

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 29.11.2022
Подписано к печати 09.12.2022
Опубликовано 15.12.2022

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. № 4. 1–178.

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 № 4 · 2022

Октябрь–Декабрь

Главный редактор:

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

Заместители главного редактора:

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

Ответственный секретарь:

Н.С. Гурко, *к.м.н., НИИОПП, Москва*

Редакционная коллегия:

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

Редакционный совет:

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

Mailing address:

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

E-mail: path.physiol@yandex.ru

Home page: www.pfiet.ru

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

Publisher: Dmitry Irishkin

E-mail: genius-media@mail.ru

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

Two-year impact factor
according to RSCI on 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 29.11.2022
Signed for publication on 09.12.2022
Published on 15.12.2022

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

ISSN 0031-2991

Pat Fiziol Eksp Ter
2022. Volume 66. No 4. 1-178.

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 № 4 · 2022

October–December

Editor in chief:

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

Assistant editors in chief:

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

Executive editor:

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

Editorial Board:

Yu.V. Archipenko, *DSc, Prof., Moscow State University, Moscow, Russia*
E.I. Astashkin, *DSc, Prof., First Moscow State Medical University, Moscow, Russia*
H. Downey, *PhD, Prof., University of North Texas, Fort Worth (TX), USA*
S.V. Grachev, *Acad. RAS, DSc, Prof., First Mos. State Med. University, Moscow, Russia*
T.A. Guskova, *Corr. Member of RAS, Dsc, Prof., Inst. of Immunology, Moscow, Russia*
A.V. Efremov, *DSc, Prof., Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia*
V.B. Koshelev, *DSc, Prof., Moscow State University, Moscow, Russia*
N.A. Krupina, *DSc, Inst. of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*
A.A. Kubatiev, *Acad. RAS, DSc, Prof., Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*
P.F. Litvitskiy, *Corr. M. of RAS, DSc, Prof., Moscow State Med. Univ., Moscow, Russia*
R. Mallet, *PhD, Prof., University of North Texas, Fort Worth (TX), USA*
O. Matsuo, *PhD, Prof., Kindai University, Higashiosaka, Japan*
G.V. Poryadin, *Corr. M. of RAS, DSc, Prof., National Research Med. Univ., Mos., Russia*
R. Sewell, *PhD, Prof., Cardiff University, Cardiff, UK*

Advisory Committee:

Yu.Yu. Byalovskiy, *DSc, Prof., Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia*
V.T. Dolgikh, *DSc, Prof., Omsk State Medical University, Omsk, Russia*
A.M. Dygay, *Acad. RAS, DSc, Prof., Tomsk National Research Medical Center of RAS, Tomsk, Russia*
D.A. Enikeev, *DSc, Prof., Bashkir State Medical University, Ufa, Russia*
V.P. Kulikov, *DSc, Prof., Altai Medical Inst. of Postgraduate Education, Barnaul, Russia*
V.P. Mikhailov, *DSc, Prof., Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia*
V.G. Ovsyannikov, *DSc, Prof., Rostov State Med. University, Rostov-na-Donu, Russia*
S.N. Orlov, *DSc, Prof., Moscow State University, Moscow, Russia*
N.N. Petrishchev, *DSc, Prof., First St.Petersburg State Med. Univ., St.Peterburg, Russia*
L.A. Severyanova, *DSc, Prof., Kursk State Medical University, Kursk, Russia*
V. Shvarz, *PhD, Prof., Saarland University, Homburg/Saar, Germany*

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Губенко М.С., Логинов В.И., Бурденный А.М., Пронина И.В., Филиппова Е.А., Казубская Т.П., Перцов С.С.** Метилирование ДНК в регуляции экспрессии генов системы апоптоза при немелкоклеточном раке легкого 5
- Белозор О.С., Шуваев А.Н., Фрицлер Я.В., Шуваев А.Н.** Мутантный Атаксин-1 с патологически удлинённой полиглутаминовой цепочкой нарушает морфологию и эндоканнабиноид-опосредованную синаптическую пластичность в клетках Пуркинье СЦА1 модельных мышей 13
- Оберган Т.Ю., Шубина Т.А., Григорьева М.Е., Ляпина Л.А.** Влияние композита хитозана с аспарагиновой кислотой на изменение реакций системы гемостаза в условиях экспериментальной гипокоагуляции 20
- Осиков М.В., Антонов В.Н., Зотов С.О., Игнатова Г.Л.** Роль сахарного диабета 2 типа в эскалации дисфункции тромбоцитов у больных с COVID-19 ассоциированным поражением легких 27
- Попова И.А., Литвицкий П.Ф., Будник И.А., Андриуца Н.С.** Этиопатогенетическое обоснование алгоритма специфической противовирусной терапии хронических воспалительных форм патологии ротоглотки, ассоциированных с герпесвирусной инфекцией. 36
- Лобанов А.В., Перепеченова Н.А., Захарова И.А., Лобанова Н.Н., Морозов С.Г.** Влияние пренатального и постнатального воздействия антител к белку S100B на формирование поведения мышей в детском и подростковом возрасте. 49
- Быков Ю.В., Батулин В.А.** Определение уровней аутоантител к нейрорецепторам у детей больных сахарным диабетом 1-го типа. 61
- Сухопарова Е.П., Зиновьев Е.В., Князева Е.С.** Прогностическая значимость элементного состава волос для оценки риска развития послеоперационных раневых осложнений 67
- Крюков И.А., Ершов А.В., Лобанов А.В., Гребенчиков О.А.** Влияние продолжительности экспозиции ксенона на объем ишемического повреждения головного мозга в эксперименте 73
- Алилуев А.В., Семенова Л.Ю., Мальцева Н.В., Порядин Г.В.** Влияние гипоксических тренировок на уровень метаболизма дофамина в структурах мозга крыс 79
- Дикунец М.А., Дудко Г.А., Вирюс Э.Д., Крючков А.С.** Применение расширенного биохимического профиля спортсмена сверхвысокой квалификации для прогнозирования стойкого снижения работоспособности 86
- Ким А.Е., Шустов Е.Б., Зайцева И.П., Лемешченко А.В.** Патфизиологические механизмы неблагоприятного взаимодействия гипоксии и температурных факторов в отношении физической работоспособности 94
- Абрамян Ш.М., Кандалова О.В., Волкова Е.Н., Найденов Н.П., Морозов С.Г.** Измерение уровня экспрессии вторичных мессенджеров апоптоза в клетках кожи, выделенных из операционного материала при проведении операции лифтинга лица у пациенток разных возрастных групп... 107

