1, AT2, and AT3). 188 women with DM1 aged 19 to 34 years were examined during pregnancy, which ended in childbirth in all cases. All women were divided into groups based on the content of insulin antibodies of various orders during pregnancy. 188 newborns of these women were clinically examined.

Results. The most favorable indicators of newborn health were observed in the group of women with a predominant increase in anti-insulin AT1. In this group, significantly ($p < 0.05$) more infants were in a relatively satisfactory condition than in all other groups. The least favorable condition of newborns was observed in the group with a predominant increase in anti-insulin AT2: 22.8% of infants were in a severe condition and 45.7% were in a moderately severe condition (total 68.5%, which was more than in other groups, $p < 0.05$). Anti-insulin AT3 partially neutralized the pathogenic effect of the respective AT2.

Conclusion. The predominant increase in anti-insulin AT1, AT2 or AT3 during pregnancy of women with DM1 significantly influences the perinatal outcomes.

Keywords: type 1 diabetes mellitus, pregnancy, newborns, antibodies to insulin, anti-idiotypic antibodies

For citation: Protsenko A.M. Effects of insulin autoantibodies of different orders in pregnant women with type 1 diabetes mellitus on the condition of the newborns. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(3): 59-68. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.59-68

For correspondence: Protsenko A.M., Researcher at the Laboratory of General and Perinatal Neuroimmunopathology of the NIIOPP, e-mail: ahummedova@mail.ru

Financing. The work was performed within the framework of the state task FGFU-2022-0011

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

Received 01.06.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Эпидемиологические исследования показывают, что у женщин, страдающих сахарным диабетом 1 типа (СД1), значительно увеличиваются риски серьезных осложнений развития эмбриона и плода по сравнению с общей популяцией беременных. При наличии у матери СД1 диабетическую фетопатию (ДФ) имеют до 75% новорожденных [1], перинатальная заболеваемость и смертность в 3-9 раз выше, чем у беременных не страдающих СД1 [2]. Некомпенсированный полностью СД1 во время беременности, согласно Global report on diabetes (2016), может оказывать негативное воздействие на мать и плод и приводить к существенному увеличению риска потери плода, врожденных пороков развития, мертворождениям и перинатальной смертности.

У детей, рожденных от матерей с СД1, 50% перинатальной смертности приходится на врожденные пороки развития, в то время как у детей, рожденных женщинами, не страдающими СД, данный показатель составляет не более 20-30% [3]. У этих детей часто выявляют аномальную массу тела, неонатальную гиперинсулинемию, гипогликемию, изменения толерантности к глюкозе, нарушения липидного метаболизма. Часто у них страдают нервная и сердечно-сосудистая системы [1]. Положение осложняется тем, что даже добившись нормального уровня сахара в крови во время беременности у пациенток с СД1, не всегда удается кардинально улучшить перинатальные исходы: риск врожденных пороков остается повышенным в 2-6 раз, а риск перинатальной смертности — в 3,5–8,5 раз (по сравнению с общей популяцией) [4]. При этом достижение нормогликемии у беременных с СД1 не приводит к полной нормализации у них обменных процессов [5].

При рассмотрении возможных механизмов неблагоприятного влияния СД1 матери на перинатальные исходы многие исследователи в настоящее время

пришли к заключению о важнейшей роли изменений в гуморальном звене материнской иммунной системы, а именно, повышенной продукции антител (АТ) к инсулину [6]. Показана связь худших неонатальных исходов с наличием аутоантител (аАТ) к островковым клеткам у матерей.

Высокое содержание АТ к антигенам островковых клеток поджелудочной железы, в том числе АТ к инсулину, выявляется в крови большинства больных СД1. В ряде случаев наступлению явного диабета предшествует довольно длительный субклинический период, характеризующийся появлением в крови аАТ против островково-специфических аутоантигенов [7]. Полагают, что взаимодействие таких АТ с антигенами β -клеток островков приводит к разрушению этих клеток с последующей редукцией выработки инсулина. На более поздних стадиях заболевания, когда собственные β -клетки уже полностью разрушены, выявляемые повышенные уровни противоинсулиновых АТ, вероятно, образуются уже на экзогенно вводимый инсулин.

В литературе обычно рассматривается содержание идиотипических антител к инсулину, или антител 1-го порядка (АТ1). При этом имеется лишь очень ограниченное число публикаций, касающихся изучения содержания антиидиотипических антител (АИАТ) к инсулину при диабете, или антител 2-го порядка (АТ2) [8]. Что касается АТ3 к инсулину при СД1, то, судя по данным доступной литературы, таких исследований не проводилось.

По имеющимся данным, АТ2 к инсулину оказывают существенное влияние на особенности течения СД1 [9]. Известно, что АИАТ (АТ2) против биологически активных веществ, как правило, обладают способностью взаимодействовать не только с $F_{(ab)}$ -фрагментами соответствующего идиотипа АТ1, но и с рецепторами исходного вещества, как бы «мимикрируя» при этом под образ самого антигена [2]. Это дает основание для предполо-

жения, что АИАТ к инсулину, являясь как бы иммунохимическим подобием, «зеркальным» отображением самого инсулина, обладают способностью связываться с его рецепторами и проявлять, таким образом, активность, свойственную антирецепторным антителам.

Несмотря на то, что многие аспекты влияния иммунных нарушений при СД1 у беременных на перинатальные исходы уже достаточно хорошо изучены [9–11], до сих пор не произведена комплексная оценка влияния антител различных порядков к инсулину (АТ1, АТ2 и АТ3) на особенности углеводного обмена у беременных с СД1 и на состояние здоровья их новорожденных. В то же время такие исследования представляются нам чрезвычайно важными, поскольку могут раскрыть новые механизмы влияния иммунных изменений у беременных с СД1 на перинатальные исходы, а также определить перспективы более эффективной коррекции выявляемых нарушений.

Цель настоящего исследования – оценка роли антител 1, 2 и 3-го порядка к инсулину у беременных с СД1 в перинатальных исходах.

Методика

В ходе работы проводили определение уровней антител разного порядка (АТ1, АТ2, АТ3) к инсулину у женщин с СД1 и группы контроля с помощью стандартного твердофазного ИФА. С этой целью планшеты активировали:

1) олигомерным инсулином человека (полимеризованным глютаровым альдегидом) для выявления антиинсулиновых АТ1;

2) F(ab)₂-фрагментами антиинсулиновых АТ1 (полученными из соответствующих АТ1, выделенных из сыворотки иммунизированных инсулином кроликов) для определения содержания АТ2;

3) F(ab)₂-фрагментами антиинсулиновых АТ2 (полученными из соответствующих АТ2, выделенных из сыворотки иммунизированных F(ab)₂-фрагментами антиинсулиновых АТ1 кроликов) для определения содержания АТ3.

Коэффициент вариации созданных тест-систем составлял не более 10%.

Иммунореактивность (ИР) каждого образца исследуемых сывороток выражали в условных единицах (у.е.), отражавших проценты иммунореактивности образца от интенсивности реакции стандартной сыворотки в соответствии с уравнением:

$$\text{ИР} = \frac{\text{ОП анализируемого образца} \times 100}{\text{ОП стандартной сыворотки}} - 100$$

где ОП – оптическая плотность.

В качестве стандартной сыворотки использовали пулированную сыворотку здоровых доноров в возрасте от 19 до 37 лет.

Для выяснения, антитела какого порядка преобладают, высчитывали соотношение относительных уровней сывороточного содержания антиинсулиновых АТ1, АТ2 и АТ3. Для этого были введены коэффициенты *K*:

$$K1(АТ1/АТ2) = (y.e.1 + 100)/(y.e.2+100)$$

$$K2(АТ2/АТ3) = (y.e.2 + 100)/(y.e.3+100)$$

$$K3(АТ1/АТ3) = (y.e.1 + 100)/(y.e.3+100), \text{ где}$$

y.e.1 – уровень АТ1 в условных единицах

y.e.2 – уровень АТ2 в условных единицах

y.e.3 – уровень АТ3 в условных единицах.

Уровни антител 1-го, 2-го и 3-го порядков считали сбалансированными, если коэффициенты *K* находились в пределах 1,2 – 0,8. Повышение коэффициентов *K1*>1,2 и *K3*>1,2 расценивали как преобладание АТ1, при *K2*>1,2 – как преобладание АТ2. Уменьшение коэффициента *K1*<0,8 говорит о преобладании АТ2, при *K2*<0,8 и *K3*<0,8 – о преобладании АТ3.

Клинический материал. Исследование выполнено по международным правилам работы с биоматериалом людей и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 26.

Были обследованы 188 женщин с диагнозом СД1 в возрасте от 19 до 34 лет, у которых в дальнейшем наступила беременность, завершившаяся родами. Все женщины оформляли добровольное информированное согласие на участие в исследовании. (Работа одобрена этическим комитетом ФГБНУ НИИОПП, протокол № 3 от 06.07.22 г.).

Продолжительность заболевания СД1 у включенных в исследование беременных женщин – более 1 года. Все женщины получали инсулинотерапию. Какая-либо другая выраженная патология, не связанная с СД1, у них отсутствовала. В качестве контроля наблюдались 32 беременные в возрасте от 17 до 35 лет без эндокринной патологии, аутоиммунных заболеваний, сопутствующей соматической патологии, психических и инфекционных заболеваний.

Группы беременных женщин. Все женщины были разделены на 5 групп, включая контрольную группу, в зависимости от содержания АТ различных порядков к инсулину во время беременности: Обследования на содержание АТ к инсулину проводили дважды на сроках 9-11 и 29-33 нед беременности.

1-я группа – женщины, у которых уровень АТ1, АТ2, АТ3 к инсулину не превышал норму – 51 женщина (27,1%).

2-я группа – женщины с преобладанием АТ1 к инсулину – 49 человек (26,1%);

3-я – группа – женщины с преобладанием АТ2 к инсулину – 35 человек (18,6%);

4 группа – женщины с преобладанием АТ3 к инсулину – 53 человека (28,2%);

5 группа (контрольная) – пациентки без СД1 с физиологическими сбалансированными уровнями определяемых антител – 32 женщины.

При наблюдениях за новорожденными оценивали состояние ребенка и его матери при рождении и особенности течения раннего неонатального периода. Оценка состояния ребенка в раннем неонатальном периоде проводилась врачом-неонатологом ежедневно в период его нахождения в родильном доме. В ходе наблюдений за новорожденными анализировали:

– состояние ЦНС (в том числе признаки нарушения мозгового кровообращения, наличие тремора подбородка и конечностей, гипотонии, нарушение процессов сосания и глотания);

– наличие респираторных нарушений (отсутствие самостоятельного или ослабленное дыхание, рассеянные хрипы в легких, вторичное апное, что в некоторых случаях требовало перевода на искусственную вентиляцию легких);

– сердечно-сосудистые нарушения (аритмия, приглушенность сердечных тонов, систолический шум);

– заболевания желудочно-кишечного тракта (пауз кишечника, кишечная непроходимость);

– содержание антител различного порядка к инсулину в течение всего раннего периода адаптации.

В группу сравнения вошли новорожденные, родившиеся у матерей контрольной группы.

Группы новорожденных. Новорожденные были разделены на 4 группы, в зависимости от их клинического состояния:

– группа Ia – 54 новорожденных (и их матери) – 28,7% с относительно удовлетворительным состоянием при рождении и в раннем неонатальном периоде;

– группа Ib – 62 новорожденных (и их матери) – 33,0% с незначительными поражениями ЦНС при рождении и положительной динамикой состояния в течение раннего неонатального периода

– группа II – 55 новорожденных (и их матери) – 29,3% в состоянии средней тяжести при рождении и в раннем неонатальном периоде;

– группа III – 17 новорожденных (и их матери) – 9,0% с тяжелым состоянием при рождении и в течение раннего неонатального периода, 1 ребёнок из этой группы погиб постнатально в раннем неонатальном периоде.

Различия показателей в группах наблюдений оценивали путем попарного сравнения всех измерений в двух группах с помощью ряда непараметрических критериев (Уилкоксона-Манна-Уитни, Смирнова, Фишера, Хи-квадрат). Ответ получали в форме вероятности.

Результаты

У обследуемых беременных синдром задержки роста плода (СЗРП) отмечался у 44 женщин из 188 (24,5%), чаще всего у женщин 3-й группы (15 человек – 42,8%). В остальных группах частота встречаемости СЗРП была следующей: в 1-й группе – у 9 (17,6%), во 2-й – у 6 (12,2%), в 4-й группе – у 14 женщин (26,4%).

Данные по массе тела новорожденных представлены в **таблице 1**. При анализе этих данных видно, что тенденция к наибольшим отклонениям в весе наблюдались у детей женщин 3-й группы. У 34,3% из них (12 детей) масса тела колебалась в диапазоне 2000–3000г. С микросомией (менее 2000 г) в этой группе было 3 ребенка (8,6%).

Наиболее высокие показатели массы тела новорожденных были отмечены у женщин 2-й группы. Так, количество детей с массой более 3 кг у женщин 2-й группы было статистически значимо ($p < 0,05$) больше, чем у женщин 3-й группы.

Многие исследователи отмечают, что нарушения в системе гуморального иммунитета матери при СД являются одной из причин рождения у них детей с аномальной массой тела [12]. Другие исследователи не обнаружили связи между присутствием аАТ к инсулину у матерей с СД1 и массой тела новорожденных [13].

У наблюдавшихся 188 беременных с СД1 роды завершились рождением живых детей. У 1 женщины новорожденный погиб в постнатальном периоде.

Осложнения при родах гипоксически-ишемического характера у новорожденных. Среди осложнений при родах у новорожденных отмечены состояния асфиксии разной степени тяжести. Частота их встречаемости представлена в **таблице 2**.

Как видно из представленной таблицы, наблюдалась тенденция к увеличению более тяжелых форм асфиксии у новорожденных от женщин 3-й группы. Одним из наиболее частых видов патологии новорожденных от матерей с СД1 являются нарушения функций ЦНС, в первую очередь – гипоксически-ишемического поражения ЦНС I, II и III степени тяжести. На **рис. 1** представлены различия по степени выраженности таких поражений у новорожденных от матерей исследуемых групп. При анализе представленных диаграмм видно, что степени нарушения мозгового кровообращения (НМК) коррелируют с содержанием АТ различных порядков к инсулину.

Наибольшее число новорожденных с гипоксически-ишемическими поражениями ЦНС II и III степени наблюдалось у женщин 3-й группы (27 человек – 77,2%), что существенно больше ($p < 0,05$), чем в любой другой группе.

Результаты исследования нарушений функций ЦНС у новорожденных свидетельствовали о том, что наиболее благоприятные показатели наблюдались у детей женщин 2-й группы (с преимущественным повышением АТГ к инсулину), а самые неблагоприятные – у детей женщин 3-й группы.

Анализ параметров гликемии новорожденных от матерей с СД1. Анализ основных параметров гликемии был проведен у всех 188 новорожденных от матерей с СД1. У 104 детей (55,3%) медианы среднесуточного уровня глюкозы в крови соответствовали значениям, характерным для здоровых новорожденных (2,0–5,6 ммоль/л). Отклонения от нормального уровня выявлены у 84 новорожденных (44,7%), из них синдром ги-

погликемии отмечен у 46, а гипергликемии – у 38 новорожденных (24,5% и 20,2% соответственно). Частота проявления гипер- и гипогликемических состояний по группам детей представлена на **рис. 2**.

Нормогликемия чаще всего определялась у новорожденных с удовлетворительным состоянием или с незначительными отклонениями в группах Ia и Ib. Так, в 1-е сут жизни нормальный уровень глюкозы в группах Ia и Ib отмечен у 39 (72,2%) и 39 (62,9%) детей соответственно, что статистически значимо выше ($p < 0,01$), чем в группе III (17,6%, 3 новорожденных). Частота проявлений дисглюкоземии возрастала по мере утяжеления состояния новорожденных: от 27,8% в группе Ia до 82,4% в группе III ($p < 0,05$).

В группе Ia новорожденных с гипогликемией было 9 человек (16,7%), со слабо выраженной гипергликемией – 6 (11,1%). У новорожденных группы Ib нормальный уровень глюкозы определялся в 62,9%

Таблица 1/Table 1

Масса тела новорожденных у матерей с СД1 (г)**Newborn body weight in mothers with DM1 (g)**

Группы женщин Women's group	Масса тела новорожденного (г) Newborn body weight (g)			
	< 2000	2000-3000	3000-4000	>4000
1-я – 51 чел./people	1 (2,0%)	13 (25,5%)	34 (66,7%)	3 (5,9%)
2-я – 49 чел./people	-	9 (18,4%)	36 (73,5%)*	4 (8,2%)
3-я – 35 чел./people	3 (8,6%)	12 (34,3%)	20 (57,1%)	-
4-я – 53 чел./people	1 (1,9%)	17 (32,1%)	34 (64,2%)	1 (1,9%)
5-я (контрольная) – 32 чел. 5-я control group – 32 people	-	4 (12,5%)	27 (84,4%)	1 (3,1%)

Примечание. * – $p < 0,05$ при сравнении с 3-й группой.

Note. * – $p < 0,05$ in comparison with the 3rd group.

Таблица 2/Table 2

Степень тяжести асфиксии у новорожденных в различных группах**The severity of asphyxia in newborns in different groups of pregnant women**

Группы беременных женщин Pregnant women groups	Степень тяжести асфиксии Degree of severity of asphyxia		
	Лёгкая light	Средняя medium	Тяжёлая heavy
1-я – 51 человек/people	15 (29,4%)	9 (17,6%)	-
2-я – 49 человек/people	16 (32,7%)	10 (20,4%)	-
3-я – 35 человек/people	12 (34,3%)	11 (31,4%)	1 (2,9%)
4-я – 53 человек/people	21 (39,6%)	13 (24,5%)	-
5-я (контрольная) – 32 чел. 5-я control group – 32 people	2 (6,3%)	1 (3,1%)	-

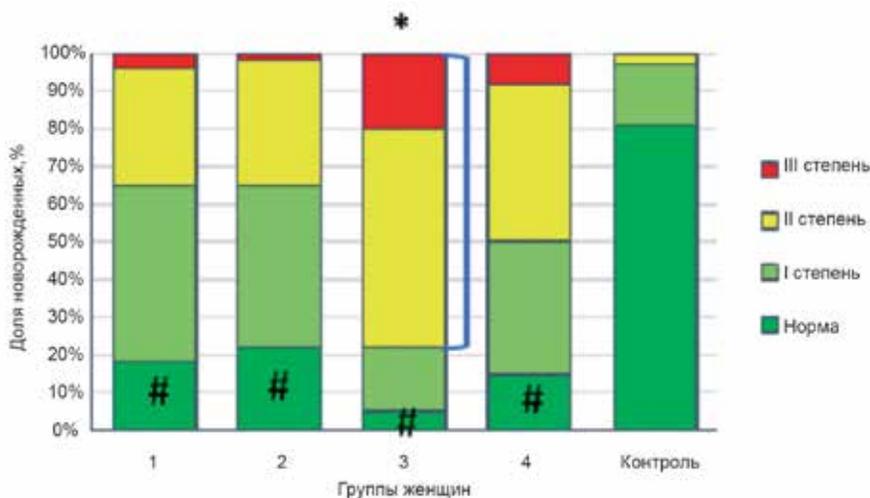


Рис. 1. Степень гипоксически-ишемического поражения ЦНС новорожденных у женщин различных групп. По вертикали – доля новорожденных с той или иной степенью поражения ЦНС, %; по горизонтали – группы беременных женщин. * – отличия от групп 1-й, 2-й, 4-й и контрольной группы; # – отличия от контрольной группы.

Fig. 1. Degrees of hypoxic-ischemic lesions of the neonatal central nervous system in women of different groups. The vertical axis is the proportion of newborns with some degree of CNS damage, %; horizontal – groups of pregnant women; * – differences from groups 1,2,4 and control group; # – differences from control group. Grade III – red, II – yellow, I – light green; dark green – norm.

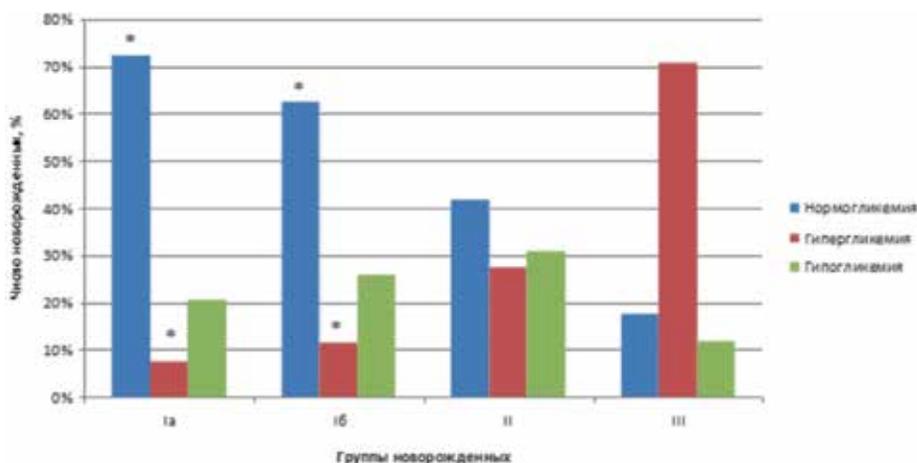


Рис. 2. Частота проявления среднесуточной нормогликемии, гипо- и гипергликемии в группах новорожденных в зависимости от тяжести их состояния. * – $p < 0,01$ по сравнению с группой III.

Fig. 2. Frequency of average daily normoglycemia, hypo- and hyperglycemia in the groups of newborns depending on the severity of their condition. The vertical axis – number of newborns; horizontal – neonatal groups; normoglycemia – blue, hyperglycemia – red, hypoglycemia – green. * – $p < 0.01$ compared with group III.

(39 чел.) наблюдений, а нарушения гликемического состояния в 1-е сут жизни отмечены у 23 (37,1%) детей.

Группа II новорожденных статистически значимо ($p < 0,05$) отличалась от групп Ia и Ib снижением числа детей с нормальным уровнем гликемии до 41,8% (23 чел.) и увеличением числа детей с дисгликоземией до 58,2% (32 чел.),

Гипогликемия первых часов жизни у 17 детей имела неодинаковый характер: у одних (9 человек) она была непродолжительной и легко компенсировалась. У другой части новорожденных II группы (8 человек) гипогликемия отличалась устойчивостью и с трудом поддавалась терапии. У этих детей проявлялись клинические симптомы гипоксии: снижение двигательной и условно-рефлек-

торной активности, трудности с дыханием. Для матерей этих детей, в целом, было характерно субкомпенсированное течение СД1. Гипергликемия, зафиксированная в первые часы жизни у 15 новорожденных, в 80,0% случаев достигала значений 7,0 ммоль/л. Однако она не сопровождалась выраженными клиническими проявлениями и отличалась непродолжительностью.

В III группе установлено снижение количества детей с нормальным содержанием глюкозы в крови до 17,6% (3 чел.) и повышение числа новорожденных с дисглюкоземией до 82,4% (14 чел.): 8 детей (47,1%) с гипергликемией и 6 (35,3%) – с гипогликемией.

Гипергликемия с уровнем выше 6,5 ммоль/л имела место у 29,4% (5 чел.) детей и отличалась устойчивостью и рефрактерностью к инсулинотерапии. Примечательно, что матери этих детей были отнесены к 3-й группе, т.е. с преимущественным повышением АТ2 к инсулину.

Гипогликемия первых часов жизни у части детей данной группы (3 чел., 17,6%) была сравнительно непродолжительной и приходила в норму от инъекций раствора глюкозы. У другой части новорожденных (3 чел., 17,6%), среди которых были недоношенные дети, гипогликемия носила устойчивый характер. Важно подчеркнуть, что матери этих детей страдали тяжелой формой СД1 в стадии субкомпенсации.

Анализ взаимосвязи между состоянием здоровья новорожденных и уровнем определяемых аАТ. Для анализа

взаимосвязи между состоянием здоровья новорожденных и уровнем определяемых аАТ мы разделили новорожденных на несколько групп в соответствии с тяжестью их состояния и особенностями течения раннего неонатального периода. Распределение этих детей по группам женщин с различным содержанием противоионсулиновых аАТ представлено на **рис 3**.

Анализ представленных диаграмм показал, что опять наиболее благоприятной в плане показателей здоровья новорожденных оказалась 2-я группа женщин с преимущественным повышением АТ1 к инсулину. В этой группе детей в тяжелом состоянии было меньше всего – 2,0%. К группе Ia относилось 51,0% детей, что статистически значимо ($p < 0,05$) больше по сравнению со всеми остальными группами детей от матерей с СД1.

Наиболее неблагоприятной в отношении состояния новорожденных оказалась 3-я группа беременных женщин. Среди них было 22,8% детей, родившихся в тяжелом состоянии и 45,7% детей в состоянии средней тяжести (в сумме – 68,5%, что значимо больше, чем в других группах, $p < 0,05$). В этой группе один ребёнок, родившийся в тяжёлом состоянии, умер в раннем неонатальном периоде.

Исходя из сказанного, можно сделать вывод о том, что АТ2, как было показано выше, блокируя рецепторы инсулина, создают основу для инсулинорезистентности, а АТ3 к инсулину, синтез которых индуцируется

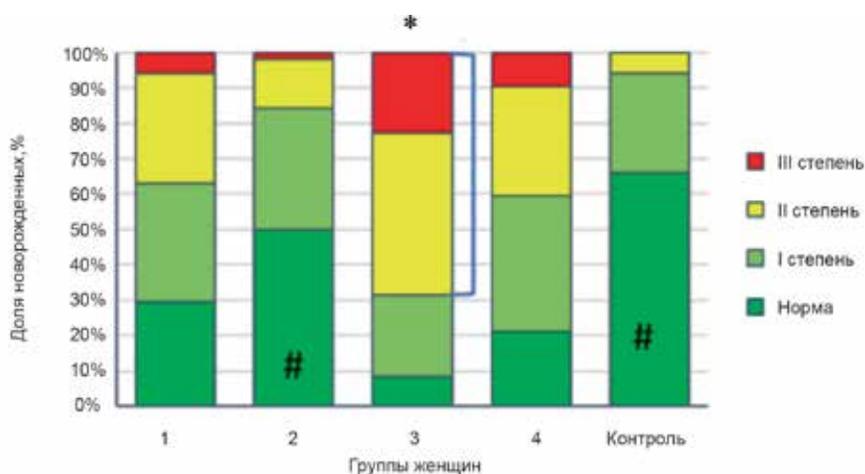


Рис. 3. Состояние здоровья новорожденных у женщин различных групп.

* – отличия от 1-й, 2-й, 4-й и контрольной групп; # – отличия от 1-й, 3-й и 4-й групп

По вертикали – доля новорожденных с различной тяжестью состояния, %; по горизонтали – группы беременных женщин.

Fig. 3. Health status of newborns in women of different groups.

The vertical axis – percentage of newborns with varying severity of condition, %; horizontal – groups of pregnant women. III (red), II (yellow), Ib (light green), Ia (dark green) – groups of newborns according to the severity of their condition.

соответствующими АТ2, связывают АТ2 и тем самым блокируют их патогенное действие.

В целом, полученные результаты продемонстрировали взаимосвязь между особенностями гуморального аутоиммунитета к инсулину и состоянием здоровья родившихся детей.

Клиническая характеристика новорожденных различных клинических групп. Приведем краткую клиническую характеристику детей, отнесенных нами к различным клиническим группам.

Все дети группы Ia (54 чел.) родились своевременно и в хорошем или удовлетворительном состоянии, с оценкой по шкале Апгар равной или выше 8 баллов. Масса тела при рождении по перцентильной шкале оценки для подавляющего большинства (96,3%) детей данной группы (52 чел.) соответствовала диапазону 25–75 П. У 3,7% новорожденных (2 чел.) имели место признаки макросомии с оценкой >75 П. У части детей (11,1%, 6 чел.) на 2-е сут проявилась желтуха, вскоре исчезающая. У 7 детей (13,0%) к началу 2-х сут появились слабые симптомы повышенной нервно-рефлекторной возбудимости. Эти состояния достаточно быстро (в течение 5–6 сут) нормализовались. Все дети этой группы были выписаны в удовлетворительном состоянии.

Для детей группы Ib при рождении характерно удовлетворительное состояние (по шкале Апгар 7–8 баллов) и признаки гипоксически-ишемического поражения ЦНС I степени, выражающиеся в повышенной нервно-рефлекторной возбудимости, расстройствах сна, срыгивании, треморе подбородка, усилении или снижении рефлексов, снижении тонуса мышц. У большинства детей этой группы (54 ребёнка, 87,1%) в первые 3–4 сут не отмечалось значительных нарушений здоровья, однако у 12,9% (8 детей), рожденных в удовлетворительном состоянии, к началу 2-х сут здоровье ухудшилось до среднетяжелого. У этих детей проявились симптомы повышенной нервно-рефлекторной возбудимости и двигательных расстройств, которые достаточно быстро компенсировались соответствующими лечебными мероприятиями. У 6 из них наблюдались гипогликемические состояния, сопровождавшиеся признаками акроцианоза. В результате предпринятого лечения их состояние быстро улучшалось, хотя при этом у 2 новорожденных сохранялась небольшая мышечная гипотония и слабо выраженное нарушение рефлекторной активности. При этом выявляемые нарушения ЦНС не превышали легкой степени тяжести.

Группу II (55 детей) составили новорожденные, состояние которых оценивалось как среднетяжелое. Из них 14 детей (25,5%) родились недоношен-

ными. В состоянии асфиксии средней тяжести родилось 27 детей (49,1%). Оценка по шкале Апгар в основном не превышала 7 баллов на 1-й мин, но к 5-й мин у 74,5% (41 ребёнок) достигала 8 баллов.

Масса тела при рождении по перцентильной шкале оценки у 21,8% (12 детей) составляла <25 П с признаками микросомии, и у такого же количества детей имели место признаки макросомии с оценкой >75 П. У 34,5% (19 новорожденных) определялся синдром морфофункциональной незрелости, что дополнительно осложнялось серьезной потерей массы тела в первые 3–4 сут. В течение первых 2 сут жизни у 25,5% (14 новорожденных) состояние ухудшалось от среднетяжелого до тяжелого. Конъюгационная желтуха появилась у 17 (30,9%) детей. Нарушения функции ЦНС характеризовались проявлением симптомов НМК I, II или III степени, синдромами гипервозбудимости у 26 детей (47,3%), угнетения функций ЦНС – у 23 детей (41,8%), мышечной дистонией – у 36 детей (65,5%), нарушениями зрения, косоглазием у 3 (5,5%) детей. У 7 детей (12,7%) развился судорожный синдром.

Все новорожденные II группы сразу после рождения получали соответствующее лечение. Большинству детей требовалась интенсивная терапия. Проводились оксигенотерапия, инфузионная, гемостатическая и дегидратационная терапия, искусственная вентиляция легких в случаях дыхательной недостаточности. Дети получали антибиотики, комплекс метаболитов и адаптогенных препаратов. Практически все новорожденные данной группы в состоянии средней тяжести проходили второй этап выхаживания.

Группа III состояла из 17 новорожденных с тяжелым состоянием. Из них 12 (70,6%) детей родились недоношенными; 16 детей в состоянии асфиксии средней тяжести и 1 ребёнок в состоянии тяжелой асфиксии. Все дети были маловесными. Тяжелое гипоксически-ишемическое поражение ЦНС наблюдалось у 14 детей (82,4%) и характеризовалось синдромами гипервозбудимости и угнетения ЦНС, снижением безусловно-рефлекторной активности и мышечной гипотонией, которая в последующем нередко сменялась гипертонусом отдельных групп мышц конечностей и проявлением судорожного синдрома. В результате перенесенной гипоксии у 7 детей (41,2%) развивалась дыхательная недостаточность; у 6 детей (35,3%) формировался отечный синдром.

На 2–4 сут жизни состояние 2 детей ухудшалось до крайне тяжелого, развивались нарушения микроциркуляции и гемодинамические расстройства, проявлялась конъюгационная желтуха 2-й и 3-й степени тяжести, а уровень общего билирубина возрастал

до 320 мкмоль/л. Один ребёнок умер в раннем неонатальном периоде.

Детям этой группы требовалось проведение интенсивной терапии с момента рождения. Они получали лечение в отделении интенсивной терапии с использованием оксигенотерапии и искусственной вентиляции легких. Проводилась инфузионная терапия и лечение антибиотиками, комплексом метаболитов, адаптогенных и гемостатических препаратов.

Обсуждение

Источники литературы указывают на отрицательные последствия нарушенной антиинсулиновой иммунореактивности у матерей для развития плода и состояния новорожденного [6]. Особо важная роль при этом принадлежит процессу трансплацентарного поступления к плоду избыточных количеств материнских антиинсулиновых АТ, способных нарушить формирование оптимального содержания данных антител у новорожденного с последующими изменениями в обменных процессах и нормальное развитие различных систем организма. При этом образующийся в организме плода избыток циркулирующих инсулин-антительных комплексов может стать причиной развития гипогликемии или гиперинсулинемии с тяжелыми последствиями для новорожденных в постнатальном периоде [14].

По нашему мнению, влияние повышенных концентраций АТ1 может подразумевать несколько вариантов активности АТ1. Например, повышенные уровни АТ1 активизируют образование комплексов АТ1-АТ2, что может способствовать уменьшению неблагоприятных воздействий АТ2 на инсулиновые рецепторы (на их избыточное блокирование или деблокирование) и восстановлению способности рецепторов связывать инсулин, нормализуя его физиологическую активность.

Другой вариант влияния АТ1 – формирование его комплексов с циркулирующим в крови свободным инсулином. Такие комплексы, распадаясь, вызывают появление в крови повышенных концентраций свободного инсулина, что может способствовать развитию гипогликемического состояния¹.

Гиперпродукция антиинсулиновых АТ1, по-видимому, служит толчком к последующей индукции биосинтеза антиидиотипических, т.е. антирецепторных АТ2, которые при достижении патологического уровня приводят к наиболее тяжелой клинической картине основного заболевания [15]. Мы сделали предполо-

жение, что нарастающие затем уровни АТ3, связывающие АТ2, могут нивелировать их негативные эффекты.

Такие АТ2 способны блокировать инсулиновые рецепторы, что приводит к инсулинорезистентности и гипергликемии [2, 15]. Способность блокировать действие инсулина и нарушать возможность клеток связывать гормон во многом зависит от конкуренции между инсулином и АТ2 за взаимодействие со специфическими рецепторами. Кроме того, есть сведения о том, что АТ2 при связывании с мембранными рецепторами инсулина могут снижать их количество в результате поглощения связанных рецепторов цитоплазмой [16]. В этом случае даже при избыточной секреции эндогенного инсулина или при инъекциях его экзогенных аналогов может наблюдаться недостаток функционирующего инсулина, известный как патологическая инсулинорезистентность, сопровождающаяся гипергликемией. Важная роль антирецепторных АТ2 в развитии инсулинорезистентности и гипергликемии подтверждается рядом других исследователей [17].

Рождение детей с микросомией или с макросомией в связи с нарушением иммунореактивности к инсулину у их матерей можно рассматривать как результат конкурентного влияния антиинсулиновых АТ1 и антирецепторных АТ2, поступающих от матери к плоду. По-видимому, перенос повышенных количеств материнских антиинсулиновых АТ1 приводит к образованию в организме плода избытка циркулирующих инсулин-антиинсулиновых комплексов и может стать причиной развития гиперинсулинемии и гипогликемии у новорожденных в раннем периоде адаптации [10].

Мы полагаем, что состояние плода/новорожденного в значительной степени обусловлено трансплацентарно поступающим от матери повышенным количеством антирецепторных АТ2. Блокируя инсулиновые рецепторы на мембране разных типов клеток плода, и нарушая тем самым нормальное потребление клетками глюкозы, эти антитела вызывают серьезные изменения энергетического, белкового и жирового метаболизма во всех органах и тканях плода/новорожденного и последующие изменения в общем развитии ребенка.

Новорожденные женщин 4-й группы имели более высокие показатели здоровья по сравнению с новорожденными женщин 3 группы. Есть все основания полагать, что индуцируемая антирецепторными АТ2 продукция соответствующих АТ3 способствует нейтрализации их негативного влияния. Это может способствовать восстановлению функциональной активности рецепторов, локализованных на тканях различных органов плода/новорожденного, их способности связывать инсулин и нормализовать утилизацию глюкозы.

¹ – Письмо Минздрава РФ от 17 декабря 2013 г. N 15-4/10/2-9478 «Гестационный сахарный диабет: диагностика, лечение, послеродовое наблюдение».

Как уже отмечалось выше, АТ2 могут оказывать двойной эффект: они способны как подавлять активность инсулиновых рецепторов, так и активизировать их, выступая в качестве аналога инсулина. В последнем случае инсулиноподобная активность материнских АТ2 может спровоцировать повышенное потребление тканями глюкозы и вызвать у новорожденного состояние гипогликемии даже при высоком содержании инсулина в крови.

Механизм протекторного действия АТ3 можно объяснить, с одной стороны, способностью АТ3 связываться с АТ2 и тем самым нейтрализовать их негативную активность, а с другой стороны – АТ3, подобно АТ1, но в меньшей степени, могут комплексоваться со свободно циркулирующим эндогенным инсулином, что защищает последний от протеолиза и пролонгирует его активность. Сопутствующим моментом при повышенном уровне АТ1 нередко являются слабые гипогликемические состояния, которые, как правило, легко купируются.

Данная работа показала, что «неуравновешенность» иммунной сети, выражающаяся в избирательном повышении АТ1, АТ2 или АТ3 к инсулину во время беременности у женщин с СД1 находят своё непосредственное отражение в перинатальных исходах.

Литература

(п.п. 2; 4; 6; 7; 10-17 см. References)

1. Солодкова И.В., Мельникова Л.Н., Паршина Н.В. и др. Дети от матерей с сахарным диабетом. Сахарный диабет у новорожденных. Клинические рекомендации (проект). *Детская медицина Северо-Запада*. 2015; 6(3): 4-10.
3. Есаян Р.М., Григорян О.Р., Пекарева Е.В. Роль компенсации углеводного обмена у беременных с сахарным диабетом I типа в развитии перинатальных осложнений. *Сахарный диабет*. 2009; 12(4): 23-7.
5. Древал А.В., Древал О.А., Старостина Е.Г. Непрерывное мониторирование гликемии в клинической практике и новые методы анализа его результатов. *Проблемы эндокринологии*. 2013; 4: 41-9.
8. Полетаев А.Б., Будыкина Т.С., Морозов С.Г. Аутоантитела к инсулину, сахарный диабет I типа и диабетическая фетопатия. *Сахарный диабет*. 2000; 4: 23-8.
9. Папышева О.В., Захарова И.А., Проценко А.М., Будыкина Т.С., Морозов С.Г., Кожевникова Е.Н. Аутоиммунные нарушения у матери с сахарным диабетом в генезе перинатальной патологии. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2018; 17(4): 111-9.

References

1. Solodkova I.V., Mel'nikova L.N., Parshina N.V., et al. Children from mothers with diabetes mellitus. *Diabetes mellitus in newborns*.

Clinical recommendations (draft). *Detskaya meditsina Severo-Zapada*. 2015; 6(3): 4-10. (in Russian)

2. Lapolla A., Dalfrà M.G., Fedele D. Diabetes related autoimmunity in gestational diabetes mellitus: is it important? *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis*. 2009; 19(9): 674-82.
3. Esayan R.M., Grigoryan O.R., Pekareva E.V. The role of compensation of carbohydrate metabolism in pregnant women with type 1 diabetes mellitus in the development of perinatal complications. *Sakhar-nyy diabet*. 2009; 12(4): 23-7. (in Russian)
4. Shand A.W., Bell J.C., McElduff A., et al. Outcomes of pregnancies in women with pregestational diabetes mellitus and gestational diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2008; 25: 708-15.
5. Dreval' A.V., Dreval' O.A., Starostina E.G. Continuous monitoring of glycemia in clinical practice and new methods for analyzing its results. *Problemy endokrinologii*. 2013; 4: 41-9.
6. Borchers A.T., Naguwa S.M., Keen C.L et al. The implications of autoimmunity and pregnancy. *J. Autoimmunity*. 2010; 34: 287-99.
7. Nokoff N., Rewers M. Pathogenesis of type 1 diabetes: lessons from natural history studies of high-risk individuals. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2013; 1281: 1-15.
8. Poletaev A.B., Budykina T.S., Morozov S.G. Autoantibodies to insulin, type 1 diabetes mellitus and diabetic fetopathy. *Sakhar-nyy diabet*. 2000; 4: 23-8. (in Russian)
9. Papysheva O.V., Zaharova I.A., Procenko A.M., Budykina T.S., Morozov S.G., Kozhevnikova E.N. Autoimmune disorders in a mother with diabetes mellitus in the genesis of perinatal pathology. *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii*. 2018; 17(4): 111-9. (in Russian)
10. Pertyńska-Marczewska M., Głowacka E., Grodzicka A., et al. Profile of peripheral blood neutrophil cytokines in diabetes type 1 pregnant women and its correlation with selected parameters in the newborns. *Am. J. Reprod. Immunol*. 2010; 63(2): 150-60.
11. Zhe L., Tian-mei W., Wei-jie M., Xin C., Xiao-min X. The influence of maternal islet beta-cell autoantibodies in conjunction with gestational hyperglycemia on neonatal outcomes. *PLoS ONE*. 2015; 10(3): 1-8.
12. Poletaev A.B., Gnedenko B.B., Makarova A.A., Krasnopolsky V.I., Budykina T.S., et al. Possible mechanisms of diabetic fetopathy: polyclonal antibodies to insulin and insulin receptor in sera of diabetic pregnant women and their newborns. *Human Antibodies*. 2000; 9(4): 189-97.
13. McCance D.R., Damm P., Mathiesen E.R., et al. Evaluation of insulin antibodies and placental transfer of insulin aspart to pregnant women with type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2008; 51: 2141-3.
14. Potter K.N., Wilkin T.J. The molecular specificity of insulin autoantibodies. *Diabetes Metab. Res. Rev*. 2000; 16: 338-53.
15. Felton J.L., Masada D., Bonami R.H., Hulbert C., Thomas J.W. Anti-Insulin B Cells Are Poised for Antigen Presentation in Type 1 Diabetes. *J. Immunol*. 2018; 201(3): 861-73.
16. Bonami R.H., Thomas J.W. Targeting Anti-Insulin B Cell Receptors Improves Receptor Editing in Type 1 Diabetes-Prone Mice. *J. Immunol*. 2015; 195(10): 4730-41.
17. Hirai H., Ogata E., Kikuchi N., Kohno T., Machii N., et al. The effects of liraglutide on both hypereosinophilic insulin allergy and the characteristics of anti-insulin antibodies in type 2 diabetes mellitus: a case report. *J. Med. Case Rep*. 2016; 10: 202.

Сведения об авторе:

Проценко Анна Мергеновна, науч. сотр. лаб. общей и перинатальной нейроинопатологии ФГБНУ НИИОПП,
e-mail: ahummedova@mail.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Александрова С.Г.¹, Бычкова Л.В.¹, Александрова М.Р.¹, Ляпунова Т.В.¹, Родоман М.Г.²

Изменения в анализах мочи и показателях функции почек у пациентов с вирусной пневмонией COVID-19

¹ Медицинский институт ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,
117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8;

² ГБУЗ «ГКБ 24 ДЗМ»,

127015, Москва, Россия, Писцовая ул., д. 10

Цель исследования – оценка характера поражения почек у пациентов с коронавирусной пневмонией.

Методика. Проведен ретроспективный анализ методом случайной выборки 300 историй болезней пациентов старше 18 лет без летальных исходов, поступивших на стационарное лечение по поводу коронавирусной инфекции, осложнившейся пневмонией и не имевших в анамнезе заболеваний мочевыделительной системы. Пациентам проводили: клинический анализ крови (ОАК), биохимический анализ крови, клинический анализ мочи (ОАМ), компьютерную томографию легких (КТ), выявление вируса COVID-19 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в мазках из ротоглотки и носоглотки.

Результаты. В исследовании преобладали лица мужского пола – 177 (59%) ($p < 0,01$) в основном в возрасте от 45 до 74 лет – 212 (70,6%) человек, чаще по сравнению с лицами молодого возраста 18-44 года – 51 (17%) и пожилого возраста старше 75 лет – 37 (12,4%) ($p < 0,01$ в каждом случае). Из 300 оцененных историй болезней в 103 (34,3%) были выявлены те или иные изменения в анализах мочи. В исследуемой группе пациентов с COVID-19-ассоциированной пневмонией и изменениями в анализах мочи сохранились те же тенденции по возрасту и полу. В проведенном исследовании изменения в анализах мочи наиболее часто выявлялись при коронавирусной пневмонии умеренной степени тяжести по КТ – 2. В каждой группе пациентов с коронавирусной пневмонией различной степени тяжести и изменениями в ОАМ превалировала протеинурия, значительно реже выявлялась лейкоцитурия. Уровень Д-димера напрямую зависел от степени поражения легких, что позволило заключить, что осложнения со стороны мочевыделительной системы были связаны, в первую очередь, с повреждением клубочков (микро-тромбоз) и значительно реже – канальцев.

Заключение. Больные с изменениями в ОАМ и повышением уровня Д-димера в сыворотке крови требуют дальнейшего наблюдения в динамике до нормализации анализов мочи, что позволит избежать риска развития осложнений со стороны мочевыделительной системы.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция; пневмония; ассоциированная с COVID-19; общий анализ мочи; повреждение почек; протеинурия; лейкоцитурия

Для цитирования: Александрова С.Г., Бычкова Л.В., Александрова М.Р., Ляпунова Т.В., Родоман М.Г. Изменения в анализах мочи и показателях функции почек у пациентов с вирусной пневмонией COVID-19. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(3): 69-79.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.69-79

Участие авторов: Александрова С.Г. – главный исследователь, набор пациентов, обработка материала, статистический анализ, написание текста статьи; Бычкова Л.В. – научный консультант, редактирование статьи; Александрова М.Р. – помощь в наборе пациентов; Ляпунова Т.В. – помощь в статистической обработке материала; Родоман М.Г. – помощь в наборе пациентов. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Александрова Светлана Григорьевна, e-mail: alexandrova-sg@rudn.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.06.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Alexandrova S.G.¹, Bychkova L.V.¹, Alexandrova M.R.¹, Lyapunova T.V.¹, Rodoman M.G.²**Changes in urine tests and renal function indices in patients with COVID-19 viral pneumonia**¹Miklukho-Maklaya str., Medical institute, RUDN University, Moscow, 117198, Russian Federation;²Pistsovaya str., City Clinical Hospital № 24 Moscow Healthcare Department, Moscow, 127015, Russian Federation**The aim of** the study was to evaluate the character of kidney damage in patients with coronavirus pneumonia.**Methods.** The retrospective random sampling analysis of 300 case histories of patients over 18 years old without lethal outcomes, who were admitted for inpatient treatment for coronavirus infection complicated by pneumonia and had no history of urinary system diseases was performed. Patients underwent: clinical blood count (CBC), biochemical blood count, clinical urinalysis (CUR), computed tomography (CT) of lungs, detection of COVID-19 virus by polymerase chain reaction (PCR) in swabs from oropharynx and nasopharynx.**Results.** The study was dominated by males, 177 (59%) ($p < 0.01$), mostly between the ages of 45 and 74 years, 212 (70.6%), with a significantly higher incidence compared to those aged young 18-44 years, 51 (17%), and elderly over 75 years, 37 (12.4%) ($p < 0.01$ in each case). Of the 300 case histories evaluated, 103 (34.3%) had some form of change in urinalysis. In the study group of patients with COVID-19-associated pneumonia and changes in urine tests the same trends by age and sex were maintained. In our study the changes in urine tests were reliably the most frequent in case of coronavirus pneumonia of CT degree of severity – 2. In each group of patients with coronavirus pneumonia of varying severity and changes in UAM, proteinuria reliably prevailed, leukocyturia was detected significantly less frequently, D-dimer level directly depended on the degree of lung damage (the higher the damage, the higher D-dimer value), which allowed to conclude that complications from the urinary system were related primarily to glomerular damage (micro-thrombosis) and significantly less often to tubule damage.**Conclusion.** Patients with changes in the UAM and increased serum D-dimer require further dynamic monitoring until urinalysis normalizes, which will avoid the risk of urinary system complications.**Keywords:** coronavirus infection; pneumonia; associated with COVID-19; general urine analysis; kidney damage; proteinuria; leukocyturia**For citation:** Alexandrova S.G., Bychkova L.V., Alexandrova M.R., Lyapunova T.V., Rodoman M.G. Changes in urine tests and renal function indices in patients with COVID-19 viral pneumonia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(3) 69-79. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.69-79

Author's contribution: Alexandrova S.G. – principal investigator, patient recruitment, material processing, statistical analysis, text writing; Bychkova L.V. – scientific adviser, editing of the article; Lyapunova T.V. – help in statistical processing of material; Rodoman M.G. – help in patient recruitment. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.**For correspondence:** **Aleksandrova Svetlana G.**, a general practitioner at NFOB, assistant of the Department of Hospital Therapy with courses in endocrinology, hematology, and CLD at the Federal State Educational Institution of Higher Professional Education, Moscow State University of Medical Sciences, e-mail: alexandrova-sg@rudn.ru**Information about the authors:**Alexandrova S.G., <https://orcid.org/0000-0001-6151-8207>Bychkova L.V., <https://orcid.org/0000-0001-8841-5515>Alexandrova M.R., <https://orcid.org/0000-0002-6801-835X>Lyapunova T.V., <https://orcid.org/0000-0002-1141-0764>Rodoma M.G., <https://orcid.org/0000-0001-6588-874X>**Financing.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 10.06.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Введение

Настоящее поколение врачей и жителей планеты стали свидетелями и пострадавшими от пандемии COVID-19, которая находится в стадии развития и увеличивает число своих жертв. Накопленный опыт по диагностике и лечению больных с ковидными пневмониями

показал, что наряду с легкими при новой коронавирусной инфекции в процесс вовлекаются и другие органы, в том числе почки. По некоторым данным, у 30-40% пациентов с COVID-19 развивается заболевание почек [1, 2], от 10 до 15% больных при пневмонии, ассоциированной с COVID-19, имели повреждение почек, проявляющееся в виде повышения уровня

креатинина крови, снижения клубочковой фильтрации, а у 26-63% пациентов отмечалась протеинурия и несколько реже – лейкоцитурия [3–5]. Нарушение функционирования почек у больных с новой коронавирусной инфекцией, в свою очередь, требует изменения доз лекарственных средств, используемых в их лечении.

В литературе рассматривается несколько версий вовлечения почек в патологический процесс. Одна из версий – наличие в почках рецепторов, к которым вирус прикрепляется, проникает, копирует себя и повреждает почечную ткань [6]. Согласно другой – гипоксия при коронавирусной пневмонии, вызванной COVID-19, может привести к почечной патологии [7]; третья версия – во время болезни вырабатываются цитокины (нередко их количество огромно), что может привести к разрушению здоровых тканей в легких, сердце, а также и в почках [8]. Так же заслуживает внимания версия о формировании микротромбов при данной инфекции, в том числе и в сосудах почек, что, естественно, приведет к их повреждению [8–10].

По данным литературы важными факторами для развития повреждений органов мочевого выделения при новой коронавирусной инфекции является наличие сопутствующих заболеваний: гипертонической болезни, сахарного диабета, ВИЧ-инфекции, а также употребление наркотических веществ, злоупотребление алкоголем, метаболические нарушения. Особого внимания в этом плане заслуживают различные заболевания почек, отмеченные ранее в анамнезе [11–13].

Следует также обратить внимание на лекарственные препараты, используемые пациентами с коронавирусной инфекцией и хроническими заболеваниями почек для снижения температуры тела. Бесконтрольный прием диклофенака, нимесулида и некоторых других нестероидных противовоспалительных препаратов может привести к существенному снижению функции почек [14–16].

Поскольку при коронавирусной инфекции COVID-19 зафиксированы случаи острого нарушения функции почек, эксперты рекомендуют всем инфицированным проводить анализ мочи, даже при отсутствии жалоб, характерных для патологии мочевыделительной системы, чтобы при своевременно начатом лечении избежать хронизации острой патологии почек [17, 18]. Так, по данным исследования, проведенного в Нью-Йорке на 5449 больных, более чем у каждого третьего пациента с COVID-19 развивается острое нарушение функции почек, часть пациентов нуждается в гемодиализе [19]. Подобные результаты демонстрируют медики Сингапура: в исследовании, в кото-

рое были включены 2702 пациента, каждый четвертый нуждался в гемодиализе [20, 21]. В Китае также обращали внимание на заинтересованность почек при коронавирусной пневмонии, вызванной COVID-19: зачастую в моче присутствовал белок или кровь, оба показателя свидетельствуют о нарушении фильтрационной способности или же работы мелких канальцев почек [22, 23].

Постоянно изучаются симптомы, патогенез, лечение и меры профилактики новой коронавирусной инфекции, в свете новых знаний об этой инфекции, с которой большинство врачей ранее не сталкивались, совершенствуются методы диагностики и лечения [24, 25]. Однако необходимы дальнейшие исследования с длительным периодом наблюдения больных, перенесших коронавирусную инфекцию, в том числе с поражением почек. Важно изучать особенности течения заболевания для понимания механизма развития тяжелых форм и осложнений, в том числе механизма повреждения почек, отсроченных последствий и разработки патогенетически обоснованных методов лечения.

Анализ международных регистров будет иметь решающее значение для определения факторов риска и наилучших терапевтических подходов к решению исходов заболевания COVID-19 [26, 27].

Цель данного исследования – оценка характера поражения почек при коронавирусной пневмонии у пациентов не имевших в анамнезе заболеваний мочевыделительной системы.

Методика

Пациенты и методы. За период с марта 2020 по апрель 2021 г. ретроспективно методом случайной выборки были отобраны и проанализированы истории болезней 300 больных, поступивших в ГБУЗ МО «НФОБ» и ГКБ №24 с диагнозом пневмония, ассоциированная с COVID-19. Все пациенты были старше 18 лет и не имели в анамнезе заболеваний мочевыделительной системы (выписка из протокола №30 заседания Комитета по Этике Медицинского института РУДН от 17 июня 2021 г.).

В стационаре пациентам проводились следующие лабораторно–инструментальные исследования: клинический анализ крови (ОАК), биохимический анализ крови, клинический (общий) анализ мочи (ОАМ), коагулограмма, компьютерная томография легких (КТ), выявление вируса COVID-19 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в мазках из ротоглотки и носоглотки. Из 300 рассмотренных историй болезней в 103 документах (34,3%) были выявлены те или иные

изменения в анализах мочи, составившие исследуемую группу по сравнению с пациентами, не имеющими изменений в анализах мочи (группа сравнения).

По данным временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» Минздрава России (версия 13 от 14.10.2021) пациенты при температуре выше 38 °С получали парацетамол 500–1000 мг. По данным регистра лекарственных средств (РЛС) у парацетамола в качестве побочного действия со стороны мочевыводящей системы может встречаться асептическая пиурия, интерстициальный гломерулонефрит, который на фоне приема препарата может вызывать протеинурию с гематурией (Нефропатии тубулоинтерстициальные, интерстициальный нефрит [EUROLAB Научные статьи (eurolab-portal.ru).

По данным указанных методических рекомендаций пациенты находившиеся на лечении в стационаре с целью профилактики тромбоза глубоких вен (ТГВ) нижних конечностей/ТЭЛА получали per os прямые антикоагулянты: ривароксабан (10 мг 1 раз в сут) или апиксабан – (2,5 мг 2 раза в сут). По данным регистра лекарственных средств (РЛС) у ривароксабана и апиксабана в качестве нечасто встречающегося побочного действия со стороны мочевыводящей системы отмечена гематурия. В нашем исследовании у 103 пациентов с поражением почек при различных степенях поражения легких (по данным КТ) в анализах мочи гематурии не было выявлено.

Пациенты с и без поражения почек, имевшие в анамнезе гипертоническую болезнь, принимали антигипертензивные препараты: ингибиторы АПФ, обладающие нефропротективным действием, бета-бло-

каторы, тиазидоподобные диуретики. Все препараты, по данным реестров – не имели выраженного ятрогенного действия на организм, в том числе на почки.

Цель исследования – оценка характера поражения почек у пациентов с коронавирусной пневмонией.

Результаты

В нашем исследовании среди 300 пациентов, находившихся в стационаре по поводу коронавирусной пневмонии, преобладали лица мужского пола: 177, (59%) против 123 (41%) женского пола ($p < 0,01$, хи-квадрат). Возраст подавляющего большинства больных от 45 до 74 лет, количество – 212 (70,6%) человек, в их числе: 45-59 лет – 108 (36%) и 60-74 лет – 104 (34,6%). Данная возрастная когорта встречалась чаще по сравнению с лицами молодого (18–44 года) возраста – 51 (17%) и пожилых пациентов старше 75 лет – 37 (12,4%) ($p < 0,01$, хи-квадрат, в каждом случае). В исследуемой группе пациентов с COVID-19-ассоциированной пневмонией и изменениями в анализах мочи сохранились те же тенденции по возрасту и полу (табл. 1).

Как видно из табл. 2, значительно чаще всего в нашем исследовании встречались пациенты с коронавирусной пневмонией умеренной степени (152 пациента из 300 (50,7%)) ($p < 0,01$, хи-квадрат), реже – с коронавирусной пневмонией легкой (65 (21,7%) и средней тяжести степени (63 (21%); а наиболее малочисленной была группа с тяжелой степенью коронавирусной пневмонии – 20 (6,6%), ($p < 0,01$, хи-квадрат). Отчасти это можно объяснить тем, что в исследование не вошли пациенты из отделения реанимации с тяжелым течением заболевания.

Таблица 1/Table 1

Частота распределения больных с коронавирусной пневмонией по полу и возрасту

Frequency of distribution of patients with coronavirus pneumonia by sex and age

Возраст Age	Мужчины Men		Женщины Women		Всего Total	
	n	%	n	%	n	%
18–44 года/years old	36	12	15	5	51	17
45–59 лет/ years old	72	24	36	12	108	36
60–74 лет/ years old	52	17,3	52	17,3	104	34,6
75–90 лет/years old	17	5,7	20	6,7	37	12,4
Итого Total	177*	59	123	41	300	100

Примечание. * $p < 0,01$, критерий хи-квадрат при сравнении в строке.

Note. * $p < 0,01$, chi-square test for in-line comparisons.

Так как ранее обсуждалось наиболее тяжелое течение новой коронавирусной инфекции у людей с сопутствующей патологией, мы оценили частоту выявления таковой у наших больных (табл. 3).

Из 300 больных с коронавирусной пневмонией у большей части была выявлена сопутствующая патология – 170 пациентов (56,7%), сопутствующая

($p < 0,01$, хи-квадрат), значимо чаще встречалась в исследуемой группе – 65 (63,1%) ($p < 0,01$, хи-квадрат при сравнении с числом лиц без сопутствующей патологии). Наиболее часто у пациентов исследуемой группы выявлялись СД – 34 (33%) ($p < 0,01$), ГБ – 14 (13,6%) и ожирение – 8 (7,8%), в группе сравнения наблюдалась подобная картина: СД 41 (20,8%)

Таблица 2/ Table 2

Распределение больных по тяжести коронавирусной пневмонии согласно данным КТ

Distribution of patients by severity of coronavirus pneumonia according to CT findings

Степень поражения легких (1–4) / Degree lesion Lungs (1–4)	Исследуемая группа / Investigated group		Группа сравнения / Comparison group		Всего / total	
	n	%	n	%	n	%
КТ-1 (легкая/mild)	19	6,3	46	15,3	65	21,7
КТ-2 (умеренная/moderate)	57*	19	95*	31,7	152*	50,7
КТ-3 (среднетяжелая)	15	5	48	16	63	21
КТ-4 (тяжелая/severe)	12	4	8*	2,7	20*	6,6
ВСЕГО/Total	103	34,3	197	65,7	300	100

Примечание. * $p < 0,01$, критерий хи-квадрат при сравнении данных в столбце. КТ (СТ) – компьютерная томография.

Note. * $p < 0.01$, chi-square test when comparing data in the column. CT - computed tomography.

Таблица 3/ Table 3

Частота выявления сопутствующих заболеваний у пациентов с коронавирусной пневмонией, абс.

Frequency of comorbidities in patients with coronavirus pneumonia, abs.

Сопутствующие заболевания (Associated diseases)	Исследуемая группа / Investigated group, n=	Группа сравнения / Comparison group, n=197	Всего Total
ГБ (Hypertension)	34*	41*	75*
СД (diabetes mellitus)	14	14	28
ИБС. Стенокардия (coronary heart disease)	0	5	5
ИБС. ПИКС (coronary heart disease).	0	4	4
ХОБЛ (chronic obstructive pulmonary disease)	1	4	5
Бронхиальная астма (Bronchial asthma)	1	2	3
Хронический бронхит (Chronic bronchitis)	1	0	1
Желчнокаменная болезнь (Biliary stone disease)	0	4	4
Хронический панкреатит (Chronic pancreatitis)	1	0	1
Хронический гастрит (Chronic gastritis)	2	0	2
Язвенная болезнь желудка (Gastric ulcer)	1	4	5
Гипотиреоз (Hypothyroidism)	1	4	5
Ожирение (Obesity)	8	14	22
Анемия (Anemia)	0	3	3
Онкозаболевания (Cancer)	1	4	5
Ревматоидный артрит (Rheumatoid arthritis)	0	2	2
Всего с патологией (Total with pathology)	65°	105	170°
Без сопутствующей патологии (No concomitant pathology)	38	92	130

Примечание. * $p < 0,01$ – критерий хи-квадрат при сравнении данных внутри группы (в столбце)

° $p < 0,01$ – критерий хи-квадрат при сравнении с числом лиц без сопутствующей патологии.

Note. * $p < 0.01$ - chi-square criterion when comparing data within the group (in the column)

° $p < 0.01$ - chi-square criterion when comparing with the number of people without concomitant pathology.

($p < 0,01$), ГБ – 14 (7,1%) и ожирение – 14 (7,1%) соответственно.

Мы регистрировали любые изменения показателей в анализах мочи (табл. 4). Статистически значимо чаще выявлялась протеинурия – 93 (90,3%), чем лейкоцитурия (более 10 клеток в поле зрения) – 10 (9,7%). Наиболее часто изменения в анализах мочи (протеинурия и лейкоцитурия) выявлены нами у пациентов с КТ 2 – 57 (55,3%) ($p < 0,01$, хи-квадрат): протеинурия – у 51 больного (54,8%) ($p < 0,01$, хи-квадрат среди всех случаев больных с протеинурией) и лейкоцитурия – у 6 (60%) ($p < 0,01$, хи-квадрат среди всех случаев

лейкоцитурии). В обоих случаях % рассчитан от количества пациентов с протеинурией и лейкоцитурией. При оценке протеинурии, установлено, что значимо чаще она была минимальной или умеренной (до 0,9 г/л), т.е. 53 (57%) всех случаев протеинурии ($p < 0,01$, хи-квадрат), значимо реже выявлялась массивная протеинурия – 5 (5,4%) ($p < 0,01$, хи-квадрат).

Учитывая полученные данные, можно сказать, что поражение почек у пациентов связано с нарушением фильтрационной функции клубочков.

Зависимость протеинурии от степени КТ представлена на графике (рис. 1).

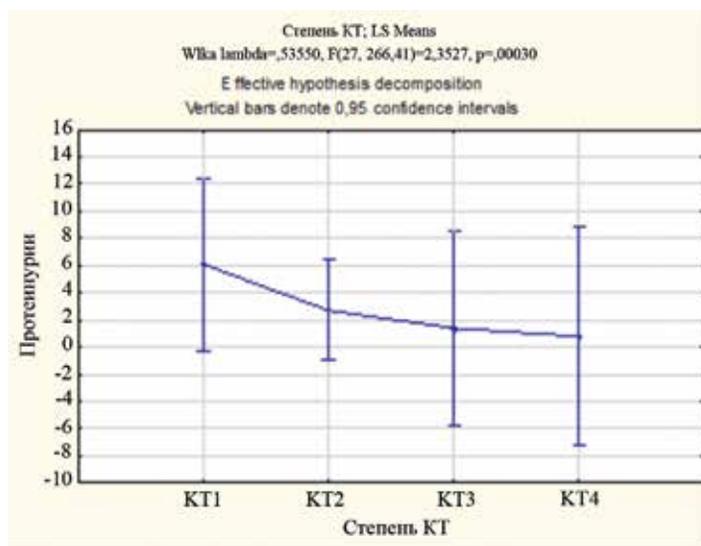


Рис. 1. Зависимость протеинурии от степени КТ (метод дисперсионного анализа, программа Statistica).

Fig. 1. Dependence of proteinuria on the degree of CT (method of analysis of variance, Statistica program).

Таблица 4/ Table 4

Частота выявления патологии в общем анализе мочи, абс.

Frequency of pathology detection in general urinalysis, abs.

Степень поражения легких (1–4) Degree lesion Lungs (1--4)	Протеинурия (г/л) Proteinuria (g/l)				Всего / total	Лейкоцитурия (кл. в п/зр) Leukocyturia (cells in p/zr)	Всего total
	Минимальная (0,05-0,4)	умеренная (0,5-0,9)	выраженная (1,0-2,9)	Массивная (>3,0)		клеток в п/зр >10 cells in p/zr	
КТ 1	4	7	6	0	17	2	19
КТ 2	17	13	18	3	51×	6×	57
КТ 3	3	4	5	2	14	1	15
КТ 4	3	2	6	0	11	1	12
Всего /Total	27 (29%)°	26 (28%)°	35 (37,6%)°	5* (5,4%)°	93* (90,3%)	10* (9,7%)	103 (100%)

Примечание. КТ (СТ) – компьютерная томография. ° – % от числа пациентов с протеинурией – 93. * – $p < 0,05$, хи-квадрат при сравнении в строке. × – $p < 0,05$, хи-квадрат при сравнении в столбце

Note. СТ – computed tomography. ° – % of patients with proteinuria – 93. * – $p < 0.05$, chi-square in the row comparison. × – $p < 0.05$, chi-square for column comparison.

Для оценки вклада тромбообразования в развитии патологии мы изучали в группах уровни Д-димера и тромбоцитов крови (рис 2)

Получены следующие данные: при КТ 1 уровень Д-димера статистически значимо чаще находился на уровне до 600 нг/мл – 15 (87,5%) случаев ($p < 0,01$, критерий хи-квадрат), при КТ 2 – значимо чаще на уровне от 400 до 600 нг/мл – 37 (64,9%) случаев ($p < 0,01$, критерий хи-квадрат), а выше 600 нг/мл – значимо чаще, чем на уровне до 250 нг/мл – 14 (24,6%) и 6 (10,5%) соответственно ($p < 0,01$, критерий хи-квадрат). Среди всех случаев КТ 4 статистически значимо чаще выявлен уровень Д-димера выше 600 нг/мл – 9 (75%) ($p < 0,01$, критерий хи-квадрат).

Вообще, обращает на себя внимание, что начиная со степени КТ 2 чаще выявлялся уровень выше 600 нг/мл (значимо при КТ 2 и КТ 4), при КТ 1 и 2 Д-димер на уровне до 250 нг/мл выявлен у 14 из всех 16 случаев (87,5%) с подобным уровнем Д-димера ($p < 0,01$, критерий хи-квадрат), а при КТ 2, 3 и 4, наоборот, в большинстве случаев выявлен уровень выше 600 нг/мл – 32 (88,9% всех случаев выявления подобного высокого уровня Д-димера ($p < 0,01$, критерий хи-квадрат).

Мы показали, что уровень Д-димера напрямую зависит от степени поражения легких: чем тяжелее поражение, тем выше значение Д-димера ($p = 0,01$) (рис 2). Анализируя данные, можно предположить, что в основном поражение почек в данной группе пациен-

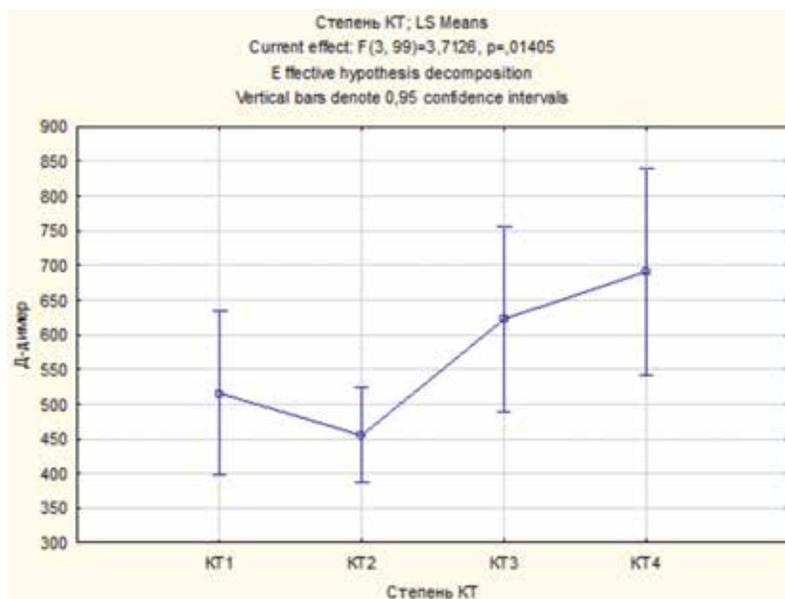


Рис. 2. Зависимость уровня Д-димера от степени КТ (метод дисперсионного анализа, программа Statistica).

Fig. 2. Dependence of D-dimer level on the degree of CT (method of analysis of variance, Statistica program).

Таблица 5/ Table 5

Уровень Д-димера в группе пациентов с поражением почек в зависимости от тяжести коронавирусной пневмонии
D-dimer levels in a group of patients with kidney damage depending on the severity of coronavirus pneumonia

Степень поражения легких (1–4) Degree lesion Lungs (1–4)	Д-димер (нг/мл) D-dimer (ng/ml)			Всего Total
	до 250	400-600	выше 600	
КТ-1	8	7	4	19
КТ-2	6	37*	14*	57
КТ-3	1	5	9	15
КТ-4	1	2	9*	12
Всего / Total	16	51*	36*	103

Примечание. * $p < 0,01$, хи-квадрат при сравнении данных при определенной степени тяжести КТ (в строке).

Note. * $p < 0.01$, chi-square when comparing data at a certain degree of CT severity (in line).

тов связано с микротромбозом сосудов почек, менее – с непосредственным воздействием вируса на почечную ткань.

В крови тромбоцитоз (содержание более 400 000 на кубический миллиметр) выявлен у одного пациента с коронавирусной пневмонией умеренной степени, осложненной поражением почек, в 1-м случае отмечена незначительная тромбоцитопения. Тромбоцитоз не выявлен ни у одного пациента с коронавирусной пневмонией тяжелой степени течения, осложненной поражением почек, в 1 случае отмечена незначительная тромбоцитопения.

Из всего вышеизложенного следует, что клубочковая протеинурия, выявляемая у пациентов с коронавирусными пневмониями, связана в подавляющем большинстве случаев с микротромбозом почечных сосудов, что подтверждается данными литературы по результатам аутопсийного материала [28]. На основании вышеизложенного следует, что при подозрении на микротромбоз почечных сосудов, следует, в первую очередь, ориентироваться на показатели Д-димера сыворотки крови.

На рис. 3 представлена зависимость содержания тромбоцитов от степени поражения легких по данным КТ.

Рисунок 3 наглядно показывает, что по уровню тромбоцитов судить об их влиянии на почечную патологию не представляется возможным.

При рассмотрении исследуемой группы ($n=103$) выявлено, что вне зависимости от степени тяжести поражения КТ, чаще встречался уровень креатинина в референсном интервале 62,0-106,0 мкмоль/л ($p<0,01$, критерий хи-квадрат), а повышенный уровень креатинина более 106 мкмоль/л выявлялся значимо более часто при КТ 1 и 2 – 11 случаев (78,6% всех случаев подобного уровня креатинина) ($p<0,01$, критерий хи-квадрат).

В нашем исследовании мы обратили внимание на выраженные изменения анализа крови по уровню содержания лейкоцитов и лимфоцитов, что проявлялось в основном лимфопенией и лейкопенией (табл. 7).

Лейкопения при коронавирусе снижает функционирование иммунной системы человека, что дает нам возможность говорить о значительном подавлении иммунитета у пациентов с коронавирусной пневмонией. Лейкопения и лимфопения определялись в обеих группах, в исследуемой группе значимо чаще выявлялись нормальные показатели, чем измененные – 65 (63,1%) ($p<0,01$, критерий хи-квадрат), а лейкоцитоз – достоверно чаще, чем лейкопения – 31 (30,1%) и 7 (6,8%) соответственно ($p<0,01$, критерий хи-квадрат).

Данные результаты свидетельствуют, что показатели уровня лейкоцитов и лимфоцитов скорее являются маркерами вирусного заболевания, то есть коронавирусной пневмонии.

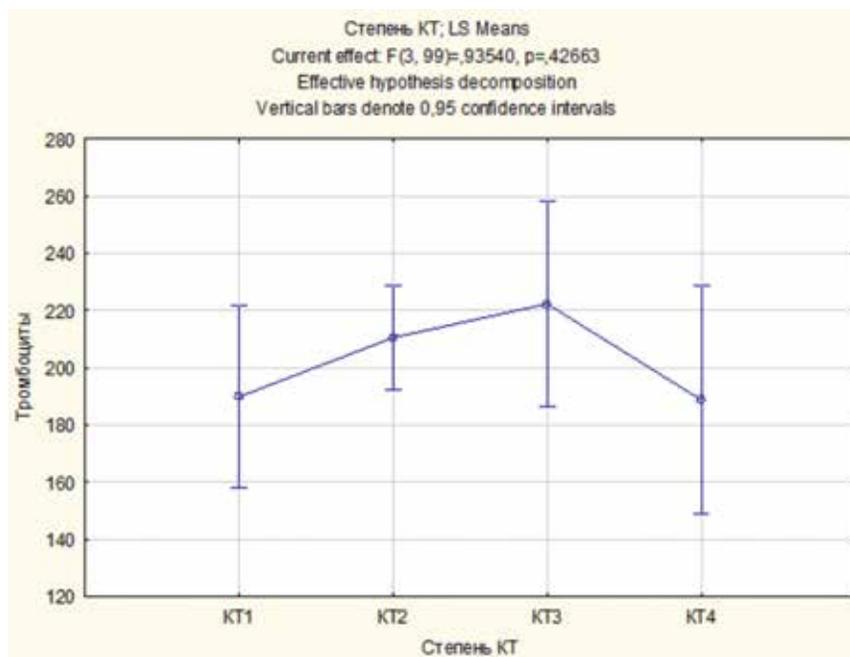


Рис. 3. Зависимость содержания тромбоцитов от степени поражения легких по данным КТ (метод дисперсионного анализа, программа Statistica).

Fig. 3. Dependence of thrombocyte content on the degree of lung damage according to CT data.

Таблица 6/ Table 6

Уровень креатинина в исследуемой группе пациентов**Creatinine levels in the study group of patients**

Степень поражения легких (1–4) Degree lesion Lungs (1--4)	Креатинин, мкмоль/л (62,0-106,0) Creatinine, μmol/l	Креатинин, мкмоль/л >106,0 Creatinine, μmol/l	Всего Total
КТ-1 (легкая/mild)	14*	5	19
КТ-2 (умеренная/moderate)	51*	6	57
КТ-3 Среднетяжелая/ moderate-severe	13*	2	15
КТ-4 тяжелая (severe)	11*	1	12
Всего (Total)	89*	14	103

Примечание. * $p < 0,01$, хи-квадрат при сравнении по степени тяжести КТ (в столбце).

Note. * $p < 0.01$, chi-square for comparison by CT severity (in column).

Таблица 7/ Table 7

Частота встречаемости лейкопении и лейкоцитоза у больных в исследовании**Frequency of leukopenia and leukocytosis in patients in the study**

Степень поражения легких (1–4) Degree lesion Lungs (1--4)	Лейкопения Leukopenia	Лейкоцитоз Leukocytosis	Норма Norm	Всего Total
У пациентов группы сравнения (n=197) In comparison group patients (n=197)				
КТ1	11 (24%)	14 (30,4%)	21 (45,7%)	46
КТ2	37 (38,9%)	28 (29,5%)	30 (31,6%)	95
КТ3	22 (45,8%)	14 (29,2%)	12 (25%)	48
КТ4	6 (75%)	2 (25%)	0	8
всего	76	58	63	197
У пациентов исследуемой группы (n=103) Patients in the study group (n=103)				
КТ1	0	8 (42,1%)	11 (57,9%)	19
КТ2	5 (8,8%)	15 (26,3%)	37 (64,9%)	57
КТ3	1 (6,7%)	3 (20%)	11 (73,3%)	15
КТ4	1 (8,3%)	5 (41,7%)	6 (50%)	12
всего	7	31*	65*	103

Примечание. * $p < 0,01$, критерий хи-квадрат при сравнении в строке.

Note. * $p < 0.01$, chi-square test for in-line comparisons.

Заключение

В нашем исследовании достоверно наиболее часто изменения в анализах мочи выявлены при коронавирусной пневмонии умеренной степени тяжести по КТ – 2. В каждой группе пациентов с коронавирусной пневмонией различной степени тяжести и изменениями в ОАМ значимо превалировала протеинурия, значительно реже выявлялась лейкоцитурия, уровень Д-димера напрямую зависел от степени пора-

жения легких (чем выше поражение, тем выше значение Д-димера), что позволило заключить, что осложнения со стороны мочевыделительной системы были связаны, в первую очередь, с повреждением клубочков (микротромбоз) и значительно реже – канальцев. Больные с изменениями в ОАМ и повышением Д-димера в сыворотке крови требуют дальнейшего наблюдения в динамике до нормализации анализов мочи, что позволит избежать риска развития осложнений со стороны мочевыделительной системы.

Литература

(п.п. 1; 2; 4–6; 8–10; 13; 15–27 см. References)

3. Выхристенко Л.П., Счастливенко А.И., Бондарева Л.И., Сидоренко Е.В., Музыка О.Г. Поражение почек при инфекции COVID-19. *Вестник ВГМУ*. 2021; 20(1): 7-23.
7. Шамхалова М.Ш., Мокрышева Н.Г., Шестакова М.В. COVID-19 и почки. *Сахарный диабет*. 2020; 23(3): 235-41. <https://doi.org/10.14341/DM12506>
11. Чистенко Г.Н. Коронавирусная инфекция. *Мир медицины*. 2020; (2): 8–9.
12. Биличенко Т.Н., Чучалин А.Г. Заболеваемость и смертность населения России от острых респираторных вирусных инфекций, пневмонии и вакцинопрофилактика. *Терапевтический архив*. 2018; 90(1): 22-6.
14. Горелов А.В., Николаева С.В., Акимкин В.Г. Новая коронавирусная инфекция COVID-19: особенности течения у детей в Российской Федерации. *Педиатрия им Г.Н. Сперанского*. 2020; 99(6): 57-62. doi: 10.24110/0031-403X-2020-99-6-57-62
28. Коган Е.А., Березовский Ю.С., Проценко Д.Д., Багдасарян Т.Р., Грецов Е.М. и др. Патологическая анатомия инфекции, вызванной SARS-CoV-2. *Судебная медицина*. 2020; 6(2): 8–30. doi:10.19048/2411-8729-2020-6-2-8-30

References

1. Perico L, Benigni A, Remuzzi G. Should COVID-19 concern nephrologists? why and to what extent? the emerging impasse of angiotensin blockade. *Nephron*. 2020; 144: 213–21. doi: 10.1159/000507305
2. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 2020; 181: 271–80.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052
3. Vyhristenko L.R., Schastlivenko A.I., Bondareva L.I., Sidorenko E.V., Muzyka O.G. Kidney damage in COVID-19 infection. *Vestnik VGMU*. 2021; 20(1): 7-23 (in Russian)
4. Cheng Y, Luo R, Wang K, Zhang M, Wang Z, Dong L, et al. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. *Kidney Int*. 2020; 97(5): 829-38. doi: 10.1016/j.kint.2020.03.005
5. Li Z., Wu M., Yao J., Guo J., Liao X., Song S., et al. Caution on kidney dysfunctions of COVID-19 patients. *MedRxiv: the preprint server for health sciences*. 2020 Mar. doi: 10.1101/2020.02.08.20021212
6. Su H., Yang M., Wan C., Yi L.-X., Tang F., Zhu H.-Y., et al. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. *Kidney Int*. 2020; 98(1): 219–27. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.04.003>
7. Shamkhalova M.S., Mokrysheva N.G., Shestakova M.V. COVID-19 and kidneys. *Sakharnyy diabet*. 2020; 23(3): 235-41. (in Russian). <https://doi.org/10.14341/DM12506>
8. Reynolds H.R., Adhikari S., Pulgarin C., Troxel A.B., Itrrate E., Johnson S.B., et al. Renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors and risk of Covid-19. *N Engl J Med*. 2020; 382: 2441–8. doi: 10.1056/NEJMoa2008975
9. Siddiqi H.K., Mehra M.R. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: a clinical-therapeutic staging proposal. *J Heart Lung Transplant*. 2020; 39: 405–7. doi: 10.1016/j.healun.2020.03.012
10. Dong L., Hu S., Gao J. Discovering drugs to treat coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Drug Discov Ther*. 2020; 14: 58–60. doi: 10.5582/ddt.2020.01012

11. Chistenko G.N. Coronavirus infection. *Mir meditsiny*. 2020; (2): 8–9. (in Russian)
12. Bilichenko T.N., Chuchalin A.G. Morbidity and mortality of the Russian population from acute respiratory viral infections, pneumonia and vaccine prevention. *Terapevticheskij arhiv*. 2018; 90(1): 22-6. (in Russian)
13. Lu X., Zhang L., Du H. et al. SARS-CoV-2 Infection in children. *N Engl J Med*. 2020; 382(17): 1663-5. doi: 10.1056/NEJMc2005073
14. Gorelov A.V., Nikolaeva S.V., Akimkin V.G. New coronavirus infection with COVID-19: features of the course in children in the Russian Federation. *Pediatriya im G.N. Speranskogo*. 2020; 99(6): 57-62. (in Russian). doi: 10.24110/0031-403X-2020-99-6-57-62.
15. Ramzy A., McNeil D.G. W.H.O. Declares Global Emergency as Wuhan Coronavirus Spreads. *The New York Times*. Accessed: January 30, 2020. Available at <https://nyti.ms/2RER70M>
16. Cucinotta D., Vanelli M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. *Acta Biomed*. 2020; 91(1): 157-60. doi: 10.23750/abm.v91i1.9397
17. Hui D.S., Azhar I.E., Madani T.A., Ntoumi F., Kock R., Dar O., et al. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health – the latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int J Infect Dis*. 2020; 91: 264–6. doi: 10.1016/j.ijid.2020.01.009.
18. Yang Y., Peng F., Wang R., Guan K., Jiang T., Xu G., et al. The deadly coronaviruses: The 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China. *J Autoimmun*. 2020; 102434 [Epub ahead of print]. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102434
19. Hirsch J.S., Ng J.H., Ross D.W., et al. Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. *Kidney Int*. 2020; 98(1): 209–18. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.05.006>
20. Expert Team of Chinese Medical Association Nephrology Branch. Recommendations for prevention and control of novel coronavirus infection in blood purification center (room) from Chinese Medical Association Nephrology Branch. *Chin J Nephrol*. 2020; 36: 82-4.
21. Kawalit I., Eltwal M., Elkhatib A., Ali A. Redefining dialysis facility recommendations for infection prevention and control during the COVID-19 outbreak. *Archives of Medicine*. 2020; 12(2(7)): 308. DOI:10.36648/1989-5216.12.2.308
22. Moein S., Hashemian M.R., Mansourafshar B., et al. Smell dysfunction: a biomarker for COVID-19. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2020; 10(8): 944-50 doi: 10.1002/alr.22587
23. Hussain A., Bhowmik B., do Vale Moreira N.C. COVID-19 and diabetes: knowledge in progress. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2020; 162: 108142. doi: 10.1016/j.diabres.2020.108142
24. Chen H., Guo J., Wang C., et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet*. 2020; 395(10226): 809–15. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30360-3
25. Fengxiang Song, Nannan Shi, Fei Shan, et al. Emerging 2019 Novel Corona-virus (2019-nCoV) Pneumonia. *Radiology*. 2020; 00: 1–8
26. Ueda M., Martins R., Hendrie P.C., et al. Managing cancer care during the COVID-19 pandemic: Agility and collaboration toward a common goal. *J Natl Compr Canc Netw*. 2020; Mar 20: 1-4. doi: 10.6004/jnccn.2020.7560
27. Holshue M.L., DeBolt C., Lindquist S., et al. First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *New England Journal of Medicine*. 2020; 382(10): 929-36. doi: 10.1056/NEJMoa2001191
28. Kogan E.A., Berzovskii YU.S., Procenko D.D., Bagdasaryan T.R., Grecov E.M., i dr. Pathological anatomy of infection caused by SARS-CoV-2. *Sudebnaya meditsina*. 2020; 6(2): 8–30. (in Russian). doi:10.19048/2411-8729-2020-6-2-8-30

Сведения об авторах:

Александрова Светлана Григорьевна, врач-терапевт ГБУЗ МО «НФОБ», ассистент каф. госпитальной терапии с курсами эндокринологии, гематологии и КЛД ФГАОУ ВО РУДН, МИ РУДН, e-mail: alexandrova-sg@rudn.ru;

Бычкова Лариса Владимировна, канд. мед. наук, доцент, доцент каф. госпитальной терапии с курсами эндокринологии, гематологии и КЛД ФГАОУ ВО РУДН, МИ РУДН, e-mail: lvb57@bk.ru;

Александрова Марина Робертовна, канд. мед. наук, доцент, каф. госпитальной терапии с курсами эндокринологии, гематологии и КЛД ФГАОУ ВО РУДН, МИ РУДН, e-mail: alexandrova-mr@rudn.ru;

Ляпунова Татьяна Владимировна, канд. мед. наук, доцент каф. медицинской информатики и телемедицины ФГАОУ ВО РУДН, МИ, e-mail: lyapunova-tv@rudn.ru;

Родоман Михаил Григорьевич, врач-уролог ГKB № 24 ДЗМ, e-mail: mikji99@mail.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092.9

Булгакова Я.В.¹, Савилов П.Н.^{2,3}

Перекисное окисление липидов и антиоксидантная система головного мозга крыс при адаптации к гипероксической нагрузке

¹ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет), 119991, Москва, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2;

²ТОГБУЗ «Тамбовская ЦРБ»,

392624, Тамбовская обл, Тамбовский р-н, с. Покрово-Пригородное, ул. Полевая, д. 4;

³ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко», 394036, Воронеж, ул. Студенческая, д. 10

Введение. Повышение эффективности гипербарической терапии при лечении очаговой патологии невозможно без знания механизмов адаптации органов и тканей не вовлечённых в патологический процесс к терапевтическим режимам гипербарической оксигенации (ГБО). **Цель исследования** – изучение влияния одно- и многократного применения ГБО в терапевтическом режиме на процессы ПОЛ и антиоксидантную систему нейронов филогенетически различных структур головного мозга.

Методика. Опыты проведены на 213 белых крысах-самцах массой 180-230 г. ГБО проводили медицинским кислородом в экспериментальной барокамере объемом 90 л, в режиме 2 ата- 50 мин, 1 сеанс в сутки в утренние часы. Всего 18 сеансов ГБО. Исследования проводили после 1, 5, 10 и 18-го сеансов ГБО. В стволе, мозжечке и полушариях головного мозга, определяли содержание продуктов ПОЛ: диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов и сопряжённых триенов (КДиСТ), малонового диальдегида (МДА). Состояние антиоксидантной системы оценивали по содержанию эндогенных антиоксидантов: мочевины, мочевой кислоты (МК), активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы.

Результаты. Установлено, что ПОЛ в филогенетически разнородных структурах головного мозга обладает различной чувствительностью как к одно-, так и многократному применению ГБО. Это проявляется разнонаправленными (стимуляция, торможение) реакциями образования ДК и КДиСТ в зависимости от количества сеансов ГБО. Это утверждение справедливо и для процессов образования ДК и КДиСТ из нейтральных липидов и фосфолипидов в пределах одного отдела мозга. По мере увеличения числа сеансов ГБО, происходит формирование рефрактерности реакций ПОЛ. Это сопровождается нормализацией в тканях мозга концентрации МДА, повышенной после 1-го и 5-го сеансов ГБО. Не изменяется содержание мочевины, курс ГБО стимулирует накопление в исследуемых тканях МК после 5-го и 10-го сеансов ГБО. Активность каталазы снижается в стволе после 5-го и увеличивалась в мозжечке и полушариях после 10-го сеансов ГБО. Активность СОД в исследуемых отделах мозга возрастает после первого сеанса и остаётся повышенной в течение всего курса ГБО.

Заключение. Применение 18-дневного курса ГБО в терапевтическом режиме (2 ата- 50 мин, 1 сеанс в сутки) не вызывает стойкого накопления продуктов ПОЛ (ДК, КДиСТ и МДА) в стволе, мозжечке и полушариях головного мозга крыс, а также истощения антиоксидантной системы. Последнее проявляется сохранением реакции нейронов на ГБО стойким увеличением активности СОД, тогда как увеличение активности каталазы и накопление МК носит временный характер.

Ключевые слова: гипероксия; мозг; адаптация; перекисное окисление липидов; антиоксиданты

Для цитирования: Булгакова Я.В., Савилов П.Н. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная система головного мозга крыс при адаптации к гипероксической нагрузке. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 63(3): 80-90.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.80-90

Участие авторов: проведение экспериментов на животных и статистическая обработка полученных данных – Булгакова Я.В.; консультация по методикам исследования, написание статьи – Савилов П.Н.; обсуждение полученных данных, редактирование – Савилов П.Н., Булгакова Я.В.

Для корреспонденции: Савилов Павел Николаевич, e-mail: p_savilov@rambler.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.05.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Bulgakova Ya.V.¹, Savilov P.N.^{1,2}

Lipid peroxidation and the antioxidant system of the rat brain in adaptation to hyperoxic load

¹Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya St. 8, Bldg. 2, Moscow 119991, Russian Federation;²Tambov Central District Hospital, Polevaya St. 4, Pokrovo-Prigorodnoye Village 392624, Tambov District, Tambov Region, Russian Federation;³Burdenko Voronezh State Medical University, Studencheskaya St. 10, Voronezh 394036, Russian Federation

Enhancing the effectiveness of hyperbaric therapy in the treatment of focal pathology is impossible without knowledge of the mechanisms of adaptation to therapeutic modes of hyperbaric oxygenation (HBO) of the organs and tissues not involved in the pathological process. **The aim** was to study the effects of single and repeated administration of HBO in the therapeutic mode on lipid peroxidation (LP) and the antioxidant system of neurons in phylogenetically different brain structures.

Methods. The experiments were performed on 213 white male rats weighing 180-230 g. HBO was created with medical oxygen in a 90-liter experimental pressure chamber (18 HBO sessions at 2 ata for 50 min, daily, in the morning). The measurements were made after the 1st, 5th, 10th, and 18th HBO sessions. The LP products measured in the brainstem, cerebellum, and hemispheres included conjugated dienes (CD), ketodienes, and conjugated trienes (KD&CT), and malondialdehyde (MDA). The state of the antioxidant system was assessed by the concentrations of endogenous antioxidants, urea, uric acid (UrAc), and superoxide dismutase (SOD) and catalase activities.

Results. In phylogenetically heterogeneous structures of the brain, LP showed different sensitivity both to single and multiple use of HBO. This was evident as multidirectional (stimulation, inhibition) responses of the CD and KD&CT formation, depending on the number of HBO sessions. This was also true for the formation of CD and KD&CT from neutral lipids and phospholipids in the same brain structure. As the number of HBO sessions was increased, the refractoriness of LP reactions developed. This was accompanied by normalization of the tissue concentrations of MDA, which had been increased after the 1st and 5th HBO sessions. Without changing the tissue concentrations of urea, the course of HBO stimulated the accumulation of UrAc after the 5th and 10th HBO sessions. The catalase activity decreased in the brainstem after the 5th and increased in the cerebellum and hemispheres after the 10th HBO sessions. The activity of SOD in the studied brain structures increased after the first session and remained elevated throughout the course of HBO.

Conclusion. The 18-day course of HBO in a therapeutic mode does not cause persistent accumulation of LP products (CD, KD&CT, and MDA) in the rat brainstem, cerebellum and hemispheres or exhaustion of the antioxidant system. The latter is evident as the preservation of the neuronal response to HBO and the steadily increased activity of SOD while the increased activity of catalase and the accumulation of uric acid were transient.

Keywords: hyperoxia; brain; adaptation; lipid peroxidation; antioxidants

For citation: Bulgakova Ya.V., Savilov P.N. Lipid peroxidation and the antioxidant system of the rat brain during adaptation to hyperoxic load. *Pathological Physiology and Experimental Therapy (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(3): 80-90. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.80-90

For correspondence: Pavel N. Savilov, Doctor of medical Sciences, Professor, anesthesiologist, Tambov Regional State Hospital «Тамбовская CRH», e-mail: p_savilov@rambler.ru

Author's contribution: conducting experiments on animals and statistical processing of the data – Bulgakova Ya.V.; consultation on research methods, writing an article – Savilov P.N.; discussion of the data obtained; editing – Savilov P.N., Bulgakova Ya.V.

Financing. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:

Bulgakova Ya.V., <https://orcid.org/0000-0001-8665-0167>

Savilov P.N., <https://orcid.org/0000-0003-0506-8939>

Received 21.05.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Введение

Одним из условий повышения эффективности и безопасности гипербарической кислородной терапии является изучение не только механизмов лечебного действия гипербарического кислорода при конкретной патологии, но и адаптивных реакций на гипероксию тканей и органов больного организ-

ма не вовлечённых в патологический процесс [1, 2]. Во-первых, это необходимо для правильной оценки прогнозируемого и ожидаемого лечебных эффектов гипероксии, равно как и для интерпретации результатов рутинных клинико-функциональных исследований. Во-вторых, это имеет особое значение для гипероксического прекондиционирования, т. е. применения сеансов ГБО для повышения устойчи-

ности как здорового, так и больного организма к действию чрезвычайного раздражителя (патогена) [3]. В частности доказана способность превентивного применения ГБО предупреждать как снижение работоспособности и выносливости при физической и психологической нагрузке [4], так и устранять риск отёка – вклинивания головного мозга при операции на мозге в области задней черепной ямки [5]. В свете вышеизложенного особое значение приобретает изучение реакций адаптации клеток здоровых органов и тканей к гипероксической нагрузке при курсовом использовании ГБО в терапевтическом (а не токсическом!) режиме. Особое значение при этом имеет изучение реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной системы нейронов интактного головного мозга, которые, как известно [6], вовлекаются в процесс формирования эпилептиформных судорог при кислородном отравлении. Вместе с тем, необходимо отметить, что последнее обнаружено при режимах ГБО не применяемых в клинике [6]. Что касается влияния терапевтических режимов ГБО на ПОЛ и антиоксидантную систему головного мозга в норме и патологии, то этому вопросу посвящены единичные исследования [7, 8].

Цель исследования – изучение влияния одно- и многократного применения ГБО в терапевтическом режиме на ПОЛ и антиоксидантную систему нейронов филогенетически различных структур головного мозга.

Методика

Опыты проведены на 213 белых нелинейных крысах-самцах массой 180–230 г в экспериментальной лаборатории кафедры нормальной физиологии Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко. ГБО проводили медицинским кислородом в экспериментальной барокамере объемом 90 л, в «мягком» режиме 2 ата- 50 мин изопрессии, 1 сеанс в сутки в утренние часы. Животные были распределены на 5 серий опытов: 1 серия – интактные животные (норма); 2, 3, 4 и 5 серии – животные, исследованные, соответственно, после 1-го, 5-го, 10-го и 18-го сеанса ГБО. Объектом исследования служили большие полушария, мозжечок и ствол головного мозга. Проведение работ осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и в соответствии с регламентом декларации ЕС от 2010 г. об использовании лабораторных животных. Исследование одобрено Этической комиссией Воронежского государственного медицинского университета.

В качестве обезболивания при манипуляциях и декапитации применялся ингаляционный наркоз медицинским эфиром. Мозг перфузировали ледяным изотоническим раствором хлорида калия (15–20 мл). Эффективность перфузии (по гемоглобину) составляла 93–98%, учитывая данные о кровенаполнении головного мозга [9]. Головной мозг извлекали на леду, выделяли ствол, мозжечок и большие полушария. Одни навески ткани гомогенизировали в растворе трис-НСI буфера (0,25M) при температуре 1–3 °С, другие экстрагировали 17% раствором трихлоруксусной кислоты при такой же температуре (гомогенизатор тефлон-40 стекло, 5 тыс об/мин). Пробы центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость использовали для определения биохимических показателей. Определение продуктов ПОЛ в отделах головного мозга проводили после экстракции биологических субстратов в смеси гептан-изопропанол. Ранее было установлено, что нейтральные липиды (триглицериды) экстрагируются гептаном, полярные липиды (фосфолипиды) – в изопропанол [10]. Содержание продуктов ПОЛ (изолированные двойные связи, диеновые конъюгаты (ДК), кетодиены и сопряженные триены (КДиСТ)) определяли на спектрофотометре «СФ-46» соответственно при длинах волн 220, 232 и 278 нм [10]. Рассчитывали окислительный индекс ДК и КДиСТ по соотношению E232/E220 и E278/E220, которое выражали в единицах окислительного индекса [10]. Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли тиобарбитуровым методом [11], мочевины – диацетилмоноксидом [12], мочевой кислоты – фенантролиновым методом [13]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли методом хемилюминисценции [14], активность каталазы – спекрофотометрически с молибдатом аммония [15].

Результаты исследований обработаны статистически с использованием параметрического t-критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна–Уитни после предварительной проверки гипотезы о нормальности выборочного распределения. Статистический анализ проводили с использованием пакетов «Microsoft Exel», Statistica 5.0 Statsoft» и «Biostat».

Результаты и обсуждение

Как показали наши исследования изопропанольных экстрактов головного мозга, однократный сеанс ГБО статистически значимо увеличивал (в 2,9 раза) окислительный индекс КДиСТ в стволе и снижал на 49% содержание ДК в полушариях головного мозга крыс (**табл. 1**). Увеличение количества сеансов до 5 нормализовало окислительный индекс

КТДиСТ в стволе головного мозга на фоне снижения на 41% содержания в нем ДК; в мозжечке и полушариях исследуемые показатели значимо не отличались от нормы (табл. 1). После 10-го сеанса ГБО отмечено увеличение концентрации ДК на 58% в стволе головного мозга **относительно 5-го сеанса** и на 118% в полушариях по сравнению с однократным применением ГБО, т. е. практически нормализовалась. Это сопровождалось увеличением по сравнению с нормой концентрации ДК и КДиСТ в ткани мозжечка, соответственно, на 58% и 67% (табл. 1). После 18-го сеанса ГБО содержание ДК в стволе головного мозга снижалось на 52% по сравнению с предыдущим периодом исследования до нормы (табл. 1). В полушариях головного мозга после 18-го сеанса ГБО исследуемые показатели продолжали оставаться в пределах нормы; в мозжечке концентрация ДК значимо не отличалась от неё, но была на 62% ниже, чем после 10-го сеанса ГБО (табл. 1). Окислительный индекс ДК в мозжечке после 18-го сеанса ГБО был значимо ниже не только

относительно нормы, но и предыдущего периода исследования (табл. 1).

Исследование гептановых экстрактов головного мозга крыс, показало, что однократный сеанс ГБО вызывает снижение содержания ДК и КДиСТ в полушариях, соответственно, на 61% и 38%, на фоне увеличения их окислительных индексов на 121% и 101% соответственно (табл. 2). В мозжечке при этом имело место избирательное снижение (на 65%) содержания КДиСТ, тогда как в стволе мозга исследуемые показатели оставались в пределах нормы (табл. 2). Увеличение количества сеансов до 5 вызывало снижение на 48% концентрации ДК в стволе мозга, не изменяя её в полушариях, где она оставалась на 64% ниже нормы (табл. 2).

В мозжечке после 5-го сеанса ГБО имело место снижение на 62% окислительного индекса КДиСТ (табл. 2). Увеличение количества сеансов ГБО до 10 не приводило к значимым изменениям по сравнению с нормой исследуемых показателей в полушариях и мозжечке (табл. 2). При этом обнаружено сни-

Таблица 1/Table 1

Содержание и окислительные индексы диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов в изопропанольных экстрактах головного мозга крыс при ГБО, (M ± m)

Content and oxidative indices of diene conjugates, ketodienes and conjugated trienes in isopropanol extracts of rat brain in HBO (M ± m)

Отдел мозга	Series of experiment	Diene conjugates Δ232/ml gomogenat	Oxidative index of DC, Δ232/Δ220	Ketodienes and conjugated trienes, Δ278/ml gomogenat	Oxidative index of KD&CT Δ278/Δ220
Ствол Brain stem	Control (8)	1,72 ± 0,20	0,67 ± 0,05	0,86 ± 0,11	0,22 ± 0,02
	1 session (7)	1,73 ± 0,27	0,70 ± 0,01	1,19 ± 0,33	0,64 ± 0,22*
	5 sessions (7)	1,02 ± 0,21*	0,67 ± 0,08	0,65 ± 0,07	0,30 ± 0,05
	10 sessions (8)	2,09 ± 0,15*	0,72 ± 0,03	0,84 ± 0,08	0,29 ± 0,01**
	18 sessions (7)	1,01 ± 0,33*	0,54 ± 0,03	0,69 ± 0,09	0,40 ± 0,08
Мозжечок Cerebellum	Control (8)	1,68 ± 0,19	0,73 ± 0,06	0,69 ± 0,08	0,42 ± 0,09
	1 session (7)	1,66 ± 0,42	0,75 ± 0,04	0,81 ± 0,13	0,34 ± 0,07
	5 sessions (7)	1,76 ± 0,41	0,72 ± 0,07	0,71 ± 0,16	0,27 ± 0,02
	10 sessions (8)	2,63 ± 0,32	0,81 ± 0,01	1,15 ± 0,23*	0,36 ± 0,06
	18 sessions (7)	1,01 ± 0,34*	0,49 ± 0,09**♦	0,56 ± 0,14	0,31 ± 0,07
Полушария Hemispheres	Control (8)	2,28 ± 0,32	0,82 ± 0,07	1,02 ± 0,09	0,38 ± 0,05
	1 session (7)	1,16 ± 0,17*	0,50 ± 0,11	0,78 ± 0,14	0,34 ± 0,05
	5 sessions (7)	1,49 ± 0,26	0,72 ± 0,05	0,72 ± 0,24	0,24 ± 0,03
	10 sessions (8)	2,54 ± 0,35*	0,83 ± 0,02*	0,73 ± 0,11	0,30 ± 0,01
	18 sessions (7)	1,76 ± 0,33	0,66 ± 0,03*	1,07 ± 0,20	0,39 ± 0,06

Примечание. * ($p < 0,05$) – статистическая значимость различий по сравнению с контролем, • ($p < 0,05$) – по сравнению с 1-м сеансом, ■ ($p < 0,05$) – по сравнению с 5-м сеансом, ♦ ($p < 0,05$) – по сравнению с десятым сеансом. В скобках – число животных.

Note. * ($p < 0,05$) – reliability of differences compared to the control, • ($p < 0,05$) – reliability of differences compared to 1 session, ■ ($p < 0,05$) – reliability of differences compared to the 5 session, ♦ ($p < 0,05$) reliability of differences compared to 10 session. In parentheses – the number of animals.

Таблица 2/Table 2

Содержание и окислительные индексы диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов в гептановых экстрактах головного мозга крыс при ГБО, (M ± m)

Content and oxidative indices of diene conjugates, ketodienes and conjugated trienes in heptane extracts of rat brain in HBO, (M ± m)

Отдел мозга	Series of experiment	Diene conjugates Δ232/ml gomogenat	Oxidative index of DC, Δ232/Δ220	Ketodienes and conjugated trienes, Δ278/ml g omogenat	Oxidative index of KD&CT Δ278/Δ220
Ствол Brain stem	Control (8)	1,45 ± 0,14	0,91 ± 0,10	0,73 ± 0,14	0,48 ± 0,12
	1 session (7)	1,15 ± 0,29	1,36 ± 0,41	0,81 ± 0,31	0,98 ± 0,45
	5 sessions (7)	0,76 ± 0,08*	0,74 ± 0,04	0,53 ± 0,27	0,53 ± 0,29
	10 sessions (8)	0,78 ± 0,13*	0,68 ± 0,03*	0,40 ± 0,15	0,34 ± 0,09
	18 sessions (7)	0,88 ± 0,33	0,74 ± 0,06	0,31 ± 0,10*	0,52 ± 0,22
Мозжечок Cerebellum	Control (8)	1,06 ± 0,18	0,89 ± 0,15	0,92 ± 0,21	0,66 ± 0,10
	1 session (7)	0,52 ± 0,15	0,76 ± 0,17	0,32 ± 0,06*	0,39 ± 0,02
	5 sessions (7)	0,78 ± 0,11	0,83 ± 0,08	0,46 ± 0,24	0,28 ± 0,13*
	10 sessions (8)	0,70 ± 0,05	0,70 ± 0,02	0,38 ± 0,13	0,38 ± 0,09
	18 sessions (7)	0,89 ± 0,21	0,78 ± 0,11	0,23 ± 0,09*	0,28 ± 0,13*
Полушария Hemispheres	Control (8)	1,50 ± 0,25	0,77 ± 0,04	0,71 ± 0,11	0,45 ± 0,06
	1 session (7)	0,58 ± 0,12*	1,70 ± 0,48	0,44 ± 0,04	0,91 ± 0,10*
	5 sessions (7)	0,54 ± 0,06*	0,70 ± 0,14	0,29 ± 0,09*	0,65 ± 0,28
	10 sessions (8)	1,35 ± 0,12 · ■	0,81 ± 0,01	0,60 ± 0,13	0,39 ± 0,06 ·
	18 sessions (7)	1,17 ± 0,21 · ■	0,88 ± 0,05	0,40 ± 0,25	0,37 ± 0,11 ·

Примечание. * ($p < 0,05$) – статистическая значимость различий по сравнению с контролем, • ($p < 0,05$) – по сравнению с 1-м сеансом, ■ ($p < 0,05$) – по сравнению с 5-м сеансом. В скобках - число животных по сериям опытов.

Note. * ($p < 0.05$) – reliability of differences compared to the control, • ($p < 0.05$) – reliability of differences compared to the first session, ■ ($p < 0.05$) – reliability of differences compared to the fifth session. In parentheses – the number of animals according to the series of experiments.

жение в гептановом экстракте ствола головного мозга содержания ДК и их окислительного индекса, соответственно, на 46% и 25% (табл. 2). Если число сеансов увеличивалось до 18, то в гептановом экстракте исследуемых тканей головного мозга выявлено снижение, относительно нормы, концентрации КДиСТ в стволе и мозжечке, соответственно, на 59% и 75%. В мозжечке при этом имело место снижение 58% окислительного индекса КДиСТ (табл. 2). Одновременно обнаружено значимое снижение содержания ДК в изопропанольном экстракте ствола и мозжечка относительно 10-го сеанса ГБО, это сопровождалось снижением окислительного индекса ДК (табл. 1). В полушариях после 18-го сеанса ГБО исследуемые показатели практически не отличались от нормы (табл. 1, 2).

Приведённые результаты показывают, что нейтральные липиды (триглицериды) и полярные липиды (фосфолипиды) в филогенетически отличных отделах головного мозга по-разному реагировали не только на однократный сеанс ГБО, но и на повышение гипероксической нагрузки путём увеличения количе-

ства сеансов ГБО. Кроме этого и в пределах исследуемого отдела головного мозга имела место неоднозначная реакция триглицеридов и фосфолипидов на гипероксию. Если на однократный сеанс ГБО (2-я серия) липиды ствола головного мозга отвечали увеличением окислительного индекса КТиСТ в обоих экстрактах, то в полушариях он увеличивался только в гептановом экстракте вместе с окислительным индексом ДК. Изменение концентраций продуктов ПОЛ после одного сеанса ГБО выявило снижение содержания ДК изопропанольном (табл. 1) и гептановом (табл. 2) экстрактах полушарий, тогда как КДиСТ снижалась в гептановом экстракте мозжечка (табл. 2). Общеизвестно, что ДК и КДиСТ являются ранними продуктами активации ПОЛ, поэтому снижение их концентрации в исследованных структурах на фоне отсутствия изменения их окислительного индекса указывает на ГБО-детерминированное вовлечение этих веществ в сопряжённые метаболические реакции.

В свою очередь окислительный индекс ДК и КДиСТ, рассчитываемый как отношение концен-

траций ДК и КДиСТ к количеству изолированных двойных связей, характеризует скорость образования данных продуктов ПОЛ [10]. Поэтому, обнаруженные изменения окислительного индекса КДиСТ в головном мозге после однократного применения ГБО (табл. 1, 2), позволяют говорить об избирательной стимуляции гипербарическим кислородом образования КДиСТ из нейтральных липидов и фосфолипидов в стволе и ДК с КДиСТ из фосфолипидов в полушариях головного мозга.

При увеличении числа сеансов ГБО до 5 (3-я серия) данный стимулирующий эффект гипербарического кислорода нивелировался, проявляясь нормализацией окислительного индекса ДК и КДиСТ в указанных экстрактах тканей головного мозга (табл. 1, 2). При этом сохранялась рефрактерность (отсутствие реакции на воздействие) к гипероксии образования ДК из нейтральных липидов во всех исследуемых отделах головного мозга и образование ДК из фосфолипидов в стволе и мозжечке. В пользу этого говорит отсутствие значимых различий окислительных индексов ДК по сравнению с аналогичными показателями после 1 сеанса ГБО (табл. 1, 2). Вместе с тем после 5-го сеанса ГБО сохранялось повышенное вовлечение в сопряжённые метаболические реакции ДК из нейтральных жиров и фосфолипидов в головном мозге, при активации данного процесса в стволе. Это проявлялось снижением концентрации указанных веществ в исследуемых экстрактах (табл. 1, 2). 5 сеансов ГБО прекращало в мозжечке активное вовлечение КДиСТ, образованных из фосфолипидов, в другие метаболические реакции, которое запускалось после однократного применения ГБО. Одновременно данный процесс стимулировался в полушариях, на что указывает снижение концентрации КДиСТ в гептановом экстракте (табл. 2).

При увеличении числа сеансов ГБО до 10 (4-я серия) рефрактерность к гипероксии процесса образования ДК из нейтральных липидов в исследуемых отделах мозга сохранялась, как и данная реакция при окислении фосфолипидов в мозжечке и полушариях. Не случайно окислительный индекс ДК у животных 4-й серии существенно не отличался от предыдущего периода исследования и нормы (табл. 1, 2). Но при этом в стволе и мозжечке происходило снижение вовлечения ДК, образовавшихся при окислении нейтральных липидов, в сопряжённые метаболические реакции. Это проявлялось увеличением их концентрации в изопропанольном экстракте на фоне отсутствия изменения их окислительного индекса (табл. 1).

Между тем, снижение окислительного индекса ДК и их содержания в гептановом экстракте

сте ствола головного мозга (табл. 2) указывает на избирательное ингибирование в нём образования ДК из фосфолипидов при увеличении числа сеансов с 5 до 10. Это сопровождалось увеличением образования из нейтральных жиров в стволе головного мозга КДиСТ, на что указывает увеличение их окислительного индекса, однако увеличение их содержания отмечено только в мозжечке (табл. 1). Сопоставление окислительного индекса и содержания КДиСТ позволяет сделать предположение, что увеличение числа сеансов с 5 до 10 избирательно вызывает в мозжечке накопление КДиСТ, получаемых при окислении нейтральных жиров, тогда как в стволе головного мозга стимулируется их вовлечение в сопряжённые метаболические реакции. Что касается полушарий головного мозга, то сохранение в пределах нормы ДК и КДиСТ после 10-го и 18-го сеансов ГБО (табл. 1 и 2) указывает на рефрактерность к указанным курсам ГБО (2 ата-50 мин) реакций образования этих веществ из нейтральных липидов и фосфолипидов, происходящих в данном отделе нервной системы.

Между тем, при увеличении числа сеансов ГБО с 10 до 18 гипербарический кислород, не влияя на образование ДК их фосфолипидов в мозжечке, ингибировал образование из них КДиСТ, что проявлялось снижением окислительного индекса и концентрации КДиСТ в гептановом экстракте мозжечка (табл. 2). Одновременно с этим в мозжечке животных 5-й серии тормозилось образование ДК из нейтральных липидов, на что указывает снижение их окислительного индекса в изопропанольном экстракте (табл. 1). Однако, это не приводило к уменьшению содержания ДК, как это было обнаружено в стволе головного мозга, хотя их образование не нарушалось. На это указывает сохранение в пределах нормы окислительного индекса ДК в изопропанольном экстракте после 18-го сеанса ГБО (табл. 1).

Одним из путей метаболических превращений ДК и КДиСТ является их вовлечение в образование малонового диальдегида (МДА). Как видно из рис. 1, однократный сеанс ГБО не вызывал увеличения концентрации МДА в стволе головного мозга. Однако, в мозжечке и больших полушариях концентрация возрастала, соответственно, на 57% и 64% (рис. 1). После 5-го сеанса концентрация МДА во всех исследованных отделах головного мозга (ствол, мозжечок, полушария) превышала норму, соответственно, на 177%, 97% и 224% (рис. 1). Однако, после 10-го сеанса ГБО концентрация МДА в стволе, мозжечке и больших полушариях головного мозга снизилась на 65%, 58% и 66% по сравнению с животными 3-й серии опытов до нормальных ве-

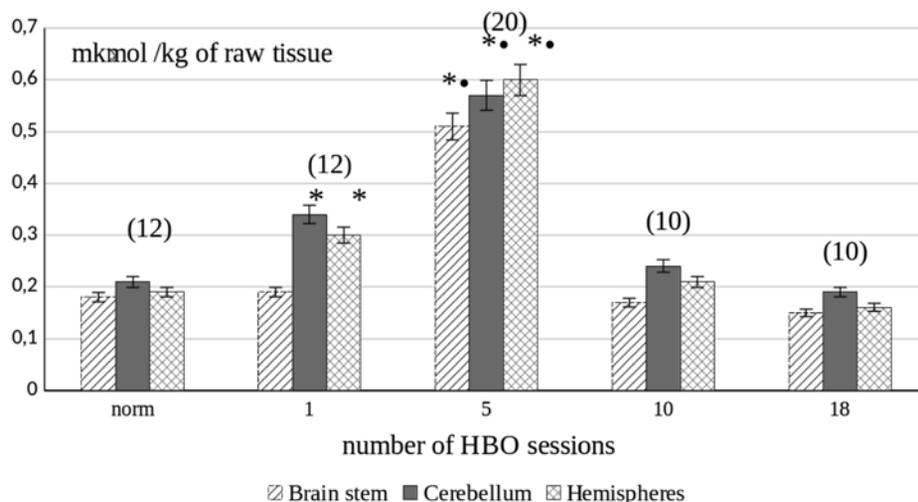


Рис. 1. Содержание малонового диальдегида в стволе, мозжечке и полушариях головного мозга крыс при гипербарической оксигенации. * ($p < 0,05$) – статистическая значимость различий по сравнению с нормой, • ($p < 0,05$) – по сравнению с однократным применением ГБО.

Fig. 1. The content of malondialdehyde in the stem, cerebellum and hemispheres of the rat brain during hyperbaric oxygenation. * ($p < 0,05$) – the reliability of differences compared with the norm, • ($p < 0,05$) – compared with a single use of HBO.

личин, оставаясь на этом уровне и после 18-го сеанса ГБО (рис. 1).

Сопоставление в исследуемых структурах головного мозга крыс динамики изменения содержания в них МДА, ДК и КДиСТ в процессе гипероксической нагрузки позволяет сделать следующие выводы. Во-первых, выделить филогенетически детерминированную рефрактерность реакции образования МДА в стволе головного мозга на однократный сеанс ГБО в режиме 2 ата-50 мин. Одной из причин этого может служить более низкое по сравнению с полушариями и мозжечком содержание в стволе головного мозга полиеновых жирных кислот – основного субстрата ПОЛ [16]. Во-вторых, это зависимость участия ДК и КДиСТ в образовании МДА: а) от источника происхождения (нейтральные липиды или фосфолипиды); б) от отдела головного мозга (ствол, мозжечок полушария); в) от величины гипероксической нагрузки. Есть все основания полагать, что однократный сеанс ГБО стимулирует в полушариях головного мозга вовлечение в образование МДА диеновых конъюгатов, образуемых при окислении нейтральных жиров и фосфолипидов, тогда как в мозжечке в этот процесс при ГБО вовлекаются КДиСТ, образованные при окислении фосфолипидов.

Увеличение числа сеансов до 5 стимулирует образование МДА в стволе головного мозга из ДК, образуемых при окислении нейтральных жиров и фосфолипидов, тогда как в мозжечке увеличение концентрации МДА, вероятно, достигается за счёт стимуляции его об-

разования из других ранних продуктов ПОЛ, пример диалкилперекисей и гидроперекисей липидов. В полушариях головного мозга при пятидневном курсе ГБО в образование МДА вовлекаются ДК и КДиСТ, образованные при окислении фосфолипидов. Нельзя исключить что, увеличение вовлечения ранних продуктов активированного ПОЛ в образование МДА к пятикратной гипероксической нагрузке есть проявление филогенетически более древней реакции адаптации клеток к окислительному стрессу. Она заключается в превращении более агрессивных ранних продуктов ПОЛ в менее агрессивные вторичные (МДА). Известно, что ранние продукты ПОЛ, несмотря на свою «короткоживучесть» оказывают повреждающее действие на белковые молекулы, взаимодействуя с SH-, NH₂-, CH₂- группами [17].

Что касается нормализации содержания МДА в исследуемых структурах головного мозга после 10-го и 18-го сеансов ГБО (рис. 1), то можно предположить формирование рефрактерности ПОЛ к продолжающемуся гипероксическому воздействию. В настоящее время известно, что одним из механизмов повышения устойчивости липидного слоя биомембран к окислительному влиянию гипербарического кислорода является взаимодействие его компонентов с мочевиной. Доказано, что переход мочевины в связанное состояние с компонентами мембран клеток и субклеточных органелл, повышает их устойчивость к токсическим режимам гипероксии [18]. В наших ис-

Содержание мочевины (ммоль/кг сырой ткани) и мочевой кислоты (мкмоль/кг сырой ткани) в отделах головного мозга крыс при ГБО, (M±m)

The content of urea (mmol/kg of raw tissue) and uric acid (mmol/kg of raw tissue) in the brain of rats with HBO, (M±m)

№ Series	Series of experiments	метаболиты metabolites	Ствол Brain stem	Мозжечок Cerebellum	Полушария Hemispheres
1	Control (norm) n=15	Urea	3,86 ± 0,41	4,46 ± 0,46	4,28 ± 0,35
		Urea acid	144,7 ± 25,7	188,2 ± 16,2	176,3 ± 17,8
2	1 сеанс n=10 (session)	Urea	2,95 ± 0,38	3,67 ± 0,40	3,86 ± 0,45
		Urea acid	131,1 ± 23,2	169,2 ± 27,7	158,7 ± 30,5
3	5 сеансов (sessions) n=10	Urea	2,80 ± 0,30	3,44 ± 0,48	3,36 ± 0,28
		Urea acid	266,1 ± 16,1**	256,6 ± 15,9**	268,5 ± 47,6**
4	10 сеансов sessions n=12	Urea	3,05 ± 0,30	3,38 ± 0,33	4,07 ± 0,28
		Urea acid	254,8 ± 33,1**	250,7 ± 17,4**	179,8 ± 22,9
5	18 сеансов (sessions) n=12	Urea	3,21 ± 0,40	3,60 ± 0,41	3,22 ± 0,16
		Urea acid	228,1 ± 34,3	229,3 ± 23,9	153,4 ± 18,1

Примечание. * ($p < 0,05$) – статистическая значимость различий по сравнению с нормой, • ($p < 0,05$) – по сравнению с однократным применением ГБО. n – число животных по сериям опытов.

Note. * ($p < 0,05$) – the reliability of differences compared with the norm, • ($p < 0,05$) – the reliability of differences compared with a single use of HBO. n – the number of animals in a series of experiments.

следованиях не выявлено изменений концентрации мочевины в исследуемых структурах головного мозга как при однократном, так и многократном воздействии ГБО в терапевтическом режиме. (табл. 3). Однако обнаружено существенное увеличение содержания в них мочевой кислоты после 5-го сеанса ГБО. Увеличение количества сеансов ГБО до 10 не приводило дальнейшему нарастанию концентрации мочевой кислоты в стволе и мозжечке, но вызывало нормализацию в полушариях головного мозга. В мозжечке и стволе головного мозга это происходило после 18-го сеанса ГБО (табл. 3).

Можно полагать, что увеличение образования мочевой кислоты к 5-му сеансу ГБО отражает реакцию нейронов головного мозга на продолжающееся гипероксическое воздействие, вызвавшее активацию ПОЛ. При этом возможными триггерами, стимулирующими её образование, выступают ранние продукты ПОЛ: ДК и КДиСТ. Неслучайно нормализация или угнетение их образования в полушариях после 10-го и 18-го сеансов ГБО (табл. 1, 2) сопровождается нормализацией содержания МДА в исследуемых структурах головного мозга. В настоящее время доказана способность мочевой кислоты защищать от окисления липопро-теиды крови [19], что не исключает аналогичный эффект в отношении липопро-теидов мембран нейронов головного мозга.

Общеизвестно, что деградация полиненасыщенных жирных кислот при гипероксии обусловлена влиянием на них активных форм кислорода. Одним из ферментов, ограничивающих образование кислородных радикалов в клетке, является супероксиддисмутаза (СОД). Катализируя реакцию дисмутации супероксидного-анион-кислорода (O_2^-) она превращает его в менее реакционноспособную молекулу перекиси водорода [19]. Как показали наши исследования, уже однократный сеанс ГБО вызывал повышение активности СОД в стволе, мозжечке и полушариях головного мозга, соответственно, на 46%, 38% и 35% (рис. 2, а). Увеличение количества сеансов ГБО до 5 не приводило к дальнейшему росту активности СОД и она продолжала оставаться выше нормы в указанных структурах мозга, соответственно, на 66%, 38% и 50% (рис. 2, а). Однако после 10-го сеанса ГБО стимулирующее влияние гипероксии на СОД прекращалось в стволе и мозжечке, но сохранялось в полушариях головного мозга (рис. 2, а). Примечательно, что это сопровождалось нормализацией в них концентрации МДА (рис. 1).

Если учесть, что повышение активности СОД есть эволюционно детерминированная реакция фермента на увеличение образования O_2^- [20], то нормализация её повышенной активности при увеличении гипероксической нагрузки до 10 сеансов в стволе и мозжечке указывает на нормализацию в них обра-

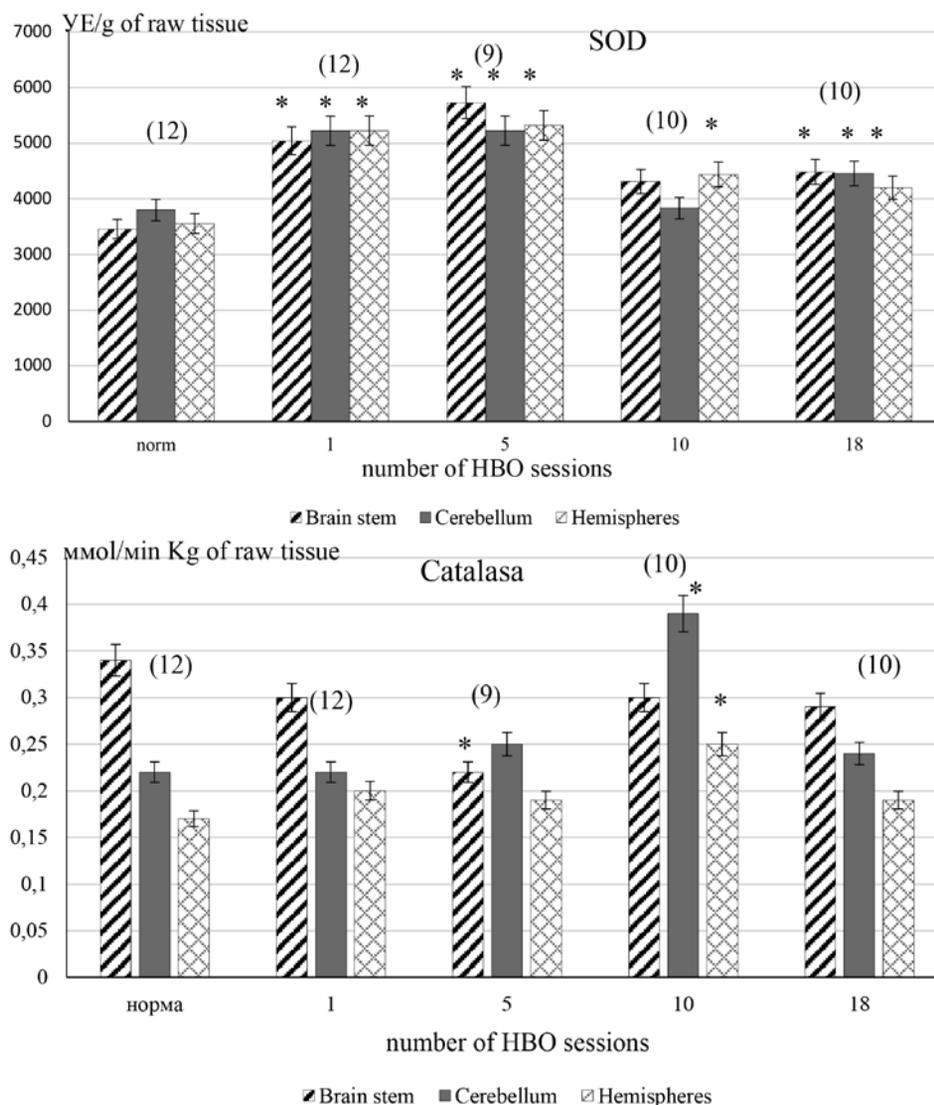


Рис. 2. Активность супероксиддисмутазы (СОД, А) и каталазы (Б) в структурах головного крыс при гипербарической оксигенации (ГБО)

Примечание. *($p < 0,05$) – статистическая значимость различий по сравнению с нормой; В скобках – число животных по сериям опытов

Fig. 2. The activity of superoxide dismutase (SOD, A) and catalase (B) in the structures of the brain of rats under hyperbaric oxygenation (HBO).

Note. *($p < 0,05$) – the reliability of differences compared with the norm; In parentheses – the number of animals in a series of experiments.

зования супероксидного аниона, в отличие от филогенетически более молодого отдела головного мозга – полушарий. Однако, увеличение количества сеансов с 10 до 18 повторно стимулировало СОД в нейронах ствола и мозжечка, не вызывая дальнейшего усиления этого процесса в полушариях. Поэтому активность СОД превышала в них норму, соответственно, на 25%, 18% и 19% (рис. 2, а). На фоне отсутствия при этом накопления в исследуемых отделах головного мозга продуктов ПОЛ указывает на неспособ-

ность 18-дневного курса ГБО вызывать истощение активности СОД в филогенетически не однородных отделах мозга.

Известно, что, перекись водорода, которая образуется в реакции, катализируемой СОД, подвергается разложению с участием каталазы [21], которая является одним из основных факторов, обеспечивающих нейропротекторный эффект астроцитов [22]. В наших исследованиях обнаружено, что в отличие от СОД, у интактных крыс выявлено значимое различие меж-

ду активностью каталазы (ммоль/мин х кг сырой ткани) в полушариях ($0,17 \pm 0,01$), мозжечке ($0,22 \pm 0,02$) и стволе ($0,34 \pm 0,02$) головного мозга.

Максимальная активность каталазы отмечена в филогенетически более древнем стволе, минимальная в филогенетически более молодых полушариях головного мозга (**рис. 2, Б**). Курсовое применение ГБО выявило снижение на 35% активности каталазы в стволе головного мозга после 5-го, и увеличение активности в мозжечке и полушариях на 77% и 47% соответственно, после 10-го сеанса ГБО (**рис. 2, Б**). Сопоставление изменения активности каталазы и СОД в структурах головного мозга при курсовом применении ГБО позволяет говорить о прямом избирательном ингибирующем влиянии пятидневного курса ГБО на активность каталазы в стволе головного мозга и об опосредованном (через стимуляцию образования перекиси в реакции катализируемой СОД) стимулирующем влиянии 10-дневного курса ГБО на активность каталазы в мозжечке и полушариях головного мозга. Отсутствие изменения активности каталазы в остальных случаях на фоне увеличения активности СОД (**рис. 2, А**) может служить результатом активации глутатионпероксидазы, которая, как и каталаза, принимает участие в элиминации перекиси водорода [23]. В пользу данного предположения указывает стимуляция в головном мозге после сеанса ГБО в 3 ата- 60 мин пролиферации астроглии [24], обладающей, как известно [25], выраженной глутатионпероксидазной активностью.

Заключение

Применение 18-дневного курса ГБО в терапевтическом режиме (2 ата- 50 мин, 1 сеанс в сутки) не вызывает стойкого накопления продуктов ПОЛ (ДК, КДиСТ и МДА) в стволе, мозжечке и полушариях головного мозга крыс, а также истощения антиоксидантной системы. Последнее проявляется сохранением реакции нейронов на ГБО стойким увеличением активности СОД, тогда как увеличение активности каталазы и накопление мочевой кислоты носит временный характер.