ORIGINAL ARTICLES

- Gubenko M.S., Loginov V.I., Burdenny A.M., Pronina I.V., Filipova E.A., Kazubskaya T.P., Pertsov S.S.** DNA methylation in the regulation of the apoptosis system gene expression in non-small cell lung cancer 5
- Belozor O.S., Shuvaev A.N., Fritsler Ya.V., Shuvaev A.N.** Mutant Ataxin-1 with an abnormally expanded polyglutamine chain disrupts morphology and endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in Purkinje cells of SCA1 model mice 13
- Obergan T.Yu., Shubina T.A., Grigorjeva M.E., Lyapina L.A.** Effect of a chitosan composite with aspartic acid on the change in reactions of the hemostasis system in experimental hypocoagulation 20
- Osikov M.V., Antonov V.N., Zotov S.O., Ignatova G.L.** The role of type 2 diabetes in the escalation of platelet dysfunction in patients with covid-19-associated lung damage 27
- Popova I.A., Litvitskiy P.F., Budnik I.A., Andriutsa N.S.** Etiopathogenetic substantiation of the algorithm for specific antiviral therapy of chronic inflammatory forms of oropharyngeal pathology associated with herpesvirus infection 36
- Lobanov A.V., Perepechenova N.A., Zakharova I.A., Lobanova N.N., Morozov S.G.** Effect of prenatal and postnatal exposure to S100B protein antibodies on the behavior of mice in nesting and juvenile periods of development 49
- Bykov Yu.V., Baturin V.A.** Concentrations of autoantibodies to neural receptors in children with diabetes mellitus 61
- Sukhoparova E.P., Zinoviev E.V., Kniazeva E.S.** Prognostic significance of the elemental composition of hair for assessing the risk of postoperative wound complications 67
- Krukov I.A., Ershov A.V., Lobanov A.V., Grebenchikov O.A.** The effect of xenon exposure duration on the volume of ischemic brain injury in experiment 73
- Aliluev A.V., Semenova L.Yu., Maltseva N.V., Poryadin G.V.** Effect of hypoxic training on dopamine metabolism in rat brain structures 79
- Dikunets M.A., Dudko G.A., Viryus E.D., Kryuchkov A.S.** The use of extended biochemical profile for predicting a sustained decline in the performance of highly qualified athlete 86
- Kim A.E., Shustov E.B., Zaitseva I.P., Lemeshchenko A.V.** Pathophysiological mechanisms of adverse interactions of hypoxia and temperature factors in relation to physical working ability 94
- Abramian Sh.M., Kandalova O.V., Volkova E.N., Naidenov N.P., Morozov S.G.** Measurement of apoptotic second messenger expression in skin cells isolated from tissue collected during face lifting surgery in patients of different age groups 107

СОДЕРЖАНИЕ

- Леонов С.Д., Родин А.В., Панченков Д.Н.** Биоимпедансный анализ селезенки после обширной резекции печени в эксперименте 115
- Савилов П.Н.** Особенности кинетики мочевины в организме при хроническом воспалительном поражении печени 122

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- Засеева А.М., Хугаева В.К., Ардасенов А.В.** Влияние лимфостимулирующего пептида на динамику летальности при экспериментальном инфаркте миокарда 132
- Лупанова И.А., Ферубко Е.В., Курманова Е.Н., Шишканов Д.В., Сайбель О.Л.** Изучение гепатопротекторной активности топинамбура травы экстракта сухого на модели токсического гепатита у крыс 138

ОБЗОРЫ

- Лукина С.С., Бурденный А.М., Филиппова Е.А., Пронина И.В., Иванова Н.А., Казубская Т.П., Брага Э.А., Логинов В.И.** Роль длинных некодирующих РНК и ДНК-метилирования в патогенезе рака яичников 143
- Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Султанова Д.А.** Роль белка сиртуина-3 при лечении фиброза печени 157
- Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б.** Инсульт и пробиота 166

ИНФОРМАЦИЯ

- Давыдова Т.В., Крупина Н.А.** Итоги работы 9-й Российской конференции по нейроиммунопатологии (с международным участием), посвященной 100-летию со дня рождения академика РАМН Г.Н. Крыжановского 172
- Кубышкин А.В., Коваленко Е.П.** Новые рубежи изучения воспаления: от трансляционных исследований к клинике (Информация о 15-м Всемирном конгрессе по воспалению (WCI2022) 175

ЮБИЛЕИ

- К 85-летию ученого – патофизиолога Н.Н. Петрищева. 178

CONTENTS

- Leonov S.D., Rodin A.V., Panchenkov D.N.** Bioimpedance analysis of the spleen after experimental extended liver resection 115
- Savilov P.N.** The kinetics of urea in the body in chronic inflammatory liver disease 122

BRIEF MESSAGES

- Zaseeva A.M., Khugaeva V.K., Ardasenov A.V.** The effect of lymphostimulating peptide on the dynamics of mortality in experimental myocardial infarction 132
- Lupanova I.A., Ferubko E.V., Kurmanova E.N., Shishkanov D.V., Saybel O.L.** Hepatoprotective activity of the *Helianthus tuberosus* L. extract in carbon tetrachloride-induced liver damage in rats 138

REVEIWS

- Lukina S.S., Burdennyu A.M., Filippova E.A., Pronina I.V., Ivanova N.A., Kazubskaya T.P., Braga E.A., Loginov V.I.** The role of long non-coding RNA and DNA methylation in the pathogenesis of ovarian cancer 143
- Grebnev D.Yu., Maklakova I.Yu., Sultanova D.A.** The role of the Sirtuin 3 protein in the treatment of liver fibrosis 157
- Paltsyn A.A., Sviridkina N.B.** Stroke and probiota 166

INFORMATION

- Davydova T.V., Krupina N.A.** Results of the 9th Russian Conference on Neuroimmunopathology (with international participation) dedicated to the 100th anniversary of the birth of Academician of the Russian Academy of Medical Sciences G.N. Kryzhanovsky 172
- Kubyshkin A.V., Kovalenko E.P.** New frontiers in the study of inflammation: from translational research to the clinic (Information about the 15th World Congress on Inflammation (WCI2022) 175

ANNIVERSARIES

- To the 85th anniversary of the pathophysiolgist N.N. Petrishchev 178

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Губенко М.С.¹, Логинов В.И.¹, Бурденный А.М.¹, Пронина И.В.¹, Филиппова Е.А.¹, Казубская Т.П.², Перцов С.С.³

Метилирование ДНК в регуляции экспрессии генов системы апоптоза при немелкоклеточном раке легкого

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

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

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,

115522, Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 23;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина»,

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

Актуальность. Рак легкого – наиболее распространенное злокачественное новообразование во всем мире: в 2020 г. было диагностировано более 2,2 млн новых случаев, с высокой частотой неблагоприятного исхода – более 1,7 млн случаев. Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) составляет примерно 85% всех случаев рака легкого. Важную роль в патогенезе этого вида рака играет aberrантное метилирование CpG-островков промоторных областей в генах, ассоциированных с апоптозом. Ранее имелись сообщения о гиперметилировании генов *DAPK1*, *APAF1*, *BCL2* в некоторых видах опухолей, но данные о роли метилирования этих генов в прогрессии НМРЛ представлены единичными сообщениями. Вопрос о роли метилирования промоторных CpG-островков в регуляции активности генов *BIM*, *BAX* и патогенезе НМРЛ до настоящего момента не выяснен. **Цель** – исследование изменений уровня экспрессии и метилирования генов системы апоптоза при НМРЛ.

Методика. Образцы опухолей НМРЛ собраны и клинически охарактеризованы в НИИ клинической онкологии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Высокомолекулярную ДНК выделяли из ткани стандартным методом. Анализ уровня метилирования проводили с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метилспецифичной ПЦР (МС-ПЦР) с детекцией в реальном времени. Анализ уровня экспрессии проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR-Green I. Для оценки значимости различий между исследуемыми группами применяли непараметрический критерий Манна–Уитни для независимых выборок.

Результаты. С применением ПЦР в реальном времени показано статистически значимое ($p < 0.05$) увеличение уровня метилирования генов *BAX*, *DAPK1* и *BIM* и снижение для гена *BCL2* в образцах опухолей по сравнению с парной гистологически нормальной тканью легкого. Показано, что в исследованных первичных опухолях уровни метилирования генов *BAX*, *BIM* и *BCL2* статистически значимо ассоциированы с уровнями их экспрессии у больных с НМРЛ. Нами впервые показано увеличение уровня метилирования гена *BAX* при одновременном снижении его экспрессии в образцах опухоли с наличием метастазов в лимфатические узлы по сравнению с образцами опухоли без оных ($p = 0.033$, $FDR = 0.05$ и $p < 0.01$, $FDR = 0.05$, соответственно).

Заключение. Обнаруженные нами новые закономерности представляют интерес для понимания механизмов развития НМРЛ, могут стать основой диагностики и прогноза течения этого заболевания, а также помочь в корректировании хода лечения с учетом патофизиологических особенностей опухоли.

Ключевые слова: метилирование; экспрессия; апоптоз; НМРЛ

Для цитирования: Губенко М.С., Логинов В.И., Бурденный А.М., Пронина И.В., Филиппова Е.А., Казубская Т.П., Перцов С.С. Метилирование ДНК в регуляции экспрессии генов системы апоптоза при немелкоклеточном раке легкого. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(4): 5-12.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.5-12

Участие авторов: обработка материала, проведение исследования – Губенко М.С.; концепция и дизайн исследования, подготовка иллюстративного материала, редактирование статьи – Логинов В.И.; написание и редактирование статьи, дизайн таблиц – Бурденный А.М.; проведение исследования по экспрессии – Пронина И.В.; статистическая обработка результатов – Филиппова Е.А.; сбор и описание материала – Казубская Т.П.; общее руководство исследованием – Перцов В.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

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

Финансирование. Работа выполнена за счет средств государственного задания №FGFU-2022-0007.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.07.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Gubenko M.S.¹, Loginov V.I.¹, Burdenny A.M.¹, Pronina I.V.¹, Filippova E.A.¹, Kazubskaya T.P.², Pertsov S.S.³**DNA methylation in regulation of the apoptosis gene expression in non-small cell lung cancer**¹Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltiyskaya St. 8, Moscow, 125315, Russian Federation;²Blokhin National Medical Research Center of Oncology,
Kashirskoe shosse, 23, Moscow, 115522, Russian Federation;³Anokhin Research Institute of Normal Physiology,
Baltiyskaya St. 8, Moscow, 125315, Russian Federation