Литература

(п.п. 1–3; 12; 19; 21–23; 25 см. References)

- Поликарпочкин А.Н., Левшин И.В. Гипербарическая оксигенация при физической реабилитации и после перенесённой инфекции: COVID-19. *Актуальные проблемы физической и специальной подготовки силовых структур*. 2021; 1: 225-30.
- Смеянович А.В., Шанько Ю.Г., Козыро В.И. ГБО в хирургии околостоловых опухолей задней черепной ямки. *Бюллетень гипербарической биологии и медицины*. 1999; 7(1-9): 60-1.
- Жиронкин А.Г., Панин А.Ф., Сорокин Л.А. *Влияние повышенного давления кислорода на организм*. Л.; Медицина, 1965.
- Булгакова Я.В., Савилов П.Н., Яковлев В.Н., Дорохов Е.В. Активность супероксиддисмутазы в филогенетически разнородных областях мозга крыс при повторяющихся сеансах гипербарической оксигенации *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2019; 55(5): 411-3.
- Манжурцев А.В., Меньшиков П.Е., Сергеева В.В., Ублинский М.В., Ахадов Т.А., Семёнова Т.А. Рост функциональной активности головного мозга после однократного сеанса гипербарической оксигенации. *Детская хирургия*. 2019; 23(1S2): 38.
- Селезнёв С.А., Вашетина С.М., Мазуркевич Г.М. *Комплексная оценка кровообращения в экспериментальной патологии*. Л.; Медицина, 1976.
- Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови. *Лабораторное дело* 1989; 1: 127-31.
- Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов с тиобарбитуровой кислотой. *Лабораторное дело*. 1988; 11: 41-3.
- Орехович А.К. *Современные методы в биохимии*. М.; Наука, 1979.
- Пашков А.Н., Романов А.Ю. Применение хемиллюминисцентного анализа для определения активности печёночных антикейлона и кейлона. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 1990; 7: 92-4.
- Корольок М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988; 1: 16-9.
- Ашмарин И.П. *Биохимия мозга*. СПб; Издательство СПбУ, 1999.
- Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*. М.; Наука, 1972.
- Гершенович З.С., Кричевская А.А., Лукаш А.И. *Мочевина в живых организмах*. Ростов н/Д.: Изд-во РГУ, 1970.
- Леонов А.Н. *Гипероксия. Адаптация. Саногенез*. Воронеж; ВГМА, 2006.
- Кимбаровская Е.М., Парина Л.И. Изменения в структуре коры больших полушарий у крыс после кислородной компрессии. *Применение кислорода под повышенным давлением*. М.; Медицина; 1971: 222-4.

References

- Gottfried I., Schottlender N., Ashery U. Hyperbaric Oxygen Treatment-From Mechanisms to Cognitive Improvement. *Biomolecules*. 2021; 11(10): 1520.
- Kirby J.P., Snyder J., Schuerer D.J.E., Peters J.S., Bochicchio G.V. Essentials of Hyperbaric Oxygen Therapy: 2019 Review. *Mol. Med.* 2019; 116(3): 176-9.
- Savilov P.N. Forms of Adaptation to Hyperoxia. *Norwegian Journal of development of the international Science*. 2021; 1(55): 26-32.
- Polikarpochkin A.N., Levshin I.V. Hyperbaric oxygen therapy during physical rehabilitation and after infection: COVID-19. *Aktualnye problemy fizicheskoy i spetsialnoy podgotovki silovykh struktur*. 2021; 1: 225-30. (in Russian)
- Smeyanovich A.V., Shan'ko Yu.G., Kozyro V.I. HBO in surgery near stem tumors of the posterior cranial fossa. *Byulleten giperbaricheskoy biologii i meditsiny*. Voronezh, 1999; 7(1-9): 60-1. (in Russian)

6. Zhironkin A.G., Panin A.F., Sorokin L.A. *The effect of increased oxygen pressure on the human body. [Vliyaniye povyshennogo davleniya kisloroda na organizm]*. Moscow; Meditsine, 1965. (in Russian)
7. Bulgakova Ya.V., Savilov P.N., Yakovlev V.N., Dorokhov E.V. Superoxide dismutase activity in phylogenetically heterogeneous areas of the rat brain during repeated sessions of hyperbaric oxygenation. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii*. 2019; 55(5): 411-3. (in Russian)
8. Manzhurtsev A.V., Menshchikov P. E., Sergeeva V. V., Ublinsky M.V., Akhadov T.A., Semenova T.A. Growth of functional activity of the brain after a single session of hyperbaric oxygenation. *Detskaya khirurgiya*. 2019; 23(1S2): 38. (in Russian)
9. Seleznev S.A., Vashetina S.M., Mazurkevich G.M. Comprehensive assessment of blood circulation in experimental pathology. *[Kompleksnaya otsenka krovoobrashcheniya v eksperimentalnoy patologii]*. Leningrad: Meditsine, 1976. (in Russian)
10. Volchegorsky I.A., Nalimov A.G., Yarovinsky B.G. Comparison of different approaches to the determination of lipid peroxidation products in heptane-isopropanol blood extracts. *Laboratornoe delo*. 1987; 4: 127-31. (in Russian)
11. Andreeva L.I., Kozhemyakin L.A., Kishkun A.A. Modification of the method of separation of lipid peroxides with thiobarbituric acid. *Laboratornoe delo*. 1988; 11: 41-3. (in Russian)
12. Richterrich D. *Clinical Chemistry*. N. Y.: Academia Press, 1962.
13. Orekhovich A.K. *Modern methods in biochemistry [Sovremennye metody v biokhimii]*. Moscow; Nauka. 1979. (in Russian)
14. Pashkov A.N., Romanov A.Yu. Application of chemiluminescent analysis to determine the activity of hepatic anticeylon and keylon. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1990; 7: 92-4. (in Russian)
15. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokarev V.E. Method for determining the activity of catalase. *Laboratornoe delo*. 1988; 1: 16-9. (in Russian)
16. Ashmarin I.P. *Biochemistry of the brain [Biokhimiya mozga]*. St. Petersburg: Publishing House SpbU; 1999. (in Russian)
17. Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. Lipid peroxidation in biological membranes *[Perekisnoe okislenie lipidov v biologicheskikh membranakh]*. Moscow: Nauka, 1972. (in Russian)
18. Gershenovich Z.S. Krichevskaya A.A., Lukash A.I. *Urea in living organisms [Mochevina v zhivyykh organizmakh]*. Rostov-na-Donu. Publishing House of Russian State University, 1970. (in Russian)
19. Kanofsky J.R. Singlet-oxygen generation from A2E Photochem. *Photobiol*. 1990; 51: 299-303.
20. Leonov A.N. *Hyperoxia. Adaptation. Sanogenesis. [Giperoksiya. Adaptatsiya. Sanogenez]*. Voronezh: VGMA, 2006. (in Russian)
21. Clark J.V., Lambertsen C.J. Pulmonary oxygen toxicity. A review. *Pharmacol. Review*. 1971; 23: 37-133.
22. Desanger S., Glowinski J., Premont J. Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J. Neurosciency*. 1996; 16: 2553-62.
23. HoY.-S., Magnenat J.-L., Bronson T. Mic with a homozygous null mutation for the most abundant Glutathione Peroxidase, Gpx1., show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide *J. Bioll. Chem*. 1998; 273(35): 22528-36.
24. Kimbarovskaya E.M., Parinova L.I. *Changes in the structure of the cerebral cortex in rats after oxygen compression. [Primenenie kisloroda pod povyshennym davleniem]*. Moscow; Meditsine. 1971: 222-4. (in Russian)
25. Dringen R., Kussmaul R., Guttereret J.M. The Glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells *Journal of Neuroshemistry*. 1999; 72(6): 2523-30.

Сведения об авторах:

Савилов Павел Николаевич, доктор мед. наук, проф., врач анестезиолог-реаниматолог отделения «Операционный блок с палатой реаниматологии и интенсивной терапии» ТОГБУЗ «Тамбовская ЦРБ», e-mail: p_savilov@rambler.ru;
Булгакова Ярослава Викторовна, канд. мед. наук, доцент каф. нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет), e-mail: yaroslava.v.bulgakova@mail.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Осиков М.В.^{1,2}, Кайгородцева Н.В.^{1,2}

Сравнительный анализ противовоспалительного действия озона и 5-аминосалициловой кислоты при экспериментальном колите

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России,

454092, Челябинск, ул. Воровского, д. 64;

²ГБУЗ Челябинская областная клиническая больница,

454092, Челябинск, ул. Воровского, д. 70

Введение. Уровень маркеров воспаления при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК) имеет не только диагностическое и прогностическое значение, но важен и для оценки эффективности терапии. Побочные эффекты и рефрактерность базисных средств терапии ВЗК, включая производные 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК), явились предпосылкой для оценки эффектов озона – плейотропного фактора регуляции гомеостаза. **Цель работы** – проведение сравнительного анализа противовоспалительного действия ректального применения озона и 5-АСК при оксазолон-индуцированном колите (ОИК).

Методика. На 73 крысах Wistar моделировали ОИК вначале накожным, затем ректальным применением оксазолон. В течение 6 сут применяли ректальные инсуффляции озона в дозе 0,1 мг/кг 1 раз в сутки или ректальные суппозитории с 50 мг 5-АСК 2 раза в сутки. Оценивали выраженность клинических симптомов по индексу активности болезни (DAI), морфологических признаков повреждения кишки – по индексу повреждения тканей (TDI). Определяли концентрацию кальпротектина в кале, содержание в крови лейкоцитов, С-реактивного белка, НСТ-редуцирующую способность нейтрофилов крови.

Результаты. При ОИК максимальное увеличение DAI и содержания кальпротектина в кале наблюдается на 6-е сут, НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови и количества в крови нейтрофилов и моноцитов – на 2-е сут, концентрации С-РБ в сыворотке крови и выраженности морфологических признаков повреждения в толстой кишке – на 4-е и 6-е сут. Применение озона на 4-е и 6-е сут снижает DAI, TDI, содержание кальпротектина в кале и концентрацию С-РБ в сыворотке; на 2-е, 4-е, 6-е сут снижает количество в крови лейкоцитов за счет лимфоцитов, ограничивает кислород-зависимый метаболизм нейтрофилов крови; на 2-е сут увеличивает содержание кальпротектина в кале. Эффекты ректальных инсуффляций озона по сравнению с применением 5-АСК сопоставимы по данным DAI, TDI; менее выражены в отношении уменьшения размера язвенного дефекта на 2-е и 6-е сут, снижения концентрации в кале кальпротектина на 6-е сут, концентрации С-РБ в сыворотке и количества лейкоцитов в крови на 2-е, 4-е, 6-е сут; более выражены в отношении снижения НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови.

Заключение. Полученные результаты об эффективности ректального применения озона при ОИК в отношении клинических признаков, местных и системных проявлений воспалительного процесса в толстой кишке, полной или частичной сопоставимости показателей ответа острой фазы, клинико-морфологических эффектов озона с ректальным применением 5-АСК являются предпосылкой для дальнейшего изучения механизма противовоспалительного действия озона при ВЗК на доклиническом этапе и возможного применения локальной озонотерапии у больных язвенным колитом и болезнью Крона.

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника; оксазолон-индуцированный колит; воспаление; озон; 5-аминосалициловая кислота

Для цитирования: Осиков М.В., Кайгородцева Н.В. Сравнительный анализ противовоспалительного действия озона и 5-аминосалициловой кислоты при экспериментальном колите. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(3): 91-100.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.91-100

Участие авторов. Осиков М.В. – концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование; Кайгородцева Н.В. – сбор и обработка материала, подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка материала, редактирование. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Осиков Михаил Владимирович, e-mail: prof.osikov@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.04.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Osikov M.V.^{1,2}, Kaygorodtseva N.V.^{1,2}**Comparative analysis of the anti-inflammatory effect of ozone and 5-aminosalicylic acid in experimental colitis**¹South Ural Medical University,

Vorovskogo St. 64, Chelyabinsk 454092, Russian Federation;

²Chelyabinsk Regional Clinical Hospital,

Vorovskogo St. 70, Chelyabinsk 454092, Russian Federation

Introduction. The investigation of inflammatory markers in inflammatory bowel diseases (IBD) is both of diagnostic and prognostic value and important for the evaluation of therapy. Side effects and the refractoriness to basic therapy for IBD, including 5-aminosalicylic acid (5-ASA) derivatives, have warranted evaluating the effects of ozone as a pleiotropic homeostasis-regulating agent. **The aim** of the study was to comparatively analyze the anti-inflammatory effects of ozone and 5-ASA when administered rectally to treat oxazolone-induced colitis (OIC).

Methods. OIC was induced in 73 Wistar rats by cutaneous followed by oral oxazolone. For 6 days, rectal insufflations of ozone were performed at a dose of 0.1 mg/kg once a day, or rectal suppositories containing 50 mg of 5-ASA were administered twice a day. The severity of clinical symptoms was assessed by the disease activity index (DAI). Morphological signs of intestinal damage were assessed by the tissue damage index (TDI). Calprotectin concentration in feces, number of blood leukocytes, C-reactive protein (CRP), and NBT-reducing ability of blood neutrophils were determined.

Results. In rats with OIC, the maximum increases in DAI and fecal calprotectin content were observed on the 6th day. The maximum increases in the NBT-reducing ability of blood neutrophils and the number of blood neutrophils and monocytes were observed on the 2nd day. The maximum serum concentration of CRP and the severity of morphological signs of damage in the colon were observed on the 4th and 6th days. The ozone treatment reduced DAI, TDI, calprotectin content in feces, and the serum concentration of CRP on the 4th and 6th days. On the 2nd, 4th, and 6th days, the ozone treatment reduced blood leukocytes at the expense of lymphocytes and limited oxygen-dependent metabolism of blood neutrophils. On the 2nd day of ozone treatment, there was an increased fecal content of calprotectin. The effects of rectal ozone insufflation were comparable with the effect of 5-ASA by DAI and TDI. These effects were less pronounced with regard to the decrease in ulcer size on the 2nd and 6th days, the decrease in the fecal concentration of calprotectin on the 6th day, the serum concentration of CRP, or the number of leukocytes in the blood on the 2nd, 4th, 6th day. The effects were more pronounced in relation to the decrease in the NBT-reducing ability of blood neutrophils.

Conclusion. The effectiveness of rectal ozone treatment in OIC in relation to clinical signs, local and systemic manifestations of the inflammatory process in the colon, complete or partial comparability of acute phase response rates, and clinical and morphological effects of ozone with rectal application of 5-ASA warrant further studying the mechanism of the anti-inflammatory effect of ozone in IBD at the preclinical stage and a possible use of local ozone therapy in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease.

Keywords: inflammatory bowel disease; oxazolone-induced colitis; inflammation; ozone; 5-aminosalicylic acid

For citation: Osikov M.V., Kaygorodtseva N.V. Comparative analysis of the anti-inflammatory effect of ozone and 5-aminosalicylic acid in experimental colitis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(3): 91-100. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.91-100

Author's contribution: Osikov M.V. – research concept and design, text writing, editing; Kaygorodtseva N.V. – collection and processing of material, preparation of illustrative material, statistical processing of material, editing. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: **Osikov Mikhail Vladimirovich**, head., Department of Pathological Physiology, FSBEI HE SUSMU, Ministry of Health of Russia, e-mail: prof.osikov@yandex.ru

Financing. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:

Osikov M.V., <https://orcid.org/0000-0001-6487-9083>

Kaygorodtseva N.V., <https://orcid.org/0000-0001-8403-8599>

Received 25.04.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Введение

Воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) – болезнью Крона (БК) и язвенным колитом (ЯК) – в мире поражены более шести миллионов человек, заболеваемость не имеет тенденции к снижению, характеризуется «омоложением», тяжестью местных и внекишечных проявлений [1]. За последние 40 лет заболеваемость ВЗК увеличилась в 6 раз [2]. Этиология ВЗК включает факторы внешней среды (инфекционные агенты, использование антибиотиков и других лекарственных средств, особенности диеты, курение, и др.) в условиях наследственной предрасположенности и реализации генетического дефекта [3]. Показаны ассоциации ВЗК с дефектами в генах, отвечающих за функцию нейтрофилов и других факторов врожденного иммунитета. ВЗК-ассоциированный таксономический дисбиоз характеризуется снижением численности противовоспалительных бактерий (*Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale* и др.), увеличением адгезивно-инвазивных штаммов *E. coli*, колибактин-продуцирующих *E. coli*, и др. провоспалительных микроорганизмов [4]. В результате сложного взаимодействия факторов окружающей среды и генетических факторов возникает дисрегуляция иммунного ответа в мукозоассоциированной лимфоидной ткани слизистой оболочки на измененную микробиоту кишечника и аутоантигены кишечной стенки при нарушении защитных механизмов интестинального барьера [5, 6]. ЯК и БК, прежде всего, характеризуются различной глубиной поражением стенки кишечника: трансмуральным при БК и на уровне слизистой оболочки при ЯК. Изучение локальных и системных маркеров воспалительного процесса при ВЗК имеет диагностическое и прогностическое значение, а также необходимо для оценки эффективности проводимой терапии.

Терапевтические подходы при ВЗК нацелены на редукцию воспалительного процесса и поддержание длительной ремиссии. Применяемые лекарственные средства включают производные 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК), топические и системные кортикостероиды, иммуносупрессанты, биологические препараты [7, 8]. Среди средств базисной терапии ключевую позицию занимают препараты 5-АСК для ректального применения в виде суппозитория, суспензии и пены. Данные методы лечения ВЗК трудно назвать эффективными ввиду развития рефрактерности и целого спектра побочных явлений, обусловленных отсутствием селективности воздействия, несостоятельностью лиганд-рецепторных взаимодействий, низкой индукцией репаративных процессов и ряда других факто-

ров [9, 10]. Доказано, что треть пациентов с ВЗК рефрактерна к традиционной терапии, что диктует необходимость разработки новых противовоспалительных терапевтических подходов.

В этом отношении особое значение приобретают БАВ эндогенного происхождения [11–13]. Озон является плейотропным фактором регуляции гомеостаза, проявляет иммуномодулирующие, антигипоксические, биосинтетические и противовоспалительные свойства [14]. В клинической практике озонотерапия успешно применяется при ревматоидном артрите, остеоартрите, при хронических сосудистых, диабетических язвах и пролежнях, диабетической стопе [14, 15–17]. Ранее нами показано, что применение озона при экспериментальном колите ограничивает окислительную деструкцию липидов и белков в очаге повреждения толстой кишки [18]. **Цель работы** – проведение сравнительного анализа противовоспалительного действия ректального применения озона и 5-АСК при оксазолон-индуцированном колите.

Методика

Исследование выполнено в экспериментально-биологической клинике ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России на 73 крысах-самцах Вистар массой 240 ± 20 г. Работа выполнялась с соблюдением правил надлежащей лабораторной практики (приказ МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 г.), Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях. Протокол исследования одобрен Этической комиссией университета. Методом простой рандомизации животных делили на группы: 1-я ($n=10$) – интактный контроль, 2-я ($n=21$) – животные с оксазолон-индуцированным колитом (ОИК), 3-я ($n=21$) – животные с ОИК, получающие ректальные инсуффляции O_3 , 4-я ($n=21$) – животные с ОИК, получающие ректально 5-АСК. Для анестезии применяли «Золетил 100» (Virbac Sante Animale) в дозе 20 мг/кг. ОИК моделировали двухэтапным применением 3%-го спиртового раствора оксазолон (4-этоксиметил-2-фенил-2-оксазолон-5-675 мкл/кг): 1-й этап – накожная сенсibilизация нанесением 675 мкл/кг оксазолон на межлопаточную область, 2-й – ректальное введение 675 мкл/кг препарата на глубину 7 см [19]. Озонокислородную смесь с концентрацией озона 2,5 мг/л получали на установке «УОТА-60-01» («Медозон», Россия) и вводили *per rectum* на глубину 7 см с помощью катетера (0,1 мг O_3 /кг массы) 1 раз в сутки в течение 6 сут. Ректальные суппозитории массой 0,3 г, содержащие 50 мг 5-АСК, готовили на основе ректаль-

ных суппозиториев «Салофальк» (МНН: Месалазин, «Doctor Falk Pharma GmbH», Германия) и применяли каждые 12 ч в течение 6 сут в соответствии с данными о периоде полувыведения 5-АСК из тканей кишки.

На 2-е, 4-е и 6-е сут моделирования ОИК животных выводили из эксперимента, забирали кровь из левого желудочка сердца, каловые массы, вырезали наиболее поврежденные фрагменты толстой кишки для морфологического исследования. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Индекс активности болезни (DAI) рассчитывали по шкале, адаптированной для крыс и включающей 3 параметра: массу тела, консистенцию каловых масс и наличие крови в кале, каждый из которых оценивали в балах от 0 до 4 [20]. Общее количество лейкоцитов в крови определяли на гематологическом анализаторе «BC-2800Vet» («Mindray», Китай), откалиброванном для крови крыс. Кислородзависимый метаболизм нейтрофилов, выделенных из крови на двойном градиенте плотности фиколл-верографина, оценивали по интенсивности восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в диформазах. Рассчитывали активность НСТ-теста: спонтанного и индуцированного частицами монодисперсного (диаметр 1,7 мкм) полистирольного латекса. Концентрацию С-реактивного белка (С-РБ) в сыворотке определяли с помощью специальной для крыс тест-системы («ElisaKit», Китай), содержание кальпротектина в супернатанте кала – с помощью тест-системы «Calprotectin Alpro» («Cloud-Clone Corp», Китай). Морфологические исследования проведены на микроскопе PrimoStar (CarlZeiss, Германия) с морфометрической установкой Pro150ES (Pixera Corporation, США). Определяли диаметр язвенного дефекта, плотность сосудистой сети. Для интегральной оценки повреждения толстой кишки рассчитывали индекс повреждения тканей (tissue damage index, TDI) от 0 до 6 с учетом лейкоцитарной инфильтрации, плотности сосудов и толщины стенки кишечника, площади повреждения, степени потери бокаловидных клеток [21]. Для статистической обработки использовали программу «IBM SPSS Statistics v.23». Характеристика выборок представлена в формате «Me (Q₁; Q₃)», где Me – медиана, Q₁ и Q₃ – значение верхнего (25) и нижнего (75) квартиля. Проверку гипотез в группах проводили с помощью критериев Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни, значимыми считали отличия при $p < 0,01$ с учетом поправки Бонферрони.

Результаты и обсуждение

При ОИК на 2-е сут наблюдения у животных снижалась масса тела, возрастало количество дефекаций

в сутки, консистенция кала становилась жидкой, в каловых массах фиксировалась кровь как при проведении бензидиновой пробы, так и визуально. На 4-е и 6-е сут клинические проявления становились более выраженными, что отражалось в увеличении DAI на 2-е, 4-е и 6-е сут, а также в статистически значимом ($p < 0,01$) прогрессирующем росте DAI со 2-х по 6-е сут. (таблица).

Отражением клинической картины при ОИК являются морфологические данные оценки состояния структур толстой кишки. На 2-е сут в очаге повреждения зафиксированы язвенные дефекты в пределах слизистой оболочки, собственная пластинка слизистой разрыхлена, ее непрерывность в проекции язвенных дефектов нарушена и утолщена за счет клеточной инфильтрации. Инфильтрат состоял преимущественно из лимфоцитов и нейтрофилов с примесью эозинофилов. Подслизистый слой был разрыхлен, резко утолщен за счет выраженного отека, отмечалась увеличенная плотность сосудистой сети (рис. 1, а). TDI варьировал от 2 до 3 ед. На 4-е и 6-е сут увеличение TDI происходило преимущественно за счет дальнейшего увеличения размера язвенного дефекта, плотности нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрации, толщины стенки кишечника без дальнейшего значимого увеличения плотности сосудистой сети (рис. 2, а); Показатель TDI варьировал от 3 до 4 ед. и в динамике ОИК на 4-е и 6-е сут был выше, чем на 2-е. Нейтрофильная инфильтрация стенки кишки в области повреждения и активация функциональной активности нейтрофилов приводили к увеличению концентрации кальпротектина в каловых массах на 2-е, 4-е и 6-е сут с прогрессирующим, статистически значимым увеличением показателя со 2-х по 6-е сут. Увеличение содержания кальпротектина в кале является общепризнанным маркером нейтрофильного воспаления стенки кишечника [22].

Изменения в очаге повреждения, связанные с воспалительным процессом, нашли отражение в показателях ответа острой фазы в крови. На 2-е сут ОИК в крови увеличивалось количество лейкоцитов за счет палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов, повышалась активность спонтанного и индуцированного НСТ-теста нейтрофилов крови, увеличивалась концентрация С-РБ в сыворотке. На 4-е и 6-е сут ОИК наблюдалось увеличение количества лейкоцитов в крови за счет сегментоядерных нейтрофилов, эозинофилов, лимфоцитов и моноцитов (только на 6-е сут). Наряду с этим, на 4-е и 6-е сут повышались концентрация С-РБ в сыворотке, активность спонтанного (только на 6-е сут) и индуциро-

Таблица/Table

Клинический статус и показатели выраженности воспалительного процесса при ОМК (Me (Q1; Q3))
Clinical status and indicators of the severity of the inflammatory process in OIC (Me (Q1; Q3))

Показатели Indicator	Группа I Group I		Группа 2/ Group II		Группа 3/ Group III		Группа 4/ Group IV		
	2 сутки/ 2 day	6 сутки/ 6 day	4 сутки/ 4 day	6 сутки/ 6 day	2 сутки/ 2 day	4 сутки/ 4 day	2 сутки/ 2 day	4 сутки/ 4 day	6 сутки/ 6 day
DAI, баллы DAI, score	0		7,00 (5,00;7,00)*	11,00 (11,00;11,00)*	5,00 (4,00;5,00)*	4,00 (4,00;4,00)* # £	4,00 (3,00;4,00)* # £	4,00 (3,00;5,00)* #	3,00 (3,00;4,00)* # £
Плотность сосудов, мм ² Vessel density, mm ²	12250,00 (10300,00; 14400,00)	17600,00 (17400,00; 19500,00)*	15650,00 (14500,00; 17800,00)*	284502,00 (23100,00; 31300,00)*	18250,00 (17700,00; 18600,00)* # £	19100,00 (17200,00; 23000,00)* £	28950,00 (28500,00; 30100,00)*	26200,00 (23700,00; 28300,00)* # &	28800,00 (19200,00; 30800,00)* # & ¥ ¥
Диаметр язвенного дефекта, мкм Ulcer defect diameter, µm	0	792,97 (397,97; 726,95)*	795,98 (691,97; 864,89)*	501,36 (483,32; 607,91)*	243,77 (179,63; 286,59)* # £	273,96 (269,62; 294,33)* # £	338,89 (184,33; 463,61)* #	439,97 (381,25; 495,95)* # & ¥	184,21 (149,35; 194,97)* # & ¥ ¥
TDI, баллы TDI, score	0	3,00 (2,00;3,00)*	4,00 (3,00;4,00)*	2,00 (2,00;3,00)*	2,00 (2,00;2,00)* #	1,00 (1,00;2,00)* # £	2,00 (2,00;3,00)*	3,00 (2,00;3,00)* #	1,00 (1,00;2,00)* #
Кальпротектин, нг/мл Calprotectin, ng/ml	0,13 (0,12;0,16)	2,31 (2,14;2,42)*	1,89 (1,76;1,98)* #	1,75 (1,71;1,81)* #	1,57 (1,52;1,62)* # £	1,22 (1,11;1,35)* # £ £ £	1,51 (1,42;1,58)* #	0,94 (0,89;0,97)* # # ¥	0,84 (0,79;0,91)* # ¥ &
Лейкоциты, • 10 ⁹ /л WBC, • 10 ⁹ /l	4,96 (4,24;6,42)	18,71 (14,04; 19,28)*	14,78 (13,87; 15,66)*	11,46 (11,31; 12,41)* #	9,09 (8,03;10,07)* # # £	7,31 (6,57;8,01)* # # £	7,21 (6,92;10,91)* # &	4,55 (4,31;6,31)* # & ¥	4,25 (3,71;4,87)* # & ¥
НФ, • 10 ⁹ /л NEUT, • 10 ⁹ /l	1,51 (1,34;1,71)	5,22 (2,63;6,63)*	2,41 (1,99;3,54)*	5,06 (3,92;5,41)*	5,23 (3,33;7,52)* #	3,74 (2,91;4,11)*	3,12 (2,52;8,19)*	1,34 (1,16;1,82)* # & ¥	1,47 (1,12;2,14)* # & ¥
ПЯН, • 10 ⁹ /л PNEU, • 10 ⁹ /l	0,02 (0;0,05)	0,34 (0,21;0,38)*	0	0	0,5 (0;0,19)	0 (0;0,08)	0,06 (0;0,11)*	0 (0;0,07)	0 (0;0,07)
СЯН, • 10 ⁹ /л SNEU, • 10 ⁹ /l	1,46 (1,34;1,65)	4,86 (2,41;6,14)*	2,41 (1,99;3,54)*	4,87 (3,92;5,41)*	5,08 (3,33;7,32)* #	3,74 (2,91;4,01)*	2,94 (2,52;8,17)*	1,34 (1,16;1,82)* # & ¥	1,47 (1,12;2,07)* # & ¥
ЭФ, • 10 ⁹ /л EOS, • 10 ⁹ /l	0,04 (0;0,04)	0	0,12 (0,05;0,12)*	0,11 (0;0,12)	0* #	0,07 (0,05;0,08) £ £	0 (0;0,11)	0,09 (0,06;0,17) &	0,06 (0;0,17)
ЛПЦ, • 10 ⁹ /л LYM, • 10 ⁹ /l	2,88 (2,32;4,48)	11,21 (10,93; 12,58)*	12,21 (11,41; 13,19)*	5,31 (5,21;7,61)* #	2,85 (2,21;4,41)* # £	3,21 (2,21;3,31)* # £	2,64 (2,57;4,41)* # &	2,78 (2,01;2,81)* #	2,55 (2,27;3,02)* #
МЦ, • 10 ⁹ /л MON, • 10 ⁹ /l	0,26 (0,23;0,32)	0,64 (0,47;0,81)*	0,34 (0,14;0,41)	0,51 (0,51;0,51)*	0,35 (0,25;0,41)	0,21 (0,21;0,41)* # £	0,32 (0,21;0,36)* # &	0,23 (0,15;0,25)	0,19 (0,17;0,25)* #

Продолжение таблицы см. на стр. 96.

Показатели Indicator	Группа 1 Group I		Группа 2/ Group II		Группа 3/ Group III		Группа 4/ Group IV		
	2 сутки/ 2 day	4 сутки/ 4 day	6 сутки/ 6 day	2 сутки/ 2 day	4 сутки/ 4 day	6 сутки/ 6 day	2 сутки/ 2 day	4 сутки/ 4 day	6 сутки/ 6 day
НСТ-тест спонт., акт-ть, % NST-test spont., active, %	4,51 (4,00;5,00)	15,00 (15,00; 15,00) *	8,51 (2,00;12,00)	7,51 (6,00;8,50)* #	5,50 (4,50;9,00)#	4,00 (4,00;6,00)	8,00 (8,00;11,00) * &	5,50 (5,00;9,00) * # ¥ &	4,00 (3,00;5,00) ¥ ¥ ¥
НСТ-тест инд., акт-ть, % NST-test ind., active, %	5,00 (4,00;6,00)	6,51 (3,00; 13,00)	10,00 (7,00;16,00) *	8,00 (7,50;8,50)* #	4,50 (4,00;5,50)£	4,00 (3,00;6,00) # £	9,00 (9,00;18,00) * &	4,00 (2,00;7,00) ¥	8,00 (7,00;10,00) * & ¥ ¥
С-РБ, пг/мл C-RP, pg/ml	95,06 (81,54; 110,95)	239,49 (192,62; 267,26) *	245,07 (136,27; 271,71)*	160,17 (134,22; 175,86) *	149,41 (120,65; 198,98)*#	84,64 (80,46; 104,35) # £ ££	124,88 (110,46; 146,38) * # &	98,94 (93,61; 104,35) # & ¥	78,21 (72,21; 85,17) # & ¥ ¥ ¥

Примечание. * – статистически значимые ($p < 0,01$) различия с группой 1; # – с группой 2; & – с группой 3; £ – с группой 3 на 2 сутки, ££ – с группой 3 на 4-е сут; ¥ – с группой 4 на 2-е сут, ¥¥ – с группой 4 на 4-е сут. НФ – нейтрофилы, ПЯН – палочкоядерные нейтрофилы, СЯН – сегментоядерные нейтрофилы, ЭФ – эозинофилы, ЛПЦ – лимфоциты, МЦ – моноциты.

Note. * – statistically significant ($p < 0,01$) differences with group 1; # – with group 2; & – with group 3; £ – with group 3 for the 2nd day, ££ – with group 3 for the 4th day; ¥ – with group 4 on day 2, ¥¥ – with group 4 on day 4. NEUT – neutrophils; PNEU – stab neutrophils; SNEU – segmented neutrophils; EOS – eosinophils; LYM – lymphocytes; MON – monocytes.

ванного НСТ-теста нейтрофилов крови. В динамике ОИК на 4-е и 6-е сут в крови общее количество лейкоцитов и сегментоядерных нейтрофилов ниже ($p < 0,01$), чем на 2-е сут, количество эозинофилов и концентрация С-РБ в сыворотке выше ($p < 0,01$), чем на 2-е сут.

Таким образом, на 2-е, 4-е и 6-е сут моделирования ОИК увеличивается индекс активности болезни DAI и индекс повреждения ткани толстой кишки TDI, возрастает количество лейкоцитов и НСТ-редуцирующая способность нейтрофилов крови, повышается содержание кальпротектина в кале и концентрация С-РБ в сыворотке. Максимальная выраженность клинических проявлений и содержания кальпротектина в кале наблюдается на 6-е сут, морфологические признаки повреждения в толстой кишке и концентрация С-РБ – на 4-е и 6-е сут, максимальная НСТ-редуцирующая способность нейтрофилов крови в индуцированном режиме и количество в крови нейтрофилов, моноцитов – на 2-е сут.

Клинико-морфологическая картина поражения толстой кишки, показатели ответа острой фазы при ОИК соответствуют изменениям при ВЗК у человека, что позволяет применять оксазолоновую модель колита для изучения патогенеза ВЗК и апробации новых терапевтических подходов к лечению [23].

Локальное применение O_3 при ОИК приводило к снижению выраженности клинических симптомов, значимому уменьшению DAI на 4-е и 6-е сут наблюдения без достижения значений в контрольной группе животных (**таблица**). Морфологическим отражением применения озона явилось уменьшение нейтрофильно-лимфоцитарной инфильтрации в очаге повреждения, пролиферация столбчатого каемчатого эпителия слизистой оболочки в перифокальной зоне, существенное сокращение размеров очагов некроза и эпителизация поверхности, обращенной в просвет кишки – покрытие однорядным столбчатым эпителием (**рис. 1, б, 2, б**). На 4-е и 6-е сут ОИК уменьшается диаметр язвенного дефекта, увеличивается площадь распределения сосудов, снижается TDI – интегральный показатель повреждения ткани. Полагаем, что увеличение площади сосудистого русла отражает активацию неонангиогенеза и ускорение репаративных процессов в области повреждения.

Концентрация кальпротектина в кале увеличивалась на 2-е сут и снижалась на 4-е и 6-е сут, но на всех сроках наблюдения оставалась значимо выше, чем в группе интактных животных. Ранее нами показано, что ректальные инсуффляции озона при ОИК усиливают окислительную деструкцию белков и липидов в очаге повреждения толстой кишки на 2-е сут, что

обусловлено прямыми окислительными свойствами озона, его способностью выступать в роли прооксиданта [18, 24]. На начальных этапах воспаления озон активирует факторы транскрипции (HIF-1 α , NF- κ B) и повышает продукцию провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6 и TNF- α) [25]. Наряду с этим, обнаружены системные изменения в крови при ОИК в условиях ректального применения озона. Количество лейкоцитов в крови снижалось на 2-е, 4-е и 6-е сут преимущественно за счет лимфоцитов, палочкоядерных нейтрофилов на 2-е сут, эозинофилов – на 4-е сут и моноцитов – на 6-е сут, на 4-е сут увеличивалось количество нейтрофилов в крови за счет сегментоядерных форм. Отметим, что общее количество лейкоцитов и нейтрофилов на 2-е, 4-е и 6-е сут, количество лимфоцитов и моноцитов на 2-е сут значимо отличалось от контрольной группы. Обнаружено снижение НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови в спонтанном режиме на 2-е и 4-е сут, в индуцированном режиме – на 2-е и 6-е сут с полным восстановлением до значений группы интактных животных, кроме активности индуцированного НСТ-теста на 4-е сут. Концентрация в сыворотке С-РБ снижалась на 4-е и 6-е сут с полным восстановлением показателя до уровня интактных животных на 6-е сут ОИК.

Итак, при экспериментальном ОИК в условиях ректального применения озона на 4-е и 6-е сут наблюдения снижается выраженность клинических признаков по показателю DAI, выраженность мор-

фологических признаков повреждения толстой кишки по показателю TDI. Снижается содержание кальпротектина в кале и концентрация С-РБ в сыворотке; на 2-е, 4-е, 6-е сут снижается количество в крови лейкоцитов преимущественно за счет лимфоцитов, ограничивается кислород-зависимый метаболизм нейтрофилов крови по показателям НСТ-редуцирующей способности; на 2-е сут в кале увеличивается содержание кальпротектина. Полагают, что противовоспалительные эффекты озона реализуются за счет активации транскрипционного фактора Nrf2, Nrf2-опосредованной Keap1-зависимой активации синтеза СОД, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы, гемоксигеназы, НАДФН-хиноноксидоредуктазы-1 и др. ферментов антиоксидантной защиты [26, 27]. Кроме этого, Nrf2 подавляет активность NF- κ B и продукцию провоспалительных цитокинов за счет прямых белок-белковых взаимодействий при умеренном окислительном стрессе под воздействием озона [28]. Данный эффект озона потенцируется ингибированием NLRP3 и ограничением синтеза IL-1 β и IL-18 [29].

На фоне применения 5-АСК при ОИК зафиксированы известные свойства данного противовоспалительного агента: на 2-е, 4-е, 6-е сут снижение содержания кальпротектина в кале, количества лейкоцитов в крови за счет нейтрофилов и моноцитов, концентрации в сыворотке С-РБ. Данные факты нашли отражение в клинико-морфологической картине: снижении DAI

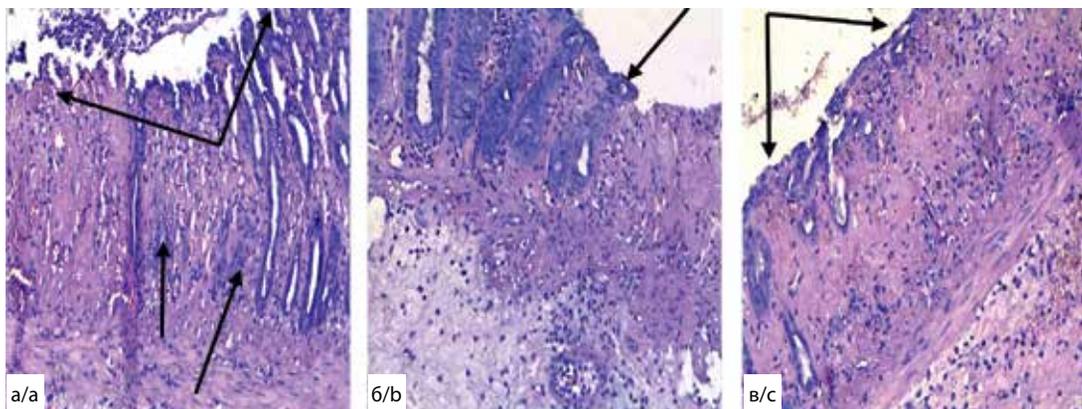


Рис. 1. Морфологические изменения в очаге повреждения толстой кишки на 2-е сут ОИК (окраска гематоксилин эозином, ув. 200): а) язвенный дефект (стрелки) слизистой оболочки толстого кишечника, нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация (стрелки); б) на фоне применения озона – начальные явления пролиферации столбчатого каемчатого эпителия слизистой оболочки (стрелка) в перифокальной зоне; в) на фоне применения 5-АСК – язвенный дефект слизистой оболочки (стрелки) в перифокальной зоне.

Fig. 1. Morphological changes in the lesion of the colon on the 2nd day of the OIC (staining hematoxylin with eosin, magnification x200): a) ulcerative defect (arrows) of the colon mucosa, neutrophil-lymphocytic infiltration (arrows); b) against the background of the use of ozone – the initial phenomena of proliferation of the columnar border epithelium of the mucous membrane (arrow) in the perifocal zone; c) against the background of the use of 5-ASA – an ulcerative defect of the mucous membrane (arrow) in the perifocal zone.

и TDI на 4-е и 6-е сут наблюдения, уменьшении размера язвенного дефекта на 2-е, 4-е, 6-е сут, увеличении площади распределения сосудов в очаге повреждения на 4-е и 6-е сут (рис. 1, в, 2, в). Отметим, что показатели спонтанного и индуцированного НСТ-теста нейтрофилов крови значимо не изменялись в условиях применения 5-АСК, но на 4-е и 6-е сут достигали значений в группе интактных животных.

Представляет интерес сравнительный анализ эффектов ректального применения озона и 5-АСК при ОИК. На 2-е сут ОИК не отмечено значимых различий между группами животных с применением озона и применением 5-АСК по выраженности клинических проявлений (показатель DAI), морфологическим признакам выраженности воспалительного процесса (показатель TDI) за исключением большего диаметра язвенного дефекта. В группе 3 было большее количество лейкоцитов в крови за счет лимфоцитов и моноцитов, выше концентрация С-РБ в сыворотке, ниже активность спонтанного и индуцированного НСТ-теста нейтрофилов крови. На 4-е сут при ОИК в условиях ректального применения озона по сравнению с 5-АСК диаметр язвенного дефекта в стенке кишки был меньше, в крови количество лейкоцитов и нейтрофилов, концентрация С-РБ выше; другие показатели, включая DAI и TDI, значимо не изменялись. На 6-е сут ОИК сравнение групп 3 и 4 выявило при применении озона больший диаметр язвенного дефекта и меньшую плот-

ность сосудов в очаге повреждения толстой кишки, более высокую концентрацию кальпротектина в кале, большее содержание в крови лейкоцитов за счет нейтрофилов, более высокую концентрацию в сыворотке С-РБ и более низкую активность спонтанного НСТ-теста нейтрофилов крови.

Таким образом, при ОИК ректальные инсуффляции озона по сравнению с применением ректальных суппозиторий с 5-АСК оказывает равнозначный эффект на снижение выраженности клинических проявлений, морфологических признаков повреждения в толстой кишке за исключением уменьшения размера язвенного дефекта и концентрации кальпротектина в кале; системные признаки воспаления, включая количество в крови нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов, концентрацию С-РБ уменьшаются более выражено при применении 5-АСК, а не озона; кислород-зависимый метаболизм нейтрофилов крови снижается более значимо в условиях применения озона, а не 5-АСК.

Выводы

1. При ОИК в динамике 6-суточного наблюдения максимальная выраженность клинических проявлений и содержания кальпротектина в кале наблюдается на 6-е сут, морфологических признаков повреждения в толстой кишке и концентрации С-РБ в сыворотке – на 4-е и 6-е сут, максимальные НСТ-редуцирующая способность нейтрофилов крови в индуцированном

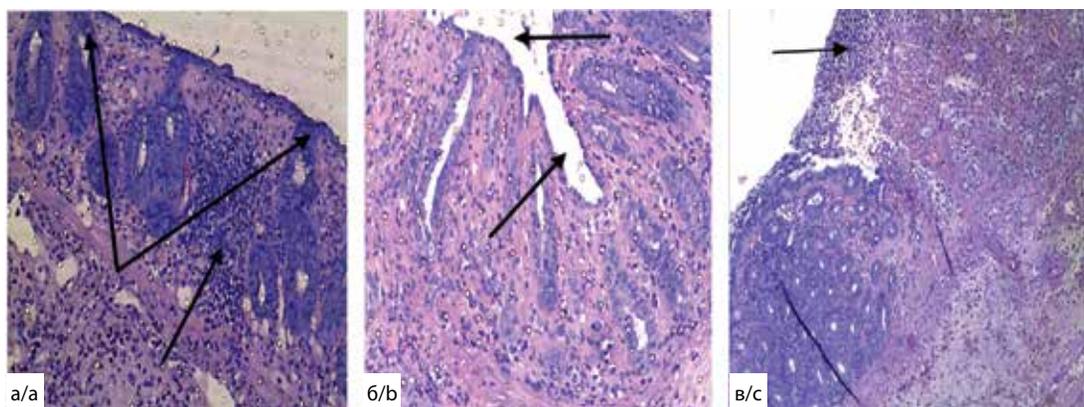


Рис. 2. Морфологические изменения в очаге повреждения толстой кишки на 6-е сут ОИК (окраска гематоксилин эозином, ув. 200): а) язвенный дефект (стрелки) слизистой оболочки толстой кишки, густая нейтрофильно-лимфоцитарная инфильтрация (стрелка); б) на фоне применения озона – эпителизованный участок некроза слизистой оболочки толстой кишки (стрелки); в) на фоне применения 5-АСК – явления пролиферации столбчатого каемчатого эпителия слизистой оболочки в перифокальной зоне (стрелка).

Fig. 2. Morphological changes in the focus of damage to the colon on the 6th day of the OIC (staining hematoxylin with eosin, magnification x200): a) ulcerative defect (arrows) of the colon mucosa, dense neutrophil-lymphocytic infiltration (arrow); b) against the background of the use of ozone – epithelialized area of necrosis of the mucous membrane of the colon (arrows); c) (arrow).against the background of ozone application - epithelialized section of the colon mucosa.

режиме и количество в крови нейтрофилов, моноцитов — на 2-е сут.

2. При ОИК ректальные инсuffляции озона в дозе 0,1 мг/кг ежедневно приводят на 4-е и 6-е сут наблюдения к снижению выраженности клинических признаков по показателю DAI, морфологических признаков повреждения толстой кишки по показателю TDI, снижению содержания кальпротектина в кале и концентрации С-РБ в сыворотке. На 2-е, 4-е, 6-е сут инсuffляции озона приводят к снижению количества в крови лейкоцитов преимущественно за счет лимфоцитов, ограничению кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов крови, на 2-е сут — к увеличению содержания кальпротектина в кале.

3. Эффекты при ОИК ректальных инсuffляций озона по сравнению с эффектами применения каждые 12 ч ректальных суппозиторий с 50 мг 5-АСК сопоставимы в отношении клинико-морфологической картины по данным DAI, TDI; менее выражены в отношении уменьшения размера язвенного дефекта на 2-е и 6-е сут, снижения концентрации в кале кальпротектина на 6-е сут, концентрации С-РБ в сыворотке и количества лейкоцитов в крови на 2-е, 4-е, 6-е сут; более выражены в отношении снижения НСТ-редуцирующей способности нейтрофилов крови.

Литература

(п.п. 1-6; 8-10; 15-17; 19-21; 23-29 см. References)

7. Ивашкин В.Т., Шелыгин Ю.А., Халиф И.Л., Белоусова Е.А., Шифрин О.С., Абдулганиева Д.И. и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации и ассоциации колопроктологов России по диагностике и лечению болезни Крона. *Колопроктология*. 2017; 2(60): 7-29.
11. Осиков, М.В., Гизингер О.А., Огнева О.И. Механизм влияния мелатонина на иммунный статус при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения. *Медицинская иммунология*. 2015; 17(6): 517-24. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-6-517-524>
12. Осиков, М.В., Давыдова Е.В., Абрамов К.С. Маркеры ремоделирования костной ткани при консолидации изолированного перелома бедренной кости в условиях системной озонотерапии. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2021; 1: 64-70.
13. Осиков, М.В. Бойко М.С., Симонян Е.В. Выраженность ответа острой фазы при экспериментальном язвенном колите в условиях применения витамина D3 в составе оригинальных ректальных суппозиторий. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2021; 65(4): 80-8.
14. Абрамов, К.С., Давыдова Е.В., Осиков М.В., Огнева О.И., Синицкий А.И. Динамика изменений показателей свободно-радикального окисления при изолированном переломе бедренной кости в условиях системной озонотерапии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2021. 65(1): 79-85. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2021.01.79-85>

18. Осиков М.В., Давыдова Е.В., Кайгородцева Н.В., Федосов А.А., Ильиных М.А., Савчук К.С., Воргова Л.В. Влияние ректального применения озона на интенсивность свободнорадикальной деструкции липидов и белков кишечника в динамике экспериментального колита. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2022. 173.(1): 33-7. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2022-173-1-33-37>
22. Фадеева Н.А., Корнеева И.А., Князев О.В., Парфенова И. Биомаркеры активности воспалительного заболевания кишечника. *Терапевтический архив*. 2018; 90(12): 107-11. <https://doi.org/10.26442/00403660.2018.12.000018>

References

1. Battistini C., Ballan R., Herkenhoff M.E., Saad S.M.I., Sun J. Vitamin D Modulates Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(1): 362. <https://doi.org/10.3390/ijms22010362>
2. Binnatli Sh.A., Aleshin D.V., Kulikov A.E., Romanov R.I. Quality of life in patients operated on for ulcerative colitis (literature review). *Koloproktologiya*. 2019; 18(1(67)): 89-100. (in Russian). <https://doi.org/10.33878/2073-7556-2019-18-1-89-100>
3. Seyed Tabib N.S., Madgwick M., Sudhakar P., Verstockt B., Korcsmaros T., Vermeire S. Big data in IBD: big progress for clinical practice. *Gut*. 2020; 69(8): 1520-32. doi: 10.1136/gutjnl-2019-320065
4. Takahashi K., Nishida A., Fujimoto T., Fujii M., Shioya M., Imaeda H., et al. Reduced abundance of butyrate-producing bacteria species in the fecal microbial community in Crohn's disease. *Digestion*. 2016; 93(1): 59-65. doi: 10.1159/000441768
5. Ryan F.J., Ahern A.M., Fitzgerald R.S., Laserna-Mendieta E.J., Power E.M., Clooney A.G. et al. Colonic microbiota is associated with inflammation and host epigenomic alterations in inflammatory bowel disease. *Nat Commun*. 2020 Mar 23; 11(1): 1512. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15342-5>
6. Schirmer M., Garner A., Vlamakis H., Xavier R.J. Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Microbiol*. 2019; 17(8): 497-511. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0213-6>
7. Ivashkin V.T., Shelygin Yu.A., Khalif I.L., Belousova E.A., Shifrin O.S., Abduganieva D. I., et al. Clinical recommendations of the Russian Gastroenterological Association and the Russian Association of Coloproctologists for the diagnosis and treatment of Crohn's disease. *Koloproktologiya*. 2017; 2(60): 7-29. (in Russian)
8. Feniouk B.A., Skulachev V.P. Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Mitochondria-Targeted Antioxidants. *Curr Aging Sci*. 2017; 10(1): 41-8. doi: 10.2174/1874609809666160921113706
9. Maev I.V., Shelygin Y.A., Skalinskaya M.I., et al. The pathomorphosis of inflammatory bowel diseases. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2020; 75(1): 27-35. (in Russian). <https://doi.org/https://doi.org/10.15690/vramn1219>
10. Levine A., Sigall Boneh R., Wine E. Evolving role of diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Gut*. 2018; 67(9): 1726-38. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315866>
11. Osikov M.V., Gizinger O.A., Oгнева О.И. Mechanism of influence of melatonin on the immune status in experimental desynchronization under LED lighting conditions. *Meditsinskaya immunologiya*, 2015; 17(6): 517-24. (in Russian). <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-6-517-524>

12. Osikov M.V., Davydova E.V., Abramov K.S. Markers of bone tissue remodeling during consolidation of an isolated femoral fracture under conditions of systemic ozone therapy. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2021; 1: 64-70. (in Russian). DOI 10.24075/vrgmu.2021.003
13. Osikov, M.V., Boyko, M.S., Simonyan, E.V. The severity of the acute phase response in experimental ulcerative colitis under the conditions of the use of vitamin D3 as part of the original rectal suppositories. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2021; 65(4): 80–8. (in Russian). <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2021.04.80-88>
14. Abramov K.S., Davydova E.V., Osikov M.V., Ogneva O.I., Sinitskiy A.I. Dynamics of Changes in Free Radical Oxidation Parameters in Isolated Fracture of the Femur under Systemic Ozone Therapy. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2021; 65(1): 79-85. DOI: 10.25557/0031-2991.2021.01.79-85. (in Russian)
15. Izadi M., Bozorgi M., Hosseine M.S., Khalili N., Jonaidi-Jafari N. Health-related quality of life in patients with chronic wounds before and after treatment with medical ozone. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97(48): 12505. doi:10.1097/MD.00000000000012505
16. Kushmakov R, Gandhi J, Seyam O, Jiang W, Joshi G, Smith NL, Khan SA. Ozone therapy for diabetic foot. *Med Gas Res*. 2018; 8(3):111-5. doi: 10.4103/2045-9912.241076
17. Seyam O, Smith NL, Reid I, Gandhi J, Jiang W, Khan SA. Clinical utility of ozone therapy for musculoskeletal disorders. *Med Gas Res*. 2018; 8(3):103-110. doi: 10.4103/2045-9912.241075. PMID: 30319765; PMCID: PMC6178642.
18. Osikov M.V., Davydova E.V., Kaygorodtseva N.V., Fedosov A.A., Il'inykh M.A., Savchuk K.S., Vorgova L.V. Influence of rectal application of ozone on the intensity of free radical destruction of intestinal lipids and proteins in the dynamics of experimental colitis. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2022; 173(1): 33-7. (in Russian) <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2022-173-1-33-37>
19. Kiesler P., Fuss I.J., Strober W. Experimental models of inflammatory bowel diseases. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol*. 2015; 1(2): 154-70. doi: 10.1016/j.jcmgh.2015.01.006
20. Kim J.J., Shajib M.S., Manocha M.M., Khan W.I. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J. Vis. Exp.* 2012; 60. doi: 10.3791/3678
21. Yao J., Lu Y., Zhi M., Hu P., Wu W., Gao X. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate Crohn's disease in rats by modulating the expression of PPAR- γ /NFAT. *Mol Med Rep*. 2017; 16(6): 8315-22. doi: 10.3892/mmr.2017.7673
22. Fadeeva NA, Korneeva IA, Knyazev OV, Parfenov AI. Biomarkers of activity inflammatory bowel diseases. *Ther Archive*. 2018; 90(12): 107-11. (In Russian). <https://doi.org/10.26442/00403660.2018.12.000018>
23. Hoving J.C., Keeton R., Höft M.A., Ozturk M., Otieno-Odhiambo P., Brombacher F. IL-4 Receptor-Alpha Signalling of Intestinal Epithelial Cells, Smooth Muscle Cells, and Macrophages Plays a Redundant Role in Oxazolone Colitis. *Mediators Inflamm*. 2020; 4361043. doi: 10.1155/2020/4361043
24. Borrelli E., Bocci V.A. The use of ozone in medicine. *Annals of Medical and Health Sciences Research*. 2018; 8. Corpus ID:21664410
25. Cenci A., Macchia I., La Sorsa V., Sbarigia C., Di Donna V., Pietraforte D. Mechanisms of Action of Ozone Therapy in Emerging Viral Diseases: Immunomodulatory Effects and Therapeutic Advantages with Reference to SARS-CoV-2. *Front. Microbiol*. 2022; 13: 871645. doi: 10.3389/fmicb.2022.871645
26. Galìè M., Covi V., Tabaracci G., Malatesta M. The Role of Nrf2 in the Antioxidant Cellular Response to Medical Ozone Exposure. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(16): 4009. doi: 10.3390/ijms20164009
27. Burke R., Chu C., Zhou G.D., Putluri V., Putluri N., Stading R.E., et al. Role of Human NADPH Quinone Oxidoreductase (NQO1) in Oxygen-Mediated Cellular Injury and Oxidative DNA Damage in Human Pulmonary Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2021; 2021:5544600. doi: 10.1155/2021/5544600
28. Martínez-Sánchez G., Schwartz A., Donna V.D. Potential Cytoprotective Activity of Ozone Therapy in SARS-CoV-2/COVID-19. *Antioxidants (Basel)*. 2020; 9(5): 389. doi: 10.3390/antiox9050389
29. Yu G., Bai Z., Chen Z., Chen H., Wang G., Wang G., et al. The NLRP3 inflammasome is a potential target of ozone therapy aiming to ease chronic renal inflammation in chronic kidney disease. *Int Immunopharmacol*. 2017; 43: 203-9. doi: 10.1016/j.intimp.2016.12.022

Сведения об авторах:

Осиков Михаил Владимирович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск;

Кайгородцева Н.В., ассистент каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Челябинск.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616.01/-099

Маклакова И.Ю.^{1,2}, Гребнев Д.Ю.^{1,2}, Базарный В.В.¹

Активация репаративной регенерации печени с помощью стволовых клеток

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России,

620028, Екатеринбург, ул. Репина, д. 3;

²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,

620026, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, д. 22 А

Несмотря на развитие современной медицины, вопросы восстановления структуры и функции печени после ее повреждения продолжают оставаться актуальными. **Цель** исследования – изучение механизмов влияния разных комбинаций стволовых клеток на активацию репаративной регенерации печени после частичной гепатэктомии.

Методика. Эксперименты проведены на зрелых белых аутбредных мышах-самцах. Выделение и культивирование мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК), выделение ГСК осуществляли из хориона плаценты мышей-самок возраста 3–4 мес. Звездчатые клетки печени (ЗКП) выделяли из печени 15 мышей в возрасте 6–8 мес. В исследовании выделили 2 опытные и 1 контрольную группы. Животным опытных групп осуществлялось введение в латеральную хвостовую вену ММСК в количестве 120 тыс кл/мышь, ГСК в количестве 10 тыс кл/мышь, ЗКП в дозе 270 тыс кл/мышь. Клетки суспендировали в 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. Животным контрольной группы вводили 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. Введение клеток осуществлялось в физиологических условиях и через 1 ч после частичной гепатэктомии. Была также выделена группа сравнения – животные без частичной гепатэктомии и без введения клеток. Для оценки морфофункционального состояния печени исследовали биохимические показатели крови и морфометрические параметры печени через 1, 3 и 7 сут после введения клеток. С целью оценки выраженности репаративных процессов в клетках печени производился анализ количества Поли-АДФ-рибозаполимера, который является продуктом реакции Поли-АДФ-рибозилирования. В сыворотке крови определяли фактор роста гепатоцитов (HGF).

Результаты. В результате исследования получено, что проведение сочетанной трансплантации ММСК и ГСК, а также ММСК и ЗКП сопровождается активацией митотической активности гепатоцитов, угнетением запрограммированной гибели гепатоцитов, восстановлением морфометрических показателей печени, нормализацией биохимических показателей крови. При этом введение ММСК и ЗКП показало более выраженный эффект на восстановление морфофункционального состояния печени по сравнению с трансплантацией ММСК и ГСК.

Заключение. Для коррекции морфофункционального состояния печени после частичной гепатэктомии целесообразно использовать сочетанную трансплантацию мультипотентных мезенхимальных стромальных и звездчатых клеток печени. Одним из ключевых механизмов действия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток является активация системы репарации ДНК, обеспечивающая снижение запрограммированной клеточной гибели, уменьшение уровня патологических митозов.

Ключевые слова: сочетанная трансплантация; частичная гепатэктомия; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; звездчатые клетки печени; репарация ДНК

Для цитирования: Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Базарный В.В. Активация репаративной регенерации печени с помощью стволовых клеток. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(3): 101-112.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.101-112

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Базарный В.В.; сбор и обработка материала – Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю.; подготовка иллюстративного материала – Базарный В.В., Маклакова И.Ю.; статистическая обработка – Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю.; написание текста – Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю.; редактирование – Гребнев Д.Ю., Базарный В.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Маклакова Ирина Юрьевна, e-mail: makliu@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке госзадания № НИОКТР 121032500021-1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.04.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Maklakova I.Yu.^{1,2}, Grebnev D.Yu.^{1,2}, Bazarniy V.V.¹**Activation of reparative liver regeneration using stem cells**¹Ural State Medical University,
Repina St. 3, Ekaterinburg 620028, Russian Federation;²Institute of Medical Cell Technologies,
Karla Marksa St., 22A, Ekaterinburg 620026, Russian Federation

Despite the advances of modern medicine, restoring the structure and function of the liver after its damage continues to be relevant. **Aim:** This study investigated mechanisms that influence different combinations of stem cells for activating reparative liver regeneration after partial hepatectomy.

Methods. Experiments were performed on mature, white, outbred male mice. Multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) were isolated and cultured and hematopoietic stem cells (HPSCs) were isolated from the chorion of the placenta of female mice aged 3-4 mos. Hepatic stellate cells (HSC) were isolated from the liver of 15 mice aged 6-8 mos. Two experimental groups and one control group were studied. MMSC, 12×10^4 cells; HPSC, 10^4 cells; and HSC, 27×10^4 cells were injected into the lateral caudal vein of each experimental mouse. The cells were suspended in 0.2 ml of 0.9% NaCl solution. Control group animals were injected with 0.2 ml of 0.9% NaCl solution. The cells were injected under physiological conditions and 1 hr after partial hepatectomy. A comparison group was also identified; it consisted of animals without partial hepatectomy and without the injection of cells. To assess the morpho-functional state of the liver, blood biochemistry and liver morphometry were studied at 1, 3, and 7 days after the cell injection. To assess the intensity of reparative processes in liver cells, the amount of poly(ADP-ribose) polymer, a product of poly-ADP ribosylation, was measured. Hepatocyte growth factor (HGF) was determined in the blood serum.

Results. The combined transplantation of MMSCs and HPSCs, as well as MMSCs and HSCs, was associated with activation of the mitotic activity of hepatocytes, inhibition of programmed hepatocyte death, restoration of liver morphometric parameters, and normalization of blood biochemical parameters. At the same time, the administration of MMSCs and HSCs showed a more pronounced effect on the restoration of the morpho-functional state of the liver compared with the transplantation of MMSCs and HPSCs.

Conclusion. To correct the morpho-functional state of the liver after partial hepatectomy, combined transplantation of MMSC and HSCs is advisable. One of the key mechanisms of the action of MMSCs is the activation of the DNA repair system, which results in a decrease in programmed cell death, i.e., a decrease in the rate of pathological mitoses.

Keywords: combined transplantation; partial hepatectomy; multipotent mesenchymal stromal cells; hepatic stellate cells; DNA repair

For citation: Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Bazarniy V.V. Activation of reparative liver regeneration using stem cells. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(3): 101-112. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.101-112

Author's contribution: concept and design of the study – Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Bazarniy V.V.; collection and processing of material – Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu.; preparation of illustrative material – Maklakova I.Yu., Bazarniy V.V.; statistical processing of the material – Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu.; text writing – Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu.; editing – Grebnev D.Yu., Bazarniy V.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: **Maklakova Irina Yu.**, associate Professor of pathological physiology of the USMU is conducted by the Ministry of health of Russia, senior researcher "Institute of medical cell technologies", laboratory of anti-aging technology, e-mail: makliu@mail.ru

Information about the authors:Maklakova I.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-6895-7947>Grebnev D.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5698-8404>Bazarniy V.V., <https://orcid.org/0000-0003-0966-9571>

Financing. The study was carried out with the financial support of the state task registration number 121032500021-1.

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

Received 18.04.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Введение

Проведение обширной резекции печени сопряжено с высоким риском развития послеоперационной печеночной недостаточности [1, 2], в значительном проценте случаев приводящей к смерти [3]. Регенера-

ция печени после частичной гепатэктомии реализуется путем сложных взаимодействий между паренхиматозными и непаренхиматозными клетками печени [4–6]. Регенеративный потенциал печени при ее резекции может быть усилен за счет миграции клеток костного мозга, что обусловлено секретлируемыми цитокинами

и факторами роста после повреждения органа. Механизмы привлечения как аутологических, так и аллогенных стволовых клеток, влияние их на регенерацию печени остаются в значительной степени не изученными. В последние годы возможность использования мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) для активации репаративной регенерации печени привлекает внимание многих научных групп [7–9]. Установлено, что ММСК способны вырабатывать противовоспалительные факторы, факторы роста, обеспечивающие повышение пролиферативной активности гепатоцитов [10]. Доказана способность ГСК посредством слияния с гепатоцитами (fusion affect) активировать репаративную регенерацию печени [11].

Известно, что стволовые клетки, выделенные из фетальных тканей, обладают большим пролиферативным потенциалом [12, 13]. В этом отношении наше внимание привлекла возможность выделения этих клеток из хориона плаценты. Обращает на себя внимание также возможность получения из данного источника гемопоэтических стволовых клеток в большем количестве, чем их можно получить из костного мозга [14].

В последние годы накапливается научный, экспериментальный материал, свидетельствующий о важной роли звездчатых клеток печени (ЗКП) (клетки печени Ито) в регенерации печени [15, 16]. Эти клетки вырабатывают различные митогены для гепатоцитов, синтезируют коллагены IV, VI, XIV типов, гликопротеины, протеогликаны, матриксные металлопротеиназы [17]. В последние годы получены данные о способности звездчатых клеток печени дифференцироваться в гепатоциты [18]. Есть данные о выработке ММСК хемоаттрактанта для ГСК и звездчатых клеток печени [19].

Учитывая биологические особенности взаимодействия ММСК с ГСК, а также с ЗКП представляется перспективным изучение влияния комбинаций этих клеток на морфофункциональное состояние печени в условиях ее повреждения.

Методика

В проведении экспериментальных исследований руководствовались Приказом Минздрава России №199 от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», в соответствии с регламентом декларации ЕС от 22 сентября 2010 г. об использовании лабораторных животных в научных целях. Протокол исследования одобрен этической комиссией «Института медицинских клеточных технологий»

Эксперименты выполнены на зрелых (6–8 мес) белых аутбредных мышах-самцах. Животные содержа-

лись в стандартных условиях вивария. ЗПК получали из печени 6–8-месячных мышей. Выделение, культивирование ММСК и выделение ГСК осуществлялось из хориона плаценты мышей-самок в возрасте 3–4 мес, срок гестации – 18 дней. Клетки суспендировали в 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. Животным опытных групп вводили в латеральную хвостовую вену ММСК в количестве 120 тыс. кл./мышь, ГСК в количестве 10 тыс. кл./мышь, ЗКП в дозе 270 тыс. кл./мышь. Введение клеток осуществлялось в физиологических условиях (без моделирования патологии печени) и через 1 ч после частичной гепатэктомии. Мышам группы контроля производилось введение 0,2 мл 0,9% раствора NaCl. Была также выделена группа сравнения – животные без моделирования патологического воздействия и без введения клеток. В каждой группе было по 7 животных (табл. 1). Оценку биохимических показателей крови и морфометрических показателей печени проводили через 1, 3 и 7 сут после введения клеток.