Background. Lung cancer is the most common malignant neoplasm worldwide: in 2020 more than 2.2 million new cases and more than 1.7 million cases with a high frequency of adverse outcome were diagnosed. Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for approximately 85% of all lung cancers. An important role in the pathogenesis of this type of cancer is played by aberrant methylation of CpG islands of promoter regions in apoptosis-related genes. Previous studies have reported hypermethylation of the DAPK1, APAF1, and BCL2 genes in some types of tumors, but reports of the role of methylation of these genes in the progression of NSCLC are scarce. The role of the promoter CpG islands methylation in the regulation of BIM, BAX gene activity and in the pathogenesis of NSCLC has not yet been clarified. **Aim.** To study changes in the expression and methylation levels of apoptosis-related genes in NSCLC. **Methods.** Samples of NSCLC tumors were collected and clinically characterized at the Blokhin Research Institute of Clinical Oncology. High-molecular DNA was isolated from the tissue by the standard method. The methylation level was analyzed using bisulfite DNA conversion and quantitative methylation-specific PCR (MS-PCR) with real-time detection. The expression level was measured by real-time PCR using the intercalating dye SYBR-Green I. The nonparametric Mann-Whitney criterion for independent samples was used to assess the significance of differences between the study groups.

Results. Real-time PCR detected a significant ($p < 0.05$) increase in the methylation level of the BAX, DAPK1, and BIM genes and a decrease in the BCL2 gene in tumor samples compared to matched, histologically normal lung tissue. In the studied primary tumors, the methylation levels of the BAX, BIM and BCL2 genes were significantly associated with respective expression levels in patients with NSCLC. For the first time, this study demonstrated an increased methylation level of the BAX gene with a simultaneous decrease in its expression in tumor samples in the presence of lymph node metastases compared to tumor samples without metastases ($p = 0.033$, FDR=0.05 and $p < 0.01$, FDR=0.05, respectively).

Conclusion. Thus, the discovered new patterns are of interest for understanding the mechanisms of NSCLC development, can form a basis for diagnosis and prognosis of the course of this disease, and also help adjusting the management considering the pathophysiological features of the tumor.

Keywords: methylation; expression; apoptosis; NSCLC**For correspondence:** *Alexey M. Burdenny*, Candidate of Biological Sciences, L.S.S. lab. Pathogenomics and Transcriptomics of FSBSI NIIOPP, e-mail: burdenny@gmail.com**For citation:** Gubenko M.S., Loginov V.I., Burdenny A.M., Pronina I.V., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., Pertsov S.S. DNA methylation in regulation of the apoptosis gene expression in non-small cell lung cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(4): 5-12. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.5-12

Authors' contribution: processing of material, conducting research – Gubenko M.S.; concept and design of research, preparation of illustrative material, editing of the article – Loginov V.I.; writing and editing of the article, table design – Burdenny A.M.; conducting research on expression – Pronina I.V.; statistical processing of the result – Filippova E.A.; collection and the description of the material – Kazubskaya T.P.; general guidance of the study – Pertsov V.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

Information about the authors:Burdenny A.M., <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>Loginov V.I., <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>Pronina I.V., <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>Filippova E.A., <https://orcid.org/0000-0001-7172-0433>Kazubskaya T.P., <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>**Financing.** The work was carried out at the expense of the state task No. FGFU-2022-0007.**Conflict of interest.** The authors declare that there is no conflict of interest.

Received 15.07.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

Несмотря на последние достижения в области профилактики, выявления и лечения рака, рак легкого остается наиболее распространенным злокачественным новообразованием во всем мире. Так, в 2020 г. было выявлено более 2,2 млн. новых случаев [1]. Следует отметить, что низкий уровень мониторинга и раннего выявления рака лёгкого приводит к поздней постановке диагноза у значительной части пациентов с данным заболеванием, что в свою очередь обеспечивает неблагоприятный прогноз и исход (более 1,7 млн случаев). В российской популяции онкобольных в 2020 г. рак легкого диагностирован у 54 375 человек, в то же время у 39 371 человек диагностирован неблагоприятный исход. От рака легкого ежегодно умирает больше больных, чем от рака простаты, молочной железы и толстой кишки вместе взятых [2]. Поэтому многочисленные исследования сосредоточены на выявлении специфических и клинически применимых молекулярных биомаркеров для раннего выявления рака легкого.

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) составляет примерно 85% всех случаев рака легкого. НМРЛ гистологически подразделяется на 2 основных подтипа: плоскоклеточный рак (ПРЛ) и аденокарциному (АДК) [3].

Следует отметить, что механизм онкогенеза НМРЛ связан с нарушением динамической регуляции клеточных процессов и обусловлен эпигенетическими факторами, которые играют критическую роль в регуляции экспрессии генов, в том числе и генов апоптоза, задействованных в патогенезе разных онкологических заболеваний, в том числе и НМРЛ [4]. Существует два пути активации апоптоза: рецептор-зависимый (внешний сигнальный путь с участием рецепторов смерти) и рецептор-независимый (внутренний митохондриальный) [5, 6]. Одним из основных генов, участвующих в рецептор-зависимом сигнальном пути активации апоптоза, является ген *DAPK1* (*Death-associated protein kinase 1*, 9q21.33). При реакции стимуляции (например, апоптотическими индукторами, онкогенами), увеличивается экспрессия pDAPK1, в результате чего опосредованно происходит активация p53 через путь p14/p19ARF, что в конечном счете, приводит к апоптозу [7, 8].