Выбор сроков выведения из эксперимента (1, 3 и 7 сут после частичной гепатэктомии) коррелирует с пиками синтетической и митотической активности клеток печени. В процессе регенерации печени после частичной гепатэктомии выделяют 2 фазы регенерации – предмитотическую и пролиферативную. Предмитотическая фаза может быть подразделена на раннюю (переход клеток из G_0 в G_1 стадию клеточного цикла и позднюю – начало репликации ДНК ($G_1 - S$)). В печени мышей ранней стадии соответствуют первые 10–12 ч после операции, поздней 12–24 ч после частичной гепатэктомии. Поздняя стадия регенерации печени характеризуется наибольшей интенсивностью биосинтетических процессов. В процесс деления постепенно вступают почти все сохранившиеся после резекции клетки и к концу 3-х сут в состоянии пролиферации оказывается 90–96,6 % гепатоцитов. После 7-х сут снижается уровень проростовых сигналов, происходит возобновление ингибиторной сигнализации, восстанавливается масса печени и восстанавливается гомеостаз.

Выделение культуры ММСК осуществлялось согласно модифицированному методу А.С. Тепляшина и соавт. [20]. Культивирование клеток проводили в условиях CO_2 инкубатора, поддерживали температуру 37 °С и увлажненную атмосферу с содержанием углекислого газа 5 %. Смена питательной среды осуществлялась каждые 3–4 сут. ММСК фенотипировались методом проточной цитометрии на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США). Для проведения исследования использовали моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромами (Weston Dickinson, США). Производили оценку содержа-

Таблица 1/Table 1

Распределение мышей по сериям экспериментов

Distribution of mice by series of experiments

Условия эксперимента Experimental conditions	Клетки Cells	Количество клеток Cells number	Время выведения мышей из эксперимента Time to get the mice out of the experiment		
			1 сут./day	3 сут./day	7 сут./day
Физиологические условия Physiological conditions	ММСК+ГСК опытная группа/ experimental group	120 тыс. кл./мышь + 10 тыс.кл./мышь в 0,2 мл 0,9 % р-ра NaCl 120 kl./mouse + 10 kl./mouse in 0,2 ml 0.9% NaCl solution	n=7	n=7	n=7
	ММСК+ЗКП опытная группа/ experimental group	120 тыс. кл./мышь + 270 тыс. кл./мышь в 0,2 мл 0,9 % р-ра NaCl 120 kl./mouse + 270 kl./mouse in 0,2 ml 0.9% NaCl solution	n=7	n=7	n=7
	0,9% р-р NaCl группа сравнения/ comparison group	0,2 мл	n=7	n=7	n=7
Частичная гепатэктомия Partial hepatectomy	ММСК+ГСК опытная группа/ experimental group	120 тыс. кл./мышь + 10 тыс.кл./мышь в 0,2 мл 0,9 % р-ра NaCl 120 kl./mouse + 10 kl./mouse in 0,2 ml 0.9% NaCl solution	n=7	n=7	n=7
	ММСК+ЗКП опытная группа/ experimental group	120 тыс. кл./мышь + 270 тыс. кл./мышь в 0,2 мл 0,9 % р-ра NaCl 120 kl./mouse + 270 kl./mouse in 0,2 ml 0.9% NaCl solution	n=7	n=7	n=7
	0,9% р-р NaCl контрольная группа/control group	0,2 мл	n=7	n=7	n=7

Примечание. ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (MMSCs – multipotent mesenchymal stromal cells). ГСК – гемопоэтические стволовые клетки (HSCs – hematopoietic stem cells) ЗКП звездчатые клетки печени (Hepatic stellate cells).

ния ММСК с иммунофенотипом CD29+, CD105+, Sca-1+, CD45- в суспензии трансплантируемых клеток (рис. 1). Для этого использовали набор Mouse Mesenchymal Stem Cell Multi-Color Flow Cytometry Kit (Bio-Techne, США). Жизнеспособность клеток определяли с помощью 7-AAD. ММСК с фенотипом 7AAD-CD45-CD105+Sca1+CD29+ в суспензии трансплантируемых клеток составило 93,5 % (рис. 1).

Выделение гемопоэтических стволовых клеток проводили методом позитивной иммуномагнитной сепарации по антигенам CD 117 и SCA-1 (Stemcell technology, Канада).

ГСК фенотипировались методом проточной цитометрии на проточном цитометре Beckman Coulter Navios (США). Для проведения анализа использо-

вали моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромами (Becton Dickinson, США). Оценивали содержание ГСК с иммунофенотипом 7-AAD, Lin-, Sca1+, CD117+ в суспензии клеток до и после проведения иммуномагнитной сепарации. В результате проведенных исследований показано, что до проведения иммуномагнитной сепарации количество жизнеспособных клеток с фенотипом 7AAD-, Lin-, Sca1+, CD117+ составляло 1,7% (рис. 2), после проведения иммуномагнитной сепарации – 95,6% (рис. 3).

Выделение ЗКП осуществлялось методом коллагеназно-пропазовой перфузии печени с последующим разделением клеток в градиенте плотности гистоденза (Sigma-Aldrich).

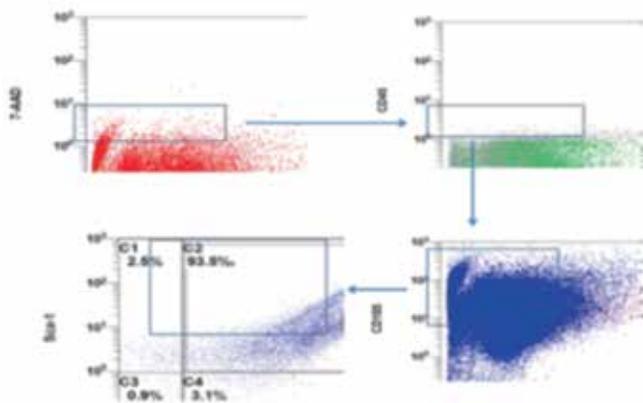


Рис. 1. Последовательность гейтирования для получения ММСК с фенотипом CD45-, CD105+, Sca1+, CD29+.

Fig. 1. Sequence of gating to obtain MMSCs with CD45-, CD105+, Sca1+, CD29+ phenotype.

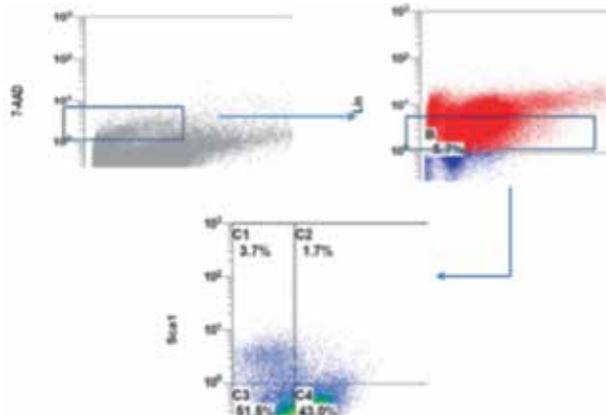


Рис. 2. Количество Sca-1+ клеток до проведения иммуномагнитной сепарации.

Fig. 2. Number of Sca-1+ cells before immunomagnetic separation.

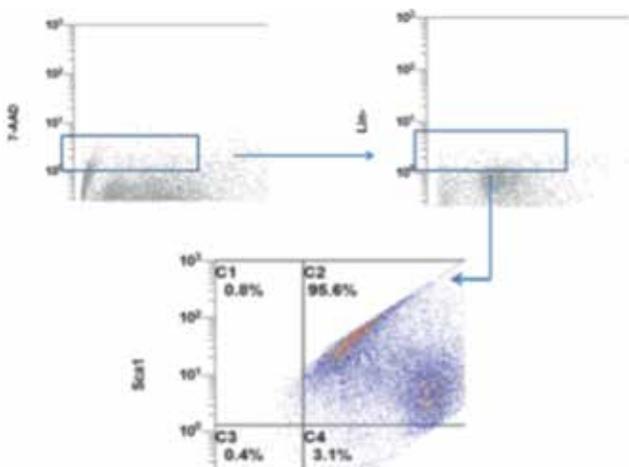


Рис. 3. Содержание CD 117+, Sca-1+, 7-AAD-, Lin- клеток после иммуномагнитной сепарации.

Fig. 3. Content of CD 117+, Sca-1+, 7-AAD-, Lin- cells after immunomagnetic separation.

Частичная гепатэктомия проводилась по методу С. Mitchell и Н. Willenbring [21]. Для анестезии использовали «Золетил» (10 мг/кг) (Virbac, Франция).

Изучали биохимические показатели крови на 1-е, 3-и и 7-е сут после введения клеток. Исследование проводили на иммуноферментном и биохимическом анализаторе Chem Well 2910 (Combi, США). Определяли: альбумин (колориметрический метод с бромкрезоловым зеленым), общий белок (биуретовая реакция), мочевины (уреазо-салицилат-гипохлоритный метод, реакция Бертрота), глюкозу (глюкозоксидазный метод), общий билирубин (Метод Йендрашека-Грофа), активность аспартата-

минотрансферазы (АСТ или АсАТ) (L-аспартат:2-оксоглутарат-аминотрансфераза, КФ 2.6.1.1.), аланинаминотрансферазы (АЛТ или АлАТ), (L-аланин:2-оксоглутарат-аминотрансфераза, КФ 2.6.1.2), щелочной фосфатазы (ЩФ, КФ 3.1.3.1.). Определение активности ферментов осуществлялось кинетическими методами. При определении биохимических показателей использовались тест-системы «Ольвекс Диагностикум», Россия. Фибриноген определяли хронометрическим методом по Клаусу на анализаторе гемостаза АПГ2-02-П с использованием реагентов «Технология стандарт» (Россия).

Морфометрию структур печени осуществляли с помощью программы анализа изображений (Biovision, Россия). С помощью микроскопа (OLYMPUS BX51, Япония) проводили микротомографию случайных полей зрения при разных увеличениях: ×100, ×200, ×400, ×1000. Исследовали не менее 10 полей зрения в каждом препарате с помощью камеры OLYMPUS XC30. Оценивали следующие параметры:

1. Площадь гепатоцита, мкм²
2. Площадь цитоплазмы гепатоцита, мкм²
3. Площадь ядра гепатоцита, мкм²
4. Ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ)
Ядерно-цитоплазматический индекс рассчитывали по формуле:

$$\text{ЯЦИ} = \frac{\text{Площадь ядра}}{\text{Площадь гепатоцита} - \text{площадь ядра}}$$

5. Количество гепатоцитов на 1 мм²
6. Количество двуядерных клеток, кл/мм²
7. Митотический индекс (МИ) гепатоцитов, ‰.

(Митозы считали на 6000 клеток для каждого животного на гистологических препаратах печени, окрашенных гематоксилином-эозином.)

8. Апоптотический индекс (АИ), выраженный в промилле.

Интенсивность апоптоза гепатоцитов определяли с помощью формулы для подсчета апоптотического индекса:

$$AI = \frac{\text{Количество гепатоцитов в состоянии апоптоза}}{1000 \text{ подсчитанных гепатоцитов}} * 1000 \text{ ‰}$$

Постановка микроядерного теста проводилась по методу Колмаковой Т.С. [22].

С целью оценки выраженности репаративных процессов в клетках печени производилась оценка уровня Поли-АДФ-рибозилирования по методу Kunzmann A., Lui D, Annett K в клетках печени с использованием первичных (Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymer antibody, Abcam) и вторичных антител (Rabbit Anti-Chicken IgY H&L (FITC), Abcam) методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре Beckman Coulter [23].

С помощью набора HGF Mouse ELISA (Abcam) методом иммуноферментного анализа осуществлялось количественное измерение HGF в сыворотке крови.

Статистический анализ проводили с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17.0). Полученные данные представляли в виде среднего арифметического значения (M) и стандартной ошибки среднего (SD). Нормальность распределения значений выборок анализировали с использованием теста Шапиро-Уилка. При условии нормального распределения различия показателей групп оценку проводили по Т-критерию Стьюдента с учетом поправки Бонферрони, в противном случае – по U-критерию Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Морфометрические параметры печени при сочетанных трансплантациях животным с частичной гепатэктомией. Проведение сочетанных трансплантаций ММСК с ГСК, а также ММСК и ЗКП мышам в физиологических условиях (без повреждения печени) не привело к изменениям морфофункционального состояния печени. Также не произошло изменения числа гепатоцитов с микроядрами. Это свидетельствует о том, что введение ММСК не влияет на уровень патологических митозов в гепатоцитах. Установлено, что трансплантация ММСК не изменяет запрограммированную клеточную гибель и активность фермен-

тов репарации ДНК семейства PARP. Полученные данные можно объяснить тем, что, несмотря на высокую функциональную активность печени, митотическая активность гепатоцитов в физиологических условиях ограничена. Поэтому введение ММСК не вызывает изменений морфофункционального состояния интактной печени.

Проведение сочетанной трансплантации ММСК и ГСК животным с частичной гепатэктомией не сопровождалось изменением морфометрических показателей печени на 1-е сут после введения клеток. В то же время на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ЗКП выявлено уменьшение запрограммированной клеточной гибели по сравнению с данными контрольной группы (**табл. 2**).

На 3-и сут после проведения котрансплантации ММСК и ГСК животным с частичной гепатэктомией при анализе морфометрических показателей печени выявлено снижение апоптотического индекса. В группе животных, которым вводили ММСК и ЗКП обнаружено увеличение массы печени по сравнению с контрольной группой. Восстановлению массы способствовало повышение митотической активности гепатоцитов. Так же как и на 1-е сут отмечается снижение запрограммированной клеточной гибели. Кроме того, сочетанная трансплантация ММСК и ЗКП способствовала повышению количества двуядерных гепатоцитов, увеличению площади ядра гепатоцитов, что привело к повышению ЯЦИ (**табл. 3**).

На 7-е сут после сочетанных трансплантаций животным с частичной гепатэктомией в обеих опытных группах отмечено увеличение массы печени за счет активации деления клеток и снижения выраженности апоптоза. Обнаружено увеличение количества двуядерных клеток, повышение площади ядра гепатоцитов, что привело к возрастанию ЯЦИ. При оценке количества клеток с микроядрами выявлено снижение их числа при котрансплантации. Показано, что котрансплантация данных видов клеток способствовала повышению активности ферментов репарации ДНК (**табл. 4**).

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что сочетанная трансплантация ММСК и ЗКП животным с частичной гепатэктомией способствует более раннему восстановлению морфофункционального состояния печени по сравнению с введением ММСК и ГСК. Увеличение массы печени отмечается уже на 3-и сут после проведения котрансплантации ММСК и ЗКП, в то время как при введении ММСК и ГСК восстановление массы органа отмечалось лишь на 7-е сут. В обеих опытных

Таблица 2/ Table 2

Морфометрическая характеристика репаративных процессов в печени мышей на 1-е сутки после частичной гепатэктомии**Morphometric characteristics of reparative processes in the liver of mice on the 1st day after partial hepatectomy**

Показатели Indicators	NaCl контрольная группа/ control group	ММСК+ГСК	ММСК+ЗКП
Масса печени, г/Hepatic mass	0,64±0,05*	0,67±0,06*	0,70±0,07*
Апоптотический индекс, ‰ / Apoptotic index, ‰	0,90±0,06*	0,83±0,08*	0,67±0,07* **
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰ / Number of hepatocytes with micronuclei, ‰	2,23±0,21	2,17±0,18	2,27±2,21
Митотический индекс, ‰/ Mitotic index, ‰	0,52±0,03	0,50±0,05	0,52±0,03
Количество гепатоцитов на 1 мкм ² /Number of hepatocytes per 1 μm ²	1192,0±89,43*	1214,43±110,94*	1151,29±108,24*
Площадь гепатоцита (мкм ²)/Hepatocyte area (μm ²)	340,20±24,43*	353,14±34,98*	346,43±26,78
Площадь цитоплазмы гепатоцита, (мкм ²)/Hepatocyte cytoplasm area (μm ²)	258,56±17,02*	274,34±27,09*	261,17±28,97
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)/ Hepatocyte nucleus area (μm ²)	81,64±7,45*	78,80±7,89*	85,26±6,22
Ядерно-цитоплазматический индекс/ Nuclear-cytoplasmic index	0,32±0,01*	0,29±0,01*	0,33±0,06
Количество двуядерных гепатоцитов на 1 мм ² / Number of bicore hepatocytes per 1 mm ²	334,31±12,30*	339,43±14,94*	345,14±11,59

Примечание. $p < 0,05$ * с группой сравнения; $p < 0,05$ ** с контрольной группой. Остальные обозначения как в таблице 1.

Note. $p < 0,05$ * with the comparison group. $p < 0,05$ ** with control group. The other designations are as in Table 1.

Таблица 3/ Table 3

Морфометрическая характеристика репаративных процессов в печени мышей на 3-и сутки после частичной гепатэктомии**Morphometric characteristics of reparative processes in the liver of mice on the 3rd day after partial hepatectomy**

Показатели Indicators	NaCl (контрольная группа)	ММСК+ГСК	ММСК+ЗКП
Масса печени, г/Hepatic mass	1,04±0,09*	1,12±0,12*	1,24±0,10* **
Апоптотический индекс, ‰/ Apoptotic index, ‰	2,13±0,20*	1,59±0,13* **	1,54±0,15* **
Количество гепатоцитов с микроядрами, ‰ / Number of hepatocytes with micronuclei, ‰	3,37±0,26*	3,10±0,23*	2,97±0,20*
Митотический индекс, ‰/ Mitotic index, ‰	8,1±0,60 *	8,2±0,49 *	10,03±0,75* **
Количество гепатоцитов на 1 мкм ² / Number of hepatocytes per 1 μm ²	1206,71±91,96*	1146,29±106,33*	1160,0±113,14*
Площадь гепатоцита (мкм ²)/Hepatocyte area (μm ²)	331,81±24,02 *	338,0±20,57*	333,43±18,20*
Площадь цитоплазмы гепатоцита, (мкм ²)/ Hepatocyte cytoplasm area (μm ²)	243,64±19,25	254,0±12,29	249,14±9,84
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)/ Hepatocyte nucleus area (μm ²)	67,13±7,01 *	84,0±8,29* **	84,29±8,61* **
Ядерно-цитоплазматический индекс/ Nuclear-cytoplasmic index	0,27±0,01*	0,33±0,02* **	0,34±0,02* **
Количество двуядерных гепатоцитов на 1 мм ² / Number of bicore hepatocytes per 1 mm ²	380,97±10,15 *	473,14±23,55* **	484,0±35,71* **

Примечание. $p < 0,05$ * с группой сравнения; $p < 0,05$ ** с контрольной группой. Остальные обозначения как в таблице 1.

Note. $p < 0,05$ * with the comparison group; $p < 0,05$ ** with control group. The other designations are as in Table 1.

Таблица 4/Table 4

Морфофункциональная характеристика репаративных процессов в печени мышей на 7-е сутки после частичной гепатэктомии
Morphometric characteristics of reparative processes in the liver of mice on the 7st day after partial hepatectomy

Показатели Indicators	Значение (Value)		
	NaCl	ММСК+ГСК	ММСК+ЗКП
Масса печени, г/Hepatic mass	1,15±0,09*	1,53±0,12**	1,48±0,09**
Апоптотический индекс, %о / Apoptotic index, %о	1,25±0,09*	0,92±0,09* **	0,89±0,08* **
Количество гепатоцитов с микроядрами, %о / Number of hepatocytes with micronuclei, %о	2,77±0,23*	2,10±0,17* **	2,14±0,18**
Митотический индекс, %о / Mitotic index, %о	4,51±0,47*	5,74±0,49* **	5,80±0,37* **
Активность ферментов семейства PARP в клетках печени, MFI/PARP enzyme activity in liver cells, MFI	59,3±5,2*	82,4±7,8* **	86,3±8,06* **
Количество гепатоцитов с микроядрами, %о / Number of hepatocytes with micronuclei, %о	1427,71±116,98	1330,57±103,06	1354,0±138,0
Площадь гепатоцита (мкм ²)/Hepatocyte area (μm ²)	286,41±22,44	289±23,63	292,57±20,94
Площадь цитоплазмы гепатоцита, (мкм ²)/ Hepatocyte cytoplasm area (μm ²)	223,03±17,97	211,36±17,52	212,21±13,88
Площадь ядра гепатоцита (мкм ²)/Hepatocyte nucleus area (μm ²)	63,39±5,12*	78,07±6,32* **	80,36±7,08* **
Ядерно-цитоплазматический индекс/Nuclear-cytoplasmic index	0,29±0,02*	0,37±0,02* **	0,38±0,02* **
Количество двуядерных гепатоцитов на 1 мм ² / Number of bicore hepatocytes per 1 mm ²)	320,77±10,64*	392,43±20,94* **	404,71±27,47* **

Примечание. *p*<0,05 * с группой сравнения; *p*<0,05 ** с контрольной группой. Остальные обозначения как в таблице 1.
Note. *p*<0,05 * with the comparison group; *p*<0,05 ** with control group. The other designations are as in Table 1.

группах отмечено повышение активности ферментов, участвующих в репарации ДНК. Эти изменения нашли свое отражение в снижении выраженности апоптоза и уменьшении количества гепатоцитов с микроядрами.

Биохимические показатели крови животных разного возраста после частичной гепатэктомии на фоне введения клеток. При изучении биохимических показателей крови на 1-е сут после резекции печени на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ЗКП отмечено снижение активности АСТ на 24,7%, АЛТ на 25,5%, щелочной фосфатазы на 23,3%. Проведение сочетанной трансплантации ММСК и ГСК животным с частичной гепатэктомией не сопровождалось статистически значимыми изменениями биохимических показателей крови на 1-е сут после операции (табл. 5).

На 3-и сут после проведения частичной гепатэктомии получен эффект от введения клеток в обеих опытных группах – имело место снижение активности АСТ, АЛТ, ЩФ. Введение ММСК и ЗКП также сопровождалось повышением уровня мочевины (табл. 6).

На 7-е сут после введения клеток в обеих опытных группах выявлено снижение активности ферментов: АСТ, АЛТ, ЩФ, отмечено повышение уровня глюкозы. Во второй опытной группе в отличие от первой выявлено повышение уровня общего белка, альбумина (табл. 7).

Проведенные исследования показали, что сочетанная трансплантация ММСК и ГСК животным с частичной гепатэктомией приводит к снижению активности цитолитических ферментов (АСТ, АЛТ), ферментов холестаза (ЩФ), восстановлению уровня мочевины, способствует повышению уровня глюкозы.

С целью выяснения механизмов активации митотической активности гепатоцитов после введения стволовых клеток проведены исследования по определению содержания фактора роста гепатоцитов (HGF) в сыворотке крови. Выявлено увеличение уровня HGF у животных, которым была проведена трансплантация клеток (табл. 8).

Обсуждение

Проведенные исследования с использованием разных сочетаний трансплантируемых клеток позво-

Биохимические показатели крови на 1-е сутки после частичной гепатэктомии

Biochemical blood values on the 1st day after partial hepatectomy

Показатели Indicators		Значение (Value)		
		NaCl	ММСК+ГСК	ММСК+3КП
Показатели белкового обмена/ Protein metabolism indicators	общий белок (г/л) total protein (g/l)	51,29±4,81*	54,71±4,78*	53,71±4,73*
	альбумин (г/л) albumin (g/l)	20,54±1,89*	22,21±1,93*	22,74±2,24*
	мочевина (ммоль/л) urea (mmol/l)	3,79±0,41*	3,99±0,27*	4,11±0,36*
Показатели цитолиза/ Cytolysis indicators	АСТ (Ед/л)/ aspartate aminotferase (U/l)	416,79±29,76*	403,80±37,29*	313,84±21,44* **
	АЛТ(Ед/л)/ alanine aminotferase (U/L)	296,91±22,64*	312,93±36,62*	221,26±20,11* **
Показатель холестаза/ Cholestasis index	щелочная фосфатаза (Ед/л) / alkaline phosphatase (U/L)	136,10±4,66*	142,79±14,36*	104,43±9,78***
Уровень глюкозы (ммоль/л)/ Glucose level (mmol/l)		4,01±0,53*	4,26±0,49*	4,37±0,40*
Общий билирубин, (мкмоль/л) Total bilirubin, (μmol/L)		19,84±2,85*	20,49±2,99*	18,76±1,87*
Фибриноген (г/л) / Fibrinogen (g/l)		2,93±0,22	3,14±0,24	3,66±0,24

Примечание. $p < 0,05$ * с группой сравнения; $p < 0,05$ ** с контрольной группой.

Note. $p < 0,05$ * with the comparison group; $p < 0.05$ ** with control group.

Биохимические показатели крови на 3-и сутки после частичной гепатэктомии

Biochemical blood values on the 3rd day after partial hepatectomy

Показатели Indicators		Значение (Value)		
		NaCl	ММСК+ГСК	ММСК+3КП
Показатели белкового обмена/ Protein metabolism indicators	общий белок (г/л) total protein (g/l)	50,03±4,82*	54,1±4,83*	53,67±4,34*
	альбумин (г/л) albumin (g/l)	19,80±2,51*	21,71±1,79*	22,01±2,04*
	мочевина (ммоль/л) urea (mmol/l)	4,37±0,33*	4,54±0,69*	5,26±0,29* **
Показатели цитолиза/ Cytolysis indicators	АСТ (Ед/л)/ aspartate aminotferase (U/l)	209,53±13,85*	159,83±15,8* **	156,97±13,35* **
	АЛТ(Ед/л)/ alanine aminotferase (U/L)	155,24±9,38*	117,94±10,95* **	114,16±13,53* **
Показатель холестаза/ Cholestasis index	щелочная фосфатаза (Ед/л) / alkaline phosphatase (U/L)	106,67±10,45*	82,90±11,34* **	83,47±8,40* **
Уровень глюкозы (ммоль/л)/ Glucose level (mmol/l)		3,66±0,29*	3,71±0,36*	3,87±0,32*
Общий билирубин, (мкмоль/л) Total bilirubin, (μmol/L)		21,99±5,47*	19,84±1,85*	20,13±1,61*
Фибриноген (г/л) / Fibrinogen (g/l)		2,0±0,17*	2,31±0,29*	2,67±0,22*

Примечание. $p < 0,05$ * с подгруппой сравнения; $p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой.

Note. $p < 0.05$ * with the comparison subgroup; $p < 0.05$ ** with the control subgroup.

лили доказать, что изучаемые виды клеток не влияют на морфофункциональное состояние печени интактных животных. В то же время при частичной гепатэктомии трансплантируемые клетки способны активировать в печени восстановительные процессы: ингибировать апоптоз, повышать митотическую активность, увеличивать количество двуядерных клеток, снижать число гепатоцитов с микроядрами, активировать ферменты репарации семейства PARP.

Снижение запрограммированной гибели гепатоцитов может быть связано со способностью ММСК индуцировать в клетках печени выработку белков теплового шока [24]. Такие белки способны поддерживать исходную конформацию белков, повышать устойчивость ферментов репарации (белки репарации семейства PARP), что приводит к коррекции нарушений в молекуле ДНК. Это подтверждается выявленным в ходе исследования увеличением активности

Таблица 7 Table 7

Биохимические показатели крови на 7-е сутки после частичной гепатэктомии

Biochemical blood values on the 7st day after partial hepatectomy

Показатели Indicators		Значение (Value)		
		NaCl	ММСК+ГСК	ММСК+ЗКП
Показатели белкового обмена/ Protein metabolism indicators	общий белок (г/л) total protein (g/l)	44,27±3,62*	50,0±4,97 *	60,27±5,09**
	альбумин (г/л) albumin (g/l)	20,59±1,90*	23,64±3,22 *	28,06±2,16**
	мочевина (ммоль/л) urea (mmol/l)	4,57±0,46*	5,77±0,48**	5,63±0,35**
Показатели цитолиза/ Cytolysis indicators	АСТ (Ед/л)/aspartate amino-transferase (U/l)	153,86±16,96*	111,94±12,04**	111,21±10,01**
	альбумин (г/л) albumin (g/l)	137,10±16,29*	96,24±9,21**	95,50±8,57 **
Показатель холестаза/ Cholestasis index	щелочная фосфатаза (Ед/л) / alkaline phosphatase (U/L)	83,11±5,93*	65,59±3,73 **	65,61±4,36**
Уровень глюкозы (ммоль/л)/ Glucose level (mmol/l)		4,30±0,29*	5,20±0,34* **	5,20±0,34* **
Общий билирубин, (мкмоль/л) Total bilirubin, (µmol/L)		15,41±2,76*	14,06±1,28*	13,70±0,83*
Фибриноген (г/л) / Fibrinogen (g/l)		2,20±0,31*	2,83±0,26**	2,87±0,24**

Примечание. $p < 0,05$ * с подгруппой сравнения; $p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой.

Note. $p < 0.05$ * with the comparison subgroup; $p < 0.05$ ** with the control subgroup.

Таблица 8/ Table 8

Количество HGF (пкг/мл) на 7-е сутки после частичной гепатэктомии

Amount of HGF (pkg/ml) at 7st days after partial hepatectomy

Группы животных (Animal groups)	Значение (Value)
Животные без гепатоектомии (группа сравнения) Animals without hepatectomy (comparison group)	4,49 ± 0,39
NaCl (контрольная группа)	10,58 ± 0,88*
ММСК	13,0 ± 1,02* **
ММСК+ГСК	12,58 ± 0,95* **
ММСК+ЗКП	16,7 ± 2,62***

Примечание. $p < 0,05$ * с подгруппой сравнения; $p < 0,05$ ** с контрольной подгруппой.

Note. $p < 0.05$ * with the comparison subgroup; $p < 0.05$ ** with the control subgroup.

ферментов семейства PARP после введения ММСК. Уменьшение количества мутаций в молекуле ДНК сопровождается снижением содержания иницирующих, эффекторных каспаз, и, как следствие, снижением апоптоза. Увеличение устойчивости ферментов репарации также способствует снижению количества клеток с микроядрами.

Проведение сочетанных трансплантаций сопровождается снижением активности ферментов цитолиза и холестаза, что связано со способностью ММСК вырабатывать противовоспалительные цитокины [25, 26].

Заключение

Показано, что при частичной гепатэктомии наиболее эффективной комбинацией клеток для восстановления морфофункционального состояния печени является проведение сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных и звездчатых клеток печени. Выявленное в работе повышение митотической активности гепатоцитов может быть связано с обнаруженным в ходе исследования повышением уровня фактора роста гепатоцитов в плазме крови. К синтезу фактора роста гепатоцитов способны и ММСК, и ЗКП, что приводит к наибольшему увеличению его уровня при сочетанном введении ММСК и ЗКП. HGF обладает выраженным митогенным и морфогенным эффектом, что способствовало активации митотической активности гепатоцитов и, в результате, увеличению массы печени.

Литература

(п.п. 5-7; 10-16; 184 19; 21; 23; 24 см. References)

- Ефанов М.Г., Гранов Д.А., Алиханов Р.Б., Руткин И.О., Цвиркун В.В., Казаков И.В. и др. Выживаемость после лапароскопических и открытых резекций печени по поводу метастазов колоректального рака. Сравнительный анализ с использованием псевдорандомизации. *Анналы хирургической гепатологии*. 2019; 24(4): 45-55.
- Хороненко В.Э., Донскова Ю.С., Баскаков Д.С., Дрожжина О.В., Сидоров Д.В., Ложкин М.В. и др. Профилактика печеночной недостаточности при обширных резекциях печени. *Анестезиология и реаниматология*. 2014; 59(4): 33-8.
- Вишневецкий В.А., Чжао А.В., Тупикин К.А., Коваленко Ю.А. Пострезекционная печеночная недостаточность/факторы риска, прогноз, профилактика. М.; 2018.
- Лызикив А.Н., Скуратов А.Г., Осипов Б.Б. Механизмы регенерации печени в норме и при патологии. *Проблемы здоровья и экологии*. 2015; 1(43): 4-9.
- Шафигуллина А.К., Заикина Э.И., Гаранина Е.Е. и др. Пролиферация клеток печени реципиента и хоуминг трансплантированных звездчатых клеток печени при частичной гепатэктомии у крыс. *Морфология*. 2019; 155(2): 324.
- Рудаков В.С., Деев Р. В., Губарев К.К. и др. Влияние трансплантации аллогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на морфофункциональное состояние печени после обширной резекции в эксперименте. *Гены & Клетки*. 2018; 2: 77-82.
- Шафигуллина А.К., Гумерова А.А., Киясов А.П. Звездчатые клетки печени – региональные стволовые клетки или фактор микроокружения. *Гены & Клетки*. 2015; X(4): 23-8.
- Тепляшин А.С. Способ выделения мезенхимальных стволовых клеток. Патент на изобретение RU 2280462 С2. – 27.02.2006. Заявка № 2004110700/15 от 09.04.2004.
- Колмакова Т.С., Белик С.Н., Моргуль Е.В. *Использование микроядерного теста для оценки эффективности лечения аллергии у детей : метод. рекомендации*. РостГМУ. Ростов н/Д. 2013.
- Трубицина И.Е., Онищенко Н.А., Люндуп А.В. и др. Иммуномодулирующий эффект аллогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крыс. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2016; 11(135): 59-63.

References

- Efanov M.G., Granov D.A., Alihanov R.B., Rutkin I.O., Cvirkun V.V., Kazakov I.V. et al. Survival after laparoscopic and open liver resections for colorectal cancer metastases. Comparative analysis using pseudorandomization. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii*. 2019; 24(4): 45-55. (in Russian)
- Horonenko V.E., Donskova Yu.S., Baskakov D.S., Drozhzhina O.V., Sidorov D.V., Lozhkin M.V., et al. Prevention of liver failure with extensive liver resections. *Anesteziology i reanimatologiya*. 2014; 59(4): 33-8. (in Russian)
- Vishnevskij V.A., Chzhao A.V., Tupikin K.A., Kovalenko Yu.A. *Postresection liver failure/risk factors, prognosis, prevention [Post-rezeksionnaya pechenochnaya nedostatochnost']*. Moscow; 2018. (in Russian)
- Lyzikov A.N., Skuratov A.G., Osipov B.B. Mechanisms of liver regeneration in normal and pathological conditions. *Problemy zdorov'ya i ekologii*. 2015; 1(43): 4-9. (in Russian)
- Van Haele M., Snoeck J., Roskams T. Human liver regeneration: An etiology dependent process. *Int. J. Mol. Sci*. 2019; 20: 2332.
- Yagi S., Hirata M., Miyachi Y., Uemoto S. Liver Regeneration after Hepatectomy and Partial Liver Transplantation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(21): 1-23.
- Brown Ch., McKee Ch., Bakshi Sh. Mesenchymal Stem Cells: Cell Therapy and Regeneration Potential. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2019; 13(9): 1738-55.
- Shafigullina A.K., Zaikina E.I., Garanina E.E., et al. Proliferation of recipient liver cells and homing of transplanted stellate liver cells during partial hepatectomy in rats. *Morfologiya*. 2019; 155(2): 324. (in Russian)
- Rudakov V.S., Deev R.V., Gubarev K.K., et al. Effect of transplantation of allogeneic multipotent mesenchymal stromal bone marrow cells on the morphofunctional state of the liver after extensive resection in an experiment. *Geny & Kletki*. 2018; 2: 77-82. (in Russian)
- Christ B., Brückner B., Winkler S. The Therapeutic Promise of Mesenchymal Stem Cells for Liver Restoration. *Trends in Molecular Medicine*. 2016; 21(11): 673-86.
- Lee J. Y., Hong S. Hematopoietic Stem Cells and Their Roles in Tissue Regeneration. *International Journal of Stem Cells*. 2019.

12. Wu M., Zhang R., Zou Q. Comparison of the biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from the human placenta and umbilical cord. *Sci. Rep.* 2018; 8, 50.
13. Heo J.S., Choi Y., Kim H.S. Comparison of Molecular Profiles of Human Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, Placenta and Adipose Tissue. *International Journal of Molecular Medicine.* 2016; 37(1): 115-25.
14. Panch S., Szymanski J., Savani B., Stroncek D.F. Sources of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Methods to Optimize Yields for Clinical Cell Therapy. 2017 *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.* 23(8). 2017.
15. Ge J.Y., Zheng Y.-W., Tsuchida et al. Hepatic stellate cells contribute to liver regeneration through galectins in hepatic stem cell niche. *Stem Cell Research & Therapy.* 2020; 11:425.
16. Higashi T., Friedman S.L., Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliver Rev.* 2017; 121: 27–42.
17. Shafigullina A.K., Gumerova A.A., Kiyasov A.P. Stellate liver cells – regional stem cells or microenvironment factor. *Geny & Kletki.* 2015; X(4): 23-8. (in Russian)
18. Kordes C., Bock H., Reichert D. Hepatic stellate cells: current state and open questions. *Biol. Chem.* 2021; 402(9): 1021–32.
19. Lee S.M., Lee S.D., Wang S.Z., Sarkar D., Lee H.M. Effect of mesenchymal stem cell in liver regeneration and clinical applications. *Hepatology Res.* 2021; 7: 53.
20. Teplyashin A.S. Method of isolation of mesenchymal stem cells / Patent for an invention RU 2280462 C2. – 27.02.2006. Application № 2004110700/15 от 09.04.2004.
21. Mitchell C., Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nature protocols.* 2008; 3 (7): 1167-71. doi: 10.1038/nprot.2014.122.
22. Kolmakova T.S., Belik S.N., Morgul' E.V. *The use of a micronucleus test to evaluate the effectiveness of allergy treatment in children: method. Recommendations. [Ispolzovanie mikroyadernogo testa dlya otsenki effektivnosti lecheniya allergii u detey: metod. Rekomendatsii].* RostGMU. Rostov na Dony. 2013. (in Russian)
23. Kunzmann A., Lui D., Annett K., et al. Flow-cytometric assessment of cellular poly(ADP-ribosyl)ation capacity in peripheral blood lymphocytes. *Immunity & Ageing.* 2006; 3: 8 doi:10.1186/1742-4933-3-8.
24. Li T., Liu Y., Yu L. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Protect Against SCA3 by Modulating the level of 70 kD Heat Shock Protein. *Cellular and molecular neurobiology.* 2018; 38: 641-55.
25. Trubitsina I.E., Onishchenko N.A., Lyundup A.V. et al. Immunomodulatory effect of allogeneic mesenchymal stem cells of rat bone marrow. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2016; 11(135): 59-63. (in Russian)
26. Andreeva E., Bobyleva P., Gornostaeva A. Interaction of multipotent mesenchymal stromal and immune cells: bidirectional effects. *Cytherapy.* 2017; 19(10): 1152-66.

Сведения об авторах:

Маклакова Ирина Юрьевна, доктор мед. наук, доцент, зав. каф. нормальной физиологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России; ст. науч. сотр. ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», e-mail: makliu@mail.ru;

Гребнев Дмитрий Юрьевич, доктор мед. наук, доцент, зав. каф. патологической физиологии, e-mail: Dr-grebneb77@mail.ru;

Базарный Владимир Викторович, доктор мед. наук, проф. каф. клинической лабораторной диагностики и бактериологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: bazarnyy_v@bk.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-002.2:616-092:616-005

Иванов А.Н., Савкина А.А., Ленгерт Е.В., Ермаков А.В., Попыхова Э.Б., Кузнецова Н.А., Степанова Т.В., Лойко Д.Д.

Влияние геля с микрокапсулами, загруженными таниновой кислотой, на развитие системных проявлений эндотелиальной дисфункции при экспериментальном пародонтите у белых крыс

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, 410012, Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112

Введение. Воспалительные заболевания пародонта оказывают негативное влияние не только на состояние полости рта, но и организм в целом, способствуя прогрессированию широкого круга патологических процессов, в том числе заболеваний сердечно-сосудистой системы. Ключевыми патогенетическими звеньями, обеспечивающими взаимосвязь локальных проявлений пародонтита с широким кругом соматических заболеваний, являются системный воспалительный ответ и дисфункция эндотелия, что обуславливает актуальность исследования эффектов новых способов пародонтальной терапии. **Цель исследования** – оценка развития системных проявлений эндотелиальной дисфункции, при лечении экспериментального пародонтита с использованием геля, содержащего альгинатные микрокапсулы с наночастицами серебра, загруженные таниновой кислотой (ТК).

Методика. Работа выполнена на 70 белых крысах, разделенных на 4 группы: контрольную (интактные животные, $n=10$); сравнительную – 20 крыс с экспериментальным пародонтитом и 2 опытные группы – по 20 животных с пародонтитом, которым проводились аппликации геля, содержащего капсулы альгината серебра без и с таниновой кислотой. Проводилась оценка концентрации в крови маркеров дисфункции эндотелия – эндотелина-1, sE-селектина, VEGF, АДМ и синдекана-1.

Результаты. Установлено, что нанесение геля, содержащего альгинатные микрокапсулы серебра в краткосрочной перспективе не вызывает существенных изменений концентраций маркеров альтерации и нарушения функций эндотелия, за исключением снижения уровня синдекана 1. Загрузка таниновой кислоты (ТК) в микрокапсулы позволяет увеличить эффективность геля, не только в снижении местных воспалительных явлений в парадонте, но и в коррекции системных нарушений функций эндотелия – на 3-й неделе эксперимента у крыс с пародонтитом выявлено снижение не только концентрации синдекана 1, но также sE-селектина и эндотелина-1.

Заключение. Полученные данные позволяют заключить, что пролонгированное высвобождение таниновой кислоты с помощью системы альгинатных капсул с наночастицами серебра суспензированных в геле позволяет уменьшить выраженность местных и системных проявлений эндотелиальной дисфункции при экспериментальном пародонтите. Результаты проведенного исследования открывают новые перспективы модернизации пародонтологического лечения посредством использования терапевтических эффектов танинов.

Ключевые слова: пародонтит; таниновая кислота; эндотелиальная дисфункция

Для цитирования: Иванов А.Н., Савкина А.А., Ленгерт Е.В., Ермаков А.В., Попыхова Э.Б., Кузнецова Н.А., Степанова Т.В., Лойко Д.Д. Влияние геля с микрокапсулами, загруженными таниновой кислотой, на развитие системных проявлений эндотелиальной дисфункции при экспериментальном пародонтите у белых крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(3): 113-121.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.113-121

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Иванов А.Н., Ленгерт Е.В.; сбор и обработка материала – Савкина А.А., Ермаков А.В., Попыхова Э.Б., Степанова Т.В.; подготовка иллюстративного материала – Савкина А.А., Кузнецова Н.А.; статистическая обработка материала – Лойко Д.Д.; написание текста – Иванов А.Н., Савкина А.А., Ленгерт Е.В.; редактирование – Иванов А.Н. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Савкина Ангелина Альбертовна, e-mail: sawkina.ange@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России «Разработка и патогенетическое обоснование применения системы пролонгированного высвобождения антибактериальных и противовоспалительных веществ для коррекции микроциркуляторных нарушений при экспериментальном пародонтите» (регистрационный номер 121032500024-2).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.04.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Ivanov A.N., Savkina A.A., Lengert E.V., Ermakov A.V., Popykhova E.B., Kuznetsova N.A., Stepanova T.V., Loiko D.D.

Effect of gel with tannic acid-loaded microcapsules on the development of systemic manifestations of endothelial dysfunction in white rats with experimental periodontitisRazumovsky Saratov State Medical University,
Bolshaya Kazachya St. 112, Saratov 410012

Inflammatory periodontal diseases have a negative impact not only on the oral cavity, but also on the whole body by contributing to progression of numerous pathological processes, including cardiovascular diseases. The major pathophysiological connections of local manifestations of periodontitis with various somatic diseases are the systemic inflammatory response and endothelial dysfunction. This determines the relevance of studying new methods of periodontal therapy. **The aim** of this work was to evaluate the development of systemic manifestations of endothelial dysfunction by changes in blood concentrations of its markers during the treatment of experimental periodontitis with a gel containing alginate microcapsules with silver nanoparticles loaded with tannic acid (TA).

Methods. The work was performed on 70 white rats divided into the following groups: control group (10 intact rats); comparison group (20 rats with experimental periodontitis), and two experimental groups (20 rats each, with periodontitis treated with applications of gel containing silver alginate capsules without and with tannic acid). Blood concentrations of endothelin-1, sE-selectin, VEGF, ADMA, and syndecan-1 were measured.

Results. The application of gel containing alginate microcapsules of silver in the short term did not cause significant changes in the concentrations of markers of alterations and endothelial dysfunction, except for a decrease in syndecan 1. Loading TA into the microcapsules allows increasing the gel effectiveness in correction of endothelial dysfunction and achieving a decrease not only in syndecan 1, but also in sE-selectin and endothelin-1 in rats with periodontitis at week 3 of the experiment.

Conclusion. The prolonged release of tannic acid provided by a system of alginate capsules with silver nanoparticles suspended in a gel reduces the severity of systemic manifestations of endothelial dysfunction in experimental periodontitis. The results of this study open new prospects for modernization of the periodontal treatment by using therapeutic effects of tannins.

Keywords: periodontitis; tannic acid; endothelial dysfunction

For citation: Ivanov A.N., Savkina A.A., Lengert E.V., Ermakov A.V., Popykhova E.B., Kuznetsova N.A., Stepanova T.V., Loiko D.D. Effect of gel with microcapsules loaded with tannic acid on the development of systemic manifestations of endothelial dysfunction in experimental periodontitis in white rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(3): 113-121 (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.113-121

Author's contribution: concept and design of the study – Ivanov A.N., Lengert E.V.; collection and processing of material – Savkina A.A., Ermakov A.V., Popykhova E.B., Stepanova T.V.; preparation of illustrative material – Savkina A.A., Kuznetsova N.A.; statistical processing of the material – Loiko D.D.; text writing – Ivanov A.N., Savkina A.A., Lengert E.V.; editing – Ivanov A.N. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: **Angelina A. Savkina**, junior researcher of the Central Research Laboratory of the SSMU named after V. I. Razumovsky, e-mail: sawkina.ange@yandex.ru

Information about authors:

Ivanov A.N., <https://orcid.org/0000-0003-4061-5221>
Savkina A.A., <https://orcid.org/0000-0003-2357-400x>
Lengert E.V., <https://orcid.org/0000-0002-6447-2811>
Ermakov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-8105-5932>
Popykhova E.B., <https://orcid.org/0000-0002-7662-4755>
Kuznetsova N.A., <https://orcid.org/0000-0001-9651-7562>
Stepanova T.V., <https://orcid.org/0000-0001-8439-8033>
Loiko D.D., <https://orcid.org/0000-0003-4299-1108>

Financing. The study was performed within the framework of the state assignment of the Saratov State Medical University named after Razumovsky of the Ministry of Health of Russia (Grant No. 121032500024-2).

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

Received 10.04.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Введение

Согласно официальной статистике ВОЗ, проведенной в 2016 году, болезни пародонта по значимости заняли одиннадцатую позицию среди распространенных глобальных заболеваний и вторую — среди заболеваний полости рта, уступая лишь кариесу постоянных зубов [1]. Общее представление о патологии пародонтального комплекса складывалось на протяжении десятилетий, но даже в настоящее время остается много нерешенных вопросов, характеризующих этиологию и патогенез данной группы заболеваний. Современная модель патогенеза представляет собой комплекс взаимодействия между патогенными микроорганизмами, защитными силами макроорганизма и факторами окружающей среды [2], в дополнении с нарушением регуляции синтеза медиаторов воспаления [3]. Все вышеперечисленные факторы способствуют развитию пародонтита, который характеризуется необратимыми гистопатологическими изменениями, клинически проявляющимися в виде разрушения периодонтальных связок зубного аппарата и резорбции костной ткани альвеолярного отростка челюсти, что в конечном счете, приводит к потере зубов [4].

Немаловажными остаются вопросы взаимосвязи пародонтита с различными системными заболеваниями, включая сердечно-сосудистые заболевания, рак, ревматоидный артрит и сахарный диабет [5]. Ключевыми патогенетическими звеньями, обеспечивающими взаимосвязь локальных проявлений пародонтита в ротовой полости с широким кругом соматических заболеваний, являются системный воспалительный ответ и дисфункция эндотелия. Локальные нарушения кровотока ассоциированы с непосредственной альтерацией сосудистой стенки, вместе с тем увеличение в крови медиаторов системного воспалительного ответа влечет за собой изменение функционирования эндотелиальных клеток во всем организме. Последнее в свою очередь оказывает негативное влияние на кровоток в тканях пародонтального комплекса, способствуя дальнейшему прогрессированию деструктивных процессов.

Ранее было показано, что альгинатные микрокапсулы серебра, входящие в состав геля, используемого для аппликации на слизистую оболочку десны, при пародонтите вызывают снижение перфузионного показателя и нормализацию механизмов модуляции кровотока в микрососудах десен у экспериментальных животных, что свидетельствует о положительном влиянии микрокапсул на микроциркуляцию. Загрузка таниновой кислоты (ТК) в микрокапсулы альгината серебра, повышает эффективность коррекции нарушений

перфузии десен, нейрогенного тонуса артериол, миогенного тонуса прекапиллярных сфинктеров, а также параметров оттока крови из системы микроциркуляции при экспериментальном пародонтите [6], однако влияние на системные факторы, участвующие в патогенезе пародонтита, остаются не изученными, что и определило направление настоящей работы. **Цель** — исследование изменений концентрации маркеров эндотелиальной дисфункции в динамике лечения экспериментального пародонтита с использованием геля, содержащего альгинатные микрокапсулы серебра, загруженные таниновой кислотой.

Методика

Опыты проводились на 70 белых нелинейных крысах, разделенных на следующие группы: контрольную, в которую вошли 10 интактных животных; группу сравнения — 20 крыс с экспериментальным пародонтитом и 2 опытные группы (1 и 2) по 20 животных с пародонтитом, которым проводились аппликации геля, содержащего капсулы альгината серебра без и с ТК. Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении, свободном доступе к воде и пище. Все экспериментальные работы проводились в соответствии с положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, требованиями национального руководства по содержанию и уходу за лабораторными животными. Эксперименты одобрены этическим комитетом Саратовского ГМУ имени В.И. Разумовского (протокол № 1 от 07.09.2021 г.).

Для формирования хронического пародонтита была использована модификация лигатурного метода A. Ionei и соавт. [7], позволяющая моделировать воспалительное заболевание пародонта в области резцов нижней челюсти. Эта модель наиболее доступна для проведения диагностических и лечебных манипуляций. Всем животным для достижения наркоза за 10 мин до проведения манипуляции внутримышечно вводили телазол (ZoetisInc, Испания) из расчета 0,1 мл/кг и ксиланит (ООО «Нита-Фарм», Россия) в дозе 1 мг/кг массы животного. После проводилось вшивание полифиламентной нерассасывающейся нити в десну в области резцов нижней челюсти. На 14-е сут после вшивания лигатура удалялась. Животным опытных групп на слизистую оболочку десны в области резцов нижней челюсти на 14, 16 и 18-е сут эксперимента производили аппликации геля, содержащего серебряные микрокапсулы без и с ТК. Синтез гелей и загрузку их ТК проводили в соответствии с протоколами, опубликованными ранее [6]. По 10 животных группы сравне-

ния и опытных групп были выведены из эксперимента через 3 и 5 нед после наложения лигатуры.

Для проведения биохимических исследований у животных сравнительных и опытных групп под наркозом проводился забор крови путем пункции правых отделов сердца на 3-й и 5-й нед соответственно. Концентрации эндотелина-1, синдекана-1, sE-селектина определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов реагентов ζ Cloud-Clone Corp \grave{e} (США), концентрацию асимметричного диметиларгинина (ADMA) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) определяли с использованием наборов реагентов ζ Imundiagnostik AG \grave{e} (Германия) и ζ VEGF Rat \grave{e} (RnDSsystems, США) на иммуноферментном планшетном анализаторе StatFax 4200 (AwarenessTechnology, США).

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программы ζ Statistica 10 \grave{e} (StatSoft, США). Проводили проверку нормальности распределения данных эксперимента по W -критерию Шапиро–Уилка. Поскольку данные в основном не соответствовали закону нормального распределения сравнение показателей проводилось с использованием U -критерия Манна–Уитни. Эта модель также использовалась для расчета критерия Z и показателей надежности p . Значения p ниже 0,05 считались статистически значимыми. Полученные данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (Q_{25} ; Q_{75}).

Результаты

В результате проведенных исследований установлено, что на 3-й нед эксперимента, в группе сравнения наблюдается статистически значимое повышение в крови концентраций маркеров альтерации эндотелия: синдекана-1 на 75%, sE-селектина на 44% и VEGF на 82% по сравнению с контрольной группой. При развитии пародонтита к 3-й нед эксперимента в крови животных увеличивается концентрация АДМА на 68% и эндотелина-1 в 3,6 раза (табл. 1).

У крыс опытной группы №1 после выполнения аппликаций на слизистую десен геля, содержащего полые альгинатные микрокапсулы с наночастицами серебра, отмечается снижение уровня синдекана-1 на 46%, сывороточная концентрация которого не имела значимых отличий от таковой у интактных животных. У животных опытной группы №1 после трехкратного применения геля с альгинатными микрокапсулами серебра без ТК, концентрации sE-селектина и VEGF в сыворотке крови были значимо выше, чем у крыс контрольной группы в 1,6 и 2,1 раза соответственно. При этом не выявлено значимых различий в концентрациях sE-

селектина и VEGF у крыс опытной группы №1 и группы сравнения. Уровни маркеров нарушения вазомоторной функции эндотелия (эндотелин-1 и АДМА) в опытной группе №1 не имели значимых отличий при сопоставлении с группой сравнения. Сывороточная концентрация ЭТ-1 и АДМА после аппликаций на слизистую оболочку десен геля с альгинатными микрокапсулами серебра, повышена в 3,5 и 1,8 раза относительно показателей интактных животных (табл. 1).

Под влиянием аппликаций геля с микрокапсулами альгината серебра, загруженными ТК, у крыс опытной группы №2 на 3-й нед эксперимента отмечается снижение уровня синдекана-1 на 50% и sE-селектина на 45% по сравнению с животными с пародонтитом, которым не проводилось лечение (группа сравнения). Сывороточные концентрации sE-селектина и синдекана-1 у животных, которым выполняли аппликации микрокапсул загруженных ТК, восстанавливаются полностью и не имеют значимых отличий от показателей группы контроля. При этом концентрация фактора роста эндотелия сосудов в крови животных опытной группы №2 повышена в 2,1 раза по сравнению с контрольной группой (табл. 1).

При анализе содержания маркеров нарушения вазомоторной функции эндотелия у крыс, которым выполнялось нанесение геля с микрокапсулами загруженными ТК, на 3-й нед эксперимента выявлено значимое снижение относительно группы сравнения сывороточной концентрации эндотелина-1 на 6,5 % без выраженного изменения уровня АДМА. На 3-й нед эксперимента у крыс опытной группы №2 сывороточные концентрации эндотелина-1 и АДМА превышали контрольные значения в 3,3 и 1,9 раза соответственно (табл. 1). В ходе сравнительного анализа концентраций маркеров эндотелиальной дисфункции у крыс опытных групп на 3-й нед эксперимента установлено, что загрузка капсул ТК более эффективно снижает уровень в крови у животных с пародонтитом sE-селектина и эндотелина-1, концентрация которых в опытной группе №2 на 51% и 5,5% ниже по сравнению с опытной группой №1. Значимых различий концентраций синдекана-1, VEGF и АДМА у животных опытных групп на 3-й нед эксперимента не выявлено (табл. 1).

Таким образом, нанесение геля, содержащего альгинатные микрокапсулы серебра в краткосрочной перспективе не вызывает существенных изменений концентраций маркеров альтерации и нарушения функций эндотелия, за исключением снижения уровня синдекана-1. Загрузка ТК в микрокапсулы позволяет увеличить эффективность геля и добиться снижения не толь-

ко концентрации синдекана 1, но также sE-селектина и эндотелина-1 у крыс с пародонтитом.

У животных группы сравнения на 5-й нед эксперимента сывороточные концентрации синдекана-1, sE-селектина и VEGF повышены в 1,3, 3,5 и 4,5 раза соответственно относительно показателей у крыс с интактным пародонтом. При этом концентрации sE-селектина и VEGF на 5-й нед эксперимента превышают таковые на 3-й нед в 2,4 и 2,5 раза. Уровни эндотелина-1 и АДМА у животных с пародонтитом на 5-й нед превышали контрольные значения в 5,5 и 2 раза соответственно (табл. 2). Уровень эндотелина-1 у крыс с пародонтитом на 5-й нед повышался на 54,7%, а АДМА на 23% по сравнению с аналогичным показателем на 3-й нед эксперимента. У крыс, которым проводи-

лись аппликации геля, содержащего микрокапсулы без ТК, сывороточные концентрации как маркеров альтерации эндотелия, так и маркеров нарушения вазомоторной функции превышали уровень значений контрольной группы. У животных данной группы концентрации в крови sE-селектина и VEGF были повышены в 2,6 раза, а эндотелина-1 и АДМА – в 3,5 и 2 раза по сравнению с показателями контрольной группы. Вместе с тем на 5-й нед эксперимента концентрации в крови VEGF и эндотелина-1 статистически значимо ниже, чем у животных группы сравнения в тот же срок наблюдения, на 43,8% и 36,2% соответственно. При этом значимых различий сывороточных концентраций синдекана-1, sE-селектина и АДМА у животных группы сравнения и опытной группы №1 не вы-

Таблица 1/ Table 1

Изменения концентраций маркеров дисфункции эндотелия на 3-й нед эксперимента у крыс с пародонтитом при аппликации геля, содержащего микрокапсулы, загруженные и незагруженные ТК
The concentrations changes of endothelial dysfunction markers in rats with periodontitis subjected to applications of a gel containing microcapsules, loaded and unloaded TA at the 3th week of the experiment

Параметры Parameters	Контрольная группа (n=10) Control group	Группа сравнения (n=10) Comparison group	Опытная группа № 1 (n=10) experimental group № 1	Опытная группа № 2 (n=10) experimental group № 2
Синдекан-1, нг/мл Syndecan-1, ng/ml	1,6 (1,5; 1,7)	2,8 (1,8; 3,2) $p_1=0,029759$	1,5 (1,4; 1,6) $p_1=0,240956$ $p_2=0,005341$	1,4 (1,4; 1,6) $p_1=0,10982$ $p_2=0,003405$ $p_3=0,936186$
sE-селектин, нг/мл sE-selectin, ng/ml	199,6 (181,5; 237,9)	287,6 (252,7; 467,1) $p_1=0,003406$	323,8 (298,2; 414,6) $p_1=0,002694$ $p_2=0,411314$	157,8 (155,6; 220,1) $p_1=0,581541$ $p_2=0,035765$ $p_3=0,012186$
VEGF, пг/мл VEGF, pg/ml	12,5 (8,1; 15,7)	22,7 (20,4; 24,5) $p_1=0,000363$	26,4 (24,2; 31,3) $p_1=0,000363$ $p_2=0,055286$	26,8 (23,8; 28,7) $p_1=0,001609$ $p_2=0,255624$ $p_3=0,935283$
Эндотелин 1, пг/мл Endothelin 1, pg/ml	14,7 (12,4; 17,6)	52,6 (17,6; 55,6) $p_1=0,000449$	52,1 (49,5; 55,1) $p_1=0,000760$ $p_2=1$	49,2 (41; 49,4) $p_1=0,00028$ $p_2=0,038562$ $p_3=0,034259$
АДМА, мкмоль/л ADMA, $\mu\text{mol/l}$	0,77 (0,6; 0,9)	1,3 (1,2; 1,4) $p_1=0,006550$	1,4 (1,3; 1,6) $p_1=0,001089$ $p_2=0,465209$	1,5 (1,4; 1,7) $p_1=0,000578$ $p_2=0,061819$ $p_3=0,283978$

Примечание. Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей.

p_1 – по сравнению с контрольной группой, p_2 – относительно значений группы сравнения в тот же срок наблюдения, p_3 – по сравнению со значениями опытной группы № 1 в тот же срок наблюдения.

Note. Data are presented as median and quartiles. p_1 – compared with the control group, p_2 – relative to the values of the comparison group at the same observation period, p_3 – compared with the values of the experimental group № 1 at the same time point.

явлено (табл. 2). У животных, которым проводились аппликации геля, содержащего микрокапсулы, заполненные ТК, на 5-й нед эксперимента концентрации в крови синдекана-1 и sE-селектина не имели значимых различий с показателями интактных крыс, а концентрации VEGF, эндотелина-1 и АДМА превышали контрольные значения в 1,8, 3,1 и 2 раза соответственно. При этом у животных опытной группы № 2 на 5-й нед эксперимента отмечалось снижение концентраций sE-селектина в 5 раз, VEGF – в 2,5 раза и эндотелина-1 в 1,8 раза относительно группы сравнения в тот же срок наблюдения (табл. 2).

При сравнении между собой показателей опытных групп на 5-й нед эксперимента обнаружено, что

при использовании геля с микрокапсулами загруженными ТК, концентрации синдекана-1 на 33%, sE-селектина на 73% , VEGF на 28% и эндотелина-1 на 12 % относительно показателей животных, которым выполнялась аппликация геля с микрокапсулами без ТК (табл. 2).

Таким образом, у крыс с пародонтитом аппликации геля, содержащего микрокапсулы без ТК, на 5-й нед эксперимента вызывают снижение сывороточных концентраций VEGF и эндотелина-1. ТК, иммобилизованная в капсулы, позволяет увеличить эффективность геля в коррекции альтерации эндотелия и его вазомоторной активности у крыс с пародонтитом.

Таблица 2/ Table 2

Изменения концентраций маркеров дисфункции эндотелия на 5-й неделе эксперимента у крыс с пародонтитом, подвергнутых аппликациям геля, содержащего микрокапсулы, загруженные и незагруженные ТК

The concentrations changes of endothelial dysfunction markers in rats with periodontitis subjected to applications of a gel containing microcapsules, loaded and unloaded TA at the 5th week of the experiment

Параметры Parameters	Контрольная группа (n=10) Control group (n=10)	Группа сравнения (n=10) Comparison group (n=10)	Опытная группа № 1 (n=10) Experimental group № 1	Опытная группа № 2 (n=10) Experimental group № 2
Синдекан-1, нг/мл Syndecan-1, ng/ml	1,6 (1,5; 1,7)	2,1 (1,7; 2,7) $p_1=0,016771$	1,8 (1,5; 2,2) $p_1=0,508332$ $p_2=0,112340$	1,2 (1,2; 1,3) $p_1=0,066193$ $p_2=0,003354$ $p_3=0,022991$
sE-селектин, нг/мл sE-selectin, ng/ml	199,6 (181,5; 237,9)	697,1 (454; 917) $p_1=0,001376$	512,7 (434,1; 681,8) $p_1=0,034425$ $p_2=0,378478$	135,9 (82,8; 331,7) $p_1=0,581541$ $p_2=0,008114$ $p_3=0,035765$
VEGF, пг/мл VEGF, pg/ml	12,5 (8,1; 15,7)	57,2 (50,9; 74,4) $p_1=0,000363$	32,1 (27,2; 40,3) $p_1=0,000192$ $p_2=0,006537$	23 (21,2; 25) $p_1=0,000662$ $p_2=0,001033$ $p_3=0,002076$
Эндотелин 1, пг/мл Endothelin 1, pg/ml	14,7 (12,4; 17,6)	81,4 (66,3; 102,3) $p_1=0,000280$	51,9 (50,4; 53,1) $p_1=0,000449$ $p_2=0,000901$	45,7 (39,2; 48,5) $p_1=0,000449$ $p_2=0,000636$ $p_3=0,001948$
АДМА, мкмоль/л ADMA, μmol/l	0,77 (0,6; 0,9)	1,6 (1,6; 1,7) $p_1=0,002223$	1,6 (1,2; 1,7) $p_1=0,001089$ $p_2=0,522817$	1,6 (1,5; 1,9) $p_1=0,000578$ $p_2=0,807541$ $p_3=0,153128$

Примечание. Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей.

p_1 – по сравнению с контрольной группой, p_2 - относительно значений группы сравнения в тот же срок наблюдения, p_3 – по сравнению со значениями опытной группы № 1 в тот же срок наблюдения.

Notes. Data are presented as median and quartiles. p_1 – compared with the control group, p_2 – relative to the values of the comparison group at the same observation period, p_3 – compared with the values of the experimental group № 1 at the same time point.

Обсуждение

Представленные результаты исследования свидетельствуют, что у животных группы сравнения на 3-й и 5-й нед в сыворотке крови повышается концентрация маркеров повреждения эндотелиальных клеток. Так, в крови у животных происходит увеличение уровня синдекана-1, который представляет собой маркер альтерации гликокаликса эндотелиальных клеток, sE-селектина, отражающего воспалительную активацию эндотелиоцитов. Следует отметить, что выраженность альтерации эндотелия у животных нарастает в период с 3-й по 5-ю нед развития экспериментального пародонтита. Альтерация эндотелия сосудов пародонта при воспалительных заболеваниях, в частности при пародонтите, описана в литературе [8]. Вместе с тем, ряд авторов указывают на системный характер дисфункции эндотелия у пациентов с пародонтитом [9, 10]. Полученные в ходе настоящей работы данные согласуются с результатами исследований у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом. Так было показано, что при пародонтите в крови пациентов увеличивается концентрация sE-селектина [11]. Системное повреждение эндотелиальных клеток может быть обусловлено несколькими механизмами, включая действие пародонтопатогенных бактерий в ходе транзиторной бактериемии, системными проявлениями воспалительного ответа, а также влиянием метаболитов, образующихся вследствие нарушения обмена веществ в тканях пародонта [12, 13]. В частности, при пародонтите выражено увеличивается продукция провоспалительных цитокинов, повышенный уровень которых регистрируется в крови, что определяет системный характер воспалительного ответа. В тоже время провоспалительные цитокины являются ключевыми стимуляторами экспрессии E-селектина на мембране эндотелиоцитов, повышение которой отражает воспалительную активацию данных клеток. Следует также отметить роль метаболитов в развитии системных проявлений дисфункции эндотелия, и, в первую очередь, продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), которые вызывают альтерацию гликокаликса эндотелиальных клеток и способствуют их воспалительной активации. Повышение уровня продуктов ПОЛ и истощение ресурса антиоксидантных систем являются характерными особенностями развития воспалительных заболеваний полости рта [14–16].

Отдельного внимания заслуживают механизмы повышения уровня VEGF в крови, обнаруженное у экспериментальных животных на 3-й и 5-й нед после наложения лигатуры. Повышенная экспрессия VEGF при

пародонтите согласуется с данными, полученными рядом других авторов [17–19]. Вероятно, синтез VEGF на фоне воспалительных заболеваний пародонта может быть вызван активацией двух путей, включая активацию гипоксия индуцированного фактора HIF/VEGF и образование комплекса IL-6/IL-6R/gp130, приводящего к активации пути JAK/STAT, усиливающего секрецию VEGF фибробластами десны [20]. Кроме того, следует учитывать, что продукция VEGF увеличивается при повреждении эндотелия в качестве компенсаторного механизма, обеспечивающего пролиферацию эндотелиальных клеток [21].

Альтерация эндотелиальных клеток приводит к их дисфункции и, в частности, к нарушению вазомоторной функции. Так, в ходе эксперимента было обнаружено повышение в сыворотке крови животных групп сравнения на 3-й и 5-й нед уровня эндотелина-1 и АДМА, которые представляют собой мощный вазоконстриктор и эндогенный ингибитор вазодилатации [22]. Представленные экспериментальные показатели согласуются с данными, полученными у пациентов с пародонтитом, которые отражают повышение уровня в крови эндотелина-1 и АДМА, что, по мнению авторов, демонстрирует взаимосвязь пародонтита с системными заболеваниями, в частности сердечно-сосудистой системы [23–25]. Следует отметить, что у животных с экспериментальным пародонтитом повышение концентраций эндотелина-1 и асимметричного диметиларгинина более выражены на 5-й нед, чем на 3-й, что свидетельствует о прогрессирующем нарушении вазомоторной активности.

Таким образом, данные, полученные на модели экспериментального пародонтита у крыс, согласуются с результатами клинических наблюдений и подтверждают концепцию системного характера прогрессирующей альтерации эндотелия при пародонтите. У крыс с экспериментальным пародонтитом наряду с признаками альтерации эндотелия в период с 3-й по 5-ю нед нарастает выраженность системных проявлений эндотелиальной дисфункции. Аппликации геля, содержащего альгинатные микрокапсулы с наночастицами серебра без ТК, на слизистую оболочку десны у животных с пародонтитом, на 3-й нед способствуют снижению концентрации синдекана-1, что может свидетельствовать о снижении повреждающего воздействия на эндотелиальные клетки. После воздействия данным гелем на воспаленную десну у животных на 5-й нед эксперимента, происходит снижение уровня VEGF, вместе с тем, в данном периоде снижается сывороточная концентрация эндотелина-1, что указывает на частичное восстановление эндотелиальной функции в отдаленном периоде. Данные

эффекты могут быть обусловлены антибактериальными свойствами наночастиц серебра, входящих в состав микрокапсул, что способствует снижению выраженности системного воспалительного ответа [26–28]. Уменьшение локальных проявлений воспаления, как свидетельствуют ранее выполненные исследования, отмечается уже на 3-й нед эксперимента [6]. Следовательно, коррекция системных проявлений под влиянием геля, содержащего альгинатные микрокапсулы с наночастицами серебра, у крыс с экспериментальным пародонтизом происходит позже, чем восстановление локального кровотока в тканях пародонта.

Аппликации на воспаленную десну у крыс геля, содержащего альгинатные микрокапсулы с наночастицами серебра заполненные ТК, приводят к снижению маркеров альтерации эндотелия, включая синдехан-1, sE-селектин и VEGF, а также эндотелин-1, особенно на 5-й нед эксперимента. Данный эффект может быть обусловлен способностью танинов снижать активацию эндотелиальных клеток и проницаемость сосудистой стенки [29]. Вместе с этим, ранее продемонстрированы антиоксидантные свойства, характерное для ТК [30]. Вероятно, что увеличение эффективности коррекции обусловлено потенцированием антибактериальных эффектов наночастиц серебра противовоспалительными и антиоксидантными свойствами ТК, что позволяет предотвратить альтерацию эндотелия не только бактериями, но и медиаторами системного воспалительного ответа, а также продуктами нарушения метаболизма в тканях пародонта.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют, что применение геля, содержащего микрокапсулы с наночастицами серебра, способно уменьшать выраженность системных проявлений дисфункции эндотелия у крыс с экспериментальным пародонтизом, а загрузка микрокапсул ТК — повышать эффективность коррекции.

Заключение

Результаты настоящего исследования позволяют заключить, что у крыс с экспериментальным пародонтизом, так же как и у пациентов с хроническим генерализованным пародонтизом, наблюдаются прогрессирующие системные проявления дисфункции эндотелия. Аппликации геля, содержащего микрокапсулы с наночастицами серебра, способны уменьшать выраженность системных проявлений дисфункции эндотелия у крыс с экспериментальным пародонтизом. Использование геля, содержащего микрокапсулы с наночастицами серебра заполненные ТК, позволяет добиться более выраженного снижения в сыворотке крови у животных

с экспериментальным пародонтизом маркеров альтерации и нарушения функции эндотелия. Полученные результаты открывают новые перспективы апробации представленной системы доставки ТК для применения в качестве местной терапии у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта.

Литература/References

1. Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017; 390(10100): 1211-1259.
2. Hernández M., Dutzan N., García-Sesnich J., Abusleme L., Dezerega A., Silva N., et al. Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *J Dent Res*. 2011; 90: 1164–70.
3. Sulijaya B., Takahashi N., Yamazaki K. (2019). Host modulation therapy using anti-inflammatory and antioxidant agents in periodontitis: A review to a clinical translation. *Archives of oral biology*. 2019; 105: 72-80.
4. Trindade F., Oppenheim F.G., Helmerhorst E.J., Amado F., Gomes P.S., Vitorino R. Uncovering the molecular networks in periodontitis. *Proteomics Clin Appl*. 2014; 8(9-10): 748-61.
5. Qasim S., Al-Otaibi D., Al-Jasser R., Gul S. S., Zafar M. S. An Evidence-Based Update on the Molecular Mechanisms Underlying Periodontal Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21(11): 3829.
6. Lengert E.V., Savkina A.A., Ermakov A.V., et al. Influence of the new formulation based on silver alginate microcapsules loaded with tannic acid on the microcirculation of the experimental periodontitis in rats. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021; 126:112144.
7. Ionel A., Lucaciu O., Moga M., et al. Periodontal disease induced in Wistar rats — experimental study. *HVM Bioflux*. 2015; 7(2): 90-5.
8. Manakil J.F., Sugerma P.B., Li H., Seymour G.J., Bartold P.M. Cell-surface proteoglycan expression by lymphocytes from peripheral blood and gingiva in health and periodontal disease. *J Dent Res*. 2001; 80(8): 1704-10.
9. Leira Y., Rodríguez-Yáñez M., Arias S., et al. Periodontitis is associated with systemic inflammation and vascular endothelial dysfunction in patients with lacunar infarct. *J Periodontol*. 2019; 90(5): 465-74.
10. Khumaedi A.I., Purnamasari D., Wijaya I.P., Soeroso Y. The relationship of diabetes, periodontitis and cardiovascular disease. *Diabetes Metab Syndr*. 2019; 13(2): 1675-8.
11. Ramírez J.H., Parra B., Gutierrez S., Arce R.M., Jaramillo A., Ariza Y., et al. Biomarkers of cardiovascular disease are increased in untreated chronic periodontitis: a case control study. *Aust Dent J*. 2015; 60(1): 135.
12. Farrugia C., Stafford G.P., Potempa J., et al. Mechanisms of vascular damage by systemic dissemination of the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *FEBS J*. 2021; 288(5): 1479-95.
13. Zhang Z., Liu D., Liu S., Zhang S., Pan Y. The Role of *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles in Periodontal Disease and Related Systemic Diseases. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 10: 585917.
14. Tóthová L., Celec P. Oxidative Stress and Antioxidants in the Diagnosis and Therapy of Periodontitis. *Front Physiol*. 2017; 8: 1055.
15. Wang Y., Andrukhov O., Rausch-Fan X. Oxidative Stress and Antioxidant System in Periodontitis. *Front Physiol*. 2017; 8: 910.

16. Tripathi V., Singh S.T., Sharma V., Verma A., Singh C.D., Gill J.S. Assessment of Lipid Peroxidation Levels and Total Antioxidant Status in Chronic and Aggressive Periodontitis Patients: An in vivo Study. *J Contemp Dent Pract.* 2018; 19(3): 287-91.
17. Ren B., Feng Q., He S., Li Y., Fan J., Chai G., et al. VEGF as a potential molecular target in periodontitis: a meta-analysis and microarray data validation. *J Inflamm (Lond).* 2021; 18(1): 18.
18. Yılmaz Şaştım Ç., Gürsoy M., Kõnõnen E., Kasurinen A., Norvio S., Gürsoy U.K., et al. Salivary and serum markers of angiogenesis in periodontitis in relation to smoking. *Clin Oral Investig.* 2021; 25(3): 1117-26.
19. Vasconcelos R.C., Costa Ade. L., Freitas Rde. A., Bezerra B.A., Santos B.R., Pinto L.P., et al. Immunoexpression of HIF-1 α and VEGF in Periodontal Disease and Healthy Gingival Tissues. *Braz Dent J.* 2016; 27(2): 117-22.
20. Niklander S., Bordagaray M.J., Fernández A., Hernández M. Vascular Endothelial Growth Factor: A Translational View in Oral Non-Communicable Diseases. *Biomolecules.* 2021; 11(1): 85.
21. Lv Z., Guo M., Li C., Shao Y., Zhao X., Zhang W. VEGF-like protein from *Apostichopus japonicus* promotes cell proliferation and migration. *Dev Comp Immunol.* 2019; 92: 230-7.
22. Houde M., Desbiens L., D'Orléans-Juste P. Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity. *Adv Pharmacol.* 2016; 77: 143-75.
23. Khalid W., Varghese S.S., Sankari M., Jayakumar N.D. Comparison of Serum Levels of Endothelin-1 in Chronic Periodontitis Patients Before and After Treatment. *J Clin Diagn Res.* 2017; 11(4): ZC78-ZC81.
24. Khalid W., Varghese S.S., Lakshmanan R., Sankari M., Jayakumar N.D. Role of endothelin-1 in periodontal diseases: A structured review. *Indian J Dent Res.* 2016; 27(3): 323-33.
25. Isola G., Alibrandi A., Currò M., Matarese M., Ricca S., Matarese G., et al. Evaluation of salivary and serum ADMA levels in patients with periodontal and cardiovascular disease as subclinical marker of cardiovascular risk. *J Periodontol.* 2020; 10.1002/JPER.19-0446.
26. Naik K., Kowshik M. The silver lining: towards the responsible and limited usage of silver. *J Appl Microbiol.* 2017; 123(5): 1068-87.
27. Yang K.R., Han Q., Chen B., Zheng Y., Zhang K., Li Q., et al. Antimicrobial hydrogels: promising materials for medical application. *Int J Nanomedicine.* 2018; 13: 2217-63.
28. Yin I.X., Zhang J., Zhao I.S., Mei M.L., Li Q., Chu C.H. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int J Nanomedicine.* 2020; 15: 2555-62.
29. Xu Y., Liu P., Xu S., Koroleva M., Zhang S., Si S., et al. Tannic acid as a plant-derived polyphenol exerts vasoprotection via enhancing KLF2 expression in endothelial cells. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 6686.
30. Curuțiu C., Dițu L.M., Grumezescu A.M., Holban A.M. Polyphenols of Honeybee Origin with Applications in Dental Medicine. *Antibiotics (Basel).* 2020; 9(12): 856.

Сведения об авторах

Иванов Алексей Николаевич, доктор мед. наук, зав. отд-нием лабораторной диагностики НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии, зав. Центральной научно-исследовательской лабораторией, зав. каф. нормальной физиологии им. И.А. Чувского ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

Савкина Ангелина Альбертовна, мл. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, e-mail: sawkina.ange@yandex.ru;

Ленгерт Екатерина Владимировна, мл. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

Ермаков Алексей Вадимович, мл. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

Попыхова Эра Борисовна, ст. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаборатории, ассистент каф. нормальной физиологии им. И.А. Чувского ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

Кузнецова Наталья Анатольевна, мл. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

Степанова Татьяна Вячеславовна, мл. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

Лойко Дарья Дмитриевна, ассистент каф. нормальной физиологии им. И.А. Чувского, мл. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 615.355:616.613-003.7-092.4

Жариков А.Ю., Кальницкий А.С., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Бобров И.П., Жарикова Г.В.

Активность матричной металлопротеиназы-2 и оксидативный стресс в почках при экспериментальном уратном нефролитиазе

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, 656038, Барнаул, пр. Ленина, д. 40

Введение. Уратный нефролитиаз – распространенная форма мочекаменной болезни. Активация матричной металлопротеиназы-2 при оксидативном стрессе и ее участие в развитии патологических процессов в почках, может являться одним из важных звеньев патогенеза данного заболевания и служить перспективной мишенью для его фармакологической коррекции. **Цель** исследования — изучение активности матричной металлопротеиназы-2 и процессов свободнорадикального окисления в почках крыс.

Методика. Эксперимент выполнен на 17 крысах-самцах сток Wistar, разделенных на контрольную ($n=8$) и опытную ($n=9$) группы. Животным подопытной группы ежедневно в течение 21 сут вводили смесь 1000 мг/кг мочевого и 500 мг/кг оксониевой кислот. В моче крыс определяли концентрацию и экскрецию матричной металлопротеиназы-2 перед началом эксперимента и на 21-е сут исследования, в гомогенате почек – концентрацию матричной металлопротеиназы-2, уровень тиобарбитуратреактивных продуктов, активность каталазы и глутатионпероксидазы, оценивали общую прооксидантную и антиоксидантную активность. Для контроля формирования заболевания проводили морфологическое исследование.

Результаты. В опытной группе концентрация в моче и экскреция матричной металлопротеиназы-2 статистически значимо возрастали в 53,9 и 112,1 раза соответственно по сравнению с исходным уровнем, а также в 87,6 и 163,8 раза соответственно в сравнении с группой контроля, показатели которой оставались стабильными. Активность матричной металлопротеиназы-2 в гомогенате почек подопытной группы статистически значимо (в 1,1 раза) превышала контрольный показатель. Концентрация тиобарбитуратреактивных продуктов, общая антиоксидантная активность и активность глутатионпероксидазы в почках подопытных крыс были в 4,6, 1,2 и 1,1 раза соответственно выше чем в контроле, при снижении активности каталазы в 2,3 раза. В почках крыс группы опыт были выявлены депозиты средним числом $2,5 \pm 0,3$ и средней площадью $951,6 \pm 253,8$ мкм² при отсутствии таковых в контроле.

Заключение. При моделировании уратного нефролитиаза существенно возрастает активность матричной металлопротеиназы-2 в моче и гомогенате почек и уровень ее экскреции с мочой при сопутствующем развитии оксидативного стресса и формировании крупных депозитов в почках.

Ключевые слова: матричная металлопротеиназа-2, оксидативный стресс, уратный нефролитиаз

Для цитирования: Жариков А.Ю., Кальницкий А.С., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Бобров И.П., Жарикова Г.В. Активность матричной металлопротеиназы-2 и оксидативный стресс в почках при экспериментальном уратном нефролитиазе.

Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2022; 66(3): 122-128.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.122-128

Участие авторов: концепция дизайн исследования – Жариков А.Ю.; сбор материала – Кальницкий А.С., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Жарикова Г.В.; анализ и интерпретация данных – все соавторы, статистическая обработка данных – Жариков А.Ю., Кальницкий А.С., Бобров И.П.; подготовка иллюстративного материала – Бобров И.П.; написание текста – Жариков А.Ю., Кальницкий А.С., Бобров И.П., редактирование текста – Жариков А.Ю. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Кальницкий Артем Сергеевич, e-mail: artem_kalnitsky@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.04.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Zharikov A.Yu., Kalnitsky A.S., Mazko O.N., Makarova O.G., Bobrov I.P., Zharikova G.V.

Matrix metalloproteinase-2 activity and oxidative stress in the kidneys during experimental urate nephrolithiasisAltai State Medical University,
Prospekt Lenina 40, Barnaul 656038

Background. Urate nephrolithiasis is a common form of urolithiasis. Matrix metalloproteinase-2, which is activated during oxidative stress and is involved in the development of pathological processes in the kidneys, may be an important component of the pathogenesis of this disease, and it might be a promising target for pharmacological correction. **Aim:** To study the activity of matrix metalloproteinase-2 and the intensity of free radical oxidation processes in rat kidneys during experimental urate nephrolithiasis. **Methods.** Experiments were performed on 17 Wistar male rats divided into control ($n=8$) and experimental ($n=9$) groups. Animals of the experimental group were injected with a mixture of 1000 mg/kg of uric acid and 500 mg/kg of oxonic acid daily for 21 days. The concentration and excretion of urinary matrix metalloproteinase-2 were determined before and on day 21 of the experiment. The concentrations of matrix metalloproteinase-2 and thiobarbiturate-reactive products, total prooxidant and antioxidant activity, and the activities of catalase and glutathione peroxidase were determined in the kidney homogenate. To monitor the formation of the disease, a morphological study was performed.

Results. In the experimental group, the urinary concentration and excretion of matrix metalloproteinase-2 increased significantly by 53.9 and 112.1 times, respectively, compared with the initial level, and also by 87.6 and 163.8 times, respectively, compared with the control group, in which these indicators were stable. The concentration of matrix metalloproteinase-2 in the kidney homogenate of the experimental group was significantly 1.1 times higher than in the control group. The concentration of thiobarbiturate-reactive products, total antioxidant activity, and glutathione peroxidase activity in the kidneys of experimental rats were 4.6, 1.2, and 1.1 times, respectively, higher than in the control group, along with a 56.5% decrease in catalase activity. In the kidneys of experimental rats, 2.5 ± 0.3 calcium deposits were found with an average area of $951.6 \pm 253.8 \mu\text{m}^2$. There were no deposits in the control group.

Conclusion. In this model of urate nephrolithiasis, the concentration of matrix metalloproteinase-2 in urine and in kidney homogenate increased manyfold. Similarly, the rate of matrix metalloproteinase-2 excretion in the urine increased along with the development of renal oxidative stress and the formation of large calcium deposits.

Keywords: matrix metalloproteinase-2; oxidative stress; urate nephrolithiasis

For citation: Zharikov A.Yu., Kalnitsky A.S., Mazko O.N., Makarova O.G., Bobrov I.P., Zharikova G.V. Matrix metalloproteinase-2 activity and oxidative stress in the kidneys during experimental urate nephrolithiasis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(3): 122-128. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.122-128

Author's contribution: research design concept – Zharikov A.Yu.; material collection – Kalnitsky A.S., Mazko O.N., Makarova O.G., Zharikova G.V.; data analysis and interpretation – all co-authors, statistical processing – Zharikov A.Yu., Kalnitsky A.S., Bobrov I.P.; preparation of illustrative material – Bobrov I.P.; writing text – Zharikov A.Yu., Kalnitsky A.S., Bobrov I.P., text editing – Zharikov A.Yu. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Artem S. Kalnitsky, post-graduate student of the Department of Pharmacology named after Professor V.M. Bryukhanov, Altai State Medical University, 40 Lenin Ave., Barnaul 656038, Russian Federation, e-mail: artem_kalnitsky@mail.ru

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

Financing. The study had no sponsorship.

Information about the authors:Zharikov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-4884-220X>Kalnitsky A.S., <https://orcid.org/0000-0003-3500-3052>Mazko O.N., <https://orcid.org/0000-0001-7299-4516>Makarova O.G., <https://orcid.org/0000-0001-7771-9468>Bobrov I.P., <https://orcid.org/0000-0001-9097-6733>Zharikova G.V., <https://orcid.org/0000-0002-3227-2348>

Received 01.04.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Введение

Уратный нефролитиаз (УН) – одна из наиболее распространенных форм мочекаменной болезни

(МКБ) [1]. При этом возможности медикаментозной терапии УН весьма ограничены, основным методом остается так называемая «цитратная терапия», которая не лишена недостатков [2]. Поэтому поиск новых

подходов к таргетной фармакологической коррекции УН сохраняет высокую актуальность.

Роль матричных металлопротеиназ (ММП) в развитии различных заболеваний сегодня хорошо известна и не вызывает сомнений, в связи с чем ММП рассматриваются в качестве потенциальной мишени для таргетной терапии [3]. Не исключено, что такой подход может быть актуальным и в отношении поиска новых средств для лечения МКБ. В то же время, на сегодняшний день информация о роли ММП в патогенезе мочекаменной болезни, и в том числе в патогенезе УН, весьма ограничена [4]. В одном из недавних исследований показано, что матриксная металлопротеиназа-9 (ММП-9) участвует в регуляции кальций-индуцированного формирования кальциевых депозитов в почках [5]. В другой работе была изучена ассоциация полиморфизмов гена ММП-9 с развитием нефролитиаза [6]. Как известно, ММП-9 относится к подгруппе желатиназ, вторым представителем которой является матриксная металлопротеиназа-2 (ММП-2) [7]. Сведений о роли ММП-2 в развитии нефролитиаза в доступной литературе не встречается. Однако известно, что матриксная металлопротеиназа-2 (ММП-2) играет существенную роль в развитии почечной недостаточности [8]. Показано, что активация ММП-2 приводит к структурным изменениям в мембране клеток канальцев с последующей атрофией канальцев, фиброзом и почечной недостаточностью [8]. При этом важное значение повреждения нефроцитов в формировании первичного очага литогенеза и последующего образования на нем депозитов хорошо известна [9]. Кроме того, известно, что активация ММП-2 напрямую связана с развитием оксидативного повреждения тканей и органов [10,11]. Роль оксидативного стресса в развитии нефролитиаза, и в том числе уратного нефролитиаза, также хорошо известна [12]. В совокупности эти сведения позволяют предполагать возможное участие ММП-2 в патогенезе нефролитиаза.

Цель исследования – изучение активности матриксной металлопротеиназы-2 и активности процесса свободнорадикального окисления в почках крыс при экспериментальном уратном нефролитиазе.

Методика

Исследование проведено на базе кафедры фармакологии имени профессора В.М. Брюханова и Исследовательского центра коллективного пользования ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России. Эксперименты выполнены на 17 самцах крыс сток Wistar 300-350 г, возраст 3–4 мес. Животные были выращены в виварии

Научно-исследовательского института цитологии и генетики (г. Новосибирск). Проведение работ осуществлялось в соответствии с приказом Минздрава России №199 от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и в соответствии с регламентом декларации ЕС от 2010 г. об использовании лабораторных животных. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» МЗ России (протокол №3 от 25.02.2021).

Экспериментальные животные были разделены на 2 группы: контрольная ($n=8$) и опытная ($n=9$). В опытной группе по общепринятой методике осуществлялось моделирование экспериментального уратного нефролитиаза: животным ежедневно в течение 3 нед внутрижелудочно вводили смесь мочево- и оксониевой кислот (1000 мг/кг и 500 мг/кг соответственно) [13]. Контрольная группа включала интактных крыс, которым по аналогичной схеме вводился физиологический раствор в эквивалентном количестве. Все животные на протяжении эксперимента находились на стандартном лабораторном рационе в индивидуальных клетках, приспособленных для сбора мочи.

До начала эксперимента, а затем на 21-е сут в моче крыс обеих групп определялась активность ММП-2. По истечении 3 нед эксперимента крысы подвергались эвтаназии, после чего у них хирургическим путем изымались обе почки, одна из которых использовалась для определения в гомогенате тканей почки активности ММП-2 и показателей активности процесса свободнорадикального окисления (СРО), а другая – для проведения морфологического исследования на предмет выявления развития нефролитиаза.

Концентрация ММП-2 в моче и гомогенате тканей почки определялась методом иммуноферментного анализа Elisa kit. Для определения использовали наборы производства CUSABIO (Ухань, Китайская народная республика), содержащие антитела, специфичные для ММП-2, предварительно нанесенные на микропланшет. Биологический материал (моча, гомогенат почечной ткани) подвергали центрифугированию при 1000 об/мин в течение 15 мин. Стандарты и исследуемые образцы переносили пипеткой в лунки, после чего происходило связывание ММП-2 иммобилизованным антителом. После удаления несвязавшихся веществ в лунки добавляли антитела, конъюгированные с биотином, специфичные к ММП-2. После промывания в лунки помещали конъюгированную с авидином пероксидазу хрена с последующим добавлением раствора тетраметилбензидина, реагирующего с пероксидом водорода с образованием окрашенного соединения.

Для оценки активности процесса СРО в почках определяли показатели прооксидантной и антиоксидантной системы. Концентрацию тиобарбитуратреактивных продуктов (ТБРП) определяли по интенсивности окраски основания Шиффа, образующегося при взаимодействии малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой. Общую прооксидантную активность оценивали в соответствии с зафиксированным уровнем окраски флюоресцентного комплекса, полученного путем взаимодействия тиобарбитуровой кислоты с продуктами реакции твина-80 с пероксидными радикалами. Общую антиоксидантную активность (ОАА) определяли по выраженности угнетения окисления ТВИН-80, индуцированного Fe^{2+} /аскорбатом. Активность каталазы (КАТ) определяли по выраженности подавления ферментом окисления молибдата натрия перекисью водорода. Активность глутатионпероксидазы (ГПО) измеряли по концентрации восстановленного глутатиона после образования окрашенного продукта в цветной реакции с реактивом Элмана. Определение проводилось в соответствии с апробированными ранее методиками [14].

При проведении морфологических исследований биологический материал после промывания в изотоническом растворе натрия хлорида подвергали процедуре проводки на аппарате TISSUE-TEK VІPTM6 (производитель – Sakkura, Япония). После этого на приборе Assu-Cut SRM (производитель – Sakkura, Япония) готовили срезы почечной ткани толщиной 5–6 мкм. Для обнаружения депозитов применяли окрашивание срезов гематаксилином и эозином. Подготовленные образцы были исследованы с помощью микроскопа Nikon Eclipse E200 (Китайская народная республика) при увеличении $\times 400$. Для осуществления морфометрических исследований использовали программное обеспечение ImageJ 1.43 от Wayne Rasband и AxioVision 3.1 от Carl Zeiss.

Статистическая обработка экспериментальных данных производилась с использованием пакета программ Statistica 12.0 для Windows. Внутригрупповые различия показателей оценивали при помощи критерия Вилкоксона, межгрупповые различия – с использованием критерия Манна-Уитни. Результаты биохимических исследований представлены медианой, 25 и 75 перцентилями (Me (Q25%;Q75%)). Результаты морфометрических исследований представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Различия признавались статистически значимыми при $p < 0,05$ [15].

Результаты

Проведенные эксперименты показали, что на исходном уровне концентрация ММП-2 в моче крыс

и величина почечной экскреции ММП-2 не имели статистически значимых различий между контрольной и опытной группами (табл. 1). Через 3 нед моделирования УН, в опытной группе наблюдался выраженный рост концентрации ММП-2 в моче – в 53,9 раза относительно исходного уровня ($p < 0,001$). При этом концентрация ММП-2 в моче интактных крыс (контрольная группа) на 21-е сут эксперимента оставалась неизменной в сравнении с исходным уровнем. В результате величина показателя к концу эксперимента в опытной группе была выше, чем в контрольной, в 87,6 раза ($p < 0,001$).

Аналогичная картина характеризовала динамику уровня почечной экскреции ММП-2 (табл. 1). У интактных животных этот показатель не изменялся. В подопытной группе после 3 нед моделирования УН наблюдался выраженный рост почечной экскреции ММП-2 относительно исходного уровня – в 112,1 раза ($p < 0,001$). Как следствие, межгрупповое различие данного показателя возросло в 163,8 раза ($p < 0,001$).

В гомогенате почечной ткани на 21-е сут эксперимента уровень концентрации ММП-2 в подопытной группе был статистически значимо выше, чем у интактных крыс (в 1,1 раза, $p = 0,011$).

Параллельно были зафиксированы характерные изменения показателей активности процесса свободнорадикального окисления в почках крыс экспериментальных групп (табл. 2). Концентрация ТБРП и ОПА в подопытной группе после 3 нед моделирования УН превышали уровень контрольной группы в 4,6 раза ($p < 0,001$) и в 1,2 раза ($p = 0,025$) соответственно. Кроме того, в подопытной группе происходило снижение активности КАТ относительно интактных крыс в 2,3 раза ($p = 0,001$) и увеличение активности ГПО в 1,1 раза ($p = 0,007$). Морфологические исследования показали, что у интактных животных микроскопическая картина почек соответствовала гистологической норме. Уратные депозиты выявлены не были (рис. 1, а). В подопытной группе после 3 нед моделирования УН депозиты были выявлены в 9 из 9 (100 %) случаев. Микролиты различной формы, синеватого цвета отмечали в корковом слое и сосочке почки. Они преимущественно были расположены в кистозно-расширенных почечных канальцах, среди клеточного детрита и клеток воспаления. Эпителий кистозно-расширенных канальцев выглядел уплощенным, ядра клеток уменьшены в размере (рис. 1, б). В строме признаки воспалительного процесса, в воспалительном инфильтрате преобладали нейтрофилы. Количество депозитов в поле зрения в среднем составило $2,5 \pm 0,3$, средняя площадь депозитов – $951,6 \pm 253,8$ мкм².

Таблица 1/ Table 1

Показатели концентрации матричной металлопротеиназы-2 в моче и гомогенате почек, уровня экскреции матричной металлопротеиназы-2 с мочой у крыс экспериментальных групп

Indicators of the concentration of matrix metalloproteinase-2 in urine and kidney homogenate, the level of excretion of matrix metalloproteinase-2 in urine in rats of experimental groups

	Концентрация ММП-2 в моче (нг/мл) Urinary MMP-2 concentration (ng/ml)		Экскреция ММП-2 с мочой (нг/сутки) Urinary excretion of MMP-2 (ng/day)		Концентрация ММП-2 в гомогенате почек (нг/ммоль) MMP-2 concentration in renal homogenate (ng/mol)	
	Контроль Control	Опыт experience	Контроль Control	Опыт experience	Контроль Control	Опыт experience
И/у	1,1 (0,7;1,2)	1,3 (0,4;13,3)	3,7 (1,8;6,1)	12,9 (2,7;23,9)	-	-
21-е сут 21 day	0,8 (0,6;43,3)	70,1 (59,6;77,1) $p_{н/у} < 0,001$ $p_k < 0,001$	7,0 (2,4;662,5)	1446,5 (1186,3;2189,0) $p_{н/у} < 0,001$ $p_k < 0,001$	142,8 (139,8;151,1)	156,4 (153,1;164,1) $p_k = 0,011$

Примечание. И/у – исходный уровень, $p_{н/у}$ – показатель статистической значимости различий показателя на 21-е сут в сравнении с исходным уровнем, p_k – показатель статистической значимости различий показателя в подопытной группе в сравнении с контрольной группой.
Note. И/у – the baseline level, $p_{н/у}$ – an indicator of the statistical significance of the differences in the indicator for 21 days in comparison with the baseline level, p_k – an indicator of the statistical significance of the differences in the experimental group in comparison with the control group. MMP2 – matrix metalloproteinase 2.

Таблица 2/ Table 2

Показатели активности процесса свободнорадикального окисления в почках крыс экспериментальных групп

Indicators of the activity of the process of free radical oxidation in the kidneys of rats of experimental groups

Группа Group	ТБРП (мг/ммоль)	ОПА (%)	ОАА (%)	КАТ (%)	ГПО (%)
Контрольная Control	1,3 (1,0;2,1)	75,9 (66,0;85,6)	61,8 (31,8;64,5)	86,5 (73,2;91,1)	35,1 (30,9;37,9)
Подопытная Experimental	6,0 (3,7;7,0) $p_k < 0,001$	88,0 (82,9;90,7) $p_k = 0,025$	51,8 (45,8;59,8)	37,3 (6;6;78,3) $p_k = 0,001$	40,1 (36,3;44,0) $p_k = 0,007$

Примечание. p_k – показатель статистической значимости различий показателя в подопытной группе в сравнении с контрольной группой. ТБРП – тиобарбитуратреактивные продукты; ОПА – общая прооксидантная активность; ОАА – общая антиоксидантная активность; КАТ – каталаза; ГПО – глутатионпероксидаза.

Note. p_k is an indicator of the statistical significance of the differences in the indicator in the experimental group in comparison with the control group. ТБРП – thiobarbiturate reactive products; ОПА – total prooxidant activity; ОАА – total antioxidant activity; КАТ – catalase; ГПО – glutathione peroxidase.

Обсуждение

У всех крыс подопытной группы развивался уратный нефролитиаз, что подтверждалось характерными морфологическими признаками: воспалительные изменения и формирование крупных депозитов в почках. Это было ожидаемо, т.к. данная методика ранее нами уже была успешно воспроизведена в нескольких экспериментах [16,17]. В почках животных подопытной группы были зафиксированы выраженные изменения активности ММП-2 – концентрация фермента в моче и гомогенате почек, а также его экскреция с мочой

многократно возрастали за 3 нед моделирования УН. Известно, что одним из мощных факторов активации ММП является оксидативный стресс [7, 18]. Согласно полученным в настоящем исследовании результатам, в почках крыс с экспериментальным уратным нефролитиазом происходило значительное увеличение активности процессов свободнорадикального окисления. Об этом, в первую очередь, свидетельствовал рост концентрации в почках ТБРП и увеличение ОПА. Как известно, ТБРП – биохимический маркер накопления малонового диальдегида, который является основным продуктом перекисного окисления мембранных фос-

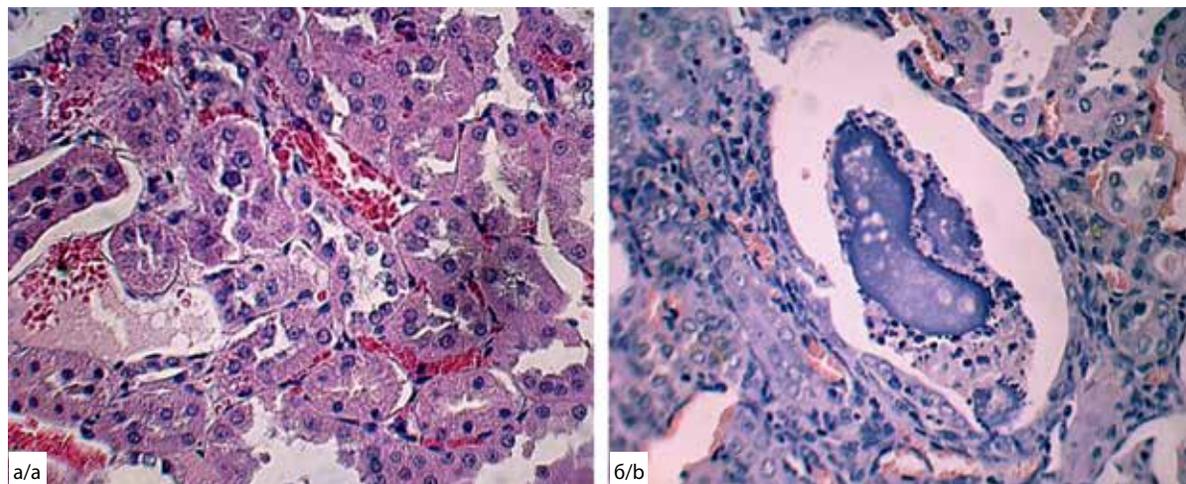


Рис. Гистологическая картина тканей почек крыс экспериментальных групп.

a – почка крысы контрольной группы. Тканевые структуры в состоянии гистологической нормы. Уратные депозиты не выявляются. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400; б – крупные уратные депозиты в канальцах почек крыс подопытной группы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400.

Fig. Histological picture of kidney tissues of rats of experimental groups.

a – a kidney of a control group rat. The tissues are in a state of histological norm. Urate deposits are not detected. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification 400; b – large urate deposits in the renal tubules of rats of the experimental group. Stained with hematoxylin and eosin. Magnification 400.

фолипидов [19]. При этом ОПА – это интегративный показатель прооксидантов и свободно-радикальных метаболитов, в связи с чем его рост указывает на усиление процессов окисления и истощение защитных антиоксидантных механизмов [20]. Кроме того, у в почках крыс подопытной группы наблюдалось увеличение активности ГПО и снижение активности КАТ, что также логично вписывается в картину развивающегося оксидативного повреждения почек [20].

Таким образом, можно предположить, что на фоне моделирования нефролитиаза активировались процессы СРО, вызвавшее активацию ММП-2. Это, учитывая хорошо известную функцию ММП-2, привело к повреждению структур и развитию воспалительного процесса в канальцах почек крыс [7]. В результате создались условия для преципитации кристаллов мочевой кислоты в очагах повреждения с последующим формированием крупных депозитов – конкрементов.

Закключение

В проведенном исследовании впервые обсуждается возможная роль активации ММП-2 в почках в патогенезе уратного нефролитиаза. Разумеется, для получения более подробной и информативной картины участия ММП-2 в уратном литогенезе понадобятся дополнительные исследования. Тем не менее, поскольку применение ингибиторов ММП в настоящее время

является одной из современных стратегий коррекции почечных патологий, ассоциированных с активацией ММП [21], фармакологическая модуляция активности ММП-2 в почках может стать перспективным направлением поиска патогенетически обоснованных методов медикаментозного лечения мочекаменной болезни.

Литература

(п.п. 1; 3– 6; 8; 10; 11; 18; 19; 21 см. References)

- Каприн А.Д., Костин А.А., Иваненко К.В., Попов С.В. Современные исследования эффективности цитратной терапии уратного нефролитиаза в России. *Медицинский совет*. 2017; 11: 176-80.
- Шадрин А.С., Терешкина И.В., Плиева Я.З., Кушлинский Д.Н., Уткин Д.О., Морозов А.А., Филипенко М.Л., Кушлинский Н.Е. Матриксные металлопротеиназы: структура, функции и генетический полиморфизм. *Патогенез*. 2017; 15(2): 14-23.
- Жариков А.Ю., Зверев Я.Ф., Брюханов В.М., Лампатов В.В. Механизм формирования кристаллов при оксалатном нефролитиазе. *Нефрология*. 2009; 13(4): 37-50.
- Перфильев В.Ю., Зверев Я.Ф., Жариков А.Ю., Брюханов В.М. Роль свободнорадикального окисления в развитии экспериментальной уратной нефропатии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 163(1): 36-9.
- Перфильев В.Ю., Зверев Я.Ф., Жариков А.Ю., Условия развития уратного нефролитиаза и подходы к его моделированию. *Нефрология*. 2017; 21(4): 48-54.
- Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Лампатов В.В. Жариков А.Ю., Талалаева О.С. *Методы доклинического (экспериментального)*

- исследования влияния лекарственных средств на функцию почек. Новосибирск; Гео; 2013.
15. Хафизьянова Р.Х., Бурыкин И.М., Алеева Г.Н. *Математическая статистика в экспериментальной и клинической фармакологии*. Казань; Медицина; 2006.
 16. Кальницкий А.С., Жариков А.Ю., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Бобров И.П. Молекулярные особенности нефропатии, ассоциированной с нарушением уратного обмена. *Молекулярная медицина*. 2021; 19(5): 46-50.
 17. Жариков А.Ю., Кальницкий А.С., Жарикова Г.В., Мазко О.Н., Макарова О.Г. Особенности соотношения активности лактатдегидрогеназы и γ -глутамилтрансферазы в моче как специфический диагностический признак уратного нефролитиаза (экспериментальное наблюдение). *Технологии живых систем*. 2021; 18(4): 44-9.
 20. Филинова С.О., Жариков А.Ю., Мазко О.Н., Макарова О.Г., Баландович Б.А. Показатели прооксидантного и антиоксидантного статусов в почках крыс при экспериментальном сахарном диабете. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(1): 124-27.
- ### References
1. Sakhaee K. Epidemiology and clinical pathophysiology of uric acid kidney stones. *J. Nephrol.* 2014; 27: 241–45.
 2. Kaprin A.D., Kostin A.A., Ivanenko K.V., Popov S.V. Modern studies of the effectiveness of citrate therapy for urate nephrolithiasis in Russia. *Meditsinskiy sovet*. 2017; 11: 176-80. (in Russian)
 3. Malemud C.J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci.* 2006; 11: 1696-701.
 4. Narula S., Tandon C., Tandon S. Role of Matrix Metalloproteinases in Degenerative Kidney Disorders. *Curr Med Chem.* 2018; 25(15): 1805-16.
 5. Wu Y., Zhang J., Li C., Hu H., Qin B., Wang T., Lu Y., Wang S. The Activation of ROS/NF- κ B/MMP-9 Pathway Promotes Calcium-Induced Kidney Crystal Deposition. *Oxid Med Cell Longev.* 2021; 2021:8836355.
 6. Mehde A.A., Mehdi W.A., Yusof F., Raus R.A., Zainal Abidin Z.A., Ghazali H., Abd Rahman A. Association of MMP-9 gene polymorphisms with nephrolithiasis patients. *J Clin Lab Anal.* 2018; 32(1): 22173.
 7. Shadrina A.S., Tereshkina I.V., Plieva Ja.Z., Kushlinskij D.N., Utkin D.O., Morozov A.A., Filipenko M.L., Kushlinskij N.E. Matrix metalloproteinases: structure, functions and genetic polymorphism. *Patogenez.* 2017; 15(2): 14-23. (in Russian)
 8. Cheng S., Pollock A.S., Mahimkar R., Olson J.L., Lovett D.H. Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury. *FASEB J.* 2006; 20(11): 1898-900.
 9. Zharikov A.Yu., Zverev Ya.F., Bryukhanov V.M., Lampatov V.V. The mechanism of crystal formation in oxalate nephrolithiasis. *Nefrologiya.* 2009; 13(4): 37-50. (in Russian)
 10. Ali M.A., Schulz R. Activation of MMP-2 as a key event in oxidative stress injury to the heart. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009; 14(2): 699-716.
 11. Ali M.M., Mahmoud A.M., Le Master E., Levitan I., Phillips S.A. Role of matrix metalloproteinases and histone deacetylase in oxidative stress-induced degradation of the endothelial glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2019; 316(3): H647-H663.
 12. Perfilov V.Yu., Zverev Ya.F., Zharikov A.Yu., Bryukhanov V.M. The role of free radical oxidation in the development of experimental urate nephropathy. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2017; 163(1): 36-9. (in Russian)
 13. Perfilov V.Yu., Zverev Y.F., Zharikov A.Yu. Conditions of urate nephrolithiasis and approaches to its modeling. *Nefrologiya.* 2017; 21(4): 48-54. (in Russian)
 14. Bryukhanov V.M., Zverev Ya.F., Lampatov V.V., Zharikov A.Yu., Talalaeva O.S. *Methods of preclinical (experimental) study of the effect of drugs on renal function. [Metody doklinicheskogo (eksperimental'nogo) issledovaniya vliyaniya lekarstvennykh sredstv na funktsiyu pochek]*. Novosibirsk: Geo; 2013. (in Russian)
 15. Khafizyanova R.Kh., Burikin I.M., Aleeva G.N. *Mathematical statistics in experimental and clinical pharmacology. [Matematicheskaya statistika v eksperimental'noy i klinicheskoy farmakologii]*. Kazan; Meditsina; 2006. (in Russian)
 16. Kalnitsky A.S., Zharikov A.Yu., Mazko O.N., Makarova O.G., Bobrov I.P. Molecular features of nephropathy associated with disorder of urate metabolism. *Molekulyarnaya meditsina.* 2021; 19(5): 46-50. (in Russian)
 17. Zharikov A.Yu., Kalnitsky A.S., Zharikova G.V., Mazko O.N., Makarova O.G. Features of the ratio of the activity of lactate dehydrogenase and γ -glutamyltransferase in urine as a specific diagnostic sign of urate nephrolithiasis (experimental observation). *Tekhnologii zhivyykh sistem.* 2021; 18(4): 44-9. (in Russian)
 18. Cui N., Hu M., Khalil R.A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* 2017; 147: 25-9.
 19. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem.* 2017; 524: 13-30.
 20. Filinova S.O., Zharikov A.Yu., Mazko O.N., Makarova O.G., Balandovich B.A. Indicators prooxidant and antioxidant status in kidneys of rats with experimental diabetes. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2020; 64(1): 124-7. (in Russian)
 21. Wozniak J., Floege J., Ostendorf T., Ludwig A. Key metalloproteinase-mediated pathways in the kidney. *Nat Rev Nephrol.* 2021; 17(8): 513-27.

Сведения об авторах:

Жариков Александр Юрьевич, доктор биол. наук, доцент, проректор по научной работе и инновациям, зав. каф. фармакологии имени профессора В.М. Брюханова ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России;

Кальницкий Артем Сергеевич, аспирант каф. фармакологии им. проф. В.М. Брюханова ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России;

Мазко Олеся Николаевна, канд. биол. наук, доцент, директор Института фармации, доцент каф. фармакологии им. проф. В.М. Брюханова ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России;

Макарова Олеся Геннадьевна, канд. фармацевт. наук, доцент, заместитель директора Института фармации, доцент кафедры фармакологии имени профессора В.М. Брюханова ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России;

Бобров Игорь Петрович, доктор мед. наук, проф. каф. судебной медицины им. проф. В.Н. Крюкова и патологической анатомии с курсом ДПО ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России;

Жарикова Ганна Викторовна, канд. биол. наук, доцент каф. биологической химии, клин. лаб. диагностики ФГБОУ ВО АГМУ Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 612.015.3:547.857–08:616.617–003.7

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

Патогенез дисфункции мочеточника и компенсаторные механизмы трафика мелких конкрементов: роль пуринергической сигнализации

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

Цель исследования – определение роли пуриновых P2X₁-, P2Y-рецепторов и аденозинового A2A-рецептора в патогенезе дисфункции мышечной оболочки и развитии компенсаторных механизмов, обеспечивающих трафик мелких конкрементов в средней трети мочеточника.

Методика. Исследование включало 58 пациентов, получавших стандартную литокинетическую терапию в связи с локализацией мелких конкрементов (≤ 6 мм) в средней трети мочеточника. По данным визуализационного контроля когорты больных распределили на две группы: с эффективной (1-я группа) и неэффективной (2-я группа) элиминацией конкрементов. Анализ функциональной активности рецепторов, модулирующих перистальтику мочеточника, выполнили *in vitro* на суспензии тромбоцитов. Использовали агонисты: АТФ, АДФ, аденозин (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия) в концентрациях EC₅₀, вызывающих агрегацию на уровне 50% у здоровых лиц. Оценку агрегации тромбоцитов проводили турбидиметрическим методом на анализаторе ChronoLog (США).

Результаты. На этапе госпитализации у пациентов обеих групп выявлена нормореактивность пуриновых P2 и P1 рецепторов. Через 4-6 сут ЛКТ в 1-й группе появлялась гиперреактивность P2X₁- и P2Y-рецепторов, реактивность A2A-рецептора сохранялась на уровне нормореактивности; через 7-9 сут в процессе элиминации конкрементов наблюдался прирост активности P2X₁-рецептора ($p < 0,001$). Данный кластер активности пуриновых рецепторов может обеспечить усиление сократительной активности гладкомышечных клеток при сохранении их базальной релаксации, что, вероятно, является оптимальным для трафика мелких конкрементов в средней трети мочеточника. Во 2-й группе в течение 4-6 сут на фоне нормореактивности P2X₁-рецептора возрастала активность P2Y-рецепторов и A2A-рецептора; кластер активности рецепторов не изменился через 7-9 сут. Следовательно, для эффективной элиминации мелких конкрементов характерна гиперреактивность P2X₁-рецептора и нормореактивность A2A-рецептора, при неэффективной – нормореактивность P2X₁-рецептора и гиперреактивность A2A-рецептора. Повышение активности A2A-рецептора может быть фактором риска нарушения трафика мелких конкрементов в средней трети мочеточника вследствие ограничения сократительной активности мышечной оболочки.

Заключение. При локализации мелких конкрементов в средней трети мочеточника выявленные особенности пуринергической сигнализации могут трактоваться как свидетельство модуляции внутриклеточного уровня Ca²⁺ в гладкомышечных клетках, позволяющей оптимизировать фазы сокращения и расслабления мышечной оболочки мочеточника.

Ключевые слова: нефролитиаз; патогенез дисфункции мочеточника; трафик мелких конкрементов; пуриновые рецепторы

Для цитирования: Баринов Э.Ф., Малинин Ю.Ю., Григорян Х.В. Патогенез дисфункции мочеточника и компенсаторные механизмы трафика мелких конкрементов: роль пуринергической сигнализации. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(3): 129-136.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.129-136

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

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

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 24.03.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

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

Pathogenesis of ureteral dysfunction and compensatory mechanisms of small stone passage: the role of purinergic signalingGorky Donetsk National Medical University,
Donetsk, Ukraine, Donetsk People's Republic**Aim:** To establish the roles of purine P2X1 and P2Y receptors and the adenosine A2A-receptor in the pathogenesis of muscular dysfunction and the formation of compensatory mechanisms that propel small stones from the middle third of the ureter.**Methods.** The study included 58 patients who underwent standard lithokinetic therapy (LKT) due to the localization of small calculi (≤ 6 mm) in the middle third of the ureter. According to the imaging data, the patients were divided into two groups: Group 1 with effective and Group 2 with ineffective elimination of calculi. The study of receptor activity that modulate the ureteral motility was performed *in vitro* on platelet suspensions. The following agonists were used: ATP, ADP, and adenosine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) at concentrations causing 50% platelet aggregation in healthy individuals (EC_{50}). Platelet aggregation was assessed by the turbidimetric method on a ChronoLog analyzer (USA). Statistical analysis was carried out using the MedCalc package.**Results.** At hospitalization, normoreactivity of purine P2 and P1 receptors was observed in patients of both groups. After 4-6 days of LKT, hyperreactivity of P2X1 and P2Y receptors developed in Group 1, but the reactivity of the A2A receptor remained normal. After 7-9 days during the process of calculus elimination, the P2X1 receptor activity was increased ($p < 0.001$). This activity of purine receptors can provide an increase in the contractile activity of smooth muscle cells while maintaining their basal relaxation. This is probably optimal for the small stone passage in the middle third of the ureter. In Group 2, during 4-6 days, the P2X1 receptor reactivity remained normal, but the activity of the P2Y receptor and the A2A receptor increased. This receptor activity did not change after 7-9 days. Therefore, the effective elimination of small calculi is associated with the hyperreactivity of the P2X1 receptor and the normoreactivity of the A2A receptor, whereas ineffective elimination is characterized by the normoreactivity of the P2X1 receptor and hyperreactivity of the A2A receptor. An increased activity of the A2A receptor may be a risk factor for stopping the small stone passage in the middle third of the ureter due to the restricted contractile activity of the muscle layer.**Conclusion.** When small calculi are localized in the middle third of the ureter, the changes in purinergic signaling can be interpreted as evidence of intracellular Ca^{2+} modulation in smooth muscle cells, which allows optimization of contraction and relaxation phases of the ureter muscle layer.**Keywords:** nephrolithiasis; pathogenesis of ureteral dysfunction; small stones passage; purine receptors**For citation:** Barinov E.F., Malinin Y.Yu., Grigoryan Kh.V. Pathogenesis of ureteral dysfunction and compensatory mechanisms of small stone passage: the role of purinergic signaling. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(3) 129-136. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.129-136

Author's contribution: Barinov E.F. – research concept and design, integrated analysis of the data obtained, editing of the manuscript; Malinin Yu.Yu. – set of clinical material, statistical analysis of the results, text writing; Grigoryan Kh.V. – laboratory research, statistical data processing.**For correspondence:** Edward F. Barinov, Doctor of Medical Sciences, Prof., head of the department the Histology, Cytology and Embryology, «State educational organization of higher professional education M. Gorky Donetsk National Medical University», 83003 Donetsk, e-mail: barinov.ef@gmail.com**Financing.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.**Information about the authors:**Barinov E.F., <https://orcid.org/0000-0002-8070-2242>Malinin Y.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-7809-5260>Grigoryan Kh.V., <https://orcid.org/0000-0001-5183-7650>

Received 24.03.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Ограниченность теоретических знаний, касающихся механизмов элиминации конкрементов из мочеточника, сдерживает совершенствование литокинетической терапии (ЛКТ). Логично предположить, что эффективность элиминации конкрементов зависит от особенностей регуляции перистальтики мочевыводящих путей (МВП) при траффике конкрементов разных размеров. Так, при наличии средних (10–20 мм) и крупных (>20 мм) конкрементов, когда воспроизводится полная обтурация просвета мочеточника, необходимо достигать максимальной релаксации гладкомышечных клеток (ГМК) в стенке мочеточника, тогда как траффик мелких конкрементов (≤ 6 мм) требует фазного усиления сократительной активности мышечной оболочки МВП. Последнее достигается как адренергическими, так и неадренергическими механизмами, модулирующими перистальтику мочеточника [1]. Особый интерес вызывают пуриновые нуклеотиды, эндотелины и метаболиты арахидоновой кислоты, которые участвуют в миогенной регуляции перистальтики мочеточника. Нуклеотидные рецепторы P2 и нуклеозидные рецепторы P1, а также эктонуклеотидазы являются важными компонентами пуринергической сигнализации в ГМК [2]. P2X₁-рецепторы экспрессируются на ГМК мочевыводящих путей [3], причем молекула АТФ участвует в модуляции фаз сокращения и расслабления ГМК [4]. Стимуляция P2Y-рецепторов вызывает повышение тонуса гладкомышечной ткани мочевого пузыря [5]. Идентифицировано несколько рецепторов аденозина, участвующих в релаксационной реакции ГМК мочевого пузыря [6]. Вызванная аденозином гиперполяризация мембраны и расслабление гладкой мускулатуры мочевыводящих путей опосредованы A2A-рецептором и активацией K⁺-каналов посредством аденилатциклазы-цАМФ [7]. Приведенные факты свидетельствуют, что пуринергическая сигнализация может способствовать элиминации мелких конкрементов, участвуя в компенсаторных реакциях, регулирующих сокращение-расслабление ГМК.

Цель исследования – определение роли пуриновых P2X₁-, P2Y-рецепторов и аденозинового A2A-рецептора в патогенезе дисфункции мышечной оболочки и становлении компенсаторных механизмов, обеспечивающих траффик мелких конкрементов из средней трети мочеточника.

Методика

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004) и письменного добровольного информированного согласия всех паци-

ентов. Работа одобрена этическим комитетом университета. В исследование включено 58 пациентов с визуализационными признаками мелких (≤ 6 мм) конкрементов в средней трети мочеточника. Пациентам на этапе госпитализации проведено комплексное клиническое обследование по традиционной схеме принятой для диагностики нефролитиаза (жалобы, сбор анамнеза, физикальный осмотр, клинико-инструментальные исследования, ультразвуковое обследование и компьютерная томография почек, микробиологический посев мочи, лабораторные исследования крови и мочи). Стандартная литокинетическая терапия (ЛКТ) включала нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), спазмолитики, антибиотики. Когорта больных распределена на две группы: с эффективной элиминацией конкрементов – 48 пациентов (1-я группа), у которых по данным визуализационного контроля в течение 9 сут произошло перемещение конкремента из средней трети мочеточника в его нижнюю треть, интрамуральный отдел или просвет мочевого пузыря; а также с неэффективной элиминацией конкремента – 10 пациентов (2-я группа), у которых локализация конкремента сохранялась в пределах средней трети мочеточника на протяжении 10 сут. Средний размер конкремента составил в 1-й группе $4,65 \pm 1,0$ мм (min-max 2,0–6,0 мм), во 2-й группе – $4,20 \pm 1,2$ мм (min-max 1,0–6,0 мм); межгрупповых различий размера не выявлено ($p > 0,05$).

Протокол исследования агрегационной способности тромбоцитов (Тц) соответствует Европейским рекомендациям по стандартизации агрегатометрии [8]. Оценку агрегации Тц (АТц) проводили турбидиметрическим методом на анализаторе ChronoLog (США). Тромбоциты больных использовали в качестве модели для оценки функциональной активности пуриновых P2X₁-, P2Y-рецепторов (P2Y₁-, P2Y₁₂) и аденозинового A2A-рецептора. В исследовании использовали агонисты соответствующих рецепторов: АТФ и АДФ и аденозин (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия) в концентрациях EC₅₀, вызывающих амплитуду агрегации 50% у здоровых лиц. Статистический анализ осуществлялся с использованием пакета MedCalc 18.10.2. Во всех случаях отличие считалось статистически значимым при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Частота элиминации мелких конкрементов из средней трети мочеточника через 1–3 сут, 4–6 сут и 7–9 сут ЛКТ составила соответственно 5 (8,6%), 13 (22,5%) и 30 (51,7%) случаев. Неэффективная элиминация имела место у 10 (17,2%) пациентов.

Исследовательский вопрос – отличается ли активность P2X₁-рецептора при эффективной и неэффективной элиминации мелких конкрементов из средней трети мочеточника? На этапе госпитализации (до начала ЛКТ) у пациентов 1-й группы выявлена нормореактивность P2X₁-рецептора, тогда как во 2-й группе – его гипореактивность (табл. 1). В процессе ЛКТ у пациентов 1-й группы отмечено постепенное повышение функциональной активности P2X₁-рецептора. Максимальный прирост активности рецептора (на 33,5%; $p < 0,001$ по сравнению с исходными данными на этапе госпитализации) отмечен во временном интервале 7-9 сут ЛКТ, когда элиминация конкрементов была подтверждена у 30 (62,5%) пациентов 1-й группы. Необходимо отметить, что у 13 (27,1%) пациентов с подтвержденной элиминацией конкрементов через 4-6 сут также имела место гиперреактивность P2X₁-рецептора (62,5±0,6%; 95%ДИ 61,1-63,8%). Данный факт позволяет рассматривать повышение активности P2X₁-рецептора как стереотипную реакцию, обеспечивающую усиление сократительной активности мышечной оболочки в средней трети мочеточника.

Во 2-й группе максимальное повышение активности P2X₁-рецептора (на 23,2%; $p < 0,001$ по сравнению с исходными данными) имело место в интервале 1-3 сут ЛКТ. Установившийся диапазон нормореактивности данного рецептора сохранялся на протяжении всего периода наблюдения. На 7-9 сут активность P2X₁-рецептора во 2-й группе была на 25,0% ($p < 0,001$) меньше, чем

в 1-й группе. На основании полученных фактов можно констатировать, что пуринергическая сигнализация, посредством стимуляции P2X₁-рецептора, участвует в компенсаторной реакции мышечной оболочки, обеспечивающей трафик мелких конкрементов в средней трети мочеточника. Значимость такой модуляции в усилении сократительной активности мочеточника подтверждается следующими фактами. Во-первых, гипоксия/ишемия тканей мочевыводящих путей (МВП) сопровождается высвобождением АТФ из клеток и повышением экспрессии P2X-рецепторов на ГМК [9]. Молекулы АТФ секретируются из эфферентных нервных окончаний вместе с норадреналином и могут усиливать сократительную активность мочеточника независимо от стимуляции α₁-адренорецептора [10]. Во-вторых, стимуляция P2X-рецептора сопровождается деполяризацией и сокращением ГМК; в тоже время АТФ имеет решающее значение для инициации потенциалов действия в афферентных нервах [11]. В третьих, АТФ-чувствительные каналы (KIR6.2) могут модулировать релаксацию ГМК [12], а, следовательно, имеется потенциальная возможность координации фаз сокращения и расслабления мышечной оболочки мочеточника.

Известно, что при повышении уровня внеклеточного АТФ усиливается процесс гидролиза пуриновых нуклеотидов посредством эктонуклеотидазы (CD39), в результате чего образуется АДФ [13]. Применительно к анализу пуринергической регуляции перистальтики

Таблица 1/Table 1

Активность пуринового P2X₁-рецептора при эффективной (1-я группа) и неэффективной (2-я группа) элиминации мелких конкрементов из средней трети мочеточника на фоне стандартной ЛКТ
Purine P2X1 receptor activity in effective (Group 1) and ineffective (Group 2) elimination of small concretions from the middle third of the ureter with standard LCT

Период исследования Research period	Функциональная активность P2X ₁ -рецептора Functional activity of the P2X1 receptor			
	1-я группа (n=48) Group 1		2-я группа (n=10) Group 2	
	X±m	Min–Max	X±m	Min–Max
До ЛКТ Before LCT	48,3±0,3	45,0-52,0	42,3±1,3 $p_{1,2} < 0,001$	31,0-45,0
1-3 суток ЛКТ 1-3 days LCT	54,5±0,5*** (n=48)	46,0-60,0	52,1±0,7*** $p_{1,2} < 0,001$	57,0-68,0
4-6 суток ЛКТ 4-6 days LCT	59,3±0,4*** (n=43)	55,0-66,0	53,3±0,7 $p_{1,2} < 0,001$	51,0-56,0
7-9 суток ЛКТ 7-9 days LCT	64,5±0,6*** (n=30)	58,0-69,0	48,4±0,7*** $p < 0,001$	45,0-52,0

Примечание. *** – статистическая значимость различий относительно предыдущего срока наблюдения $p < 0,001$; $p_{1,2}$ – статистическая значимость различий между 1-й и 2-й группой.

Note. *** – statistical significance of differences relative to previous observation period $p < 0,001$; $p_{1,2}$ – statistical significance of differences between Group 1 and Group 2.

мочеточника при нефролитиазе, важным представляется сопоставление активности P2X₁-рецептора и P2Y-рецептора, с учетом возможности их взаимодействия при повышении сократительной активности ГМК [14].

Исследовательский вопрос – изменяется ли активность P2Y-рецепторов при траффике мелких конкрементов в средней трети мочеточника? На этапе госпитализации до начала ЛКТ у пациентов обеих групп выявлена нормореактивность P2Y-рецепторов (табл. 2). В 1-й группе нормореактивность P2Y-рецепторов сохранялась в раннем периоде (1-3 сут) ЛКТ и сменялась их гиперреактивностью, начиная с 4-х сут консервативного лечения. Прирост активности через 4-6 сут ЛКТ составил 10,0% и через 7-9 сут – 10,9% ($p < 0,001$), что отражает достижение стационарного уровня пуринового метаболизма. Во 2-й группе через 1-3 сут ЛКТ обнаружена гиперреактивность P2Y-рецепторов, причем их активность превышала таковую в 1-й группе на 14,9% ($p < 0,001$). Более высокий уровень активности P2Y-рецепторов у пациентов 2-й группы имел место через 4-6 сут и 7-9 сут, когда межгрупповая разница достигала, соответственно, 18,6% и 17,6% ($p < 0,001$).

Следовательно, при неэффективной элиминации конкрементов стационарный уровень гидролиза АТФ, хотя и на более высоком уровне, также устанавливался на 4-е сут ЛКТ. Остается вопрос – имеется ли связь между повышением активности P2Y-рецепторов и траф-

фиком мелких конкрементов в мочеточнике, тем более, что гиперреактивность P2Y-рецепторов выявлена в обеих группах, начиная с 4-х суток? В определенной степени ответом на этот вопрос могут быть результаты анализа взаимосвязи между активностью пуриновых P2X₁- и P2Y-рецепторов. Установлено, что через 7-9 сут в 1-й и 2-й группах сила корреляционной связи отличалась, соответственно, $r_{P2X_1-P2Y} = 0,375$ и $r_{P2X_1-P2Y} = 0,611$ ($p < 0,05$). Можно предположить, что при неэффективной элиминации конкрементов взаимодействие пуринергических рецепторов способствовало критическому повышению уровня внутриклеточного Ca²⁺ для которого характерно усиление базального тонуса (гипертонус) мышечной оболочки мочеточника. На возможность синергии пуриновых P2-рецепторов указывают [15], причем следствием такого взаимодействия было длительное повышение тонуса гладкомышечной ткани мочевого пузыря. При эффективной элиминации слабая сила связи между активностью P2X₁- и P2Y-рецепторов может отражать ограничение функции эктонуклеотидазы (CD39), позволяющее поддерживать высокий уровень внеклеточного АТФ.