Митохондриальный путь активации апоптоза индуцируется повреждением ДНК, действием радиации, цитотоксических агентов, глюкокортикоидов и т.д. Он связан с экспрессией генов *BCL2L11/BIM* (*BCL2 like 11/BCL-2-interacting mediator of cell death*, 2q13) и *BAX* (*BCL-2 associated x protein*, 19q13.33) [9]. Эти

белки вызывают повышение проницаемости мембраны митохондрий, в результате в цитоплазму поступает апоптогенный белок цитохром С, который вместе с белковым продуктом гена *APAF1* (*Apoptosis Protease Activating Factor-1*, 12q23.1) образует комплекс с каспазами необходимыми для протекания процесса апоптоза [10]. Напротив, белковый продукт гена *BCL2* (*B-cell lymphoma 2*, 18q21.3) способствует понижению проницаемости мембраны митохондрий и может остановить процесс апоптоза. Кроме того, Bcl-2 образует комплекс с фактором апоптоза Araf-1, что сдерживает активацию каспазо-зависимого пути апоптоза [11].

Ранее имелись сообщения об аномальном метилировании генов *DAPK1*, *APAF1*, *BCL2*, *BIM/BCL2L11* в некоторых видах опухолей, но данные о роли метилирования этих генов в прогрессии НМРЛ представлены единичными сообщениями [4, 12, 13]. Вопрос о роли метилирования промоторного CpG-островка в регуляции активности гена *BAX* и патогенезе НМРЛ не выяснен (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, июнь 2022).

Цель работы – исследование изменений уровня экспрессии и метилирования генов системы апоптоза, а именно, про-апоптотических генов *APAF1*, *DAPK1*, *BIM*, *BAX*, и анти-апоптотического гена *BCL2* в прогрессии НМРЛ.

Методика

Образцы опухолей НМРЛ собраны и клинически охарактеризованы в НИИ клинической онкологии ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина по системе TNM в соответствии с классификацией RUSSCO. Исследование проведено с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности, одобрена этическим комитетом института и выполнялась по международным правилам работы с биоматериалом людей.

В табл. 1 приведены обобщенные данные по клинико-патоморфологическим характеристикам 28 исследованных парных образцов НМРЛ.

Высокомолекулярную ДНК и РНК выделяли из ткани стандартными методами. Анализ уровня метилирования проводили с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метилспецифичной ПЦР (МС-ПЦР) с детекцией в реальном времени, как описано в работе [14]. Последовательности олигонуклеотидов и условия проведения МС-ПЦР взяты из [15]. Исследование было проведено с использованием оборудования ЦКП «Прикладная Генетика» МФТИ. (Соглашение № 075-15-2021-684).

Анализ уровня экспрессии мРНК пяти генов *APAF1*, *DAPK1*, *BIM*, *BAX*, *BCL2* проводили методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с исполь-

зованием интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green I в составе набора qPCRmix-HS SYBR (5x) в соответствии с протоколом производителя (Евроген, Россия) на амплификаторе BioRad CFX96 qPCRSystem (Bio-Rad, США), последовательности праймеров для гена *BIM* приведены в табл. 2. Праймеры для генов *APAF1*, *DAPK1*, *BCL2*, *BAX* и гена *B2M*, являющегося эндогенным внутренним контролем, относительно которого и проводили нормирование продуктов амплификации исследуемого гена, взяты из работ [16, 17].

Таблица 1/ Table 1

Клинико-патоморфологические параметры больных НМРЛ
Clinical and pathomorphological parameters of NSCLC patients

Клинико-патоморфологический параметр Clinical and pathomorphological parameters		n, (%)
Гистологический диагноз Histological diagnosis	Плоскоклеточный рак легкого Squamous cell lung cancer	15, (53,6)
	Аденокарцинома легкого Adenocarcinoma of lung	13, (46,4)
Стадия опухолевого процесса Stage of tumor process	I	11, (39,3)
	II	8, (28,6)
	III	7, (25,0)
	IV	2, (7,1)
Степень дифференцировки Differentiation grade	G1	2, (7,1)
	G2	14, (50,0)
	G3	12, (42,9)
Размер первичной опухоли Primary tumor size	T1	4, (14,3)
	T2	18, (64,3)
	T3	4, (14,3)
	T4	2, (7,1)
Лимфогенное метастазирование Lymphogenic metastasis	N0	12, (42,9)
	N1-3	16, (57,1)
Статус курильщика Smoker status	Курит / Smokes	14, (50,0)
	Не курит / No Smokes	14, (50,0)

Все реакции ПЦР повторяли трижды. В качестве отрицательного контроля использовали пробы без кДНК. Данные анализировали с использованием относительной количественной оценки по $\Delta\Delta C_t$ -методу. Изменения уровня экспрессии менее чем в 2 раза ($|\Delta\Delta C_t| \leq 2$) рассматривали как отсутствие изменений [18].

Статистический анализ. Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием пакета статистических программ «IBM SPSS Statistics 22» и включала определение медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q1–Q3). Для оценки значимости различий применялся непараметрический критерий Манна–Уитни, критерий Краскала–Уоллиса. Корреляционный анализ проводили посредством расчета коэффициента корреляции Спирмена и уровня его значимости. Различия считали существенными при $p < 0.05$, где p – показатель статистической значимости различий между изучаемыми выборками. Применяли поправку на множественное сравнение Бенджамини–Хохберга и оценивали величину FDR (false discovery rate, частота ложного обнаружения).