Гипотеза – можно предположить, что трансформация пуриновых нуклеотидов в стенке МВП имеет конечной целью образование аденозина, который обладает антигипоксантным и противовоспалительным эффектом [16]. В этом случае повышение активности аденозино-

Таблица 2/ Table 2

Активность пуринового P2Y-рецепторов при эффективной (1-я группа) и неэффективной элиминации (2-я группа) мелких конкрементов из средней трети мочеточника на фоне стандартной ЛКТ

Purine P2Y receptor activity in effective (Group 1) and ineffective (Group 2) elimination of small concrements from the middle third of the ureter with standard LCT

Период исследования Research period	Функциональная активность P2Y-рецепторов Functional activity of the P2Y receptor			
	1-я группа (n=48) Group 1		2-я группа (n=10) Group 2	
	X±m	Min–Max	X±m	Min–Max
До ЛКТ Before LCT	53,2±0,4	50,0-58,0	48,5±0,3 $p_{1-2} < 0,001$	47,0-50,0
1-3 суток ЛКТ 1-3 days LCT	51,7±0,5* (n=48)	45,0-59,0	59,1±0,7*** $p_{1-2} < 0,001$	57,0-63,0
4-6 суток ЛКТ 4-6 days LCT	58,5±0,7*** (n=43)	50,0-66,0	69,4±0,5*** $p_{1-2} < 0,001$	67,0-71,0
7-9 суток ЛКТ 7-9 days LCT	59,0±0,8 (n=30)	51,0-67,0	69,4±0,4 $p < 0,001$	68,0-70,0

Примечание. * – статистическая значимость различий относительно предыдущего срока наблюдения $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$; p_{1-2} – статистическая значимость различий между 1-й и 2-й группой.

Note. * – statistical significance of differences relative to previous observation period $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$; p_{1-2} – statistical significance of differences between Group 1 and Group 2.

вых А2-рецепторов могло бы рассматриваться как компенсаторный механизм, направленный на снижение негативного влияния гипоксии/ишемии на мышечную оболочку мочеточника и ингибирование воспаления в МВП при нефролитиазе. Изменяется ли при этом перистальтика мочеточника и влияет ли стимуляция А2А-рецепторов на трафик мелких конкрементов не известно.

Исследовательский вопрос – отличается ли активность аденозинового А2А-рецептора при эффективной и неэффективной элиминации мелких конкрементов из средней трети мочеточника? До начала ЛКТ у пациентов 1-й группы с эффективной элиминацией конкрементов выявлена нормореактивность А2А-рецептора, которая сохранялась в этом диапазоне на протяжении 9 сут ЛКТ (табл. 3). Известно, что при стимуляции А2А-рецепторов развивается релаксация ГМК, связанная с активацией К⁺-каналов [17]. Считается, что внеклеточный аденозин противодействует эффектам активации пуриновых Р2-рецепторов; баланс между внеклеточным АТФ и аденозином регулируется главным образом активностью нуклеотидаз CD39 и CD73, которые формируют аденозинэргическую ось [18]. В этой связи сохранение нормореактивности Р2X₁-, Р2Y-рецепторов и А2А-рецепторов, отражает поддержание физиологического уровня пуринергической модуляции перистальтики при локализации мелких конкрементов в средней трети мочеточника.

Данный механизм, если судить по частоте элиминации мелких конкрементов, оказался малоэффективным для выведения конкрементов через 1-3 сут ЛКТ.

Через 4-6 сут ЛКТ обнаружено повышение активности Р2X₁-, Р2Y-рецепторов и сохранение нормореактивности А2А-рецептора. Представленный кластер активности рецепторов отражает: (а) повышение уровня внеклеточного АТФ; (б) включение адаптационной метаболической реакции с участием эктонуклеотидазы (CD39), направленной на гидролиз избытка АТФ; (в) сохранение стабильного физиологического уровня аденозина посредством взаимодействия нуклеотидазы (CD73) и аденозиндезаминазы. На этапе выведения конкрементов через 7-9 сут синхронно повышалась активность А2А-рецептора и Р2X₁-рецептора, соответственно, на 9,0% и 8,8% (*p* < 0,001) по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. При этом стимуляция А2А-рецептора оставалась в диапазоне нормореактивности; тогда как стимуляция Р2X₁-рецептора достигала максимального значения гиперреактивности. Применительно к случаям с доказанной элиминацией конкрементов, выявленные особенности пуринергической сигнализации могут трактоваться как свидетельство оптимальной модуляции внутриклеточного уровня Са²⁺ в ГМК, позволяющей координировать процесс сокращения и расслабления мышечной оболочки мочеточника. В литературе приводятся до-

Таблица 3/ Table 3

Активность аденозинового А2А-рецепторов при эффективной (1-я группа) и неэффективной элиминации (2-я группа) мелких конкрементов из средней трети мочеточника на фоне стандартной ЛКТ

Adenosine A2A receptor activity in effective (Group 1) and ineffective (Group 2) elimination of small concrements from the middle third of the ureter with standard LCT

Период исследования Research period	Функциональная активность А2А-рецептора Functional activity of the A2A receptor			
	1-я группа (n=48) Group 1		2-я группа (n=10) Group 2	
	X±m	Min–Max	X±m	Min–Max
До ЛКТ Before LCT	51,7±0,5 (n=48)	48,0–58,0	46,6±0,3 <i>p</i> ₁₋₂ <0,001	45,0–48,0
1-3 суток ЛКТ 1-3 days LCT	49,0±0,2*** (n=48)	45,0–52,0	58,8±1,1*** <i>p</i> ₁₋₂ <0,001	55,0–64,0
4-6 суток ЛКТ 4-6 days LCT	45,4±0,7*** (n=43)	35,0–55,0	68,2±0,6*** <i>p</i> ₁₋₂ <0,001	65,0–70,0
7-9 суток ЛКТ 7-9 days LCT	49,5±0,7*** (n=30)	41,0–56,0	69,3±0,8 <i>p</i> ₁₋₂ <0,001	66,0–73,0

Примечание. *** – статистическая значимость различий относительно предыдущего срока наблюдения *p* < 0,001; *p*₁₋₂ – статистическая значимость различий между 1-й и 2-й группой.

Note. *** – statistical significance of differences relative to previous observation period *p* < 0.001; *p*₁₋₂ – statistical significance of differences between Group 1 and Group 2.

казательства такой модуляции путем взаимодействия P2Y₁₂-рецептора и аденозинового A2B-рецептора; при этом ограничение сократимости стенки мочевого пузыря вызванное АТФ и АДФ обеспечивалось аденозином посредством аденилатциклазы-цАМФ [19].

У пациентов 2-й группы на этапе госпитализации выявлена нормореактивность A2A-рецептора, которая через 1-3 сут ЛКТ сменялась гиперреактивностью; за указанный период прирост активности данного рецептора составил 26,2% ($p < 0,001$) относительно исходных значений. В дальнейшем сохранилась тенденция к увеличению активности A2A-рецептора: через 4-6 сут прирост составил 46,3% и через 7-9 сут – 48,7% ($p < 0,001$) по сравнению с исходными значениями. Следовательно, при неэффективной элиминации мелких конкрементов активность аденозинового рецептора повышалась с момента начала ЛКТ, достигала «плато» на 4-е сут и оставалась на стабильном уровне гиперреактивности в течение 9 сут. Необходимо отметить, что у пациентов 2-й группы активность A2A-рецептора была выше, чем в 1-й группе: через 1-3 сут – на 20,0%, 4-6 сут – на 50,2% и 7-9 сут – на 40,0% ($p < 0,001$). Интегрируя полученные данные можно сформулировать основные закономерности пуринергической модуляции перистальтики при траффике мелких конкрементов в средней трети мочеточника. При эффективной элиминации – в первые трое суток ЛКТ поддерживалась нормореактивность пуриновых P1 и P2 рецепторов, которая с 4-х сут сменялась гиперреактивностью P2X₁-рецептора и P2Y-рецепторов при сохранении нормореактивности A2A-рецептора. При неэффективной элиминации в первые трое суток ЛКТ возникала гиперреактивность P2Y-рецепторов и A2A-рецептора и поддерживалась нормальность P2X₁-рецептора; в дальнейшем активность P2Y-рецепторов и A2A-рецептора возрастала, а нормореактивность P2X₁-рецептора сохранялась. Таким образом, при неэффективной элиминации: (а) основной причиной нарушения транспорта мелких конкрементов в интервале 4-9 сут является усиление пуринергической релаксации ГМК, вызванной стимуляцией A2A-рецепторов; (б) нормореактивность P2X₁-рецептора являлась фактором лимитирующим повышение сократительной активности мышечной оболочки мочеточника; (в) гиперреактивность P2Y-рецепторов не обеспечивала аддитивный эффект, который позволил бы увеличить силу сокращения ГМК.

Полученные результаты позволяют сформулировать концепцию патогенеза дисфункции мочеточника при наличии в его просвете мелких конкрементов. Вероятно, у части пациентов с нефролитиазом, вследствие низкой эффективности консервативной терапии, траффик

конкрементов происходит на фоне выраженной гипоксии/ишемии тканей мочеточника и наличии инфекции в МВП. При этом запускается защитная реакция организма связанная с интенсификацией метаболизма пуринов, конечной целью которой может быть повышение продукции аденозина и стимуляция A2-рецепторов. Одним из биологических эффектов данного типа рецепторов является уменьшение уровня Ca²⁺ в ГМК и снижение тонуса мышечной оболочки МВП. При длительном поддержании гиперреактивности A2A-рецептора включается петля отрицательной обратной связи, направленная на снижение метаболизма пуринов и ограничение активности P2X₁-рецептора. Подтверждением этого положения может быть наличие отрицательной корреляционной связи между активностью A2A-рецептора и P2X₁-рецептора ($r_{A2-P2X} = -0,601$; $p < 0,05$) во 2-й группе и отсутствие таковой в 1-й группе пациентов. Возможность влияния аденозинового A2A-рецептора на чувствительность пуриновых P2 рецепторов обсуждалась в литературе [20]. В результате возникающего дисбаланса содержания пуриновых нуклеотидов и нуклеозидов, возрастает уровень внеклеточного аденозина и воспроизводится выраженная релаксация ГМК. При этом нормореактивность P2X рецептора и гиперреактивность P2Y-рецептора не обеспечивают должного усиления сократительной активности мышечной оболочки, позволяющей удалять мелкие конкременты из просвета МВП. Иная ситуация складывается при эффективной элиминации мелких конкрементов. Наличие избытка АТФ, одновременная стимуляция P2X₁-и P2Y-рецепторов вызывают повышение уровня Ca²⁺ в ГМК и усиление сократительной активности мышечной оболочки, при этом сохраняющаяся физиологическая концентрация аденозина и нормореактивность A2A-рецептора поддерживают базальный уровень релаксации ГМК. Превалирование пуринергических механизмов, усиливающих сокращение мышечной оболочки, над аденозин-индуцированной релаксацией обеспечивает оптимальную модуляцию перистальтики для выведения мелких конкрементов из просвета мочеточника.

Дальнейшее исследование влияния пуриновых P1 и P2 рецепторов на цикл сокращение-расслабление гладкой мышечной ткани мочевыводящих путей позволит оценить перспективу использования соответствующих агонистов для совершенствования тактики консервативного лечения при расположении конкрементов в средней трети мочеточника.

Выводы:

1. При траффике мелких (≤ 6 мм) конкрементов в средней трети мочеточника изменяется активность

пуриновых P1 и P2 рецепторов, способных изменять содержание ионов Ca²⁺ в гладкомышечных клетках, что подтверждает участие пуринергической сигнализации в модуляции перистальтики мочевыводящих путей при нефролитиазе.

2. Эффективная элиминация мелких конкрементов воспроизводится на фоне гиперреактивности P2X₁-рецептора, P2Y-рецептора и нормореактивности аденозинового A2A-рецептора. Данный кластер активности пуриновых рецепторов может обеспечить усиление сократительной активности гладкомышечных клеток при сохранении их базальной релаксации, что, вероятно, является оптимальным для траффика мелких конкрементов в средней трети мочеточника.

3. Нарушение элиминации мелких конкрементов возникало у пациентов с нормореактивностью P2X₁-рецептора, гиперреактивностью P2Y-рецептора и A2A-рецептора.

Ключевым фактором патогенеза дисфункции мочеточника может быть повышение содержания аденозина, снижающего уровень внутриклеточного Ca²⁺ в гладкомышечных клетках; при этом возникающее нарушение взаимодействия актиновых и миозиновых филаментов ограничивает сократительную активность мышечной оболочки мочеточника, обеспечивающей траффик мелких конкрементов.

Литература/References

1. Guan N.N., Gustafsson L.E., Svennersten K. Inhibitory Effects of Urothelium-related Factors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2017; 121(4): 220-4. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12785>
2. Kishore BK, Robson SC, Dwyer KM. CD39-adenosinergic axis in renal pathophysiology and therapeutics. *Purinergic Signal.* 2018; 14(2): 109-20. <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9596-x>
3. Marucci G., Dal Ben D., Buccioni M., Marti Navia A., Spinaci A., Volpini R., et al. Update on novel purinergic P2X3 and P2X2/3 receptor antagonists and their potential therapeutic applications. *Expert Opin Ther Pat.* 2019; 29(12): 943-63. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1693542>
4. Aronsson P., Andersson M., Ericsson T., Giglio D. Assessment and characterization of purinergic contractions and relaxations in the rat urinary bladder. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010; 107(1): 603-13. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00554.x>
5. Yu W., Hill W.G., Robson S.C., Zeidel M.L. Role of P2X4 Receptor in Mouse Voiding Function. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 1838. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20216-4>
6. Silva I., Magalhães-Cardoso M.T., Ferreirinha F., Moreira S., Costa A.F., Silva D., et al. β₃ Adrenoceptor-induced cholinergic inhibition

tion in human and rat urinary bladders involves the exchange protein directly activated by cyclic AMP 1 favoring adenosine release. *Br J Pharmacol.* 2020; 177(7): 1589-608. <https://doi.org/10.1111/bph.14921>

7. Gopalakrishnan S.M., Buckner S.A., Milicic I., Groebe D.R., Whiteaker K.L., Burns D.J., et al. Functional characterization of adenosine receptors and coupling to ATP-sensitive K⁺ channels in Guinea pig urinary bladder smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 300(3): 910-7. <https://doi.org/10.1124/jpet.300.3.910>
8. Harrison P., Mackie I., Mumford A. British. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Brit Journal of Haematology.* 2011; 155 (1): 30–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08793.x>
9. Qian Y., Qian C., Xie K., Fan Q., Yan Y., Lu R., et al. P2X7 receptor signaling promotes inflammation in renal parenchymal cells suffering from ischemia-reperfusion injury. *Cell Death Dis.* 2021; 12(1): 132. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03384-y>
10. Gonzalez-Montelongo M.D.C., Fountain S.J. Neuropeptide Y facilitates P2X1 receptor-dependent vasoconstriction via Y1 receptor activation in small mesenteric arteries during sympathetic neurogenic responses. *Vascul Pharmacol.* 2021; 136: 106810. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2020.106810>
11. North R.A. P2X receptors. *Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016; 371(1700): 20150427. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.042710>
12. Smith P.A. K⁺ Channels in Primary Afferents and Their Role in Nerve Injury-Induced Pain. *Front Cell Neurosci.* 2020; 14: 566418. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.566418>
13. Faas M.M., Sáez T., de Vos P. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses? *Mol Aspects Med.* 2017; 55: 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.01.002>
14. Ralevic V., Dunn W.R. Purinergic transmission in blood vessels. *Auton Neurosci.* 2015; 191: 48-66. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.04.007>
15. Yu W., Sun X., Robson S.C., Hill W.G. Extracellular UDP enhances P2X-mediated bladder smooth muscle contractility via P2Y(6) activation of the phospholipase C/inositol trisphosphate pathway. *FASEB J.* 2013; 27(5): 1 895-903. <https://doi.org/10.1096/fj.12-219006>
16. Alexopoulos D., Moulias A., Koutsogiannis N., Xanthopoulou I., Kakkavas A., Mavronasiou E., et al. Differential effect of ticagrelor versus prasugrel on coronary blood flow velocity in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention: an exploratory study. *Circ Cardiovasc Interv.* 2013; 6(3): 277-83. <https://doi.org/10.1161/CIRCINTERVENTIONS.113.000293>
17. Kleppisch T., Nelson M.T. Adenosine activates ATP-sensitive potassium channels in arterial myocytes via A2 receptors and cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92(26): 12441-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.26.12441>
18. Kishore B.K., Robson S.C., Dwyer K.M. CD39-adenosinergic axis in renal pathophysiology and therapeutics. *Purinergic Signal.* 2018; 14(2): 109-20. <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9596-x>
19. Hao Y., Wang L., Chen H., Hill W.G., Robson S.C., Zeidel M.L., et al. Targetable purinergic receptors P2Y12 and A2b antagonistically regulate bladder function. *JCI Insight.* 2019; 4(16): e122112. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.122111>
20. Fong Z., Griffin C.S., Large R.J., Hollywood M.A., Thornbury K.D., Sergeant G.P. Regulation of P2X1 receptors by modulators of the cAMP effectors PKA and EPAC. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2021; 118(37): e2108094118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2108094118>

Сведения об авторах:

Баринов Эдуард Федорович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького», Донецк, ДНР, e-mail: barinov.ef@gmail.com;
Малинин Юрий Юрьевич, канд. мед. наук, зав. каф. урологии ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького»; Донецк, ДНР;
Григорян Хачен Владимирович, канд. мед. наук, ассистент каф. урологии ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького», Донецк, ДНР, e-mail: khachengrigoryan@gmail.com

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-002-008.953-092

Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Порядин Г.В., Панина М.И., Ларина В.Н., Рыжих А.А., Стоделова Е.А.

Постковидный синдром сопровождается формированием нейтрофильных экстраклеточных ловушек в нитевидной форме

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

Цель исследования – определение числа нейтрофильных экстраклеточных ловушек и уровня внеклеточных пуриновых азотистых оснований в периферической крови больных с постковидным синдромом.

Методика. Обследован 41 амбулаторный пациент в возрасте от 18 до 59 лет (21 после перенесенной коронавирусной инфекции, 20 лиц, не перенесших инфекцию, составили группу сравнения). Для визуализации и подсчета НЭЛ использовали метод флуоресцентной микроскопии. Выявление нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ) проводили с помощью флуоресцентного красителя для двухцепочечной ДНК SYBR Green I (Evrogen). Пуриновые азотистые основания определяли методом цветной реакции, основанной на взаимодействии их с азотнокислым серебром с образованием окрашенного соединения.

Результаты. НЭЛ нитевидной формы в крови у пациентов с постковидным синдромом наблюдались на протяжении 3 и более месяцев. Концентрация внеклеточных пуриновых азотистых оснований в крови больных возросла пропорционально тяжести перенесенного заболевания.

Заключение. Постковидный синдром сопровождается формированием в крови больных нейтрофильных экстраклеточных ловушек в нитевидной форме. В периферической крови больных с посткоронавирусным синдромом выявляются внеклеточные пуриновые азотистые основания в концентрациях, способных вызвать вторичную альтерацию клеток.

Ключевые слова: постковидный синдром; нейтрофильные экстраклеточные ловушки; внеклеточные пуриновые азотистые основания; ковид-19; патогенез

Для цитирования: Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Порядин Г.В., Панина М.И., Ларина В.Н., Рыжих А.А., Стоделова Е.А. Постковидный синдром сопровождается формированием нейтрофильных экстраклеточных ловушек в нитевидной форме. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(3): 137-140.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.137-140

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

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

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 31.03.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Salmasi J.M., Kazimirskii A.N., Poryadin G.V., Panina M.I., Larina V.N., Ryzhikh A.A., Stodelova E.A.

Post-covid syndrome is associated with the formation of neutrophil extracellular traps in a filamentous form

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

Aim. The aim of the study was to determine the number of neutrophil extracellular traps (NETs) and the concentration of extracellular purine nitrogenous bases in the peripheral blood of patients with post-COVID syndrome.

Methods. 41 outpatient patients aged 18 to 59 years were examined (21 after coronavirus infection and 20 without previous infection, the comparison group). Fluorescence microscopy was used to visualize and count NETs. NETs were detected using a fluores-

cent dye for double-stranded DNA, SYBR Green I (Evrogen). Purine nitrogenous bases were determined by a color reaction based on their interaction with silver nitrate to form a colored compound.

Results. The filamentous NETs in the blood of patients with post-COVID syndrome were present for 3 months or longer. The concentration of extracellular purine nitrogenous bases in the patients' blood increased proportionally to the disease severity.

Conclusion. Post-COVID syndrome is accompanied by the formation of filamentous NETs in the blood of patients. Extracellular purine nitrogenous bases are found in the peripheral blood of patients with post-COVID syndrome at concentrations that are capable of causing secondary alterations of cell.

Keywords: post-COVID syndrome; neutrophil extracellular traps; extracellular purine nitrogenous bases; COVID-19; pathogenesis

For citation: Salmasi J.M., Kazimirskii A.N., Poryadin G.V., Panina M.I., Larina V.N., Ryzhikh A.A., Stodelova E.A. Postcovid syndrome is associated by the formation of neutrophils extracellular traps in a filamentous form. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(3): 137-140. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.137-140

Author's contribution: the concept and design of the study – Poryadin G.V., Larina V.N.; collection and processing of material – Ryzhikh A.A., Stodelova E.A.; preparation of illustrative material – 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 authors.

For correspondence: Alexander N. Kazimirskii, Doctor of Biol. Sciences, Associate Prof., Leading Researcher, Department of Molecular Technologies, Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russian Federation, alnica10@mail.ru

Financing. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:

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

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

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

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

Larina V.N., <https://orcid.org/0000-0001-7825-5597>

Ryzhikh A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0673-5775>

Stodelova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-0673-5775>

Received 31.03.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Постковидный синдром – патологическое состояние, которое регистрируется у 20% людей, перенесших коронавирусную инфекцию (COVID-19). Больные с постковидным синдромом страдают от головных болей, астении, артралгий, последствий поражения внутренних органов (легких, сердца, ЖКТ), кожи и нейропсихопатологических расстройств. У больных развивается «постковидное воспаление» различной локализации, которое, как можно предположить, индуцировано формированием в крови нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ) [1]. Поражение внутренних органов может быть обусловлено токсическим действием продуктов ферментативной деградации волокон с ДНК, возникающих при распаде НЭЛ.

Цель исследования – определение количества нейтрофильных экстраклеточных ловушек, внеклеточных пуриновых азотистых оснований в периферической крови больных с постковидным синдромом.

Методика

Пациенты. Проведение работ осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России

№ 199 от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и в соответствии с регламентом декларации ЕС от 2010 г. об использовании лабораторных животных. Исследование одобрено Этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова, протокол № 203. В исследование были включены 21 амбулаторный пациент в возрасте от 18 до 59 лет после перенесенной коронавирусной инфекции. Группу сравнения (здоровые доноры) составили 20 лиц в возрасте от 18 до 59 лет без перенесенной коронавирусной инфекции, обратившиеся к врачу-терапевту поликлиники для прохождения диспансеризации.

Определение содержания нейтрофильных экстраклеточных ловушек

Получение клеточных фракций. В исследовании использовали клеточные фракции нейтрофилов. Стерильно выделенные нейтрофилы переносили в среду RPMI-1640 и использовали в экспериментах по культивированию. Жизнеспособность выделенных нейтрофилов составляла не менее 90%, которую определяли в тесте с 0,1% раствором трипанового синего.

Флуоресцентное окрашивание нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Для выявления и подсчета нейтрофильных экстраклеточных ловушек использовали флуоресцентную микроскопию. НЭЛ окрашивали флуоресцентным красителем SYBR Green (Evrogen). Среди 100 нейтрофилов подсчитывали количество нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Результаты выражали в процентах — как отношение числа нейтрофильных экстраклеточных ловушек к общему количеству нейтрофилов.

Определение пуриновых азотистых оснований. Метод основан на цветной реакции взаимодействия пуриновых азотистых оснований с азотнокислым серебром с образованием окрашенного соединения. Пуриновые азотистые основания из плазмы крови экстрагировали хлороформом, растворяли в 10% NaOH и добавляли 500 мкл 1% раствора AgNO_3 , приготовленного на 10% растворе аммиака. Пробы фотометрировали при длине волны 610 нм. Калибровочный график был линейен в диапазоне 0–10 мг/мл.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов программ STATISTICA 12.0 (StatSoft). Описательная статистика представлена при нормальном распределении в виде среднего значения (M) \pm стандартная ошибка (m). При распределении, отличающемся от нормального, — в виде медианы (Me) и 25-го и 75-го перцентилей распределения значений показателя (межквартильный размах). Сравнение количественных признаков проводили по данным дисперсионного анализа Краскела–Уоллеса. Различия считали статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

Результаты

Исследование нейтрофильных экстраклеточных ловушек (НЭЛ) у больных с постковидным синдромом показывает, что они формируются в виде тонких одиночных нитей значительной длины. Размеры нитей с ДНК превышают несколько десятков клеточных диаметров. Особенность нейтрофильных экстраклеточных ловушек у больных с постковидным синдромом состоит в том, что сетевидную структуру эти волокна ДНК не формируют и к захвату с последующей ретракцией апоптозирующих клеток не способны.

Ранее была выявлена зависимость морфологической структуры НЭЛ от вида воспаления [2]. Формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек в виде одиночных нитей НК, по нашим данным, свидетельствует о развитии асептического воспалительного процесса у этих больных. Количество НЭЛ у больных с постковидным синдромом невелико, но наблюдается

на протяжении весьма длительного промежутка времени (3 месяца и более). У больных с легким течением заболевания количество НЭЛ составляет $0,00[0,00 \div 1,31]$ %, в группе со среднетяжелым течением заболевания — $0,00[0,00 \div 0,56]$ %, а при тяжелой форме ковида НЭЛ не определяются.

Концентрация внеклеточных пуриновых азотистых оснований в плазме крови больных была увеличена пропорционально тяжести заболевания. В группе больных с легким течением ковида концентрация внеклеточных пуриновых азотистых оснований составляет $7,38[0,0 \div 60,7]$ мг/мл, при среднетяжелой и тяжелой форме течения заболевания — $19,15[0,0 \div 33,5]$ и $34,19[3,35 \div 70,0]$ мг/мл, соответственно.

Формирование НЭЛ в нитевидной форме представляет определенную опасность в связи с тем, что такие морфологические структуры могут быть источниками внеклеточных пуриновых азотистых оснований. За счет собственных ДНКаз, локализованных на самом хроматине, которые активируются при уменьшении степени спирализации, развивается деградация нитей ДНК, и свободные нуклеотиды появляются во внеклеточном пространстве. Эктоферменты CD39 и CD73, локализованные на поверхностной мембране клеток крови и эндотелия, катализируют гидролиз нуклеотидов до азотистых оснований и могут вызывать увеличение концентрации внеклеточных пуриновых азотистых оснований. Исследования сыворотки крови пациентов с COVID-19 показали повышенные уровни внеклеточной ДНК, а также специфические маркеры НЭЛ [3]. Получены данные о том, что на клетках крови больных увеличена активность ферментов, катализирующих гидролиз внеклеточных нуклеотидов до свободных азотистых оснований [4]. НЭЛ продуцируют внеклеточные азотистые основания, которые могут играть важную роль в патогенезе повреждения в постковидном периоде.

Обсуждение

Молекулярные индукторы запуска формирования НЭЛ в настоящее время неизвестны. В настоящем исследовании мы выявляли НЭЛ у больных с постковидным синдромом только в нитевидной форме. Никаких иных морфологических вариантов НЭЛ у обследуемых больных обнаружено не было. Причем, у больных с тяжелым течением НЭЛ отсутствуют. При этом концентрация внеклеточных пуриновых азотистых оснований в плазме крови больных с постковидным синдромом была увеличена пропорционально степени тяжести заболевания. У больных с тяжелой формой постковидного синдрома НЭЛ отсутствуют, но мы предполагаем, что нитевидные структуры ДНК продуцируют иные

клетки крови. В настоящее время мы находим подтверждение этого положения в наших текущих исследованиях. Поэтому увеличение концентрации внеклеточных пуриновых азотистых оснований пропорционально повышению тяжести постковидного синдрома представляется закономерным.

Внеклеточные пуриновые азотистые основания токсичны для организма, однако механизм их повреждающего действия неизвестен. Экспериментальные модели на животных с продолжительным адениновым питанием показали, что происходит быстрое развитие патологии почек с обширным тубулоинтерстициальным фиброзом, атрофией канальцев, образованием кристаллов и выраженной кальцификацией сосудов, а также сердечно-сосудистые нарушения [5–8].

Литература

(п.п. 3–8 см. References)

1. Кулес И.В., Салмаси Ж.М., Терновой К.С., Казимирский А.Н., Ободзинская Т.Е., Лим В.Г., и др. Предпосылки к созданию атласа постковидного воспаления как способа персонализированной фармакотерапии, а также прогнозирования и предупреждения органых и системных дисфункций. *Медицинский Совет*. 2021; (12): 72-88. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-12-72-88>
2. 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. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.02.34-42>

References

1. Kukes I.V., Salmasi J.M., Ternovoy K.S., Kazimirskii A.N., Obodzinская Т.Е., Lim V.G., et al. Prerequisites for the creation of an atlas

of postcovid inflammation as a way of personalized pharmacotherapy, as well as predicting and preventing organ and systemic dysfunctions. *Meditsinskiy sovet*. 2021; (12): 72-88. (In Russian). <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-12-72-88>

2. 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 Fiziologya i Eksperimental'naya terapiya*. 2022; 66(2): 34-42. (in Russian). <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.02.34-42>
3. Zuo Y., Yalavarthi S., Shi H., Gockman K., Zuo M., Madison J.A., et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*. 2020 Jun 4; 5(11):e138999. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.138999>
4. Ahmadi P., Hartjen P., Kohsar M., Kummer S., Schmiedel S., Bockmann J.H., et al. Defining the CD39/CD73 Axis in SARS-CoV-2 Infection: The CD73- Phenotype Identifies Polyfunctional Cytotoxic Lymphocytes. *Cells*. 2020 Jul 22; 9(8): 1750. <https://doi.org/10.3390/cells9081750>
5. Molnar J.J., Riede U.N., Widmer A., Rohr H.P. Adenin-induzierte Leberparenchymzellschädigung [Adenine induced liver parenchymal cell injury]. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1970; 54: 524-30. (in German). PMID: 4104599.
6. Riede U.N., Widmer A.E., Bianchi L., Molnar J., Rohr H.P. Ultrastrukturell-morphometrische Untersuchungen an der Rattenleberparenchymzelle nach akuter Adeninintoxikation [Ultrastructural-morphometric study on rat liver parenchymal cells in acute adenine poisoning]. *Pathol Eur*. 1971; 6(1): 1-18. (in German). PMID: 4323827.
7. Diwan V., Brown L., Gobe G.C. Adenine-induced chronic kidney disease in rats. *Nephrology (Carlton)*. 2018 Jan; 23(1): 5-11. <https://doi.org/10.1111/nep.13180>. PMID: 29030945.
8. Dos Santos I.F., Sheriff S., Amlal S., Ahmed R.P.H., Thakkar C.V., Amlal H. Adenine acts in the kidney as a signaling factor and causes salt- and water-losing nephropathy: early mechanism of adenine-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019 Apr 1; 316(4):F743-F757. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00142.2018>. Epub 2019 Jan 9. PMID: 30623725; PMCID: PMC6483032.

Сведения об авторах:

Салмаси Ж.М., доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, e-mail: profjms@yandex.ru

Казимирский А.Н., доктор биол. наук, вед. науч. сотр. отдела молекулярных технологий, e-mail: alnica10@mail.ru;

Порядин Г.В., член-корр. РАН, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, e-mail: poryadin_GV@rsmu.ru;

Панина М.И., доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, e-mail: pan-mar@list.ru;

Ларина В.Н., доктор мед. наук, проф., зав. каф. поликлинической терапии лечебного факультета, e-mail: larinav@mail.ru;

Рыжих А.А., аспирант каф. поликлинической терапии лечебного факультета, e-mail: lina.alinamedic@yandex.ru

Стоделова Е.А., аспирант каф. поликлинической терапии лечебного факультета, e-mail: korableva_ea@rsmu.ru

Обзоры

© Чаулин А.М., 2022

УДК 616-005.8

Чаулин А.М.

Сердечные тропонины как биомаркеры повреждения кардиомиоцитов при артериальной гипертензии: акцент на патофизиологические механизмы

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России
443099, Самара, Россия, ул. Чапаевская, д. 89;
ГБУЗ «Самарский областной клинический кардиологический диспансер»,
443070, Самара, Россия, ул. Аэродромная, д. 43

Введение. Многие патологические состояния различного генеза вызывают повреждение кардиомиоцитов (КМЦ). Одним из наиболее чувствительных и специфичных критериев оценки степени повреждения КМЦ являются сердечные тропонины (СТ) – регуляторные белковые молекулы, которые высвобождаются в сыворотку крови из КМЦ при их гибели или повреждении. Новые высокочувствительные методы детекции СТ позволяют выявлять незначительные повреждения КМЦ на самых ранних стадиях сердечно-сосудистых патологий, в связи с чем могут изменить представление о патогенезе и открыть новые диагностические возможности.

Цель обзора – обобщение патофизиологических механизмов, лежащих в основе повреждения КМЦ и высвобождения СТ в сосудистое русло при артериальной гипертензии и обсуждение клинического значения изменения уровня СТ у пациентов, страдающих артериальной гипертензией.

Методика. При подготовке обзора были использованы отечественные (elibrary/ПИНЦ) и зарубежные (Embase, Pubmed/Medline) базы данных.

Заключение. В повреждении КМЦ и высвобождении СТ при артериальной гипертензии задействованы следующие патофизиологические механизмы: гипертрофия миокарда, апоптоз КМЦ, повреждение клеточной мембраны КМЦ и повышение ее проницаемости для молекул СТ, а также изменение скорости клубочковой фильтрации в почках. С учетом данных о прогностической ценности уровня СТ при артериальной гипертензии открываются перспективы для использования этих биомаркеров при выборе тактики ведения пациентов.

Ключевые слова: патофизиология; повреждение миокарда; кардиомиоциты; апоптоз; сердечные тропонины

Для цитирования: Чаулин А.М. Сердечные тропонины как биомаркеры повреждения кардиомиоцитов при артериальной гипертензии: акцент на патофизиологические механизмы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(3): 141-150.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.141-150

Для корреспонденции: Чаулин Алексей Михайлович, e-mail: alekseymichailovich22976@gmail.com

Участие авторов: Чаулин А.М. – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение и анализ данных исследования, написание статьи, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.11.2021

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Chaulin A.M.

Cardiac troponins as biomarkers of cardiomyocyte damage in arterial hypertension: emphasis on pathophysiological mechanisms

Samara State Medical University,
Chapaevskaya St. 89, Samara 443099, Russian Federation;
Samara Regional Clinical Cardiological Dispensary,
Aerodromnaya St. 43, Samara 443070, Russian Federation

Introduction. Many pathological conditions, both of cardiovascular and extra-cardiac genesis, cause damage to cardiomyocytes (CMC). One of the most sensitive and specific criteria for the detection of CMC damage are cardiac troponins (CT), regulatory protein molecules that are released into the blood from CMC when these cells are killed or damaged. New, highly sensitive methods for detecting CT can identify minor damage to CMC at the earliest stages of cardiovascular pathologies. Thus, these methods may change the understanding of the pathogenesis and suggest new diagnostic possibilities.

The aim of this review was to summarize the pathophysiological mechanisms underlying the damage to CMC with the release of CT and to discuss the clinical significance of elevated CT in arterial hypertension.

Methods. In the search for literature, Russian (elibrary/RSCI) and international (Embase, Pubmed/Medline) databases were used. The following keywords were used: myocardial damage, cardiac troponins, arterial hypertension, pathophysiology.

Conclusion. The CMC damage and the CT release in arterial hypertension are mediated by the following pathophysiological mechanisms: myocardial hypertrophy, CMC apoptosis, damage to the CMC cell membrane and its increased permeability to CT molecules, and changes in the glomerular filtration rate. Taking into account the prognostic value of CT in arterial hypertension, there are prospects for using these biomarkers in choosing tactics for management of patients.

Keywords: pathophysiology; myocardial damage; cardiomyocytes; apoptosis; cardiac troponins

For citation: Chaulin A.M. Cardiac troponins as biomarkers of cardiomyocyte damage in arterial hypertension: emphasis on pathophysiological mechanisms. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(3): 141-150. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.141-150

Author's contribution: Chaulin A.M. – concept and design of the study, data collection and analysis, manuscript writing, editing, approval of the final version, fully responsible for the content.

For correspondence: *Aleksey M. Chaulin*, assistant of department Histology and Embriology, «Samara State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; 89 Chapaevskaya Str., Samara 443099, Russian Federation, e-mail: alekseymikhailovich22976@gmail.com

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Financing. The study had no sponsorship.

Information about the authors:

Chaulin A.M., <https://orcid.org/0000-0002-2712-0227>

Received 25.11.2021

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

Основы биохимии, физиологии и диагностической роли сердечных тропонинов. Роль сердечных тропонинов (СТ) в современной диагностике сердечно-сосудистых патологий трудно переоценить. Данные кардиомаркеры считаются наиболее чувствительными и специфичными индикаторами повреждения миокарда, что позволяет рассматривать их в качестве «золотого стандарта» диагностики острой формы ишемической болезни сердца (ИБС) – инфаркта миокарда (ИМ) [1]. СТ являются белковыми молекулами, которые совместно с другим белком тропомиозином образуют тропонин-тропомиозиновый комплекс, являющийся важной составной частью тонких (также называемых активновыми) филаментов [2, 3]. Среди белков, входящих в состав тонких филаментов, только сер-

дечный тропонин Т (СТ-Т) и сердечный тропонин I (СТ-I), имеют специфическую структуру, свойственную только для основных клеток мышечной оболочки сердца, кардиомиоцитов (КМЦ). Остальные белки тонких филаментов, включая актин, тропомиозин и тропонин С имеют одинаковую структуру как в скелетных, так и в сердечной мышцах. СТ играют важную роль посредством участия в регуляции акта сокращения-расслабления рабочих КМЦ. Тропонин С связывается с ионами кальция, которые поступают в цитоплазму преимущественно из саркоплазматического ретикулула, кальциевые каналы в котором открываются при передаче нервного импульса. СТ-Т обеспечивает прикрепление тропонин-тропомиозинового комплекса к тонким филаментам и после соединения тропони-

на С с ионами кальция участвует в конформационных (пространственных) перемещениях тропонин-тропомиозинового комплекса для последующего открытия участков связывания головок миозина на актине. Взаимодействие двух последних белков с образованием поперечных актомиозиновых мостиков лежит в основе сокращения поперечнополосатых мышц. СТ-I, напротив, проявляет активность в период расслабления мышц, блокируя образование актомиозиновых мостиков. Мутации в генах, кодирующих СТ, приводят к выраженным нарушениям сокращения-расслабления КМЦ (наследственные кардиомиопатии), которые клинически проявляются симптомокомплексом сердечной недостаточности (одышка, общая слабость, переутомление, отеки и др.) [4, 5].

Белки СТ-T и СТ-I выходят из клетки в кровь при ишемическом некрозе КМЦ, что можно использовать в диагностике инфаркта миокарда (ИМ) [1-3]. Применение СТ для диагностики ИМ регламентировано в ряде современных отечественных руководств (российского общества кардиологов) [6, 7] и зарубежных рекомендаций (европейского общества кардиологов, американской кардиологической ассоциации, американской коллегии кардиологов и др.) [1, 8].

Хотя основным направлением использования СТ является диагностика инфаркта миокарда, диагностическая ценность данных биомаркеров выходит далеко за рамки этой острой сердечно-сосудистой патологии. Это подтверждается рядом клинических и экспериментальных работ, сообщавших о положительных уровнях СТ в крови среди пациентов, которые имели несердечные патологии (почечная недостаточность, инсульт, хроническая обструктивная болезнь легких, сахарный диабет (СД), кардиотоксические свойства препаратов и другие) [9-12], и неишемические сердечно-сосудистые заболевания (сердечные тахикардии, кардиомиопатия, миокардит, сердечная недостаточность, и ряд других) [13-15]. Некоторые исследователи сообщают о диагностически-значимых повышениях уровней СТ при физиологических процессах (например, при физических нагрузках [16], действии стрессовых факторов на организм человека [17], возраст- и гендерно-ассоциированных особенностях концентрации СТ [18], а также влиянии суточных биоритмов на уровни СТ) [19]. В целом, эти работы свидетельствуют о наличии множества других механизмов (не обусловленных ишемическим некрозом) выхода СТ из КМЦ. Поэтому СТ могут свидетельствовать о наличии ИМ только в том случае, если у пациентов имеются признаки ишемии миокарда (типичная для ИМ боль в грудной клетке, ишемические измене-

ния, выявляемые при помощи электрокардиографии и эхокардиографии). Во многих работах сообщается об очень высокой частоте неассоциированных с ИМ случаев повышения СТ в сыворотке крови. Так, например, по данным крупного ретроспективного исследования G. Lindner и соавт. почти 90% случаев повышения СТ-T были обусловлены не ИМ, а другими патологиями: острая легочная эмболия, почечная недостаточность, расслоение аорты, сердечная недостаточность, пери-/миокардит, интенсивные физические нагрузки, рабдомиолиз, кардиотоксическая химиотерапия, высокочастотная абляционная терапия, разряды дефибриллятора, сердечные инфильтративные нарушения (например, амилоидоз), травма грудной клетки, сепсис, шок, обострение хронической обструктивной болезни легких и диабетический кетоацидоз [20]. В связи с чем стоит крайне осторожно подходить к интерпретации повышенных значений уровня СТ в сыворотке и обязательно учитывать данные других методов диагностики (анамнез, физикальное обследование, функциональная диагностика) перед проведением дополнительных потенциально-опасных инвазивных исследований (коронарной ангиографии), окончательной постановкой диагноза и назначением терапии. Основные причины повышения уровня СТ представлены на **рис. 1**.

В отношении диагностической роли СТ стоит отметить важную роль аналитических характеристик лабораторных методов определения, по мере улучшения которых ряд представлений о биохимии, метаболизме и диагностической ценности СТ претерпели изменения. Современные методы определения СТ называются высокочувствительными (high-sensitive), и их главным преимуществом является очень низкий предел детекции (минимальная определяемая концентрация) (в среднем 1-10 нг/л и менее), что позволяет раньше выявить факт наличия повреждения КМЦ. Клиническое значение имеют следующие особенности высокочувствительных методов определения СТ: 1) ранняя диагностика ИМ (в течение 1-2 ч от момента развития болевого синдрома или поступления в отделение неотложной помощи); 2) роль гендерных, циркадных и возрастных факторов, которые по данным ряда исследований могут оказать влияние на точность постановки диагноза, 3) возможность определять СТ у здоровых людей с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний или лиц, имеющих субклинические формы сердечно-сосудистых заболеваний, что имеет прогностическую ценность, 4) диагностическое значение концентраций СТ в моче и ротовой жидкости (слюне) при сердечно-сосудистых патологиях. Это новое на-

правление неинвазивной диагностики и мониторинга сердечно-сосудистых патологий имеет многообещающие перспективы, благодаря ряду преимуществ, связанных с получением биоматериала [21-24].

Одной из самых распространенных сердечно-сосудистых патологий является артериальная гипертензия. Принимая во внимание высокую распространенность артериальной гипертензии и ее роль в развитии и прогрессировании опасных сердечно-сосудистых осложнений, рассмотрение механизмов повреждения КМЦ и прогностической ценности основных биомаркеров повреждения (СТ) при данной патологии имеет важное фундаментальное и практическое значение, в связи с чем заслуживает отдельного внимания. Обсуждению данных аспектов и уделено основное внимание в данном обзоре. Для достижения поставленной цели проведен поиск актуальной отечественной и зарубежной литературы по базам данных elibrary/РИНЦ и Embase, Pubmed/Medline. В процессе поиска литературы использовались следующие ключевые слова: повреждение миокарда, myocardial damage, сердечные тропонины, cardiac troponins артериальная гипертензия, arterial hypertension, патофизиология, pathophysiology.

Артериальная гипертензия как значимая причина повышения СТ. Механизмы повреждения КМЦ и повышения СТ. Артериальная гипертензия является одним из ведущих факторов риска развития острых сердечно-со-

судистых патологий и приводит к развитию примерно половины случаев острых форм ишемической болезни сердца и острых ишемических инсультов [25]. Дополнительным негативным фактором артериальной гипертензии является высокое коварство данной патологии, заключающееся в невыраженности симптомов и постепенном привыкании пациентов к повышенному артериальному давлению, поэтому многие случаи артериальной гипертензии остаются недодиагностированными. В результате первыми клинически значимыми проявлениями артериальной гипертензии, заставляющими пациентов обращаться в отделения неотложной помощи, являются острые сердечно-сосудистые осложнения, такие как ИМ, транзиторные ишемические атаки, инсульты и др. Так, S. Caligiuri и соавт. обнаружили повышенное артериальное давление у 50% работников ряда городских предприятий, которые никогда ранее не обращались с жалобами на повышение артериального давления и соответственно не принимали препаратов для его нормализации. Кроме того, из числа испытуемых у 2% показатели систолического и диастолического давления превысили 180 и 120 мм рт. ст. – величины, соответствующие гипертоническому кризу и требующие неотложной терапии [25].

Согласно ряду недавних исследований, артериальная гипертензия может рассматриваться в качестве значимой причины повышения СТ как в сыво-



Рис. 1. Основные причины повреждения КМЦ и повышения уровней СТ в биологических жидкостях.

Fig. 1. The main causes of CMC damage and increased levels of CT in biological fluids.

ротке крови [26–28], так и моче пациентов [29–31], однако патофизиологические механизмы, вызывающие повышение уровней СТ и повреждение КМЦ окончательно не установлены. Учитывая патогенез артериальной гипертензии можно выделить следующие ключевые патофизиологические механизмы, лежащие в основе повреждения КМЦ и выходу СТ в сосудистое русло: 1) гипертрофия миокарда, обусловленная повышением нагрузки на миокард; 2) усиление апоптоза, происходящее вследствие гиперактивности симпатoadреноловой системы или повышения нагрузки на миокард; 3) повреждение клеточных мембран КМЦ, что приводит к повышению мембранной проницаемости и выходу СТ; 4) влияние артериального давления на скорость клубочковой фильтрации, что играет важную роль в элиминации СТ из сосудистого русла.

Гипертрофия миокарда. Высокое артериальное давление вызывает повышение преднагрузки на миокард, что вызывает его компенсаторную перестройку и формирование гипертрофии, которая проявляется увеличением объема КМЦ. При увеличении КМЦ степень высвобождения СТ в результате метаболизма в сосудистое русло повышается. Об этом свидетельствуют исследования выявившие гендерные особенности уровней СТ. При этом основным механизмом формирования гендерных особенностей, по данным авторов, является масса миокарда, которая у мужчин выше, чем у женщин [32–34]. Подобные особенности характерны для метаболизма поперечнополосатой скелетной мускулатуры, что проявляется гендерными различиями уровней скелетных тропонинов, креатинина и других продуктов азотистого обмена. Дополнительным доказательством того, что из гипертрофированных КМЦ выходит больше молекул СТ являются клинические исследования, выявившие корреляцию уровней СТ с гипертрофией миокарда у здоровых лиц и пациентов, страдающих артериальной гипертензией [35, 36].

Апоптоз КМЦ. Апоптоз клеток сердечной мышечной ткани при артериальной гипертензии развивается в результате растяжения стенок миокарда, повышения преднагрузки и гиперактивации симпатoadреноловой системы, что было показано в ряде экспериментальных и клинических работ [37–40]. Так, W. Cheng и соавт., изучая влияние растяжения миокарда на процессы апоптоза КМЦ отметили, что в КМЦ зоны растяжения увеличивается генерация активных форм кислорода (в 2,4 раза) и экспрессия белка Fas (в 21 раз), что свидетельствует о значительном усилении апоптоза в ответ на растяжение миокарда [37]. При усилении преднагрузки на КМЦ и повышении артериального давления (введение фенилэфрина лабораторным свиньям) обна-

ружена значительная активация запрограммированной гибели КМЦ по сравнению с животными, получившими плацебо ($31,3 \pm 11,9$ против $4,6 \pm 3,0$ КМЦ в состоянии апоптоза/см²; $p < 0,01$). Кроме того, высокая степень апоптоза КМЦ в опытной группе сопровождалась резким повышением уровней СТ-I (856 ± 956 нг/л через 1 ч и 1462 ± 1691 нг/л через 24 ч) [38]. И наконец, в качестве еще одного важного фактора, усиливающего апоптоз КМЦ при артериальной гипертензии, можно отметить гиперактивацию симпатoadреноловой системы. В работах на кардиомиоцитах *in vitro* показано, что бета-агонисты усиливают апоптоз КМЦ посредством ц-АМФ зависимой активации потенциал-зависимых кальциевых каналов и перегрузки КМЦ ионами кальция [40] и NF2-сигнального пути, приводящего к активации c-Jun N-концевых киназ, повышению уровней цитозольного цитохрома с и экспрессии Вах [39].

Повреждение клеточных мембран КМЦ и повышение проницаемости. Состояние клеточной мембраны является одним из ключевых факторов, влияющих на степень высвобождения цитозольных белковых молекул в сосудистое русло. Многие патологические процессы сопровождаются выходом цитоплазматических биомаркеров в русло еще до гибели (необратимого повреждения) клеток. Например, высвобождение печеночных энзимов (аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, гамма-глутамилтрансферазы) и мышечных маркеров (креатинфосфокиназы и ее изоформ, скелетных изоформ тропонинов, миоглобина) при ранних стадиях воспалительных заболеваний гепатобилиарного тракта и скелетных миопатиях соответственно, когда признаков некроза еще не наблюдается [41, 42]. СТ локализуются как в составе тропонинового комплекса на тонких филаментах (структурная или несвободная фракция СТ), так и свободно (цитоплазматическая или свободная фракция СТ). По некоторым данным примерно 95% от общего содержания СТ в КМЦ находится в составе структурной фракции, и около 5% — в составе цитоплазматической фракции. Ряд авторов считают, что цитозольная фракция СТ может выходить из цитоплазмы КМЦ в сосудистое русло при нетяжелых и обратимых повреждениях КМЦ, возникающих при физических нагрузках [13, 14, 34] или под влиянием психоэмоционального стресса [17]. Степень повышения уровня СТ при таких повреждениях невелика, составляя всего 3–5 раз от верхней референтной границы, что обусловлено относительно небольшим объемом свободно-локализованных СТ в цитоплазме. Кроме того, цитоплазматическая фракция СТ играет важную роль в формировании циркадных ритмов как у здоровых лиц, так и пациентов

с сердечно-сосудистыми патологиями. Наиболее высокие уровни СТ отмечаются утром, что связано с повышенной активностью симпатoadренальной системы [43, 44]. По данным М. Hessel и соавт. цитоплазматическая фракция СТ может высвободиться при повышении артериального давления и преднагрузки на миокард. Основным механизмом, ответственным за данное повышение уровней СТ являются трансмембранные рецепторные белки КМЦ, в частности интегрины. Стимуляция последних сопровождается активацией ферментов (матриксных металлопротеиназ и кальпаина), вызывающих повреждение (повышение проницаемости) мембраны КМЦ и выход СТ в сосудистое русло [45].

Влияние артериального давления на скорость клубочковой фильтрации и элиминацию СТ из сосудистого русла. Важнейшим фактором, влияющим на уровни СТ в сыворотке крови, являются механизмы их элиминации из сосудистого русла. При этом значительную роль в элиминировании СТ играет мочевыделительная система. В ряде исследований отмечена высокая распространенность повышенных уровней СТ у пациентов, страдающих патологиями мочевыделительной системы, в частности при почечной недостаточности, которую в связи с этим следует рассматривать в качестве значимой и не связанной с ИМ причины повышения СТ [9, 46, 47]. Отмечена корреляция между степенью почечной недостаточности, определяемой на основании скорости клубочковой фильтрации и степенью повышения СТ у пациентов, не имеющих признаков сердечно-сосудистой патологии [9]. Факторы, усиливающие скорость клубочковой фильтрации, в частности высокое артериальное давление, напротив, усиливают элиминацию СТ из сосудистого русла в мочу, что продемонстрировано в исследовании Р. Pervan и соавт. [29]. Это обстоятельство имеет важное практическое значение, заключающееся в возможности использования мочи в качестве биоматериала для мониторинга течения артериальной гипертензии и оценки ее прогноза.

Одним из возможных объяснений того как СТ проходят через клубочковый фильтр являются процессы протеолитического расщепления СТ под влиянием ряда внутри- и внеклеточных протеиназ. Так, размер белковой молекулы связан с возможностью ее прохождения через небольшие поры клубочкового фильтра. Низкомолекулярные белки, в отличие от высокомолекулярных белков, как правило, обнаруживаются в небольших количествах в первичной моче, что свидетельствует о связи фильтрации с размером молекулы [48]. СТ под действием ряда внутриклеточных и внеклеточ-

ных протеолитических энзимов фрагментируются на несколько десятков фрагментов, молекулярная масса которых крайне мала, что вероятно, позволяет им активнее элиминироваться из сосудистого русла. Элиминация СТ возможна не только через клубочковый фильтр, но и другие барьеры, в частности гематосаливарный, гематоэнцефалический в слюну и ликвор соответственно, что подтверждается соответствующими исследованиями [21-24, 29, 49, 50]. Однако, процессы протеолитического расщепления тропонинов внутри клеток и в сыворотке крови крайне мало изучены. Хотя исследователи сообщают о нескольких десятках фрагментов различной молекулярной массы и размеров, неизвестны все ферменты, которые отвечают за расщепление тропонинов и формирование такого значительного числа фрагментов. При этом в исследовании I. Katrukha и соавт. [51] сообщается, что фермент тромбин катализирует специфическое расщепление СТ-Т на два фрагмента. Примечательно, что в условиях высокого артериального давления у пациентов наблюдается активация данного фермента [52], соответственно, усиливаются процессы протеолитического расщепления тропонинов на небольшие фрагменты и усиливается скорость клубочковой фильтрации, которая способствует элиминации сформировавшихся небольших фрагментов СТ через клубочковый фильтр из сосудистого русла в мочу. Идентификация всех влияющих на протеолитическое расщепление СТ имеет важное значение для понимания данного процесса и улучшения лабораторной диагностики, включая использование мочи в качестве неинвазивного биоматериала. Среди наиболее ценных кардиомаркеров, рекомендуемых для диагностики ИМ и сердечной недостаточности, определение СТ и натрийуретических пептидов (НУП) в моче показало многообещающие результаты. В недавно проводимых исследованиях несколькими исследовательскими группами продемонстрирована высокая диагностическая ценность СТ и НУП в неинвазивно-получаемых биологических жидкостях у лиц, страдающих ИБС [22, 53], ИМ [21, 24], СД [23], СН [54] и артериальной гипертензией [29]. Дальнейшие исследования необходимо направить на уточнение этих перспективных диагностических возможностей.

Суммируя вышесказанное можно предложить следующую схему патофизиологических механизмов повреждения КМЦ и повышения уровня СТ у пациентов, страдающих артериальной гипертензией (рис. 2).

Прогностическая ценность СТ у пациентов, страдающих артериальной гипертензией. Механизмы выхода СТ в сосудистое русло из КМЦ имеют важное практическое значение, поскольку высокие уровни СТ свиде-



Рис. 2. Патофизиологические механизмы повреждения КМЦ и повышения уровней СТ в биологических жидкостях при артериальной гипертензии.

Fig. 2. Pathophysiological mechanisms of CMC damage and increased CT levels in biological fluids in arterial hypertension.

Таблица/ Table

Клинические исследования, посвященные изучению диагностической роли СТ при артериальной гипертензии
Clinical studies devoted to the study of the diagnostic role of CT in arterial hypertension

Количество пациентов, диагноз Number of patients, diagnosis	Исследуемая биологическая жидкость Biological fluids to be tested	Распространенность и степень повышения СТ при артериальной гипертензии, прогностическая ценность Prevalence and degree of elevation cardiac troponins (CT) in arterial hypertension, prognostic value	Источник литературы Literature source
Артериальная гипертензия, Arterial hypertension n = 306	Сыворотка крови Serum	Повышенные уровни СТ-T отмечены у 47% пациентов и были ассоциированы с гипертрофией левого желудочка и неблагоприятным прогнозом в долгосрочной перспективе Elevated CT-T levels were noted in 47% of patients and were associated with left ventricular hypertrophy and poor long-term prognosis	H Uçar et al [24]
Артериальная гипертензия, Arterial hypertension n = 467	Сыворотка крови Serum	Повышенные уровни СТ-I наблюдались у 15% пациентов и были связаны с риском развития хронической сердечной недостаточности Elevated CT-I levels were observed in 15% of patients and were associated with a risk of developing chronic heart failure	G. Acosta и соавт. [55]
Артериальная гипертензия, Arterial hypertension n = 171	Сыворотка крови Serum	Повышенные уровни СТ-I зарегистрированы у 32% пациентов и были ассоциированы с повышенным риском развития неблагоприятных сердечно-сосудистых событий (MACE) и риском развития ИБС Elevated CT-I levels were reported in 32% of patients and were associated with an increased risk of adverse cardiovascular events (MACE) and the risk of coronary heart disease	D. Pattan-shetty и соавт. [56] Coronary heart disease
Артериальная гипертензия, Arterial hypertension n = 929	Сыворотка крови Serum	Повышенные уровни СТ-I отмечены у 31% пациентов и были ассоциированы с риском развития ИМ и отека легких Elevated CT-I levels were noted in 31% of patients and were associated with the risk of MI and pulmonary oedema	M. Talha Ayub и соавт. [57]
Артериальная гипертензия, Arterial hypertension n = 20	Моча Urine	Мочевые уровни СТ-I у пациентов с гипертензией были достоверно выше, чем у пациентов с нормальным артериальным давлением. Референтные интервалы уровней СТ в моче пока не установлены. Urinary CT-I levels were significantly higher in patients with hypertension than in those with normal blood pressure. Reference intervals for urinary ST levels have not yet been established.	P. Pervan и соавт. [29]

Примечание/Note. СТ – сердечные тропонины (CT, cardiac troponins), ИБС – ишемическая болезнь сердца (coronary heart disease), ИМ – инфаркт миокарда (myocardial infarction).

тельствуют о повреждении КМЦ и неблагоприятном прогнозе [24, 29, 55-57]. Данные о распространенности и прогностической ценности СТ при артериальной гипертензии по результатам клинических исследований представлены в **таблице**.

Заключение и перспективы

Основываясь на результатах литературного анализа, артериальную гипертензию можно рассматривать в качестве распространенного патологического состояния, которое вызывает повреждение клеток миокарда. О повреждении КМЦ при артериальной гипертензии свидетельствует повышение уровней СТ в крови, ротовой жидкости и моче по данным клинических исследований. Повреждение КМЦ и повышение СТ обусловлено рядом патофизиологических механизмов: 1) гипертрофия миокарда, 2) гибель КМЦ в результате апоптоза, 3) активация протеолитических ферментов внутри КМЦ, что приводит к повреждению мембран клеток и повышению мембранной проницаемости, 4) усиление первого этапа мочеобразования (филтрации), что сопровождается повышением элиминации СТ из крови в мочу.

Относительно новой областью современной диагностики является изучение диагностической/прогностической ценности многих биомаркеров в неинвазивно-получаемых биологических жидкостях. В качестве последних наиболее удобными являются ротовая жидкость и моча, поскольку их получение является атравматичным, неинвазивным, безболезненным и в дополнении ко всему не требует обученного медицинского персонала во время процедуры забора данного биоматериала. Разработка тест-полосок для биомаркеров, и в частности кардиомаркеров в ближайшей перспективе позволит осуществлять быструю диагностику в домашних условиях в качестве мониторинга состояния при хронических сердечно-сосудистых заболеваниях, или предварительной диагностики потенциально-опасных острых форм сердечно-сосудистых заболеваний до приезда скорой помощи.

Литература

(п.п. 1-4; 8; 9; 11; 13-18; 20; 21; 23; 25-33; 35-40; 43-52; 54-57 см. References)

5. Дупляков Д.В., Чаулин А.М. Мутации сердечных тропонинов, ассоциированные с кардиомиопатиями. *Кардиология: новости, мнения, обучение*. 2019; 7(3): 8-17.
6. Острый инфаркт миокарда с подъемом сегмента ST электрокардиограммы. Клинические рекомендации 2020. Российское кардиологическое общество, Ассоциация сердечно-сосудистых хирургов России. *Российский кардиологический журнал*. 2020; 25(11): 4103.

7. Барбараш О.Л., Дупляков Д.В., Затеишиков Д.А., Панченко Е.П., Шахнович Р.М., Явелов И.С., и др. Острый коронарный синдром без подъема сегмента ST электрокардиограммы. Клинические рекомендации 2020. *Российский кардиологический журнал*. 2021; 26(4): 4449.
10. Чаулин А.М., Дупляков Д.В. Коморбидность хронической обструктивной болезни легких и сердечно-сосудистых заболеваний. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2021; 20(3): 2539.
12. Чаулин А.М., Дупляков Д.В. Кардиопротективные стратегии при доксорубин-индуцированной кардиотоксичности: настоящее и перспективы. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2022; 18(1): 103-12.
19. Чаулин А.М., Дуплякова П.Д., Дупляков Д.В. Циркадные ритмы сердечных тропонинов: механизмы и клиническое значение. *Российский кардиологический журнал*. 2020; 25(3S): 4061.
22. Чаулин А.М., Карслян Л.С., Григорьева Е.В., Нурбалтаева Д.А., Дупляков Д.В. Клинико-диагностическая ценность кардиомаркеров в биологических жидкостях человека. *Кардиология*. 2019; 59(11): 66-75.
24. Чаулин А.М., Дуплякова П.Д., Бикбаева Г.Р., Тухбатова А.А., Григорьева Е.В., Дупляков Д.В. Концентрация высокочувствительного тропонина I в ротовой жидкости у пациентов с острым инфарктом миокарда: пилотное исследование. *Российский кардиологический журнал*. 2020; 25(12): 3814.
34. Чаулин А.М., Абашина О.Е., Дупляков Д.В. Высокочувствительные сердечные тропонины (hs-Tn): методы определения и основные аналитические характеристики. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2021; 20(2): 2590.
41. Никонова М.А., Карбышева Н.В., Кожевникова Г.М., Мамеев А.Н., Шевченко В.В., Бесхлебова О.В. Парентеральные вирусные гепатиты у лиц с гемофилиями: пути решения проблемы. *Бюллетень медицинской науки*. 2019; 1(13): 58-62.
42. Евдокимова Н.Е., Цыганкова О.В., Латынцева Л.Д. Синдром повышенной креатинфосфокиназы плазмы как диагностическая дилемма. *Русский Медицинский Журнал*. 2021; 29(2): 18-25.
53. Бунин В.А., Козлов К.Л., Линькова Н.С., Пальцева Е.М. Повышение концентрации тропонина-I в слюне пациентов с ишемической болезнью сердца коррелирует со стадией развития заболевания. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2017; 6(S 4): 13-4.