Результаты

В результате исследования уровня метилирования 5 апоптоз-ассоциированных белоккодирующих генов на 28 парных образцах НМРЛ было показано статистически значимое повышение уровня метилирования в опухолях легкого в сравнении с условной нормой для генов *BAX*, *DAPK1* и *BIM* ($p \leq 0.001$, $p = 0.035$ и $p = 0.05$, соответственно, $FDR = 0.05$) (рис. 1, а). В то же время для анти-апоптозного гена *BCL2* показано значимое снижение уровня метилирования в опухолях НМРЛ в сравнении с условной нормой (рис. 1, а).

Стоит отметить, что при изучении уровня экспрессии мРНК (рис. 1, б), кодируемых этими генами, выявлено статистически значимое снижение уровня экспрессии у *BAX* и повышение экспрессии у *BCL2* ($p = 0.0002$, $FDR = 0.05$ и $p = 0.0029$, $FDR = 0.05$, соответственно).

Полученные нами данные о метилировании изученных генов нашли свое подтверждение в ряде работ

Таблица 2/ Table 2

Используемые праймеры для ПЦР-РВ
RT-PCR primers used

Ген Gene	Структура праймеров (5'-3') Primer Structure (5'-3')	$T_{отж}, ^\circ C$	Размер продукта п.н. Product size
<i>BIM</i>	F: TGCCAGGCCTTCAACCACTATCTCA R: GGGTGGTCTTCGGCTGCTGGTAAT	60	176

зарубежных авторов. Так в работе [19] метилирование гена *DAPK1* было значительно выше при раке легкого, чем в незлокачественных тканях легкого (32/104 (31%) против 3/16 (19%), $p = 0,022$). Высокий уровень метилирования гена *DAPK1* был также отмечен и в других работах на раке легкого [8, 20].

Для гена *BIM* не все так однозначно. Нами показано статистически значимое повышение уровня метилирования гена в опухоли, что косвенно подтверждается работами зарубежных авторов, выполненных при других видах онкологии [21, 22]. Однако в работе [13] проведенной на образцах НМРЛ было показано, что основным эпигенетическим процессом инактивации гена *BIM* является ацетилирование гистонов.

Данные о гипометилировании гена *BCL2* и его гиперэкспрессии в опухоли нашли свое подтверждение в литературе [23, 24]

Далее нами был проведен корреляционный анализ зависимости между уровнем метилирования исследованных генов и экспрессией кодируемых ими мРНК. Обнаружено, что в исследованных первичных опухолях уровни метилирования генов *BAX*, *BIM* и *BCL2* статистически значимо ассоциированы с уровнями их экспрессии у больных с НМРЛ. Так, для гена *BCL2* было показано, что со снижением уровня метилирования в опухолевой ткани происходит статистически значимое ($R_s = -0.783$, $p < 0.001$, $FDR = 0.01$) увеличение уровня экспрессии его мРНК. На рис. 2 представлены корреляционные зависимости между уровнем экспрессии мРНК и уровнями метилирования генов *BAX* и *BIM* у больных НМРЛ.

Основываясь на полученных нами данных о сильной отрицательной корреляции метилирования с экспрессией, можно сказать, что полученные результаты свидетельствуют о том, что гиперметилирование в опухоли является биологическим маркером изменения экспрессии генов мРНК. Следует подчеркнуть, что наши результаты согласуются как с данными мировых исследователей, полученными для других генов при НМРЛ, так и нашими собственными, полученными для других видов онкологии [4, 18, 25]

Во второй части нашей работы мы провели анализ изменения уровня метилирования и экспрессии в образцах первичных опухолей НМРЛ с учётом клинико-патоморфологических особенностей опухоли, таких как: стадия опухолевого процесса, размер опухоли, степень дифференцировки, наличие лимфогенного метастазирования, гистологического типа опухоли и статуса курильщика.

Нами впервые показано увеличение уровня метилирования гена *BAX* в образцах опухоли с наличием метастазов в лимфатические узлы по сравнению с образцами опухоли без оных ($p = 0.033$, $FDR = 0.05$) (рис. 3). Следует отметить, что показатели уровня экспрессии мРНК *BAX* в опухоли при этом статистически значимо снижались ($p < 0.01$, $FDR = 0.05$) (рис. 3). Таким образом, можно предположить, что данный ген является важным маркером прогрессии НМРЛ. Об измененной экспрессии *BAX* часто сообщают при НМРЛ [26]. Однако ни в одном из этих исследований не сделан вывод о том, что измененная экспрессия *BAX* имеет