References

1. Collet J.P., Thiele H., Barbato E., Barthélémy O., Bauersachs J., Bhatt D.L., et al; ESC Scientific Document Group. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2021; 42(14): 1289-367.
2. Chaulin A.M. False-Positive Causes in Serum Cardiac Troponin Levels. *J Clin Med Res*. 2022; 14(2): 80-7.
3. Chaulin A. Cardiac troponins: contemporary biological data and new methods of determination. *Vasc Health Risk Manag*. 2021; 17: 299-316.
4. Mogensen J, Hey T, Lambrecht S. A Systematic Review of Phenotypic Features Associated With Cardiac Troponin I Mutations in Hereditary Cardiomyopathies. *Can J Cardiol*. 2015; 31(11): 1377-85.
5. Duplyakov DV, Chaulin AM. Mutations of heart troponines, associated with cardiomyopathies. *Kardiologiya: novosti, mneniya, obuchenie*. 2019; 7(3): 8-17. (in Russian)

6. 2020 Clinical practice guidelines for Acute ST-segment elevation myocardial infarction. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2020; 25(11): 4103. (in Russian)
7. Barbarash O.L., Duplyakov D.V., Zateichikov D.A., Panchenko E.P., Shakhnovich R.M., Yavelov I.S., et al. 2020 Clinical practice guidelines for Acute coronary syndrome without ST segment elevation. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2021; 26(4): 4449. (in Russian)
8. Thygesen K., Alpert J.S., Jaffe A.S., Chaitman B.R., Bax J.J., Morrow D.A., White H.D. Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF) Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*. 2018; 138(20): e618-e651.
9. Dubin R.F., Li Y., He J., Jaar B.G., Kalleem R., Lash J.P., et al; CRIC Study Investigators. Predictors of high sensitivity cardiac troponin T in chronic kidney disease patients: a cross-sectional study in the chronic renal insufficiency cohort (CRIC). *BMC Nephrol*. 2013; 14: 229.
10. Chaulin A.M., Duplyakov D.V. Comorbidity in chronic obstructive pulmonary disease and cardiovascular disease. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021;20(3):2539. (in Russian)
11. Chaulin A.M., Abashina O.E., Duplyakov D.V. Pathophysiological mechanisms of cardiotoxicity in chemotherapeutic agents. *Russian Open Medical Journal*. 2020; 9: e0305.
12. Chaulin A.M., Duplyakov D.V. Cardioprotective Strategies for Doxorubicin-induced Cardiotoxicity: Present and Future. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2022;18(1):103-112. (in Russian)
13. Eggers KM, Lindahl B. Application of Cardiac Troponin in Cardiovascular Diseases Other Than Acute Coronary Syndrome. *Clin Chem*. 2017;63(1):223-235.
14. Chaulin AM. Cardiac Troponins Metabolism: From Biochemical Mechanisms to Clinical Practice (Literature Review). *Int J Mol Sci*. 2021;22(20):10928.
15. Chaulin AM. Elevation Mechanisms and Diagnostic Consideration of Cardiac Troponins under Conditions Not Associated with Myocardial Infarction. Part 2. *Life (Basel)*. 2021;11(11):1175.
16. Chaulin AM. Elevation Mechanisms and Diagnostic Consideration of Cardiac Troponins under Conditions Not Associated with Myocardial Infarction. Part 1. *Life (Basel)*. 2021;11(9):914.
17. Lazzarino AI, Hamer M, Gaze D, Collinson P, Steptoe A. The association between cortisol response to mental stress and high-sensitivity cardiac troponin T plasma concentration in healthy adults. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(18):1694-1701
18. Rocco E, La Rosa G, Liuzzo G, Biasucci LM. High-sensitivity cardiac troponin assays and acute coronary syndrome: a matter of sex? *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2019;20(8):504-509.
19. Chaulin A.M., Duplyakova P.D., Duplyakov D.V. Circadian rhythms of cardiac troponins: mechanisms and clinical significance. *Russian Journal of Cardiology*. 2020;25(3S):4061. (in Russian)
20. Lindner G., Pfortmueller C.A., Braun C.T., Exadaktylos A.K. Non-acute myocardial infarction-related causes of elevated high-sensitive troponin T in the emergency room: a cross-sectional analysis. *Intern Emerg Med*. 2014; 9(3): 335-9.
21. Mirzaei-Dizgah I., Riahi E. Salivary troponin I as an indicator of myocardial infarction. *Indian J Med Res*. 2013; 138(6): 861-5.
22. Chaulin A.M., Karslyan L.S., Bazyuk E.V., Nurbaltaeva D.A., Duplyakov D.V. Clinical and Diagnostic Value of Cardiac Markers in Human Biological Fluids. *Kardiologiya*. 2019; 59(11): 66-75. (in Russian)
23. Chen J.Y., Lee S.Y., Li Y.H., Lin C.Y., Shieh M.D., Ciou D.S. Urine High-Sensitivity Troponin I Predict Incident Cardiovascular Events in Patients with Diabetes Mellitus. *J Clin Med*. 2020 Dec 2; 9(12): 3917.
24. Chaulin A.M., Duplyakova P.D., Bikbaeva G.R., Tukhbatova A.A., Grigorieva E.V., Duplyakov D.V. Concentration of high-sensitivity cardiac troponin I in the oral fluid in patients with acute myocardial infarction: a pilot study. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2020; 25(12): 3814. (in Russian)
25. Caligiuri S.P., Austria J.A., Pierce G.N. Alarming Prevalence of Emergency Hypertension Levels in the General Public Identified by a Hypertension Awareness Campaign. *Am J Hypertens*. 2017; 30(3): 236-9.
26. Harvell B., Henrie N., Ernst A.A., Weiss S.J., Oglesbee S., Sarangarm D., et al. The meaning of elevated troponin I levels: not always acute coronary syndromes. *Am J Emerg Med*. 2016; 34(2): 145-8.
27. Uçar H., Gür M., Kivrak A., Koyunsever N.Y., Seker T., Akilli R.E., et al. High-sensitivity cardiac troponin T levels in newly diagnosed hypertensive patients with different left ventricle geometry. *Blood Press*. 2014; 23(4): 240-7.
28. Afonso L., Bandarū H., Rathod A., Badheka A., Ali Kizilbash M., Zmily H., et al. Prevalence, determinants, and clinical significance of cardiac troponin-I elevation in individuals admitted for a hypertensive emergency. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2011; 13(8): 551-6.
29. Pervan P., Svagusa T., Prkacin I., Savuk A., Bakos M., Perkov S. Urine high sensitive Troponin I measuring in patients with hypertension. *Signa Vitae*. 2017; 13: 62-4.
30. Chaulin A.M. Diagnostic value of highly sensitive cardiac troponins and mechanisms of their increase in serum and urine in arterial hypertension. *La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio*. 2021; 17(2): 99-107.
31. Potkonjak A.M., Sabolović Rudman S., Nikolac Gabaj N., Kuna K., Košec V., Stanec Z., et al. Urinary troponin concentration as a marker of cardiac damage in pregnancies complicated with preeclampsia. *Med Hypotheses*. 2020; 144: 110252.
32. Gore M.O., Seliger S.L., Defilippi C.R., Nambi V., Christenson R.H., et al. Age- and sex-dependent upper reference limits for the high-sensitivity cardiac troponin T assay. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 63(14): 1441-8.
33. Giannitsis E., Mueller-Hennessen M., Zeller T., Schuebler A., Aurich M., Biener M., et al. Gender-specific reference values for high-sensitivity cardiac troponin T and I in well-phenotyped healthy individuals and validity of high-sensitivity assay designation. *Clin Biochem*. 2020; 78: 18-24.
34. Chaulin A.M., Abashina O.E., Duplyakov D.V. High-sensitivity cardiac troponins: detection and central analytical characteristics. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2021; 20(2): 2590. (in Russian)
35. McEvoy J.W., Chen Y., Nambi V., Ballantyne C.M., Sharrett A.R., Appel L.J., et al. High-Sensitivity Cardiac Troponin T and Risk of Hypertension. *Circulation*. 2015 Sep 1;132(9): 825-33.
36. Stabouli S., Kotsis V., Rizos Z., Toumanidis S., Karagianni C., Constantopoulos A., et al. Left ventricular mass in normotensive, prehypertensive and hypertensive children and adolescents. *Pediatr Nephrol*. 2009; 24(8): 1545-51.
37. Cheng W., Li B., Kajstura J., Li P., Wolin M.S., Sonnenblick E.H., et al. Stretch-induced programmed myocyte cell death. *J Clin Invest*. 1995; 96(5): 2247-59.

38. Weil B.R., Suzuki G., Young R.F., Iyer V., Canty J.M. Jr. Troponin Release and Reversible Left Ventricular Dysfunction After Transient Pressure Overload. *J Am Coll Cardiol*. 2018; 71(25): 2906-16.
39. Dalal S., Connelly B., Singh M., Singh K. NF2 signaling pathway plays a pro-apoptotic role in β -adrenergic receptor stimulated cardiac myocyte apoptosis. *PLoS One*. 2018; 13(4):e0196626.
40. Singh K., Xiao L., Remondino A., Sawyer D.B., Colucci W.S. Adrenergic regulation of cardiac myocyte apoptosis. *J Cell Physiol*. 2001; 189(3): 257-65.
41. Nikonorova M.A., Karbysheva N.V., Kozhevnikova G.M., Mamaev A.N., Shevchenko V.V., Beskhebova O.V. Parenteral viral hepatitis in people with hemophilia: ways to solve the problem. *Bulletin of Medical Science*. 2019; 1(13): 52-6.
42. Evdokimova N.E., Tsygankova O.V., Latyntseva L.D. Evaluation of plasma creatine phosphokinase as a diagnostic dilemma. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal*. 2021; 29(2): 18-25.
43. Fournier S., Iten L., Marques-Vidal P., Boulat O., Bardy D., Beghah A., et al. Circadian rhythm of blood cardiac troponin T concentration. *Clin Res Cardiol*. 2017; 106(12): 1026-32.
44. Suárez-Barrientos A., López-Romero P., Vivas D., Castro-Ferreira F., Núñez-Gil I., Franco E., et al. Circadian variations of infarct size in acute myocardial infarction. *Heart*. 2011; 97(12): 970-6.
45. Hessel M.H., Atsma D.E., van der Valk E.J., Bax W.H., Schalij M.J., van der Laarse A. Release of cardiac troponin I from viable cardiomyocytes is mediated by integrin stimulation. *Pflugers Arch*. 2008; 455(6): 979-86.
46. Ali S.A., Kazmi S., Jalal-Ud-Din M., Qasim M.I., Jadoon Z.G. Frequency of elevated troponin T in patients of hronic renal failure without clinically suspected acute myocardial infarction. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2019; 31(3): 364-7.
47. Long B., Belcher C.N., Koefman A., Bronner J.M. Interpreting troponin in renal disease: A narrative review for emergency clinicians. *Am J Emerg Med*. 2020; 38(5): 990-7.
48. Zou L., Sun W. Human urine proteome: a powerful source for clinical research. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 845: 31-42.
49. Maeda H., Michiue T., Zhu B.L., Ishikawa T., Quan L. Analysis of cardiac troponins and creatine kinase MB in cerebrospinal fluid in medicolegal autopsy cases. *Leg Med (Tokyo)*. 2009; 11 Suppl 1:S266-8.
50. Wang Q., Michiue T., Ishikawa T., Zhu B.L., Maeda H. Combined analyses of creatine kinase MB, cardiac troponin I and myoglobin in pericardial and cerebrospinal fluids to investigate myocardial and skeletal muscle injury in medicolegal autopsy cases. *Leg Med (Tokyo)*. 2011; 13(5): 226-32.
51. Katrukha I.A., Kogan A.E., Vylegzhanina A.V., Serebryakova M.V., Koshkina E.V., Bereznikova A.V., et al. Thrombin-Mediated Degradation of Human Cardiac Troponin T. *Clin Chem*. 2017; 63(6): 1094-100.
52. Derhaschnig U., Testori C., Riedmueller E., Aschauer S., Wolzt M., Jilma B. Hypertensive emergencies are associated with elevated markers of inflammation, coagulation, platelet activation and fibrinolysis. *J Hum Hypertens*. 2013; 27(6): 368-73.
53. Bunin V.A., Kozlov K.L., Linkova N.S., Paltseva E.M. An increase in troponin-I concentration in the saliva of patients with coronary heart disease correlates with the stage of disease development. *Kompleksnye problemy serdecno-sosudistykh zabolevaniy*. 2017; 6(S 4): 13-4. (in Russian)
54. Joharimoghadam A., Tajdini M., Bozorgi A. Salivary B-type natriuretic peptide: a new method for heart failure diagnosis and follow-up. *Kardiol Pol*. 2017; 75(1): 71-7.
55. Acosta G., Amro A., Aguilar R., Abusnina W., Bhardwaj N., Koromia G.A., et al. Clinical determinants of myocardial injury, detectable and serial Troponin levels among patients with hypertensive crisis. *Cureus*. 2020; 12(1):e6787.
56. Pattanshetty D.J., Bhat P.K., Aneja A., Pillai D.P. Elevated troponin predicts long-term adverse cardiovascular outcomes in hypertensive crisis: a retrospective study. *J Hypertens*. 2012 Dec; 30(12): 2410-5.
57. Talha Ayub M., Torres C., Del Cid J., Khan M.S., Rasool W., Talha Aijaz, et al. The prognostic significance of highly sensitive cardiac troponin i elevation in patients presenting with hypertensive crisis. *Circulation*. 2019; 140: A16333.

Сведения об авторах:

Чаулин Алексей Михайлович, ассистент каф. гистологии и эмбриологии, сотр. НИИ Кардиологии СамГМУ, e-mail: alekseymichailovich22976@gmail.com

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Ревокатова Д.П., Зурина И.М., Горкун А.А., Сабурин И.Н.

Современные подходы к созданию васкуляризированных костных биоэквивалентов

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Восстановление структуры и функциональной активности костной ткани при переломах и системных заболеваниях скелета является актуальной проблемой, решение которой позволит улучшить качество и продолжительность жизни. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно увеличивается количество сложных случаев переломов, требующих хирургического вмешательства, а также пересадки костной ткани. Существующие методы алло-, ауто- и ксено-трансплантации обладают рядом побочных эффектов, плохо приживаются, вызывают иммунное отторжение, либо не подходят для замещения крупных дефектов. В связи с этим внимание исследователей фокусируется на создании искусственной костной ткани.

Обзор литературы посвящен современным подходам к созданию васкуляризированных костных биоэквивалентов для трансплантации полученных конструктов с целью обеспечения эффективной регенерации костной ткани. Одним из ключевых условий успешного восстановления костной ткани является ангиогенез. В процессе эмбрионального развития остеогенез и ангиогенез тесно связаны. Многие факторы, секретируемые эндотелиальными клетками, запускают процесс остеогенной дифференцировки, воздействуя на ключевые транскрипционные факторы. В свою очередь остеопрогениторные клетки воздействуют на эндотелиальные клетки или их предшественники, стимулируя прорастание кровеносных сосудов в костную ткань. Положительная обратная связь осуществляется за счет взаимной регуляции множества транскрипционных факторов, факторов роста, цитокинов, компонентов внеклеточного матрикса, а также различных микроРНК. Это взаимодействие также играет критическую роль в процессе регенерации костной ткани и заживлении переломов, так как процесс во многом сходен с развитием кости в эмбриогенезе.

В обзоре рассматривается ряд ключевых механизмов взаимодействия ангиогенеза и остеогенеза в процессе эмбриогенеза и регенерации, а также обсуждается проблема использования этих механизмов в тканевой инженерии для лечения переломов и создания васкуляризированных костных биоэквивалентов при восстановлении крупных дефектов кости.

Ключевые слова: остеогенез; ангиогенез; мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; регенерация кости; васкуляризация; биопечать; дифференцировка; остеобласты; эндотелиальные клетки; со-культивирование

Для цитирования: Ревокатова Д. П., Зурина И.М., Горкун А.А., Сабурин И.Н. Современные подходы к созданию васкуляризированных костных биоэквивалентов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66 (3): 151-165. DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.151-165

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Зурина И.М., Горкун А.А., Сабурин И.Н.; написание текста – Ревокатова Д.П.; подготовка иллюстраций – Ревокатова Д. П.; редактирование текста и иллюстраций – Зурина И.М., Горкун А.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: *Ревокатова Дарья Петровна*, e-mail: revokatova.d@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.04.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Revokatova D.P., Zurina I.M., Gorkun A.A., Saburina I.N.

Modern approaches to bone tissue vascularization

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

Restoration of the structure and functional activity of bone tissue in fractures and systemic skeletal diseases is an important problem, the solution of which will improve quality and expectancy of life. According to the World Health Organization, the number of complicated fractures, that require surgical intervention and bone grafting, increases every year. The existing methods of allo-, auto- and xenotransplantation have several shortcomings, such as immune rejection or unsuitability for replacing large defects.

For this reason, much attention is paid to creation of artificial bone tissue. This review addresses modern approaches to the development of vascularized bone bioequivalents that would provide effective bone tissue regeneration after transplantation of the obtained constructs. Angiogenesis is one of the critical conditions for the successful restoration of bone tissue. During embryonic development, osteogenesis and angiogenesis are closely interrelated. Many factors produced by endothelial cells trigger osteogenic differentiation by affecting the key transcription factors. In turn, osteogenic progenitors influence endothelial cells or their progenitors to stimulate blood vessel growth into the bone tissue. This positive feedback occurs due to the mutual regulation of transcription factors, cytokines, extracellular matrix components, and various microRNAs. This interaction also plays a critical role in bone tissue regeneration and fracture healing since this process is largely similar to the development of bones in embryogenesis. This review describes some of the key mechanisms of the interaction between angiogenesis and osteogenesis and provides examples of a possible use of these mechanisms in tissue engineering to create a vascularized bone bioequivalent to repair large bone defects.

Keywords: osteogenesis; angiogenesis; multipotent mesenchymal stromal cells; bone regeneration; vascularization; bioprinting; differentiation; osteoblasts; endothelial cells; co-cultivation

For citation: Revokatova D.P., Zurina I.M., Gorkun A.A., Saburina I.N. Modern approaches to bone tissue vascularization. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66 (3): 151-165.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.151-165

Author's contribution: concept and design of the research – Zurina I.M., Gorkun A.A., Saburina I.N.; writing the text – Revokatova D.P.; preparing illustrations – Revokatova D.P.; editing of text and illustrations – Zurina I.M., Gorkun A.A. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Daria P. Revokatova*, Junior Researcher, Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8 Baltiyskaya Str., Moscow 125315, Russian Federation, e-mail: revokatova.d@gmail.com

Financing. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:

Revokatova D.P., <https://orcid.org/0000-0002-7539-2403>

Zurina I.M., <https://orcid.org/0000-0002-3275-0215>

Gorkun A.A., <https://orcid.org/0000-0001-5859-812X>

Saburina I.N., <https://orcid.org/0000-0003-2014-2535>

Received 05.04.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

bFGF – основной фактор роста фибробластов (basic fibroblast growth factor)

BMP – костный морфогенетический белок (bone morphogenetic protein)

Bsp – костный сиалопротеин (Bone sialoprotein)

CD31 - кластер дифференцировки 31 (cluster of differentiation 31)

CD34 - кластер дифференцировки 34 (cluster of differentiation 34)

Coll – коллаген I типа (Collagen I)

EMCN - муцин-подобный сиалогликопротеин (mucin-like sialoglycoprotein)

FGF – фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor)

HIF-1 α – фактор, индуцируемый гипоксией (Hypoxia-inducible factor 1-alpha)

HUVEC – эндотелиальные клетки вены пупочного канатика (Human umbilical vein endothelial cells)

IGF- Инсулиноподобный фактор роста (insulin growth factor)

Msx2 - гомеобоксный белок MSX-2 (Homeobox protein MSX-2)

MyoD – транскрипционный фактор, отвечающий за дифференцировку миоцитов

OC – остеокальцин (Osteocalcin)

ON – остеоонектин

OP – остеопонтин (Osteopontin)

OPG – остеопротегерин

Osx – остерикс (Osterix)

PDGF – тромбоцитарный фактор роста (Platelet-derived growth factor)

PPAR- γ - рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором гамма (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)

Runx2 – связанный с Runt фактор транскрипции 1 (Runt-related transcription factor 1)

Sox9 - SRY-Box Transcription Factor 9

TGF β – трансформирующий фактор роста β (Transforming growth factor beta)

TNF- α – фактор некроза опухоли (Tumor necrosis factor alpha)

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor)

VEGFR2 (Flk1) – рецептор к VEGF (Vascular endothelial growth factor receptor 2)

β -TCP – бета-трикальцийфосфат (beta tricalcium phosphate)

ВКМ – внеклеточный матрикс

КМ – костный мозг

ММСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки

ПЭК – предшественники эндотелиальных клеток

СКЖТ – стромальные клетки жировой ткани

Введение

Кость — сильно васкуляризованная ткань и ее развитие, ремоделирование и регенерация очень зависят от кровоснабжения. В настоящее время именно отсутствие кровеносных сосудов, и, как следствие, гипоксия и гибель клеток, при создании биоэквивалентов является основным фактором, лимитирующим эффективные процессы регенерации костной ткани. Наличие кровеносных сосудов в костной ткани не только обеспечивает снабжение клеток кислородом и питательными веществами, но также осуществляет паракринную регуляцию остеогенеза. Таким образом одной из основных целей при создании костных биоэквивалентов *in vitro* является их предваскуляризация для обеспечения более эффективной регенерации после трансплантации в область дефекта.

В обзоре обсуждаются основные механизмы взаимодействия остеогенеза и ангиогенеза в процессе развития и регенерации костной ткани, а также некоторые стратегии создания васкуляризованных костных биоэквивалентов. Они основаны на использовании факторов роста, различных систем доставки этих факторов, совместном культивировании клеток разного типа, использовании гидрогелей и матриц, а также на построении сосудов методом биопечати.

Актуальность

Восстановление структуры и функциональной активности костной ткани при травмах, а также системных заболеваниях скелета, является актуальной проблемой общества, решение которой позволит улучшить качество и продолжительность жизни. Так, согласно недавнему исследованию, в 2019 г. в мире было зарегистрировано 178 млн новых переломов, что на 33,4% больше, чем в 1990 г. [1]. Переломы возникают вследствие несчастных случаев или профессиональных травм, например, полученных во время занятий спортом. Кроме того, данный показатель постоянно растет в связи с увеличением продолжительности жизни, что также приводит к росту связанных с лечением медицинских расходов.

К заболеваниям костной ткани, некоторые из которых приводят к высокому риску переломов, относятся

остеопороз, остеонекроз, остеоартрит, ревматоидный артрит, Болезнь Педжета, остеосаркома, иммунные заболевания костей и многое другое. Самой распространенной причиной переломов является остеопороз — метаболическое возраст-ассоциированное заболевание скелета, главной особенностью которого является преобладание процессов резорбции над процессами остеогенеза и нарушение микроархитектуры костной ткани. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в развитых странах около 50% женщин и 20% мужчин старше 50 лет страдают остеопорозом.

Ежегодно в мире проводят около двух миллионов операций по пересадке костной ткани, что является вторым по частоте видом трансплантации после переливания крови [2]. Почти в 50% случаев для пересадки в область перелома используют аутологичный костный материал из подвздошной кости, дистальной части бедренной или проксимального отдела большой берцовой кости пациента. Недостатками ауто-трансплантации являются большое количество побочных эффектов, травма донорского участка и невозможность использовать данный метод для замещения крупных костных дефектов [3]. Еще в 25% случаев проводят алло- и ксенотрансплантации. Костные алло- и ксенотрансплантаты обладают высокой механической прочностью и эффективны при восстановлении массивных костных дефектов, однако довольно долго приживаются из-за тканевой несовместимости и могут осложняться бактериальной или вирусной инфекцией. Во избежание заражения такой материал подвергают серьезной обработке, что также снижает его остеоиндуктивные свойства [4].

Чтобы преодолеть упомянутые выше недостатки ауто-, алло- и ксенотрансплантации, ученые сосредоточили свое внимание на создании искусственной костной ткани. В настоящее время уже в 25% случаев переломов активно применяют синтетические костные трансплантаты, состоящие из прочного остеоиндуктивного матрикса, заполненного разными типами клеток, а также факторами роста [5]. Самыми распространенными синтетическими заменителями являются биоматериалы на основе фосфата кальция, например гидроксиапатит, трикальцийфосфат, биоактивное стекло (синтети-

ческая керамика на силикатной основе), костный цемент из полиметилметакрилата и др. [5]. Тем не менее, поиск новых методов восстановления крупных дефектов костной ткани по-прежнему является актуальной проблемой. Кость является метаболически активной сильно васкуляризованной тканью, в которой лимит диффузии, обеспечивающий формирование остеобластами жизнеспособной структуры, составляет 200 мкм [6]. В связи с этим, основным фактором, лимитирующим эффективные процессы регенерации, является дефицит в искусственном трансплантате кровеносных сосудов и кислорода, что снижает его интеграцию в ткани хозяина и приводит к гибели клеток. Таким образом, одной из основных целей биоинженерии костных биоэквивалентов является их предваскуляризация, для обеспечения которой важно понимать молекулярные механизмы взаимодействия остео- и ангиогенеза в процессе развития и регенерации кости. Данный обзор рассматривает некоторые аспекты дифференцировки остеогенных и эндотелиальных клеток, описывает механизмы их взаимодействия и систематизирует современные подходы создания васкуляризированной костной ткани.

Развитие костной ткани. Если рассматривать костную ткань на примере трубчатой кости (например, бедренная кость или фаланги пальцев), то ее можно разделить на внешний — кортикальный слой и внутренний — губчатый. Кортикальная кость очень прочная и состоит из остеонов — костных пластинок, расположенных вокруг Гаверсова канала, в котором проходят кровеносные сосуды и нервы. Губчатая кость пористая, часто содержит красный костный мозг и сильно васкуляризована.

Существует два механизма формирования кости во время эмбрионального развития — за счет эндохондрального или внутримембранного окостенения. Эндохондральное окостенение происходит путем образования хрящевых структур, которые затем заменяются на кальцинированную костную ткань [7]. На первом этапе хондроциты в месте расположения будущего центра первичного окостенения прекращают пролиферировать, становятся гипертрофированными и выделяют проангиогенные факторы (например, фактор роста эндотелия сосудов — VEGF). Под воздействием этих факторов кровеносные сосуды прорастают в область будущего окостенения и образуют там исходную сосудистую сеть [8]. Пришедшие по кровеносным сосудам остеогенные предшественники адгезируются к минерализованному хрящевому матриксу и начинают формировать кость. Таким образом формируются длинные и короткие трубчатые кости, например, бедренная кость и фаланги пальцев [9].

Плоские кости, такие как крыша черепа и лопатки, формируются путем внутримембранного окостене-

ния. В этом случае вначале происходит конденсация мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК), которые затем напрямую дифференцируются в остеобласты и начинают вырабатывать внеклеточный матрикс (ВКМ), способствующий формированию костной ткани [9].

Созревание остеобластов. Процесс созревания остеобластов длится около 3 нед и включает 3 этапа. На первом этапе клетки синтезируют фибронектин, коллаген I типа (Col1), рецептор к трансформирующему фактору роста (TGF-R) и остеопонтин (OPN). На втором этапе клетки начинают синтезировать щелочную фосфатазу, которая расщепляет фосфатсодержащие вещества для получения свободного фосфата и минерализации костей. На третьем этапе уже зрелые остеобласты синтезируют остеокальцин (OCN) и накапливают фосфат кальция [9].

Остеогенная дифференцировка ММСК контролируется множеством взаимодействующих факторов. Вначале под действием транскрипционного фактора Sox9 происходит конденсация ММСК и хондрогенная дифференцировка клеток. Затем зрелые хондроциты в перихондрии запускают остеогенную дифференцировку ММСК. Нокаут Sox9 приводит к недостатку экспрессии Runx2 — основного фактора, обеспечивающего дифференцировку ММСК в остеогенном направлении. Таким образом Sox9 является самым ранним фактором в молекулярном каскаде дифференцировки остеобластов и в особенности важен для эндохондрального окостенения [10]. Генами-мишенями Runx2 являются остеопонтин (OPN), костный сиалопротеин (Bsp), остеокальцин (OCN), остеопротегерин (OPG) и многие другие. Экспрессия Runx2 также регулируется такими факторами как BMP (костный морфогенетический белок), Wnt, Notch и TGFβ (трансформирующий фактор роста бета) [11]. Другой важный транскрипционный фактор остеогенной дифференцировки — Osterix (Osx) находится под контролем сигнального пути Wnt и необходим для экспрессии таких маркеров остеогенеза как Col1, OCN, Bsp, остеоонектин (ON), OPN, однако никак не влияет на экспрессию Runx2 [12]. BMP-сигналинг находится в начале молекулярного каскада остеогенной дифференцировки и стимулирует пролиферацию и созревание остеогенных предшественников [10]. BMP-2 необходим для экспрессии Osterix и Sox9, а также увеличивает экспрессию гомеобоксного гена *Msx2*, подавляющего адипогенную дифференцировку, воздействуя на фактор PPARγ (рецептор, активируемый пероксисомными пролифераторами). Runx2 так же может ингибировать PPARγ [12]. Большинство факторов, например TGFβ, IGF (инсулиноподобный фактор роста), FGF (фак-

тор роста фибробластов), TNF- α (фактор некроза опухоли), влияют на дифференцировку остеобластов, как раз воздействуя на Runx2 и Osterix [9]. Интересно, что оба транскрипционных фактора также являются механически чувствительными, то есть их экспрессия может быть вызвана механическим воздействием на клетки. Показано, что сжатие клеток блокирует миогенную и адипогенную дифференцировку ММСК, подавляя экспрессию *MyoD* (ген, отвечающий за дифференцировку миоцитов) и PPAR γ , и в то же время активирует экспрессию Runx2, Osterix, Msx2 и Sox9, стимулируя остеогенную дифференцировку клеток. Растяжение также стимулирует экспрессию Runx2, Osterix, Msx2, щелочной фосфатазы, OCN, Col1. Напряжение сдвига увеличивает экспрессию коллагена I типа, остеокальцина, остеоопонтина [9]. Это объясняет необходимость физической активности для поддержания нормального гомеостаза и регенерации костной ткани.

Связь остеогенеза и ангиогенеза. Кровеносные сосуды могут формироваться двумя способами. В раннем эмбриогенезе мезодермальные клетки дифференцируются в гемангиобласты – предшественники эндотелиальных клеток (ПЭК) и клеток крови, которые затем в процессе васкулогенеза мигрируют и формируют примитивные сосуды. На первом этапе мезодермальные ПЭК в ответ на воздействие β FGF и VEGF начинают дифференцироваться в эндотелиальном направлении. Затем эндотелиальные клетки (ЭК) пролиферируют, мигрируют друг к другу, начинают формировать сосуды и выделять тромбоцитарный фактор роста (PDGF), тем самым воздействуя на предшественников перицитов (периваскулярных клеток) через рецептор к PDGF и стимулируя их миграцию в направлении растущих сосудов. Перициты играют важную роль в поддержании сосудов, поскольку их взаимодействие с эндотелиальными клетками приводит к формированию сосудистой базальной мембраны [13]. Однако большинство сосудов, в том числе и в костях, возникает вторым способом, в результате ангиогенеза – разрастания и разветвления существующих сосудистых сетей.

В последние годы уделяется особое внимание взаимодействию между эндотелиальными и остеопрогениторными клетками, так как они всегда располагаются в непосредственной близости друг от друга в местах формирования кости, что указывает на важную роль их правильной коммуникации в заживлении и ремоделировании костной ткани [14]. Взаимодействие между ЭК, остеобластами и хондроцитами в перихондрии имеет решающее значение для начала формирования кости. Выявлено большое количество факторов, обеспечивающих стабильную систему взаиморегуляции остеогенеза и ангиогенеза.

Основным фактором, стимулирующим ангиогенез является фактор роста эндотелия сосудов VEGF. Основным рецептором к VEGF является тирозинкиназа VEGFR2 (Flk1). Передача сигналов через Flk1 обеспечивает миграцию, пролиферацию и жизнеспособность эндотелиальных клеток [15]. В процессе эндохондрального окостенения гипертрофические хондроциты секретуют VEGF, который способствует прорастанию сосудов в хрящ, а в процессе регенерации VEGF воздействует на ЭК и стимулирует васкуляризацию костной ткани [16]. VEGF также играет ключевую роль аутокринной регуляции остеогенеза, контролируя миграцию, дифференцировку и жизнеспособность хондроцитов, остеокластов и остеобластов, на поверхности которых также экспрессируется рецептор Flk1 [17]. Кроме того, VEGF ингибирует адипогенную дифференцировку ММСК [18].

Важную роль в регенерации скелетной ткани играет гипоксия. Фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1 α), индуцирует дифференцировку остеопрогениторных клеток и также стимулирует ангиогенез [19], а ингибирование HIF-1 α , напротив, нарушает формирование костей и васкуляризацию [20]. Показано, что предварительное культивирование ММСК в условиях гипоксии индуцирует HIF-1 α -зависимую экспрессию VEGF и β FGF, что улучшает выживаемость клеток, способствует усилению ангиогенеза и остеогенной дифференцировки ММСК и таким образом ускоряет заживление крупных костных дефектов [21].

Фактор BMP также обеспечивает взаимодействие осте- и ангиогенеза. Эндотелиальные клетки продуцируют BMP-2,4,7 и TGF β , тем самым контролируя дифференцировку и активность остеобластов [22], а BMP-2 и 7 индуцируют экспрессию VEGF и стимулируют ангиогенез [23]. VEGF усиливает экспрессию BMP-2 в эндотелиальных клетках и модулирует индуцированную BMP-4,6 остеогенную дифференцировку ММСК через Runx2-зависимые механизмы [24].

Другой фактор, координирующий осте- и ангиогенез – PDGF. Это основной фактор, который секретруется активированными тромбоцитами для стимуляции механизмов восстановления в травмированных тканях, в том числе и в кости [25]. При повреждении костной ткани высокие концентрации PDGF стимулируют пролиферацию сосудистых перицитов и остеопрогениторных клеток, их миграцию в область повреждения, а также увеличивают минерализацию [25]. При этом ингибирование PDGF приводит к несогласованной миграции перицитов *in vitro* [26]. Таким образом, PDGF также является важным фактором, координирующим ангиогенную и остеогенную дифференцировку.

Регенерация костной ткани во многом повторяет события эмбрионального остеогенеза. Повреждение костной ткани вызывает локальное нарушение сосудистой сети и приводит к гипоксии, которая стимулирует высвобождение проангиогенных факторов, а также к образованию гематомы, воспалению и, как следствие, выделению факторов (BMP, FGF, Wnt и др.), привлекающих в область повреждения остеогенные прогениторные клетки [27]. Заживление переломов регулируется через взаимодействие таких факторов как TGFβ, BMP, FGF, PDGF, Wnt и другими факторами, многие из которых также стимулируют дифференцировку эндотелиальных клеток и васкуляризацию [16]. В месте повреждения ММСК способствуют заживлению переломов, экспрессируя BMP-2, снижая уровень фактора некроза опухоли TNF-α, ингибирующего дифференцировку остеобластов и секретируя иммуно-

модулирующие и антиапоптотические факторы роста и цитокины [28]. ММСК также могут стимулировать ангиогенез паракринным образом, например за счет секреции VEGF, или непосредственно дифференцируясь в эндотелиальные клетки или перициты [26].

Молекулярные механизмы взаимодействия остеогенеза и ангиогенеза кратко представлены на **рисунке 1**.

Использование факторов роста для васкуляризации биоэквивалентов костной ткани. Большинство тканеинженерных конструкций нуждаются в сосудистой сети для снабжения клеток питательными веществами и кислородом. Процесс естественного врастания сосудов в искусственную ткань после трансплантации занимает много времени, что накладывает ограничения на размер конструкции, либо приводит к быстрой гибели клеток трансплантата из-за гипоксии и нехватки питательных веществ. Самые первые попытки стиму-

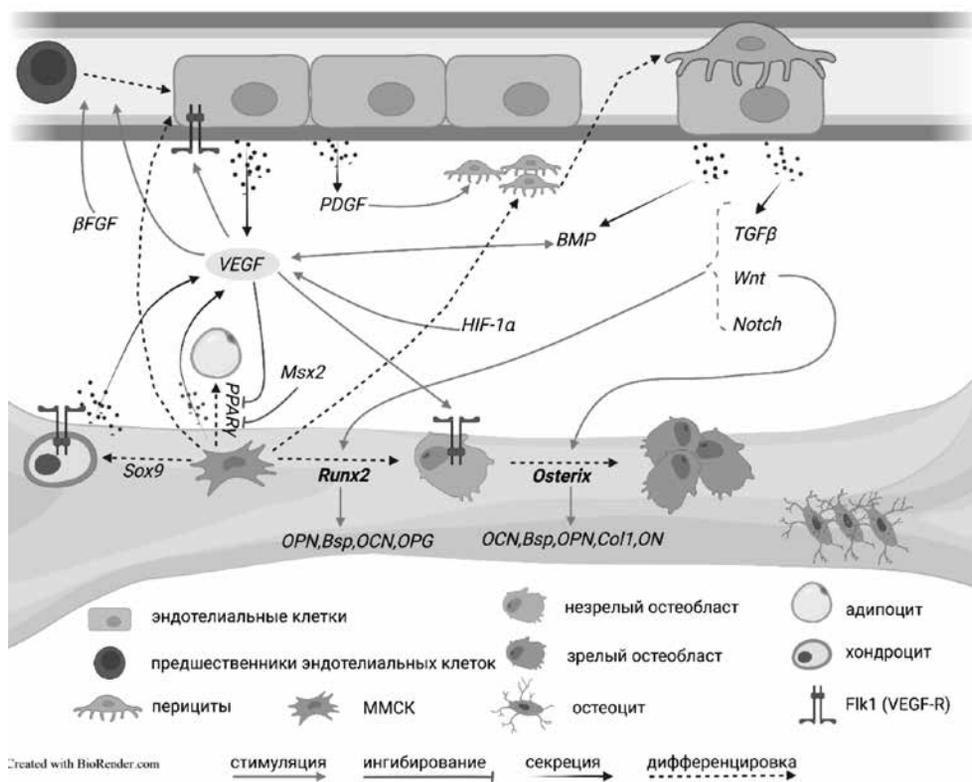


Рис. 1. Молекулярные механизмы взаимодействия остеогенеза и ангиогенеза: объяснение в тексте. ММСК (мультипотентные мезенхимные стромальные клетки), FGF (фактор роста фибробластов), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), PDGF (тромбоцитарный фактор роста), BMP (костные морфогенетические белки), TGF (трансформирующий фактор роста), OPN (остеопонтин), OCN (остеокальцин), ON (остеонектин), Bsp (костный сиалопротеин), OPG (остеопротегерин), PPAR (рецептор, активируемый пероксисомными пролифераторами), HIF (фактор, индуцируемый гипоксией), Runx (фактор транскрипции, связанный с Runt).

Fig. 1. Molecular mechanisms of interaction between osteogenesis and angiogenesis: explanation in the text. MMCK (multipotent mesenchymal stromal cells), FGF (fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), BMP (bone morphogenetic proteins), TGF (transforming growth factor), OPN (osteopontin), OCN (osteocalcin), ON (osteonectin), Bsp (bone sialoprotein), OPG (osteoprotegerin), PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor), HIF (hypoxia-inducible factor), Runx (Runt-related transcription factor).

лирование васкуляризации были основаны на использовании различных проангиогенных цитокинов и факторов роста. VEGF, FGF, ангиопоэтин (Ang), TGF, PDGF и некоторые интерлейкины являются ключевыми факторами, стимулирующими васкуляризацию [29]. Добавление экзогенного PDGF способствует остеогенной дифференцировке стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ), а также формированию сосудистой сети *in vitro* за счет привлечения периваскулярных клеток [30]. Однако эффективная васкуляризация зависит не только от правильного сочетания факторов роста, но и от их дозированного и контролируемого высвобождения. Однократное введение факторов в высокой концентрации приводит к появлению функционально несовершенных кровеносных сосудов. Например, высокая концентрация VEGF приводит к формированию излишне проницаемых сосудов [29]. Поэтому преимущественно обладают системы, в которых факторы роста смешивают с гидрогелями или наносят на различные каркасы перед трансплантацией, что обеспечивает их дозированное высвобождение в течение долго периода. Например, для постепенного высвобождения VEGF могут быть использованы коллагеновые каркасы с частицами гидроксиапатита [31] или микрочастицы альгината, которые перед трансплантацией в область дефекта вводят в состав каркаса из коллагена и гидроксиапатита [32]. Такой подход позволяет также создавать системы, которые дозированно выделяют сразу несколько факторов в разных концентрациях. Например, использование каркаса на основе фосфата кальция и полилактогликолевой кислоты, который выделял одновременно PDGF и VEGF, приводило к формированию стабильной сосудистой сети [33]. В другом исследовании были получены пористые матрицы из бета-трикальцийфосфата (β -ТСП), которые контролируемо выделяли VEGF и BMP-2. Внутримышечная имплантация таких конструкций усиливала васкуляризацию и остеогенную дифференцировку [34]. Аналогичные результаты были показаны для BMP-2, VEGF и β FGF на модели дефекта свода черепа у крыс [35].

ММСК секретируют большинство из этих факторов, что во многом обеспечивает их регенеративные свойства. Показано, что кондиционированные среды от СКЖТ содержат VEGF, FGF-2 и ангиопоэтин, при этом пик концентрации приходится на 7-е сутки культивирования ММСК [36]. Также для СКЖТ показано присутствие IGF [37] и TGF β [38]. Эти факторы могут способствовать регенерации костной ткани за счет единовременной стимуляции как васкуляризации, так и дифференцировки остеогенных предшественников. Эффективность использования кондиционирован-

ных сред от ММСК для терапии заболеваний костной ткани уже неоднократно была продемонстрирована на различных моделях *in vivo*. Показано, что кондиционированные среды от ММСК КМ значительно снижают область дефекта свода черепа у крыс, действуя как на остеогенез, так и на васкуляризацию [39]. Использование искусственных полимерных микрочастиц, заполненных концентрированной кондиционированной средой от ММСК КМ, снижает клеточный апоптоз, системное воспаление и увеличивает жизнеспособность остеобластов в мышинной модели остеопороза, вызванного овариэктомией [40]. Было проведено несколько клинических испытаний, подтверждающих безопасность и эффективность использования кондиционированных сред от ММСК в стоматологической практике для регенерации альвеолярной кости челюсти [41].

Генетическая инженерия открыла новые возможности доставки проангиогенных факторов. Одним из подходов является заселение твердых каркасов и гидрогелей остеогенными предшественниками (osteoblastами или ММСК), сверхэкспрессирующими гены ангиогенных факторов роста. Разнообразие методов генетической модификации позволяет получать необходимую концентрацию и скорость выделения каждого фактора. На модели дефекта свода черепа была показана эффективность СКЖТ, сверхэкспрессирующих BMP-2 и VEGF. Авторы смешивали BMP-2 и VEGF-трансфицированные клетки в разных концентрациях, подбирая оптимальное соотношение для стимуляции ангиогенеза и остеогенеза [42]. Также была показана эффективность ММСК костного мозга, сверхэкспрессирующих FGF, после трансплантации в дефект свода черепа у крыс [43]. Однако, несмотря на свою эффективность, основным недостатком метода генетической инженерии является его высокая стоимость.

МикроРНК — малые некодирующие молекул РНК длиной около 22 нуклеотидов, регулирующие экспрессию генов за счет РНК интерференции. На основании экспериментальных данных было выделено множество микроРНК, которые отвечают за регуляцию взаимодействия процессов остеогенеза и ангиогенеза. К ним относятся miR-9, miR-10a, miR-20a, miR-26a, miR-29b, miR-31, miR-34a, miR-92a, miR-125b, miR-126, miR-135b, miR-181a, miR-195, miR-200b, miR-210, miR-222 и miR-424 и многие другие [44]. Экзогенное введение или ингибирование определенных микроРНК открывает широкий спектр терапевтических возможностей. Так, на *in vivo* модели остеопороза, индуцированного овариэктомией, было показано, что блокирование miR-

148a ингибирует резорбцию кости и увеличивает костную массу у мышей [38]. Аналогичные результаты были продемонстрированы при ингибировании miR-1187 [45]. Напротив, экзогенное введение miR-451 способствует дифференцировке и минерализации остеобластов на модели остеопороза, индуцированного овариэктомией [46]. Список микроРНК, регулирующих гомеостаз костной ткани, постоянно пополняется.

Совместное культивирование остеогенных и ангиогенных клеток. Другим подходом к достижению васкуляризации одновременно с остеогенезом в составе костных биоэквивалентов является совместное культивирование (со-культивирование) эндотелиальных и остеогенных клеток или их предшественников в монослое, сфероиде, гидрогеле или на различных каркасах. В качестве остеогенных клеток могут быть использованы как зрелые остеобласты, так и ММСК. Преимущество зрелых остеобластов заключается в том, что они сразу после трансплантации могут продуцировать минерализованный костный матрикс. Однако их сложно изолировать из тканей пациента и они медленно пролиферируют [29]. Поэтому при инженерии костной ткани отдается предпочтение остеопрогениторным клеткам, например ММСК, либо преостеобластным культурам. По сравнению со зрелыми остеобластами эти клетки имеют преимущества, так как могут быть легко изолированы из множества источников, имеют высокий пролиферативный потенциал, а также секретируют VEGF, стимулирующий ангиогенез и дифференцировку предшественников эндотелиальных клеток [47].

Эндотелиальные клетки являются более гетерогенной популяцией, чем остеобласты. Они различаются по морфологии, проницаемости и профилю экспрессии генов в зависимости от органа и типа сосудов. Из-за доступности источника, простоты выделения и культивирования чаще всего используются эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVES). Также могут быть использованы предшественники эндотелиальных клеток (ПЭК). Они имеют высокий пролиферативный потенциал, жизнеспособность и успешно изолируются из периферической крови, костного мозга и пуповинной крови по экспрессии таких маркеров, как фактор фон Виллебранда (vWF), CD31, VE-кадгерин (белок клеточной адгезии эндотелия сосудов), CD133, Flk1 и CD34 [48]. В некоторых исследованиях используют и зрелые эндотелиальные клетки сосудов [14].

Преимущества со-культивирования эндотелиальных и остеогенных клеток было показано во многих исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Контактное взаимодей-

ствие между HUVES и остеобластами приводит к значительным изменениям экспрессии генов в обеих популяциях клеток с активацией Flk-1 в ЭК и щелочной фосфатазы в остеобластах [49]. ММСК положительно влияют на способность HUVES формировать стабильные капиллярные сети [50]. Однако после предварительной дифференцировки в остеогенном направлении ММСК теряют способность координировать ЭК и стимулировать формирование сосудов [26]. Совместная монослойная культура эндотелиальных клеток аорты и ММСК из костного мозга индуцирует как остеогенез, так и ангиогенез. Об этом свидетельствует образование капилляроподобных структур, интенсивная минерализация и увеличение экспрессии остеогенных маркеров [51]. При совместном культивировании ПЭК и ММСК КМ возрастает способность формировать капилляроподобные структуры, происходит более ранняя экспрессия остеогенных (Col1, OCN и BMP-2) и ангиогенных (VEGF, Flk1) маркеров [52], а также возрастает активность щелочной фосфатазы и отложение ВКМ, что вероятно связано с активацией MAPK-сигнального пути [53].

3D со-культивирование клеток в виде сфероидов приводит к усилению взаимодействия между двумя популяциями за счет высокого содержания ВКМ и формирования контактов. Так, совместное 3D культивирование ММСК КМ и HUVES значительно ускоряет остеогенную дифференцировку за счет активации Wnt и BMP-сигнальных путей [54]. Со-культивирование в сфероиде ЭК микрососудов кожи человека и остеобластов приводит к формированию капилляроподобных структур, которые после имплантации *in vivo* вырастают за пределы сфероидов и интегрируются в сеть окружающих кровеносных сосудов [55].

При совместном культивировании важную роль играет соотношение разных типов клеток. Соотношение HUVES и остеобластов в монослойной культуре 5:1 положительно влияет на ангиогенез, в то время как соотношение 1:5 способствует минерализации [56]. Для поддержания пролиферации эндотелиальных клеток аорты и ММСК КМ в совместной культуре баланс должен быть сдвинут в сторону первых (5:1, соответственно). В ином случае остеогенные клетки будут подавлять пролиферацию эндотелиальных клеток [51]. Такая же закономерность показана для сфероидов из СКЖТ и HUVES: ангиогенный потенциал последних сохраняется при соотношении равном 2:8, соответственно [26].

Другим важным фактором, определяющим успех со-культивирования, является состав питательной среды и последовательность добавления различных ин-

дукционных факторов. Во многих исследованиях показано, что остеогенная среда оказывает ингибирующее действие на ЭК [50]. Вероятно, это может быть связано с содержащимся в среде β -глицерофосфатом, который индуцирует апоптоз эндотелиальных клеток [57]. При культивировании СКЖТ в виде сфероидов для формирования полноценной сосудистой сети необходимо индуцировать сначала ангиогенез, а через 7 суток добавлять остеогенные индукционные факторы [30]. При со-культивировании HUVEC с ММСК костного мозга на децеллюляризованных костных каркасах развитие сосудов так же усиливается, если индуцировать ангиогенез до остеогенеза, а также добавлять новые ММСК из костного мозга на стадии остеогенной индукции [50]. Кроме того, было показано, что добавление в среду BMP-2 значительно снижает количество клеточного дебриса, что свидетельствует о том, что данный фактор может поддерживать жизнеспособность клеток [50]. Таким образом, последовательная индукция васкуляризации и остеогенеза способствует оптимальной дифференцировке клеток в пределах одной тканеинженерной конструкции.

Со-культивирование эндотелиальных и остеогенных прогениторных клеток является перспективным методом получения васкуляризованных костных биоэквивалентов. Однако использование клеток из разных источников ограничивает их клиническое применение, особенно в случае аутологичной терапии, при которой используются собственные клетки пациента, а не аллогенный материал. В связи с этим особое внимание уделяется поиску клеток, которые могут быть легко изолированы из тканей пациента, а также способны дифференцироваться и в ангиогенном, и в остеогенном направлении [58]. Данным критериям удовлетворяет популяция СКЖТ. Показано, что СКЖТ в высокой плотности в условиях как монослойного, так и 3D культивирования способны к самоорганизации и формированию тубулоподобных структур [14]. Единовременное добавление остеогенных и ангиогенных индукторов также может увеличить ангиогенный потенциал СКЖТ сфероида, что подтверждается формированием сосудоподобных структур в фибриновом геле [59]. Трансплантация различных пористых скаффолдов, заселенных сфероидом СКЖТ, приводит к формированию костной ткани, а также способствует васкуляризации тканеинженерной конструкции и ее интеграции в сосудистую сеть хозяина [60]. Культивирование СКЖТ на каркасах в присутствии остеогенных и ангиогенных индукционных факторов усиливает их остеогенную дифференцировку [61]. Таким образом, СКЖТ являются удобным типом клеток для воспро-

изведения *in vitro* ангиогенной ниши с целью регенерации сосудов и васкуляризации [62], а также способны дифференцироваться в остеогенном направлении, способствуя восстановлению костных дефектов. Однако ангиогенный потенциал СКЖТ в значительной степени зависит от стадии их дифференцировки [63] и предварительная индукция клеток в остеогенном направлении значительно снижает их способность к васкуляризации *in vivo* [55].

При со-культивировании клеток важную роль играет внеклеточный матрикс (ВКМ), содержание которого значительно увеличивается при культивировании на пористых каркасах или в 3D условиях по сравнению с монослойной культурой. ВКМ содержит факторы роста, которые в результате протеолиза матриксными металлопротеиназами могут участвовать в регуляции различных процессов. Так, было показано, что ВКМ, синтезируемый фибробластами, хондроцитами и ЭК, индуцирует остеогенез, а остеобластами – образование капилляров [29]. Это позволяет использовать в тканевой инженерии только синтезированный *in vitro* ВКМ вместо самих клеток.

Костные синтетические биоматериалы. При больших дефектах костной ткани инъекция суспензии клеток в область повреждения не эффективна, потому для доставки и закрепления клеток или сфероидов в области повреждения широкое применение находят различные синтетические биоматериалы. Функциональная костная ткань состоит из 3 основных компонентов: жесткого пористого минерализованного каркаса, клеток остеогенного ряда и кровеносных сосудов. *In vitro* такую систему можно создать, комбинируя синтетические биоматериалы с клетками, способными дифференцироваться в остеогенном и эндотелиальном направлениях, а также добавляя различные факторы роста, стимулирующие остеогенез и васкуляризацию. Идеальный каркас должен быть изготовлен из биоматериалов, имитирующих структуру и свойства естественного внеклеточного матрикса кости. Он должен способствовать адгезии клеток, обладать остеоиндуктивными свойствами, быть прочным, пористым для обеспечения васкуляризации и необходимой диффузии газов и питательных веществ, а также быть биосовместимым, то есть не вызывать отторжения при трансплантации [30].

На данный момент существует огромное разнообразие синтетических костных биоматериалов, многие из которых уже применяются в клинической практике. В большинстве современных исследований используют матрицы, основанные на соединениях кальция и фосфора, как например бета-трикальцийфосфат (β -ТСР)

и гидроксиапатит (НА) [7]. Основным преимуществом таких биоматериалов является их биodeградация после трансплантации, в результате чего освобождается пространство для пролиферации клеток, роста и васкуляризации кости, а также выделяются ионы Са и Р, которые могут дополнительно стимулировать остеогенез [16]. Для обеспечения одновременной васкуляризации и остеогенеза, каркасы часто заселяют совместной культурой из эндотелиальных и остеопрогениторных клеток, что приводит к более эффективному восстановлению поврежденной ткани [5]. β -ТСР каркасы могут стимулировать остеогенную дифференцировку, а также поддерживать васкуляризацию конструкта. Показано, что HUVEC эффективнее пролиферируют и формируют сосудистую сеть на β -ТСР матрицах, по сравнению с другими каркасами [64]. В клинической практике β -ТСР уже не раз применялся для улучшения регенерации костной ткани. Культивирование СКЖТ на β -ТСР при добавлении BMP-2 фактора приводит к формированию конструкции, которая способна полностью восстановить крупный дефект бедренной кости [15]. Аналогичные результаты *in vivo* были получены при совместном культивировании ММСК с ПЭК на каркасе из β -ТСР [65]. Помимо Са-Р матриц используется также керамика на основе кремния, как например волластонит (CaSiO_3), диопсид ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$) и другие. Кремний играет важную роль в кальцификации костей и предотвращает остеопороз, увеличивая синтез основных компонентов внеклеточного матрикса кости — коллагена и протеогликана [66]. Также применяют природные биоразлагаемые полимеры такие как коллаген, хитозан и целлюлоза. Их основное преимущество заключается в нетоксичности и низком риске иммунного ответа, так как основной продукт деградации этих полимеров — это аминокислоты, которые легко поглощаются организмом человека [66]. Данные полимеры могут быть использованы для контролируемой доставки факторов. Коллагеновые носители также способствуют миграции клеток и улучшают васкуляризацию после трансплантации [67]. По сравнению с природными полимерами, синтетические биоразлагаемые полимеры (полигликолевая кислота, поливиниловый спирт, поликапролактое и др.) сильно отличаются друг от друга по механическим и химическим свойствам. Химическая модификация позволяет создавать полимеры с необходимыми свойствами, варьируя степень биodeградации, адгезивные свойства, прочность и др. В обзоре С. Гао и соавт. [66] рассмотрены основные костные биоматериалы, описываются их характеристики и области применения.

Использование костных биоматериалов является перспективным подходом в регенеративной медицине. Жесткий каркас в сочетании с остеогенными сигналами создает для клеток необходимое механическое напряжение, запускает остеогенную дифференцировку и синтез ВКМ, а пористая структура каркаса позволяет равномерно заселить клетками весь конструкт и формирует пространство для васкуляризации, что необходимо для обеспечения всех клеток питательными веществами и газами. Данный подход позволяет наиболее точно моделировать *in vitro* структуру костной ткани с необходимым микроокружением для дифференцировки. Трансплантация таких васкуляризованных костных биоэквивалентов в область повреждения обеспечивает быстрое и эффективное восстановление кости.

Биопечать. Еще одним способом получения васкуляризованных костных биоэквивалентов является трехмерная биопечать — метод объединения разных типов клеток, факторов роста и внеклеточного матрикса для создания искусственных многоклеточных тканей или органов [68]. Биопечать позволяет с высокой точностью и воспроизводимостью послойно напечатать ткань, соблюдая необходимую геометрию и пространственное распределение разных типов клеток, и воспроизвести структуру и функции нативной ткани [69]. Данная тема обширна и заслуживает отдельного обзора. Существуют различные методы биопечати кровеносных сосудов, которые включают струйную (капельную), экструзионную и лазерную печать [70]. При биопечати на основе экструзии клетки ресуспендируют в гидрогеле, состоящем из альгината, фибрина, полиэтиленгликоля (ПЭГ) или желатина, формируя таким образом биочернила. После экструзии биочернила подвергаются физической или химической модификации, что придает им необходимую прочность и позволяет гелю сохранять форму [70]. Полая структура сосуда может быть получена путем печати в вертикальных полых трубочках, вокруг твердого стержня или с использованием «жертвенных» чернил [70]. Благодаря особой химической структуре такие чернила могут быть удалены после печати с помощью температуры, механического воздействия или путем инкубации в среде для культивирования клеток, содержащей ферменты, растворяющие гидрогель. В результате остаются полые каналы, которые могут быть заселены эндотелиальными клетками. Классическими «жертвенными» биочернилами являются желатин, который плавится при инкубации напечатанной конструкции при 37 °С, либо альгинат и гиалуроновая кислота, которые могут быть удалены ферментативным расщеплением при ин-

кубации конструкций в культуральной среде, содержащей альгинатлиазу или гиалуронидазу [29].

Струйный метод биопечати позволяет более точно распределять разные типы клеток при печати благодаря использованию тонких акустических и электростатических технологий [70]. Лазерную биопечать чаще используют для создания каркасов, которые затем засевают клетками, либо для печати клеток на поверхности конструкта [70].

Комбинированная биопечать остеогенных и эндотелиальных предшественников представляет собой многообещающую стратегию для производства васкуляризированной искусственной костной ткани для восстановления костных дефектов критического размера. Так, в недавнем исследовании были созданы костные тканеинженерные конструкции путем биопечати СКЖТ и HUVEC человека [71]. Подкожная имплантация таких конструкций мышам приводила к формированию из HUVEC кровеносных сосудов, которые были окружены мышинными перицитами. При этом СКЖТ синтезировали кальцинированный костный матрикс [71]. В похожем исследовании методом экструзионной биопечати была напечатана конструкция, состоящая из ЭК микрососудов дермы человека и СКЖТ. Авторы показали, что имплантация данной конструкции способствовала формированию сосудистых структур и костного матрикса [12]. В другом исследовании наблюдали формирование сосудистой сети при совместной биопечати культур ПЭК и ММСК человека в коллагеновом гидрогеле [72]. Та же группа ученых использовала лазерную биопечать для печати HUVEC непосредственно в костных дефектах свода черепа у мышей, заполненных ММСК и коллагеном с заякоренным на нем VEGF. HUVEC были способны образовывать организованные микрососудистые сети на поверхности коллагена внутри костного дефекта, что приводило к увеличению скорости васкуляризации и регенерации кости уже через 2 месяца [72]. Для создания более сложной структуры сосуда можно использовать совместную культуру HUVEC и перицитов [73]. В другом исследовании авторы пытались воссоздать структуру костного остеона с помощью экструзионной биопечати, используя ММСК и HUVEC, инкапсулированные в фибриновые биочернила [74]. В недавнем исследовании была напечатана модель васкуляризированной кости с использованием желатин-наногидроксиапатитного каркаса. Каркас вначале засевали ММСК, которые подвергались остеогенной индукции, а спустя 2 недели добавляли HUVEC для индукции ангиогенеза. Полноценная васкуляризация была достигнута уже через две недели [75].

Таким образом трехмерная биопечать демонстрирует высокий потенциал в экспериментах *in vivo* и *in vitro* и открывает новые возможности в тканевой инженерии. Однако, несмотря на достигнутый прогресс, это все еще новая технология, и на многие вопросы еще предстоит ответить.

Основные стратегии васкуляризации костного биоэквивалента кратко представлены на **рисунке 2**.

Заключение

Современные подходы к созданию тканеинженерных конструкций для восстановления крупных дефектов костной ткани направлены на моделирование *in vitro* ниши, способствующей дифференцировке как клеток костной линии, так и клеток эндотелиального ряда для обеспечения должной васкуляризации. В эмбриональном развитии остеогенез и ангиогенез являются тесно связанными процессами, и взаимодействие между эндотелиальными клетками или их предшественниками с остеопрогениторными клетками имеет решающее значение для формирования костной ткани. В настоящее время существует много способов васкуляризации костной ткани. Разрабатываются новые методы доставки микроРНК и факторов роста, стимулирующих васкуляризацию. Изучается возможность со-культивирования остеогенных и эндотелиальных клеток и их предшественников в виде сфероидов, в составе гидрогеля, а также на синтетических каркасах. Разрабатываются подходы единовременной индукции ММСК в остеогенном и ангиогенном направлении. В последнее время многие ученые отдают предпочтение трехмерной биопечати, так как она позволяет быстро получить сложноорганизованные конструкции из остеопрогениторных клеток, окруженных полыми сосудами, состоящими из эндотелиальных и периваскулярных клеток, а также сделать эти конструкции персонализированными с учетом особенностей дефекта у конкретного пациента. Однако многие вопросы остаются не до конца неизученными: оптимальные составы биоматериалов для контролируемой доставки факторов роста, оптимальное соотношение остеогенных и эндотелиальных предшественников при совместном культивировании, последовательность и продолжительность добавления, а также концентрации индукционных факторов для обеспечения успешной васкуляризации при сохранении остеогенной составляющей. Метод биопечати влечет за собой множество вопросов, связанных с типом используемого гидрогеля, концентрацией клеток и составом факторов роста. Будущие исследования должны быть направлены на выяснение механизмов взаимодействия между эн-

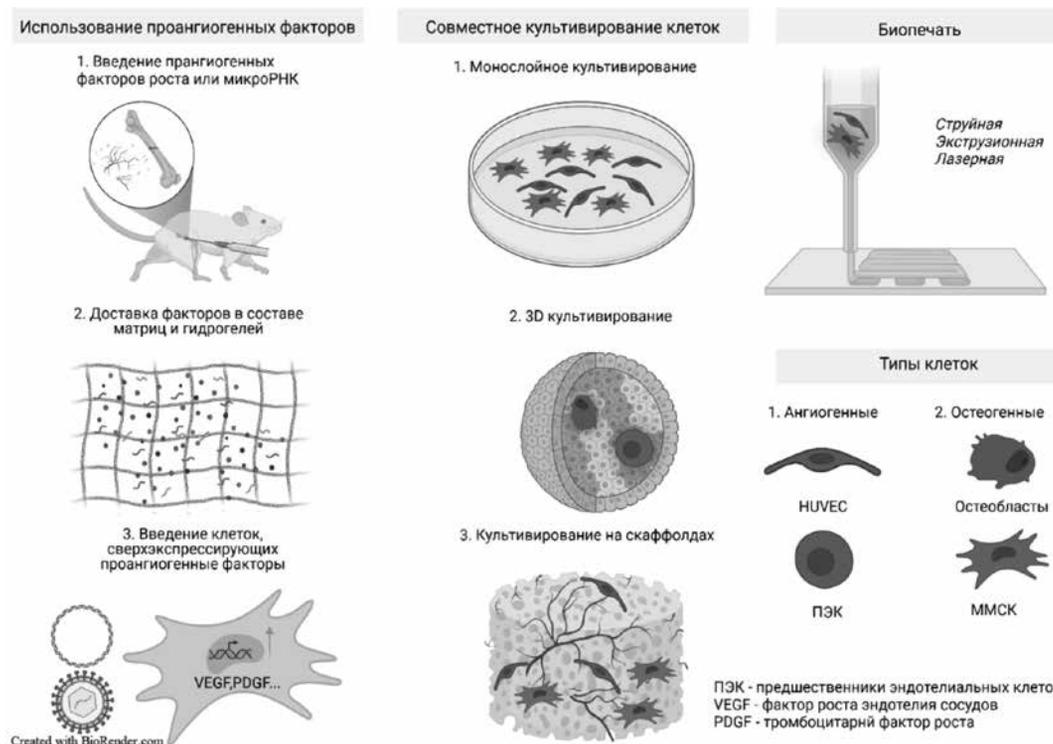


Рис. 2. Стратегии васкуляризации костного биоэквивалента: объяснение в тексте. MMCK (мультипотентные мезенхимные стромальные клетки), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), PDGF (тромбоцитарный фактор роста), ПЭК (предшественники эндотелиальных клеток), HUVEC (эндотелиальные клетки пупочной вены человека).

Fig. 2. Bone bioequivalents vascularization strategies: explanation in the text. MMCK (multipotent mesenchymal stromal cells), VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), ПЭК (endothelial precursor cells), HUVEC (human umbilical vein endothelial cells).

дотелиальными и остеогенными предшественниками в разных системах, а также на обеспечение оптимизированных и стандартизированных условий культивирования. Подбор оптимального источника клеток и систем культивирования может приблизить нас к клиническому применению костных тканеинженерных конструкций для восстановления крупных дефектов.