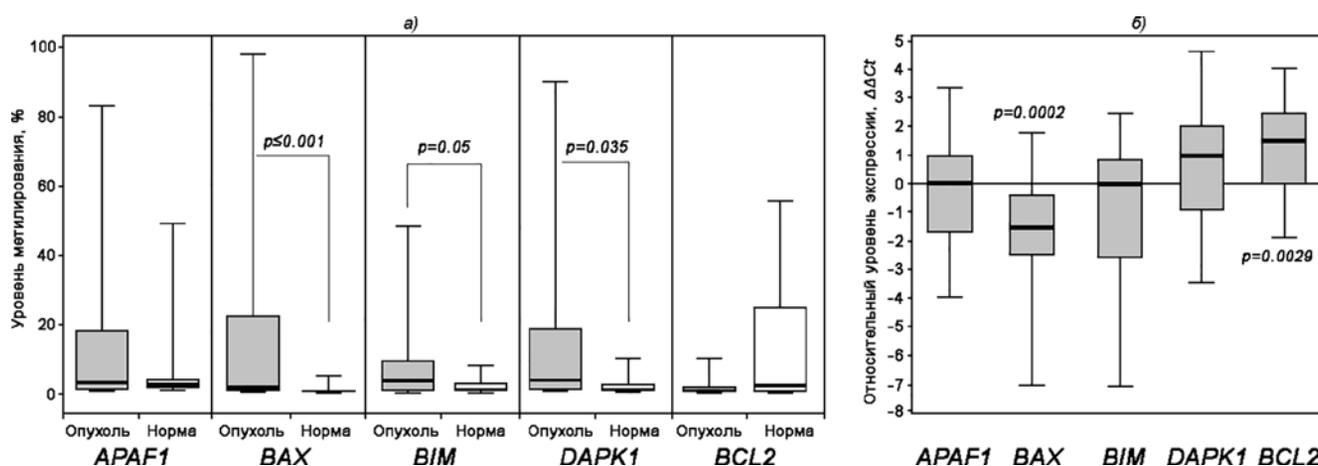


Рис. 1. Профили метилирования (а) и экспрессии (б) генов *APAF1*, *BAX*, *BIM*, *DAPK1*, *BCL2* в образцах НМРЛ. Рассчитано с применением непараметрического критерия Манна–Уитни. Показаны медианы и диапазон: верхний (3-й) и нижний (1-й) квантили.

Fig. 1. Methylation (a) and expression profiles (b) of *APAF1*, *BAX*, *BIM*, *DAPK1*, *BCL2* genes in NSCLC samples. Calculated using nonparametric Mann–Whitney test. Medians and range are shown: upper (3rd) and lower (1st) quartiles.

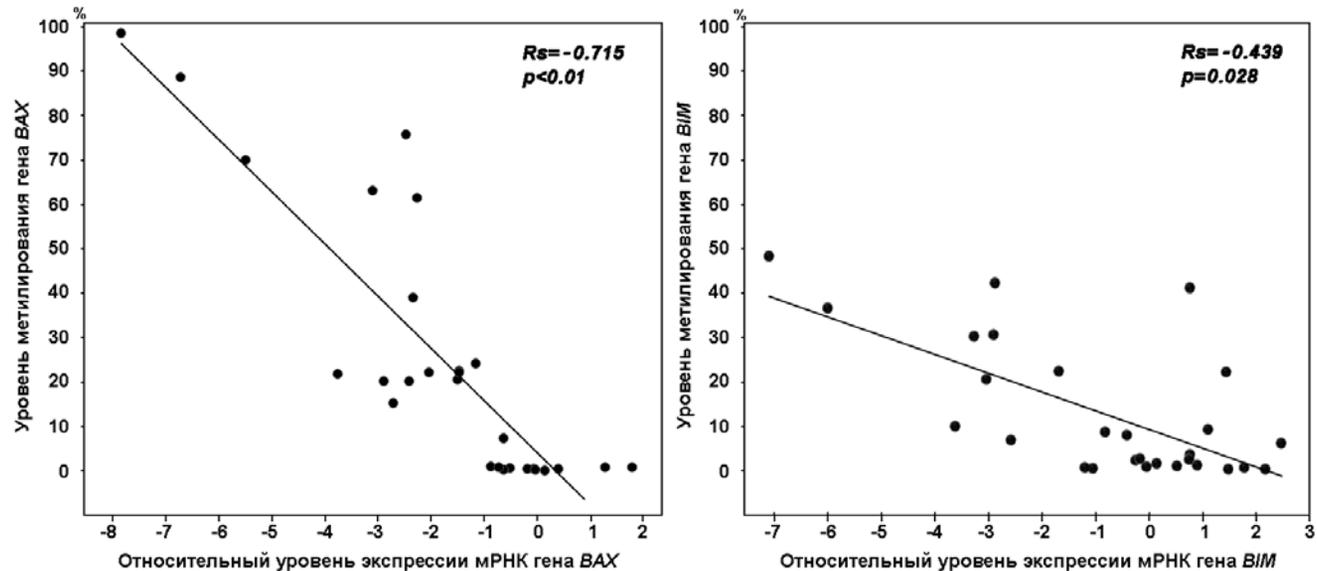


Рис. 2. Связь между экспрессией мРНК и метилированием ДНК.

По оси абсцисс – уровни экспрессии мРНК, определенные с помощью количественного анализа RT-PCR. По оси ординат – уровень метилирования ДНК (%) для каждого конкретного образца, исследованного с помощью количественной МС-ПЦР. Коэффициент корреляции Спирмена **Rs** и **p**-значение (двустороннее) корреляции отображаются в правом верхнем углу каждого графика.

Fig 2. Relationship between mRNA expression and DNA methylation.

Abscissa: mRNA expression levels determined by quantitative RT-PCR analysis. Ordinate: the level of DNA methylation (%) for each specific sample studied by quantitative RT-PCR. The Spearman correlation coefficient **Rs** and the **p**-value (two-sided) of the correlation are displayed in the upper right corner of each graph.

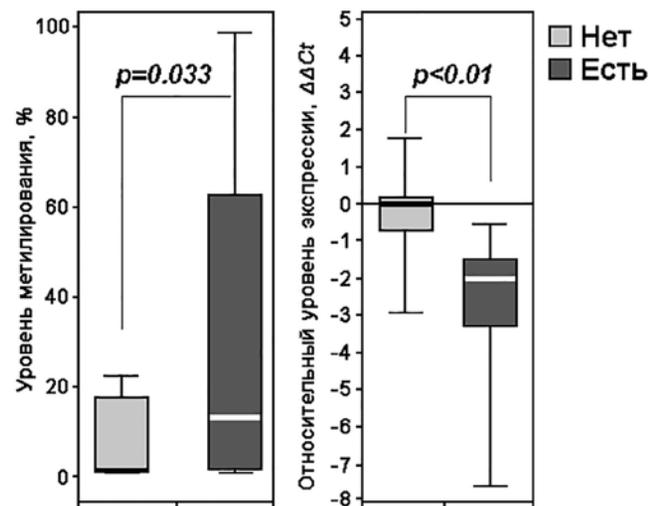


Рис. 3. Профиль метилирования и экспрессии для гена *BAX* в образцах НМРЛ с учётом наличия или отсутствия лимфогенного метастазирования. Рассчитано с применением критерия Манна–Уитни. Показаны медианы и диапазон: верхний (3-й) и нижний (1-й) квартили.