Литература/References

1. Global, regional, and national burden of bone fractures in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet. Heal. Longev.* 2021; 2: 580–92. [https://doi.org/10.1016/S2666-7568\(21\)00172-0](https://doi.org/10.1016/S2666-7568(21)00172-0)
2. Wang W., Yeung K. W. K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact. Mater.* 2017; 2: 224–47. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>
3. Baldwin P., Li D. J., Auston D.A., Mir H.S., Yoon R.S., Koval K.J. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J. Orthop. Trauma.* 2019; 33: 203–13. <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000001420>
4. Cancedda R., Giannoni P., Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical prac-

tice. *Biomaterials.* 2007; 28, 4240–50. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.06.023>

5. Genova T., Roato I., Carossa M., Motta C., Cavagnetto D., Mussano F. Advances on Bone Substitutes through 3D Bioprinting. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(19): 7012. <https://doi.org/10.3390/ijms21197012>
6. Muschler G.F., Nakamoto C., Griffith L.G. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Jt. Surg Am.* 2004; 86: 1541–58. <https://doi.org/10.2106/00004623-200407000-00029>
7. Clarkin C., Olsen B.R. On bone-forming cells and blood vessels in bone development. *Cell Metab.* 2010; 12: 314–16. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.09.009>
8. Long F., and Ornitz D. M. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013; 5: 1–20. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008334>
9. Rutkovskiy. (2016). Osteoblast Differentiation at a Glance. 95–106. <https://doi.org/10.12659/msmbr.901142>
10. Salazar V.S., Gamer L.W., Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2016; 12: 203–21. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.12>
11. Li Y., Ge C., Long J.P., Begun D.L., Rodriguez J.A., Goldstein S.A., et al. Biomechanical stimulation of osteoblast gene expression requires phosphorylation of the RUNX2 transcription factor. *J. Bone Miner. Res.* 2012; 27: 1263–74. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1574>

12. Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R., et al. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell*. 2002; 108: 17–29. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00622-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00622-5)
13. Armulik A., Abramsson A., and Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ. Res.* 2005; 97: 512–23. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7>
14. Kocherova I., Bryja A., Mozdziak P., Angelova Volponi A., Dyszkiewicz-Konwińska M., Piotrowska-Kempisty H., et al. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Grafts. *J. Clin. Med.* 2019; 8(10): 1602. <https://doi.org/10.3390/jcm8101602>
15. Olsson A., Dimberg A., Kreuger J., Claesson-welsh L. Reviews VEGF receptor signalling — in control of vascular function. 2006; 7: 359–71.
16. Ho-Shui-Ling A., Bolander J., Rustom L.E., Johnson A.W., Luyten F.P., Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials*. 2018; 180: 143–62. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.017>
17. Hu K., Olsen B. R., Hu K., Olsen B. R. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *J Clin Invest*. 2016; 126: 509–26. <https://doi.org/10.1172/JCI82585>
18. Street J., Bao M., Bunting S., Jr F., Ferrara N., Steinmetz H., et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci*. 2002; 99(15): 9656–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.152324099>
19. Mallela J., Ravi S., F. Jean Louis, Mulaney B., Cheung M., U. Sree Garapati, et al. Natriuretic peptide receptor A signaling regulates stem cell recruitment and angiogenesis: a model to study linkage between inflammation and tumorigenesis. *Stem Cells*. 2013; 31(7): 1321–7. <https://doi.org/10.1002/sterm.1376>
20. Wan C., Shao J., Gilbert S.R., Riddle R.C., Long F., Johnson R.S., et al. Role of HIF-1 α in skeletal development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010; 1192: 322–26. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05238.x>
21. Lambertin E., Penolazzi L., Angelozzi M., Bergamin L.S., Manfredini C., Vieceli Dalla Sega F., et al. Hypoxia Preconditioning of Human MSCs: a Direct Evidence of HIF-1 α and Collagen Type XV Correlation. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2018; 51: 2237–49. <https://doi.org/10.1159/000495869>
22. Bai Y., Yin G., Huang Z., Liao X., Chen X., Yao Y., et al. Localized delivery of growth factors for angiogenesis and bone formation in tissue engineering. *Int. Immunopharmacol.* 2013; 16: 214–23. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.04.001>
23. Chen G., Deng C., Li Y.P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int. J. Biol. Sci.* 2012; 8: 272–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijbs.2012.07.019>
24. Protein M., Peng H., Ph D., Huard J., Ph D. The Dose of Growth Factors Influences the Synergistic Effect of Vascular Endothelial Growth Factor Ectopic Bone Formation. *Tissue Eng Part A*. 2009; 15(8): 2123–33. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0214>
25. Caplan A.I., Correa D. PDGF in bone formation and regeneration: new insights into a novel mechanism involving MSCs. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 2011; 29 (12): 1795–803. <https://doi.org/10.1002/jor.21462>
26. Marshall J., Barnes A., Genever P. Analysis of the Intrinsic Self-Organising Properties of Mesenchymal Stromal Cells in Three-Dimensional Co-Culture Models with Endothelial Cells. *Bioengineering*. 2018; 5: 92. <https://doi.org/10.3390/bioengineering5040092>
27. Schlund C., El Khassawna T., Serra A., Dienelt A., Wendle S., Schell H., et al. Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification. *Bone*. 2018; 106: 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.10.019>
28. Manieri N.A., Mack M.R., Himmelrich M.D., Worthley D.L., Hanso E.M., Eckmann, L., et al. Mucosally transplanted mesenchymal stem cells stimulate intestinal healing by promoting angiogenesis. *J. Clin. Invest*. 2015; 125: 3606–18. <https://doi.org/10.1172/JCI81423>
29. Simunovic F., Finkenzeller G. Vascularization strategies in bone tissue engineering. *Cells*. 2021; 10(7): 1749. <https://doi.org/10.3390/cells10071749>
30. Hutton D.L., Moore E.M., Gimble J.M., Grayson W.L. Platelet-derived growth factor and spatiotemporal cues induce development of vascularized bone tissue by adipose-derived stem cells. *Tissue Eng. Part A*. 2013; 19: 2076–86. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0752>
31. Piard C., Luthcke R., Kamalidinov T., Fisher J. Sustained delivery of vascular endothelial growth factor from mesoporous calcium-deficient hydroxyapatite microparticles promotes in vitro angiogenesis and osteogenesis. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2021; 109: 1080–87. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37100>
32. Quinlan, E., López-Noriega, A., Thompson, E.M., Hibbitts, A., Cryan, S.A., & O'Brien, F.J. Controlled release of vascular endothelial growth factor from spray-dried alginate microparticles in collagen-hydroxyapatite scaffolds for promoting vascularization and bone repair. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2017; 11(4), 1097–109. <https://doi.org/10.1002/term.2013>
33. Farokhi M., Mottaghtalab F., Ai J., Shokrgozar M.A. Sustained release of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor from silk/calcium phosphate/PLGA based nanocomposite scaffold. *Int. J. Pharm.* 2013; 454: 216–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.080>
34. Suárez-González D., Lee J.S., Diggs A., Lu Y., Nemke B., Markel M., et al. Controlled multiple growth factor delivery from bone tissue engineering scaffolds via designed affinity. *Tissue Eng. Part A*. 2014; 20: 2077–87. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0358>
35. Kuttappan S., Mathew D., Jo J.I., Tanaka R., Menon D., Ishimoto T., et al. Dual release of growth factor from nanocomposite fibrous scaffold promotes vascularisation and bone regeneration in rat critical sized calvarial defect. *Acta Biomater*. 2018; 78: 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.07.050>
36. Sagaradze G., Grigorieva O., Nimiritsky P., Basalova N., Kalinina N., Akopyan Z., et al. Conditioned Medium from Human Mesenchymal Stromal Cells: Towards the Clinical Translation. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(7): 1656. <https://doi.org/10.3390/ijms20071656>
37. Sadat S., Gehmert S., Song Y.-H., Yen Y., Ba X., Gaiser S., et al. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 363: 674–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.09.058>
38. Cheng P., Chen C., He H.B., Hu R., Zhou H.D., Xie H., et al. miR-148a regulates osteoclastogenesis by targeting V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 2013; 28: 1180. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1845>
39. Osugi M., Katagiri W., Yoshimi R., Inukai T., Hib H., Ueda M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Eng. Part A*. 2012; 18: 1479–89. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0325>

40. Shen M., Wu R., Jin R., Pan J., Guo F., Li Z., et al. Injection of synthetic mesenchymal stem cell mitigates osteoporosis in rats after ovariectomy. *J. Cell. Mol. Med.* 2018; 22: 3751–57. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13618>
41. Katagiri W., Osugi M., Kawai T., Hibi H. First-in-human study and clinical case reports of the alveolar bone regeneration with the secretome from human mesenchymal stem cells. *Head Face Med.* 2016; 12: 5. <https://doi.org/10.1186/s13005-016-0101-5>
42. Lee E., Ko J.-Y., Kim J., Park J.-W., Lee S., Im G.-I. Osteogenesis and angiogenesis are simultaneously enhanced in BMP2-/VEGF-transfected adipose stem cells through activation of the YAP/TAZ signaling pathway. *Biomater. Sci.* 2019; 7: 4588–602. <https://doi.org/10.1039/c9bm01037h>
43. Qu D., Li J., L. Y., Gao Y., Zuo Y., Hsu Y., et al. Angiogenesis and osteogenesis enhanced by bFGF ex vivo gene therapy for bone tissue engineering in reconstruction of calvarial defects. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2011; 96: 543–51. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33009>
44. Fröhlich L.F. Micrnas at the Interface between Osteogenesis and Angiogenesis as Targets for Bone Regeneration. *Cells.* 2019; 8(2): 121. <https://doi.org/10.3390/cells8020121>
45. John A.A., Prakash R., Kureel J., Singh D. Identification of novel microRNA inhibiting actin cytoskeletal rearrangement thereby suppressing osteoblast differentiation. *J. Mol. Med. (Berl).* 2018; 96: 427–44. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1624-y>
46. Karvande A., Kushwaha P., Ahmad N., Adhikary S., Kothari P., Tripathi A. K., et al. Glucose dependent miR-451a expression contributes to parathyroid hormone mediated osteoblast differentiation. *Bone.* 2018; 117: 98–115. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.09.007>
47. Ge Q., Zhang H., Hou J., Wan L., Cheng W., Wang X., et al. VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanisms. *Mol. Med. Rep.* 2018; 17: 1667–75. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8059>
48. Kim S., Recum H. Endothelial Stem Cells and Precursors for Tissue Engineering : Cell Source, Differentiation, Selection, and Application. *Tissue Eng Part B.* 2008; 14(1): 133-47. <https://doi.org/10.1089/teb.2007.0304>
49. Stahl A., Wenger A., Weber H., Stark G.B., Augustin H.G., Finkenzeller G. Bi-directional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal coculture model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 322: 684–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.175>
50. Correia C., Grayson W.L., Park M., Hutton D., Zhou B., Guo X.E., et al. In vitro model of vascularized bone: synergizing vascular development and osteogenesis. *PLoS One.* 2011; 6: 28352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028352>
51. Gurel Pekozer G., Torun Kose G., Hasirci V. Influence of co-culture on osteogenesis and angiogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells and aortic endothelial cells. *Microvasc. Res.* 2016; 108: 1–9. [10.1016/j.mvr.2016.06.005](https://doi.org/10.1016/j.mvr.2016.06.005)
52. Li Q., Wang Z. Influence of Mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells in co-culture on osteogenesis and angiogenesis: An in vitro study. *Arch. Med. Res.* 2013; 44: 504–13. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2016.06.005>
53. Xu C., Liu H., He Y., Li Y., and He X. Endothelial progenitor cells promote osteogenic differentiation in co-cultured with mesenchymal stem cells via the MAPK-dependent pathway. *Stem Cell Res. Ther.* 2020a; 11: 537. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02056-0>
54. Saleh F.A., Whyte M., Genever P.G. Effects of Endothelial Cells on Human Mesenchymal Stem Cell Activity in a 3D In Vitro Model. 2011; 44: 242–57. <https://doi.org/10.22203/ecm.v022a19>
55. Walser R., Metzger W., Görg A., Pohlemann T., Menger M.D., Laschke M.W. Generation of co-culture spheroids as vascularisation units for bone tissue engineering. 2013; 26: 222–33. <https://doi.org/10.22203/ecm.v026a16>
56. Shah A.R., Wenke J.C., Agrawal C.M. Manipulation of Human Primary Endothelial Cell and Osteoblast Coculture Ratios to Augment Vasculogenesis and Mineralization. *Ann. Plast. Surg.* 2016; 77: 122–28. <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000000318>
57. Di Marco G.S., Hausberg M., Hillebrand U., Rustemeyer P., Witkowski W., Lang D., et al. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2008; 294: 1381–87. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00003.2008>
58. Saburina I.N., Gorkun A.A., Fidarov A.F., Kolokol'tsova T.D., Zurina I.M., Kosheleva N.V., et al. Induction of Vascular- and Osteogenesis in Spheroids Formed by Adipose-Derived Stromal Cells. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2018; 166: 163–69. [10.1007/s10517-018-4306-4](https://doi.org/10.1007/s10517-018-4306-4)
59. Gorkun A.A., Revokatova D.P., Zurina I.M., Nikishin D.A., Bikmulina P.Y., Timashev P.S., et al. The Duo of Osteogenic and Angiogenic Differentiation in ADSC-Derived Spheroids. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021; 9: 572727. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.572727>
60. Laschke M.W., Menger M.D. Prevascularization in tissue engineering: Current concepts and future directions. *Biotechnol. Adv.* 2016; 34: 112–21. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.004>
61. Gardin C., Bressan E., Ferroni L., Nalesso E., Vindigni V., Stellini E., et al. In vitro concurrent endothelial and osteogenic commitment of adipose-derived stem cells and their genomic analyses through comparative genomic hybridization array: novel strategies to increase the successful engraftment of tissue-engineered bone grafts. *Stem Cells Dev.* 2012; 21: 767–77. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0147>
62. Cerino G., Gaudiello E., Muraro M.G., Eckstein F., Martin I., Scherberich A., et al. Engineering of an angiogenic niche by perfusion culture of adipose-derived stromal vascular fraction cells. *Sci. Rep.* 2017; 7: 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13882-3>
63. Scherzed A., Hackenberg S., Froelich K., Rak K., Schendzielorz P., Gehrke T., et al. The differentiation of hMSCs counteracts their migration capability and pro - angiogenic effects in vitro. 2016; 35(1): 219–26. [10.3892/or.2015.4383](https://doi.org/10.3892/or.2015.4383)
64. Chen Y., Wang J., Zhu X.D., Tang Z.R., Yang X., Tan Y.F., et al. Enhanced effect of β -tricalcium phosphate phase on neovascularization of porous calcium phosphate ceramics: in vitro and in vivo evidence. *Acta Biomater.* 2015; 11: 435–48. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.09.028>
65. Seebach C., Henrich D., Kähling C., Wilhelm K., Tami A.E., Alini M., et al. Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto beta-TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats. *Tissue Eng. Part A.* 2010; 16: 1961–70. [10.1089/ten.TEA.2009.0715](https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0715)
66. Gao C., Peng S., Feng P., Shuai C. Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Res.* 2017; 5: 17059. <https://doi.org/10.1038/boneres.2017.59>
67. O'Loughlin A., Kulkarni M., Crean M., Vaughan E.E., Mooney E., Shaw G., et al. Topical administration of allogeneic mesenchymal stromal cells seeded in a collagen scaffold augments wound healing and increases angiogenesis in the diabetic rabbit ulcer. *Diabetes.* 2013; 62: 2588–94. <https://doi.org/10.2337/db12-1822>

68. Matai I., Kaur G., Seyedsalehi A., McClinton A., Laurencin C.T. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials*. 2020; 226: 119536. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119536>
69. Murphy S.V., De Coppi P., Atala A. Opportunities and challenges of translational 3D bioprinting. *Nat. Biomed. Eng.* 2020; 4: 370–80. [10.1038/s41551-019-0471-7](https://doi.org/10.1038/s41551-019-0471-7)
70. Chen E.P., Toksoy Z., Davis B.A., Geibel J.P. 3D Bioprinting of Vascularized Tissues for in vitro and in vivo Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021; 9: 664188. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.664188>
71. Rukavina P., Koch F., Wehrle M., Tröndle K., Björn Stark G., Koltay P., et al. In vivo evaluation of bioprinted prevascularized bone tissue. *Biotechnol. Bioeng.* 2020; 117: 3902–11. <https://doi.org/10.1002/bit.27527>
72. Kérourédan O., Hakobyan D., Rémy M., Ziane S., Dusserre N., Fricain J.-C., et al. In situ prevascularization designed by laser-assisted bioprinting: effect on bone regeneration. *Biofabrication*. 2019; 11: 45002. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab2620>
73. Xu L., Varkey M., Jorgensen A., Ju J., Jin Q., Park J. H., et al. Bioprinting small diameter blood vessel constructs with an endothelial and smooth muscle cell bilayer in a single step. *Biofabrication*. 2020b; 12: 45012. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aba2b6>
74. Piard C., Baker H., Kamalitinov T., Fisher J. Bioprinted osteon-like scaffolds enhance in vivo neovascularization. *Biofabrication*. 2019; 11: 25013. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab078a>
75. Chiesa I., De Maria C., Lapomarda A., Fortunato G.M., Montemurro F., Di Gesù R., et al. Endothelial cells support osteogenesis in an in vitro vascularized bone model developed by 3D bioprinting. *Biofabrication*. 2020; 12: 25013.

Сведения об авторах:

Сабурова Ирина Николаевна, доктор биол. наук, зав. лаб. клеточной биологии и патологии развития;

Зурина Ирина Михайловна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития;

Горкун Анастасия Алексеевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития;

Ревокатова Дарья Петровна, мл. науч. сотр. лаб. клеточной биологии и патологии развития.

© Коллектив авторов, 2022

УДК [612.67+616.831]-02:613.24

Фефелова Ю.А., Мурашев Б.Ю.

Влияние ограничения калорийности питания на процессы старения и развитие нейродегенеративных заболеваний

ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1

Исследования на моделях млекопитающих демонстрируют, что ограничение калорийности питания замедляет процессы старения, увеличивает продолжительность жизни и отодвигает начало ряда возрастных заболеваний, в том числе нейродегенеративных. При ограничении калорийности питания организм переходит в режим поддержания жизнеспособности, что реализуется за счет включения программ стрессоустойчивости и замедления процессов роста и репродукции. К реализации данных программ приводят выраженные изменения внутриклеточных процессов: активация репарации макромолекул и восстановление длины теломер хромосом, что способствует поддержанию стабильности генома и протеома, выживаемости стволовых клеток. Кроме того, происходит перепрограммирование метаболических процессов и изменение их скорости, в том числе через влияние рестрикции питания на эпигенетические механизмы контроля. Ограничение калорий – это диетическая стратегия, которая может оказать влияние на скорость развития нейродегенерации. Таким образом, диета и питание являются одними из наиболее значимых модифицируемых внешних факторов, регулирующих метаболизм клеток, что определяет перспективные траектории изучения их влияния на механизмы развития нейровоспалительных и нейродегенеративных процессов. В обзоре обсуждаются механизмы, посредством которых клетки переходят на иные программы жизнеобеспечения при рестрикции питания, что проявляется изменениями процессов нейровоспаления, нейрогенеза в ответ на реализацию эпигенетических программ, запуска ответа сиртуинов, изменений в митохондриальном биогенезе.

Ключевые слова: ограничение калорийности питания; нейродегенеративные процессы; клеточный метаболизм; сиртуины; митохондриальный биогенез; аутофагия

Для цитирования: Фефелова Ю.А., Мурашев Б.Ю. Влияние ограничения калорийности питания на процессы старения и развитие нейродегенеративных заболеваний. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(3): 166-176. DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.166-176

Участие авторов: концепция и дизайн публикации – Фефелова Ю.А.; подбор литературных источников Мурашев Б.Ю., Фефелова Ю.А.; написание статьи – Фефелова Ю.А.; редактирование текста – Фефелова Ю.А., Мурашев Б.Ю. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: **Фефелова Юлия Анатольевна**, e-mail: fefelovaja@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта No 22-25-20067.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.03.2022

Принята к печати 14.06.2022

Опубликована 12.09.2022

Fefelova Yu.A., Murashev B.Yu.

Effect of caloric restriction on aging and neurodegenerative diseases

Voino-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University,
Partizana Zheleznyaka St. 1, Krasnoyarsk 660022, Russian Federation

Research using mammalian models has shown that calorie restriction slows the aging process, increases life expectancy, and delays the onset of a number of age-related diseases, including neurodegenerative diseases. During caloric restriction, the organism goes into a viability maintenance mode, which is realized by the activation of stress resistance programs and the slowing of growth and reproduction processes. Very pronounced changes in intracellular processes lead to the realization of these programs, which include activation of mechanisms for repair of macromolecules and for restoration of the length of chromosome telomeres. This contributes to maintaining the stability of the genome and proteome, and the survival of stem cells. In addition, metabolic processes are reprogrammed, and their rate changes due to the influence of nutritional restriction on epigenetic control mechanisms. Caloric restriction is a dietary strategy that may have an impact on the rate of neurodegeneration. Therefore, diet and nutrition are among the most significant modifiable external factors that regulate cell metabolism. This approach offers promising ways for studying the influence of diet and nutrition on the mechanisms of neuroinflammatory and neurodegenerative processes. This article discusses mechanisms that change cellular function such that cells switch to life support programs during

nutritional restriction. This is manifested by changes in the processes of neuroinflammation and neurogenesis in response to epigenetic programs that trigger the sirtuin response and change mitochondrial biogenesis.

Keywords: caloric restriction; neurodegenerative processes; cellular metabolism; sirtuins; mitochondrial biogenesis; autophagy

For citation: Fefelova Yu.A., Murashev B.Yu. Effect of calorie restriction on aging and neurodegenerative diseases. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(3) 166-176. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.03.166-176

Author's contribution: research concept and design – Fefelova Yu.A.; data collection Murashev B.Yu., Fefelova Yu.A.; article writing – Fefelova Yu.A.; article editing – Fefelova Yu.A., Murashev B.Yu.; approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: **Yulia A. Fefelova**, Doctor of Biol. Sciences, Department of Pathological Physiology named after professor V.V. Ivanov of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky" Ministry of Health of the Russian Federation, 1 Partizan Zheleznaya str, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation, e-mail: fefelovaja@mail.ru

Information about the authors:

Fefelova Yu.A., <https://orcid.org/0000-0001-5434-7155>

Murashev B.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-1280-3324>

Financing. The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation in the framework of scientific project No. 22-25-20067.

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

Received 14.03.2022

Accepted 14.06.2022

Published 12.09.2022

В 1935 г. Маккей и его коллеги показали, что ограничение калорийности питания или calorie restriction (CR) без недоедания увеличивает средние и максимальные показатели продолжительности жизни крыс [1]. С тех пор большим числом исследований подтверждено, что ограничение потребления пищи без недоедания замедляет процесс старения и приводит к заметному увеличению продолжительности жизни и улучшению показателей здоровья дрожжей, плодовых мух, нематод, рыб, хомячков, а также различных линий мышей и крыс [2–4]. Возраст начала ограничений калорийности питания и степень ограничений определяют величину максимального увеличения продолжительности жизни [5, 6]. Животные не только живут дольше и обладают лучшим здоровьем, но и физиологически моложе особей, которых кормили *ad libitum* (вволю, без ограничений) [2, 3]. Примерно 30% грызунов, находящихся на CR умирают в пожилом возрасте без каких-либо значительных патологических повреждений, что позволяет предположить, что у млекопитающих старение не обязательно связано с изнурительными болезненными состояниями [7, 8].

Таким образом, становится понятным, что ограничение калорийности питания – это диетическая стратегия, которая может улучшить здоровье и способствовать долголетию большинства модельных организмов [9–11]. CR можно определить как ограничение диеты организма по сравнению с кормлением *ad libitum*, но при этом без изменений уровня посту-

пающих витаминов, минералов и аминокислот [12]. Важным направлением исследований является изучение влияний изменений при режиме ограничения калорийности питания не только на здоровые клетки и организм в целом, что дает выход на программы здорового питания и увеличения продолжительности жизни, но и влияние на развитие различных патологических процессов.

Исследования последних лет на моделях млекопитающих демонстрируют что CR увеличивает продолжительность жизни, снижает факторы риска и отодвигает начало ряда возрастных патологий, в определенной степени связанных со старением, таких как рак, II тип сахарного диабета, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания [13]. В ответ на снижение потребления калорий происходит перепрограммирование метаболических процессов, что в результате приводит к повышению чувствительности к инсулину, снижению уровня глюкозы крови, изменению передачи сигналов факторов роста, уменьшению активности воспалительных процессов и ангиогенеза [13–15].

Старение – это биологический процесс, определяемый изменениями на клеточном уровне, такими как геномная нестабильность, сдвиги в эпигенетической регуляции, нарушения протеостаза, чувствительности к питательным веществам, митохондриальная дисфункция, истощение стволовых клеток, изменения межклеточной коммуникации. Поскольку продолжительность жизни человека в последние десятилетия существенно возросла, а пожилые люди более

склонны к развитию ряда патологий, назрела необходимость в поиске мер, влияющих на замедление процесса старения. CR модулирует механизмы восприятия питательных веществ, улучшает метаболический профиль, повышает устойчивость к стрессу, снижает выраженность окислительного стресса и улучшает течение воспалительных процессов. Таким образом, CR и CR-миметики могут стать средствами для замедления процесса старения и увеличения продолжительности здоровой жизни в экспериментальных моделях и, возможно, у людей [15].

Ограничение калорийности пищи уже показало положительные эффекты в профилактике и лечении ряда нейродегенеративных патологий, таких как болезнь Паркинсона, Альцгеймера и нейроэндокринные расстройства.

Большинство исследований деменции сосредоточено на разработке фармакологических вмешательств, направленных на предотвращение когнитивных нарушений, но, несмотря на всесторонние международные усилия, лекарственные препараты оказывают весьма умеренное влияние на симптомы и не останавливают прогрессирование нейродегенеративных процессов. В связи с этим предлагается альтернативный подход к предотвращению возникновения нейродегенеративных заболеваний, связанных с возрастом – это рестрикция питания, а именно ограничение калорийности пищи, прерывистое голодание и изменение соотношений макронутриентов пищи [16]. Оценка поведения и познания в экспериментальных моделях на грызунах лежит в основе исследований старения мозга и нейродегенеративных заболеваний. Используемые тесты включают водный лабиринт Морриса, лабиринт Барнса, распознавание объектов, кондиционирование страха, водный лабиринт с радиальными рукавами и Y-образный лабиринт. Каждый из этих тестов отражает некоторые аспекты памяти, включая эпизодическую память, память распознавания, семантическую память, пространственную память и эмоциональную память. В исследованиях оценивались ограничение калорийности, прерывистое голодание и изменения макроэлементного состава пищи. Было показано, что диетические вмешательства оказывают положительное влияние на различные когнитивные и поведенческие реакции у грызунов. Таким образом, изменения в питании могут в определенной степени тормозить старение мозга и, возможно, развитие нейродегенеративных процессов [17].

Нейровоспаление. Благоприятное влияние ограничения калорийности питания включает метаболическую, антиоксидантную и иммуномодулирующую

адаптацию, которые потенциально могут влиять на инициацию, прогрессирование и прогноз ряда неврологических и нейровоспалительных расстройств [6]. Нейровоспаление представляет собой скоординированный ответ центральной нервной системы на вредные раздражители, в том числе возникающие при инфекциях, черепно-мозговых травмах или ряде неврологических заболеваний. Процесс характеризуется активацией и пролиферацией микроглии и астроцитов, которые претерпевают морфологические изменения и высвобождают провоспалительные медиаторы (цитокины, хемокины и белки комплемента) [18, 19]. При персистенции факторов повреждения формируется хроническое нейровоспаление, что характерно для ряда нейродегенеративных заболеваний. Хроническое нейровоспаление было предложено рассматривать как один из потенциальных факторов старения [20]. Современные исследования выявляют сложные взаимоотношения между метаболизмом питательных веществ и активацией воспалительных путей в различных тканях, включая мозг. Нарушение энергетического обмена мозга, повышение резистентности к инсулину и нарушение митохондриальной функции связаны с механизмами, которые приводят к нейровоспалительным и возрастным нейродегенеративным заболеваниям [21]. Этот позволяет сформулировать гипотезу о том, что восстановление метаболического баланса может быть ключевым вмешательством для противодействия возрастным патологиям. Ограничение калорийности питания – одно из потенциальных направлений, поскольку оказывает существенное влияние на метаболические и противовоспалительные пути.

Ограничение калорийности у грызунов и людей улучшает чувствительность к инсулину и толерантность к глюкозе через уменьшение образования конечных продуктов гликирования (AGE) [4, 22], которые связывают специфические рецепторы RAGE, экспрессируемые на многих клетках, включая нервные и иммунные. Активация RAGE приводит к выбросу провоспалительных цитокинов и образованию активных форм кислорода [23]. Эффект CR связан с уменьшением количества некоторых воспалительных медиаторов в скелетных мышцах, таких как NF- κ B, STAT5, TNF- α , IL-6 и IL-8, и со значительным увеличением ключевых стресс-зависимых молекулярных шаперонов (HSP-70 и Grp78) и аутофагических медиаторов (LC3, beclin-1) [24]. Кроме того, CR может ингибировать воспаление, влияя на процесс накопления стареющих клеток [4], которые индуцируют секрецию ряда факторов роста, металлопротеиназ,

провоспалительных цитокинов и хемокинов, под общим названием SASP [25].

Нейрогенез, генерация зрелых нейронов из нервных стволовых клеток в некоторых областях мозга взрослых млекопитающих определяет как физиологические процессы в мозге, так и нейродегенеративные расстройства. Установлено, что чрезмерное потребление калорий ускоряет возрастное снижение нейрогенеза, в то время как ограничение калорий и физические упражнения имеют противоположный эффект [26]. Старение значительно нарушает регуляцию процессов воспаления и ряда иммунных параметров у крыс, а введение режима ограничения калорийности питания в течение одного и двух месяцев является полезным для иммунной системы стареющих крыс (жизнеспособность лимфоцитов, пролиферация лимфоцитов, цитотоксичность, про (IL-6 и TNF- α) и противовоспалительные (IL-10) цитокины), но неблагоприятным для иммунных параметров молодых крыс [27].

Таким образом, среди множества экзогенных и эндогенных факторов, которые модулируют нейрогенную активность и нейровоспаление роль питательных веществ, энергетического метаболизма становится все более очевидной.

Сиртуины. В последние годы в мировой научной литературе уделяется большое внимание белкам семейства сиртуинов. Сиртуины играют важную роль в старении мозга и метаболической регуляции у млекопитающих, в том числе, участвуя в реализации эффектов диетических ограничений [28]. Важные пути, определяющие процесс старения регулируются сиртуинами и включают путь PI3K/Akt/mTOR [29, 30], что предполагает большой терапевтический потенциал CR, действующей через эффекты сиртуинов. Семь членов этого семейства белков имеют сходную структуру и обладают деацетилазной активностью, а некоторые из этих белков имеют и другие ферментативные свойства [31]. Сиртуины участвуют в регуляции множества различных процессов, таких как клеточный цикл, аутофагия, транскрипция, восстановление ДНК, метаболизм, инсулиновый ответ и стрессоустойчивость. Ферментативная активность сиртуинов зависит от уровня NAD⁺, что определяет их регулируемую роль в клеточных метаболических процессах. Ведущая роль сиртуинов в контроле и модуляции обменных процессов является сопрягающим звеном между активностью сиртуинов и влиянием факторов питания на организм. Сиртуины действуют в нервной ткани, в печени, поджелудочной железе, жировой ткани, мышцах, сердечно-сосудистой системе, молочных железах, легких, репродуктивной системе [32, 33].

Ряд ключевых сигнальных путей и регуляторов частично опосредуют эффекты CR на старение и продолжительность жизни: путь передачи сигналов инсулина/IGF1-подобного фактора роста, пути передачи сигнала AMPK и сигнала TOR, а также семейство белков сиртуинов [34]. Однако ни один из этих путей не несет полную ответственность за эффект CR и это подтверждается тем, что блокирование любого из них по отдельности не блокирует полностью индуцированное CR продление продолжительности жизни. Таким образом, хотя влияние на каждый из этих путей приводит к увеличению продолжительности жизни в эксперименте, CR все же дает значительные дополнительные преимущества. Остается неясным, опосредуют ли эти пути разные аспекты ответа CR, взаимодействуют ли друг с другом в ответ на CR, или действуют на разных стадиях ограничения калорийности питания. CR вызывает системные изменения во всем организме [35–37] и предстоит выяснить, как на системном уровне достигнуть регулирования процесса старения [38].

Исследования на животных выявили, что активность Sirt1 определяет нейрональную пластичность [39] и в определенной степени предотвращает токсическое действие мисфолдинговых белков при болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и прионной болезни [40]. Кроме того, обнаружена FoxO3a-зависимая активация митохондриальной антиоксидантной защиты [41]. Нейропротекторные эффекты Sirt1 связаны со способностью этого фермента активировать аутофагию [42] и подавлять NF- κ B-зависимое нейровоспаление [43], а также влиять на ослабление процессов дегенерации аксонов [44, 45]. Sirt1 можно рассматривать, как интегратор нейроэндокринной и метаболической адаптации к CR, что в конечном итоге приводит к увеличению продолжительности жизни [46, 47].

Сиртуин 3 (Sirt3), локализованный в митохондриях, защищает клетку от окислительного или метаболического стресса. Показано, что дефицит этого белка ускоряет нейродегенерацию в условиях нейротоксичности. Были изучены поведение и когнитивные функции мышей с нокаутом Sirt3, что провоцировало возникновение дефектов памяти у мышей. Наблюдалось снижение числа нейронов в передней поясной коре головного мозга, что, по-видимому, и способствовало развитию дефицита памяти [48].

Нокаут Sirt6 у мышей приводил к ускоренному старению и преждевременной смерти к трехнедельному возрасту, что сопровождалось метаболическими дефектами и геномной нестабильностью [49]. Напротив, мыши со сверхэкспрессией Sirt6 демонстри-

ровали увеличенную продолжительность жизни [50]. Предполагается, что Sirt6 является датчиком повреждения ДНК и играет роль в процессах репарации ДНК [49, 51, 52]. Животные с дефицитом Sirt6 могут быть использованы в качестве модели для спорадической нейродегенерации, поскольку на фоне ускоренного накопления повреждений ДНК демонстрируют нарушения обучения и памяти, повышенную гибель нейрональных клеток и появление гиперфосфорилированного тау-белка [53–55].

Основные механизмы влияния ограничения калорийности питания при нейродегенеративных заболеваниях, старении и повреждениях головного мозга связаны с противовоспалительными эффектами, активацией нейрогенеза и пластичности нейронов. На клеточном уровне – это, прежде всего, аутофагия и митохондриальный биогенез. Молекулярные схемы (AMPK/mTOR, Sirtuins, CREB/Sirt1) в нейронах реагируют на доступность питательных веществ и запускают адаптивные программы [47].

Старение мозга вызвано потерей нейрофизиологических функций из-за нейродегенерации. Семейство сиртуинов играет центральную роль в благотворном влиянии ограничения калорийности питания на процессы нейродегенерации.

Нейродегенерация – аутофагия. Антивозрастные эффекты CR заключаются в ослаблении прогрессирующей гибели клеток и предотвращении агрегации аномальных белков при нейродегенеративных заболеваниях. CR является индуктором аутофагии, строго регулируемого внутриклеточного процесса, который способствует переработке аномальных белковых агрегатов и поврежденных органелл в биоэнергетические и биосинтетические материалы. Нерегулируемая аутофагия может привести к клеточной дисфункции, аномальному накоплению белка, протеотоксичности, итогом чего может быть повышение рисков возникновения нейродегенеративных заболеваний. В связи с этим контролируемая активация аутофагии может быть терапевтической стратегией при широком спектре заболеваний нервной системы. Немедикаментозные терапевтические вмешательства, в том числе ограничения калорийности питания, замедляющие старение за счет модуляции определенных стадий аутофагии, могут быть полезными для предотвращения преждевременного старения, развития нейродегенерации и связанных с ней заболеваний [56].

Цитоплазматические и ядерные включения белковых агрегатов в пораженных областях мозга являются распространенными признаками нескольких нейродегенеративных заболеваний. К ним относятся мутантный

белок хантингтина (mHTT) при болезни Хантингтона, β -амилоидный (A β) пептид, а также связанный с микротрубочками тау-белок при болезни Альцгеймера и тельца Леви – агрегаты α -синуклеина, связанного с другими белками, при болезни Паркинсона [57]. Еще только предстоит выяснить ведущие механизмы, способствующие дегенерации нейронов при агрегационных изменениях белков, однако на основании имеющихся сегодня результатов, можно предполагать, что дефекты в путях связанных с аутофагией в значительной степени способствуют преждевременному старению [58] и нейродегенерации [59–61]. Следовательно, необходимы терапевтические вмешательства, направленные на дефектные стадии систем, связанных с аутофагией при нейродегенеративных заболеваниях [62–64]. Клетки эукариот снабжены двумя основными факторами разрушения белков: убиквитин-протеасомная система (UPS) и лизосомозависимая система деградации [62, 65]. Аутофагия – это процесс устранения поврежденных органелл и разрушения лизосом, неправильно свернутых долгоживущих белков и экзогенных патогенов. Аутофагия играет существенную роль в снижении производства активных форм кислорода (АФК) и способствует митохондриальному обновлению и биогенезу, что увеличивает продолжительность жизни за счет более позднего начала возрастных осложнений. Нерегулируемая аутофагия может привести к клеточной дисфункции, аномальному накоплению белка, протеотоксичности и, как следствие, развитию нейродегенеративных заболеваний [66]. Ограничение калорийности питания является мощным индуктором процесса аутофагии и это единственное немедикаментозное вмешательство, способствующее увеличению продолжительности жизни у пациентов [67–69]. Голодание и CR играют роль в регуляции аутофагии и приводят к ее индукции в самых разных тканях и органах [70]. Тем не менее, связь между аутофагией, CR и эффективной модуляцией ключевых компонентов долголетия остаются неясными и заслуживают дальнейшего внимания. Целевая, точно контролируемая активация аутофагии, в том числе через активацию путей связанных с действием CR, представляет собой многообещающий терапевтический подход. Немедикаментозные терапевтические вмешательства, замедляющие старение за счет модуляции определенных стадий аутофагии, могут быть полезными для предотвращения преждевременного старения, нейродегенерации и связанных с ней заболеваний [71].

Митохондриальный биогенез. Кроме аутофагии, еще одним важнейшим клеточным механизмом нейрозащиты является митохондриальный биогенез (МБ). Реализация МБ предполагает активацию различных генети-

ческих программ и регуляторов ядерной транскрипции. Ведущим коактиватором транскрипции, главным регулятором митохондриального биогенеза является PGC-1 (альфа и бета) [72]. PGC-1 и митохондриальный биогенез активируются ограничением калорий в различных тканях у мышей. В частности, показано, что мыши, лишенные PGC-1 в адипоцитах, не способны увеличивать митохондриальный биогенез в белых жировых клетках (WAT) в ответ на CR. Несмотря на слабую индукцию митохондриального биогенеза в ответ на ограничение калорий, мыши, лишенные жировых PGC-1, реагировали на CR, улучшая гомеостаз глюкозы. Исследование демонстрирует, что коактиваторы PGC-1 являются основными регуляторами CR-индуцированного митохондриального биогенеза в WAT. Для улучшения гомеостаза глюкозы, опосредованного CR, не требуется усиленный митохондриальный биогенез и окислительная функция в жировой ткани [73]. Индукция CR образования бежевых адипоцитов связана с внеклеточным ремоделированием в жировой ткани, ослаблением воспаления жировой ткани и улучшением системного метаболического гомеостаза. Однако бежевые адипоциты быстро превращаются в белые после отмены CR. Авторы исследования показывают, что переход от бежевого к белому жиру при отмене агониста β 3-AR может быть ослаблен CR, частично за счет поддержания митохондриального биогенеза [74]. Физиологический стресс (ограничение калорий и физические упражнения) индуцирует экспрессию NADPH-оксидазы 4, что активирует Nrf2 (редокс-чувствительный транскрипционный фактор, защищающий клетки от окислительного стресса) и повышает выносливость. Мыши с временным истощением SOD2 или гиперэкспрессией термогена UCPI1, специфичного для скелетных мышц, демонстрируют Nrf2-опосредованную экспрессию антиоксидантного гена и PGC1 α -опосредованный митохондриальный биогенез [75]. CR увеличивает количество микроРНК, которые необходимы для CR-индуцированной активации митохондриальной трансляции в печени мышей. CR-индуцированные микроРНК вызывают перепроизводство белков, кодируемых мтДНК, что улучшает митохондриальный протеостаз и функцию. Эти данные устанавливают физиологическую роль митохондриальной функции, усиленной miRNA, при воздействии CR и показывают, что miRNAs являются критическими медиаторами CR в индукции митохондриального ответа на развернутые белки (UPRmt) для улучшения митохондриального протеостаза [76].

Антиоксидантные эффекты CR включают снижение производства активных форм кислорода (АФК) за счет ингибирования метаболизма, управляемого

mTOR (член семейства фосфатидилинозитол-3-киназы семейства протеинкиназ) и активацию аутофагии. Происходит улучшение антиоксидантной способности за счет активации SOD2 через регулируемую роль представителей семейства сиртуинов, в частности Sirt3 [77-81]. CR активирует зрелую форму белка Sirt3 и митохондриальную промежуточную пептидазу (MIPEP), митохондриальную сигнальную пептидазу (MtSPase) в WAT. MIPEP расщепляет форму предшественника Sirt3 и активирует определенные белки митохондриального матрикса, что позволяет предположить, что MIPEP может способствовать поддержанию митохондрий в режиме CR посредством активации Sirt3 [82]. Обсуждается также возможный защитный механизм Sirt1 в регуляции митохондриального биогенеза и аутофагии при болезни Альцгеймера [83]. Дисфункция митохондрий и метаболизм глюкозы являются последовательными предшественниками, ведущими к болезни Альцгеймера, характерной особенностью которой является образование и накопление активных форм кислорода (АФК) [84].

Метаболические и пищевые стимулы изменяют архитектуру мозга за счет влияния на типовые процессы такие как воспаление, нейрогенез и синаптическая пластичность. Состояние системного, хронического воспаления слабой степени выраженности сопровождается процессом старения [85]. Противовоспалительное действие пониженного потребления калорий и/или прерывистого голодания хорошо зарекомендовало себя в экспериментальных моделях болезней [86].

Ограничение калорийности питания определяет нейропротективные эффекты за счет изменений в ряде нейрональных молекулярных механизмов. В ответ на диетическое ограничение как у модельных организмов, так и у млекопитающих, происходит ингибирование передачи сигналов mTOR, что включает усиленный стресс—ответ и, в конечном итоге, приводит к увеличению продолжительности жизни [87–89]. И напротив, дисрегуляция сигнализации mTOR [90, 91] приводит к ускоренному старению, чему в определенной степени способствует протеостаз и усиление стресса эндоплазматического ретикула (ЭР), повышенное образование активных форм кислорода в митохондриях, подавление аутофагии, усиление инсулинорезистентности и воспаления [92]. Ось AMPK–mTOR физиологически участвует в восприятии питательных веществ и регуляции аппетита в гипоталамусе [93], но также играет роль в высших функциях мозга и в развитии нейродегенеративных процессов [59, 94, 95]. Блокада mTOR определяет ряд аспектов нейропротекторного влияния диетического питания на мозг.

Чувствительными к питательным веществам являются ряд клеточных путей сопряженных с AMPK

[96, 97], PGC1 [98, 99] и CREB. Они активируются диетическим ограничением и прерывистым голоданием и связаны с семейством сиртуинов [100].

Таким образом, вырисовывается ключевая роль нейропротективной направленности процессов инициированных диетическими ограничениями в ряде модельных систем. Связь между изменениями метаболических процессов и развитием нейродегенерации указывает на необходимость дальнейшего изучения механизмов формирования устойчивости к болезням и старению при ограничениях питания.

Эпигенетические механизмы. Клеточная адаптация, возникающая в ответ на изменения калорийности питания, может быть объяснена изменениями в эпигенетических механизмах, опосредованных метилированием ДНК, модификацией гистонов и ролью микроРНК. Эпигенетические механизмы находятся в авангарде клеточных изменений, которые могут модулироваться CR и приводить к длительной клеточной адаптации и улучшению показателей здоровья.

Процесс метилирования ДНК важен для нормального функционирования клеток центральной нервной системы, реализации процессов памяти и нарушается с возрастом. Группой исследователей получены данные, что ограничение калорийности питания влияет на связанное с возрастом дифференциальное CG и не-CG метилирование в гиппокампе мышей-самцов. А именно, CR ослабляет связанные с возрастом изменения метилирования CG и не-CG в гиппокампе в сочетании с CR-специфическим метилированием, при котором затронуты гены, отвечающие за воспалительные и иммунные процессы, что может способствовать нейрозащитным эффектам CR. Предотвращение связанных с возрастом изменений метилирования согласуется с эффектами долголетия при режиме ограничения калорийности питания, действующими в данном случае через эпигенетические механизмы [101, 102].

В клиническом исследовании снижение веса, вызванное CR в течение 8 нед, приводило к значительному снижению метилирования ДНК воспалительного цитокина фактора некроза опухоли (TNF) и существенной разнице биомаркеров снижения веса [103]. Аналогичные паттерны метилирования TNF и лептина наблюдались у женщин с ожирением, которым назначали низкокалорийную диету в течение 8 нед [104], что уменьшало воспалительные проявления у данных пациентов. Генами, которые модифицируются в результате CR-индуцированной потери веса, также являются гены кодирующие АТФазу, транспортирующую фосфолипиды (АТР10А), и молекула CD 44, что

было выявлено у мужчин с избыточным весом и ожирением [105].

В эксперименте на мышах индуцированное CR метилирование ДНК, происходило в генах, связанных с метаболизмом жирных кислот, триглицеролов и кетонных тел, включая АТФ-цитратлиазу (Acl), яблочный фермент 1 (Me1), ацетоацетил-КоА-синтетазу (Aacs2), пируваткиназу (Pklr), глицерол-3-фосфатацилтрансферазу (Gpm), элонгазу жирных кислот 6 (Elovl6) и ацетил-КоА-карбоксилазу 1 (Acaca) [101, 102]. Гены, активируемые режимом CR, отвечали за регуляцию энергии, воспаление и фагоцитоз.

Определение профилей miRNA при длительном хроническом ограничении калорийности питания (CCR) и при прерывистом диетическом ограничении (ICR) в головном мозге мышей выявило, что образцы мозга из группы CCR характеризовались повышенным уровнем экспрессии mmu-miR-713 при снижении уровней экспрессии mmu-miR-184-3p и mmu-miR-351-5p по сравнению с группой ICR. Таким образом, по мнению авторов, режим CCR может оказывать защитные эффекты, модулируя специфические miRNA, поскольку они играют роль в нейрогенезе, регуляции хроматина и гистонов. Эти три группы miRNA могут быть потенциальными мишенями для нейродегенеративных и связанных со старением заболеваний и могут играть важную роль в защитных эффектах ограничения калорийности пищи в головном мозге [106].

CR влияет на физиологию цереброваскулярных эндотелиальных клеток через снижение интенсивности окислительного стресса, усиление функции эритроидного ядерного фактора 2 (Nrf2) и увеличения miR. CR обеспечивает стойкие антиоксидантные, проангиогенные и противовоспалительные клеточные эффекты, сохраняя юношеский фенотип в цереброваскулярных эндотелиальных клетках возрастных крыс и благодаря этим эффектам CR может улучшить цереброваскулярную функцию и предотвратить сосудистые когнитивные нарушения [107].

В головном мозге мышей, находившихся в условиях CR наблюдалось возрастное снижение экспрессии микроРНК – mmu-miR-181a, mmu-miR-30e и mmu-miR-34a, с соответствующим увеличением экспрессии Bcl-2, снижением активности генов проапоптоза, таких как Bax и усилением расщепления каспаз. Подавление miR-34a, -30e и -181a позволяет экспрессии их общего гена-мишени (Bcl-2) оставаться на высоком уровне без посттранскрипционной репрессии, что сопровождается сопутствующими низкими уровнями экспрессии Bax и расщеплением каспаз; эта цепь событий может быть частью основного механизма, способствующего

увеличению выживаемости нейронов у долгоживущих мышей, находившихся в режиме CR [108].

CR вызывает длительные эпигенетические эффекты, которые опосредуют экспрессию генов, связанных с иммунометаболическими процессами. Эпигенетическое перепрограммирование хронического слабо-выраженного воспаления с помощью CR может привести к иммунометаболическим адаптациям, которые улучшают качество жизни, увеличивают продолжительность жизни и отодвигают сроки начала хронических заболеваний, в том числе нейродегенеративных.

Заклучение

Таким образом, очевидна ключевая роль нейропротективной направленности процессов, инициированных диетическими ограничениями в ряде модельных систем. Результаты исследований механизмов влияния диеты, физических упражнений могут дать безопасные и эффективные решения для замедления старения мозга и развития нейродегенеративных заболеваний до начала клинических проявлений [21]. Инсулинорезистентность, системное воспаление и нарушение энергетического метаболизма головного мозга связаны с патологическими процессами активации микроглии, накоплением нейротоксического белка, аксональной и синаптической дисфункцией и гибелью нейронов при нейродегенерации [109, 110]. CR и другие диетические подходы могут быть эффективными в решении проблем обмена веществ и иммунновоспалительных реакций, связанных с нарушениями метаболизма мозга. CR действует через консервативные механизмы, к которым прежде всего относятся метаболические и иммунные пути.

Связь между изменениями обменных процессов и развитием нейродегенерации указывает на необходимость дальнейшего выявления механизмов возникновения устойчивости к болезням и старению при диетических ограничениях. В этом отношении различия и сходства между действием различных форм рестрикции питания, а также физических упражнений и когнитивных тренировок в плане развития защитных реакций – это область дальнейших исследований.

Литература/References

1. McCay C.M., Crowell M.F., Maynard L.A. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *Nutrition*. 1989; 5: 155-71, discussion 172.
2. Weindruch R., Naylor P.H., Goldstein A.L., Walford R.L. Influences of aging and dietary restriction on serum thymosin alpha 1 levels in mice. *J Gerontol*. 1988; 43: B40-42.
3. Masoro E.J. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev*. 2005; 126: 913-22.
4. Fontana L., Klein S., Holloszy J.O. Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production. *Age (Dordr)*. 2010; 32: 97-108.
5. Weindruch R., Gottesman S.R., Walford R.L. Modification of age-related immune decline in mice dietarily restricted from or after midadulthood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982; 79: 898-902.
6. Fontana L., Partridge L., Longo V.D. Extending healthy life span from yeast to humans. *Science*. 2010; 328: 321-6.
7. Shimokawa I., Higami Y., Hubbard G.B., et al. Diet and the suitability of the male Fischer 344 rat as a model for aging research. *J Gerontol*. 1993; 48: B27-32.
8. Zhang Y., Ikeno Y., Bokov A., et al. Dietary restriction attenuates the accelerated aging phenotype of Sod1(-/-) mice. *Free Radic Biol Med*. 2013; 60: 300-6.
9. Fontana L., Partridge L. Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell*. 2015; 161: 106-18.
10. Green C.L., Lamming D.W., Fontana L. Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022; 23: 56-73.
11. Duregon E., Pomatto-Watson L., Bernier M., et al. Intermittent fasting: from calories to time restriction. *Geroscience*. 2021; 43: 1083-92.
12. Das M., Gabriely I., Barzilai N. Caloric restriction, body fat and ageing in experimental models. *Obes Rev*. 2004; 5: 13-9.
13. Antunes F., Corazzari M., Pereira G., et al. Fasting boosts sensitivity of human skin melanoma to cisplatin-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 485: 16-22.
14. O'Flanagan C.H., Smith L.A., McDonnell S.B., Hursting S.D. When less may be more: calorie restriction and response to cancer therapy. *BMC Med*. 2017; 15(1): 106.
15. Giacomello E., Toniolo L. The Potential of Calorie Restriction and Calorie Restriction Mimetics in Delaying Aging: Focus on Experimental Models. *Nutrients*. 2021; 13(7): 2346.
16. Dias I.R., Santos C.S., Magalhaes C., et al. Does calorie restriction improve cognition? *IBRO Rep*. 2020; 9: 37-45.
17. Wahl D., Coogan S.C., Solon-Biet S.M., et al. Cognitive and behavioral evaluation of nutritional interventions in rodent models of brain aging and dementia. *Clin Interv Aging*. 2017; 12: 1419-28.
18. Wolf S.A., Boddeke H.W., Kettenmann H. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol*. 2017; 79: 619-43.
19. Matias I., Morgado J., Gomes F.C.A. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Front Aging Neurosci*. 2019; 11: 59.
20. Di Benedetto S., Muller L., Wenger E., et al. Contribution of neuroinflammation and immunity to brain aging and the mitigating effects of physical and cognitive interventions. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017; 75: 114-28.
21. Cunnane S.C., Trushina E., Morland C., et al. Brain energy rescue: an emerging therapeutic concept for neurodegenerative disorders of ageing. *Nat Rev Drug Discov*. 2020; 19: 609-33.
22. Yoshino M., Kayser B.D., Yoshino J., et al. Effects of Diet versus Gastric Bypass on Metabolic Function in Diabetes. *N Engl J Med*. 2020; 383: 721-32.

23. Jiang X., Wang X., Tuo M., Ma J., Xie A. RAGE and its emerging role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2018; 672: 65-9.
24. Yang L., Licastro D., Cava E., et al. Long-Term Calorie Restriction Enhances Cellular Quality-Control Processes in Human Skeletal Muscle. *Cell Rep.* 2016; 14: 422-8.
25. Chinta S.J., Woods G., Demaria M., Rane A., Zou Y., McQuade A., Rajagopalan S., et al. Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. *Cell Reports.* 2018; 22(4): 930-40.
26. Cavallucci V., Fidaleo M., Pani G. Nutrients and neurogenesis: the emerging role of autophagy and gut microbiota. *Curr Opin Pharmacol.* 2020; 50: 46-52.
27. Chakraborty A., Banerjee S., Mukherjee B., Poddar M.K., Ali N. Calorie restriction modulates neuro-immune system differently in young and aged rats. *Int Immunopharmacol.* 2021; 100: 108141.
28. Qadir M.I., Anwar S. Sirtuins in Brain Aging and Neurological Disorders. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2017; 27: 321-9.
29. Mazucanti C.H., Cabral-Costa J.V., Vasconcelos A.R., et al. Longevity Pathways (mTOR, SIRT, Insulin/IGF-1) as Key Modulatory Targets on Aging and Neurodegeneration. *Curr Top Med Chem.* 2015; 15: 2116-38.
30. Sharples A.P., Hughes D.C., Deane C.S., et al. Longevity and skeletal muscle mass: the role of IGF signalling, the sirtuins, dietary restriction and protein intake. *Aging Cell.* 2015; 14: 511-23.
31. Feldman J.L., Dittenhafer-Reed K.E., Denu J.M. Sirtuin catalysis and regulation. *J Biol Chem.* 2012; 287: 42419-27.
32. Shoba B., Lwin Z.M., Ling L.S., et al. Function of sirtuins in biological tissues. *Anat Rec (Hoboken).* 2009; 292: 536-43.
33. Zullo A., Simone E., Grimaldi M., et al. Effect of nutrient deprivation on the expression and the epigenetic signature of sirtuin genes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2018; 28: 418-24.
34. Kenyon C.J. The genetics of ageing. *Nature.* 2010; 464: 504-12.
35. Lee C.K., Klopp R.G., Weindruch R., Prolla T.A. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science.* 1999; 285: 1390-3.
36. Pletcher S.D., Macdonald S.J., Marguerie R., et al. Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol.* 2002; 12: 712-23.
37. Zhou B., Yang L., Li S., et al. Midlife gene expressions identify modulators of aging through dietary interventions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109: E1201-1209.
38. Hou L., Wang D., Chen D., et al. A Systems Approach to Reverse Engineer Lifespan Extension by Dietary Restriction. *Cell Metab.* 2016; 23: 529-40.
39. Gao Z., Zhang J., Kheterpal I., et al. Sirtuin 1 (SIRT1) protein degradation in response to persistent c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) activation contributes to hepatic steatosis in obesity. *J Biol Chem.* 2011; 286: 22227-34.
40. Donmez G., Arun A., Chung C.Y., et al. SIRT1 protects against alpha-synuclein aggregation by activating molecular chaperones. *J Neurosci.* 2012; 32: 124-32.
41. Brunet A., Sweeney L.B., Sturgill J.F., et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science.* 2004; 303: 2011-5.
42. Lee I.H., Cao L., Mostoslavsky R., et al. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 3374-9.
43. Yeung F., Hoberg J.E., Ramsey C.S., et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 2004; 23: 2369-2380.
44. Araki T., Sasaki Y., Milbrandt J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science.* 2004; 305: 1010-3.
45. Herskovits A.Z., Guarente L. SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence. *Neuron.* 2014; 81: 471-83.
46. Satoh A., Brace C.S., Rensing N., et al. Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH. *Cell Metab.* 2013; 18: 416-30.
47. Pani G. Neuroprotective effects of dietary restriction: Evidence and mechanisms. *Semin Cell Dev Biol.* 2015; 40: 106-14.
48. Kim H., Kim S., Choi J.E., et al. Decreased Neuron Number and Synaptic Plasticity in SIRT3-Knockout Mice with Poor Remote Memory. *Neurochem Res.* 2019; 44: 676-82.
49. Mostoslavsky R., Chua K.F., Lombard D.B., et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell.* 2006; 124: 315-29.
50. Kanfi Y., Naiman S., Amir G., et al. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature.* 2012; 483: 218-21.
51. Tennen R.I., Chua K.F. Chromatin regulation and genome maintenance by mammalian SIRT6. *Trends Biochem Sci.* 2011; 36: 39-46.
52. Kugel S., Mostoslavsky R. Chromatin and beyond: the multitasking roles for SIRT6. *Trends Biochem Sci.* 2014; 39: 72-81.
53. Kaluski S., Portillo M., Besnard A., et al. Neuroprotective Functions for the Histone Deacetylase SIRT6. *Cell Rep.* 2017; 18: 3052-62.
54. Portillo M., Eremenko E., Kaluski S., et al. SIRT6-CBP-dependent nuclear Tau accumulation and its role in protein synthesis. *Cell Rep.* 2021; 35: 109035.
55. Stein D., Mizrahi A., Golova A., et al. Aging and pathological aging signatures of the brain: through the focusing lens of SIRT6. *Aging (Albany NY).* 2021; 13: 6420-41.
56. Menzies F.M., Fleming A., Caricasole A., et al. Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron.* 2017; 93: 1015-34.
57. Xilouri M., Stefanis L. Autophagy in the central nervous system: implications for neurodegenerative disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010; 9: 701-19.
58. Rajawat Y.S., Hilioti Z., Bossis I. Aging: central role for autophagy and the lysosomal degradative system. *Ageing Res Rev.* 2009; 8: 199-213.
59. Ravikumar B., Vacher C., Berger Z., et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet.* 2004; 36: 585-95.
60. Nixon R.A. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci.* 2007; 120: 4081-91.
61. Corti O., Blomgren K., Poletti A., Beart P.M. Autophagy in neurodegeneration: New insights underpinning therapy for neurological diseases. *J Neurochem.* 2020; 154: 354-71.

62. Rubinsztein D.C. Autophagy induction rescues toxicity mediated by proteasome inhibition. *Neuron*. 2007; 54: 854-6.
63. Gerrish A., Russo G., Richards A., et al. The role of variation at AbetaPP, PSEN1, PSEN2, and MAPT in late onset Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2012; 28: 377-87.
64. Harris H, Rubinsztein DC. Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2012; 8: 108-17.
65. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*. 2007; 21(22): 2861-73.
66. Marmolejo-Martinez-Artesero S., Casas C., Romeo-Guitart D. Endogenous Mechanisms of Neuroprotection: To Boost or Not to Boost. *Cells*. 2021; 10(2): 370.
67. Bishop N.A., Guarente L. Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. *Nat Rev Genet*. 2007; 8: 835-44.
68. Bishop N.A., Guarente L. Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. *Nature*. 2007; 447: 545-9.
69. Colman R.J., Beasley T.M., Kemnitz J.W., Johnson S.C., Weindruch R., Anderson R.M. Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nat Commun*. 2014; 5: 3557.
70. Loos B., Klionsky D.J., Wong E. Augmenting brain metabolism to increase macro- and chaperone-mediated autophagy for decreasing neuronal proteotoxicity and aging. *Prog Neurobiol*. 2017; 156: 90-106.
71. Ntsapi C., Loos B. Caloric restriction and the precision-control of autophagy: A strategy for delaying neurodegenerative disease progression. *Exp Gerontol*. 2016; 83: 97-111.
72. Lin J., Handschin C., Spiegelman B.M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*. 2005; 1: 361-70.
73. Pardo R., Vila M., Cervela L., et al. Calorie restriction prevents diet-induced insulin resistance independently of PGC-1-driven mitochondrial biogenesis in white adipose tissue. *FASEB J*. 2019; 33: 2343-58.
74. Mooli R.G.R., Mukhi D., Watt M., et al. Sustained mitochondrial biogenesis is essential to maintain caloric restriction-induced beige adipocytes. *Metabolism*. 2020; 107: 154225.
75. Kasai S., Shimizu S., Tataru Y., et al. Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. *Bio-molecules*. 2020; 10(2): 320.
76. Zhang R., Wang X., Qu J.H., et al. Caloric Restriction Induces MicroRNAs to Improve Mitochondrial Proteostasis. *iScience*. 2019; 17: 155-66.
77. Kops G.J., Dansen T.B., Polderman P.E., et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*. 2002; 419: 316-21.
78. Bedogni B., Pani G., Colavitti R., et al. Redox regulation of cAMP-responsive element-binding protein and induction of manganese superoxide dismutase in nerve growth factor-dependent cell survival. *J Biol Chem*. 2003; 278: 16510-9.
79. St-Pierre J., Drori S., Uldry M., et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*. 2006; 127: 397-408.
80. Qiu X., Brown K., Hirschey M.D., Verdin E., Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab*. 2010; 12: 662-7.
81. Liu L., Peritore C., Ginsberg J., Kayhan M., Donmez G. SIRT3 attenuates MPTP-induced nigrostriatal degeneration via enhancing mitochondrial antioxidant capacity. *Neurochem Res*. 2015; 40: 600-8.
82. Kobayashi M., Higami Y. Metabolic Alteration in Aging Process: Metabolic Remodeling in White Adipose Tissue by Caloric Restriction. *Yakugaku Zasshi*. 2020; 140: 383-9.
83. Ye F., Wu A. The Protective Mechanism of SIRT1 in the Regulation of Mitochondrial Biogenesis and Mitochondrial Autophagy in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2021; 82: 149-57.
84. Chen J.X., Yan S.S. Role of mitochondrial amyloid-beta in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2010; 20(2): S569-78.
85. Franceschi C., Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014; 69(1): S4-9.
86. Mercken E.M., Crosby S.D., Lamming D.W., et al. Calorie restriction in humans inhibits the PI3K/AKT pathway and induces a younger transcription profile. *Aging Cell*. 2013; 12: 645-51.
87. Vellai T., Takacs-Vellai K., Zhang Y., et al. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature*. 2003; 426: 620.
88. Harrison D.E., Strong R., Sharp Z.D., et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*. 2009; 460: 392-5.
89. Selman C., Tullet J.M., Wieser D., et al. Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science*. 2009; 326: 140-4.
90. Dazert E., Hall MN. mTOR signaling in disease. *Curr Opin Cell Biol*. 2011; 23(6): 744-55.
91. Efeyan A., Comb W.C., Sabatini D.M. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature*. 2015; 517: 302-10.
92. Kapahi P., Chen D., Rogers A.N., et al. With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging. *Cell Metab*. 2010; 11: 453-65.
93. Hardie D.G. AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Curr Opin Cell Biol*. 2015; 33: 1-7.
94. Caccamo A., Majumder S., Richardson A., Strong R., Oddo S. Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. *J Biol Chem*. 2010; 285: 13107-20.
95. Magri L., Cambiaghi M., Cominelli M., et al. Sustained activation of mTOR pathway in embryonic neural stem cells leads to development of tuberous sclerosis complex-associated lesions. *Cell Stem Cell*. 2011; 9: 447-62.
96. Canto C., Gerhart-Hines Z., Feige J.N., et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009; 458: 1056-60.
97. Price N.L., Gomes A.P., Ling A.J., et al. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab*. 2012; 15: 675-90.
98. Schulz T.J., Zarse K., Voigt A., et al. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab*. 2007; 6: 280-93.
99. Canto C., Auwerx J. PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*. 2009; 20: 98-105.

100. Herskovits A.Z., Guarente L. Sirtuin deacetylases in neurodegenerative diseases of aging. *Cell Res.* 2013; 23: 746-58.
101. Hadad N., Unnikrishnan A., Jackson J.A., et al. Caloric restriction mitigates age-associated hippocampal differential CG and non-CG methylation. *Neurobiol Aging.* 2018; 67: 53-66.
102. Hadad N., Unnikrishnan A., Jackson J.A., Masser D.R., Otolara L., Stanford D.R., Richardson A., Freeman W.M. Caloric restriction mitigates age-associated hippocampal differential CG and non-CG methylation. *Neurobiol Aging.* 2018; 67: 53-66.
103. Campion J., Milagro F.I., Goyenechea E., Martinez J.A. TNF-alpha promoter methylation as a predictive biomarker for weight-loss response. *Obesity (Silver Spring).* 2009; 17: 1293-7.
104. Cordero P., Campion J., Milagro F.I., et al. Leptin and TNF-alpha promoter methylation levels measured by MSP could predict the response to a low-calorie diet. *J Physiol Biochem.* 2011; 67: 463-70.
105. Milagro F.I., Campion J., Cordero P., et al. A dual epigenomic approach for the search of obesity biomarkers: DNA methylation in relation to diet-induced weight loss. *FASEB J.* 2011; 25: 1378-89.
106. Ozorhan U., Tuna B.G., Cicekdal M.B., et al. Long-term chronic caloric restriction alters miRNA profiles in the brain of ageing mice. *Br J Nutr.* 2022; 127(5): 641-52.
107. Csiszar A., Gautam T., Sosnowska D., et al. Caloric restriction confers persistent anti-oxidative, pro-angiogenic, and anti-inflammatory effects and promotes anti-aging miRNA expression profile in cerebrovascular endothelial cells of aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014; 307: H292-306.
108. Khanna A., Muthusamy S., Liang R., Sarojini H., Wang E. Gain of survival signaling by down-regulation of three key miRNAs in brain of calorie-restricted mice. *Aging (Albany NY).* 2011; 3: 223-36.
109. Tups A., Benzler J., Sergi D., et al. Central Regulation of Glucose Homeostasis. *Compr Physiol.* 2017; 7: 741-64.
110. Aldana B.I. Microglia-Specific Metabolic Changes in Neurodegeneration. *J Mol Biol.* 2019; 431: 1830-42.

Сведения об авторах:

Фефелова Юлия Анатольевна, доктор биол. наук, доцент каф. патологической физиологии им. проф. В.В. Иванова ФГБОУ ВО «КГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России;

Мурашев Борис Юрьевич, канд. мед. наук, ассистент каф. физиологии им. проф. А.Т. Пшоники ФГБОУ ВО «КГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России.