Fig. 3. Methylation and expression profile for the *BAX* gene in NSCLC samples based on the presence or absence of lymphogenic metastasis. Calculated using the Mann–Whitney criterion. Medians and range are shown: upper (3rd) and lower (1st) quartiles.

существенное значение в качестве прогностического маркера, хотя ни одно из них не исследовали экспрессию *BAX* совместно с метилированием его промоторного CpG-островка.

В нашей работе нам не удалось выявить значимых изменений в уровнях метилирования и/или экспрессии у генов *DAPK1*, *BCL2*, *BIM*, *APAF1*, связанных с прогрессией НМРЛ, но в работе китайских ученых, показано, что увеличенный уровень метилирования гена *DAPK1* не только связан с развитием метастазов, но и с плохим прогнозом у пациентов с НМРЛ [27].

Таким образом, исследованные гены играют существенную роль в процессах клеточного гомеостаза и в случае нарушения динамических процессов эпигенетической регуляции могут быть вовлечены в пути злокачественной трансформации, в частности при НМРЛ и его гистологических подтипах.

Заключение

Таким образом, в проведенном нами исследовании показана корреляция уровня метилирования с уровнем экспрессии для исследуемых генов при НМРЛ. Во-первых, выявлено статистически значимое снижение уров-

ня экспрессии мРНК при гиперметилировании генов *BAH*, *BIM* у больных НМРЛ. И напротив, для *BCL2* показано статистически значимое увеличение уровня экспрессии мРНК при общем снижении уровня метилирования в опухоли. Во-вторых, показана взаимосвязь между изменением уровня экспрессии от уровня метилирования промоторного CpG-островка для гена *BAH* при метастазировании опухоли в лимфатические узлы. Таким образом, выявленные нами особенности представляются важными для понимания патогенеза НМРЛ; а исследование уровня метилирования и/или экспрессии может найти применение при разработке персонализированных подходов к диагностике, прогнозу и терапии больных НМРЛ.

Авторы благодарят Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина за сбор и клинко-гистологическую характеристику образцов НМРЛ.

Литература

(п.п. 1; 3–27 см. References)

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. *Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность)*. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021.

References

- Cancer Today*. International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr/today/> (accessed May 18, 2022)
- Kaprin A.D., Starinsky V.V., Shakhzadova A.O. *Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality) [Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2020 godu (zabolevaemost' i smertnost')]*. Moscow: P.A. Herzen Institute of Medical Research – Branch of the Federal State Budgetary Institution “NMIC of Radiology” of the Ministry of Health of the Russian Federation. 2021.
- Sung S., Heymann J.J., Crapanzano J.P., Moreira A.L., Shu C., Bulman W.A., et al. Lung cancer cytology and small biopsy specimens: diagnosis, predictive biomarker testing, acquisition, triage, and management. *J Am Soc Cytopathol*. 2020; 9(5): 332-45. doi: 10.1016/j.jasc.2020.04.014. PMID: 32591241
- Yang S., Huang Y., Zhao Q. Epigenetic Alterations and Inflammation as Emerging Use for the Advancement of Treatment in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Immunol*. 2022; 13:878740. doi: 10.3389/fimmu.2022.878740. PMID: 35514980
- Liu G., Pei F., Yang F., Li L., Amin A.D., Liu S., et al. Role of Autophagy and Apoptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(2): 367. doi: 10.3390/ijms18020367. PMID: 28208579;
- Singh P., Lim B. Targeting Apoptosis in Cancer. *Curr Oncol Rep*. 2022; 24(3): 273-84. doi: 10.1007/s11912-022-01199-y. PMID: 35113355
- Pfeffer C.M., Singh A.T.K. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(2): 448. doi: 10.3390/ijms19020448
- Li Y., Zhu M., Zhang X., Cheng D., Ma X. Clinical significance of DAPK promoter hypermethylation in lung cancer: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther*. 2015; 9: 1785-96. doi: 10.2147/DDDT.S78012. PMID: 25848215
- Tan Y.Q., Zhang X., Zhang S., Zhu T., Garg M., Lobbie P.E., et al. Mitochondria: The metabolic switch of cellular oncogenic transformation. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021; 1876(1): 188534. doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188534. PMID: 33794332
- Shakeri R., Kheirollahi A., Davoodi J. Contribution of Apaf-1 to the pathogenesis of cancer and neurodegenerative diseases. *Biochimie*. 2021; 190: 91-110. doi: 10.1016/j.biochi.2021.07.004. PMID: 34298080
- Basu A. The interplay between apoptosis and cellular senescence: Bcl-2 family proteins as targets for cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 2022; 230: 107943. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107943. PMID: 34182005
- Zhao Y., Zhou H., Ma K., Sun J., Feng X., Geng J., et al. Abnormal methylation of seven genes and their associations with clinical characteristics in early stage non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2013; 5(4): 1211-8. doi: 10.3892/ol.2013.116
- Zhao M., Zhang Y., Li J., Li X., Cheng N., Wang Q., et al. Histone deacetylation, as opposed to promoter methylation, results in epigenetic BIM silencing and resistance to EGFR TKI in NSCLC. *Oncol Lett*. 2018; 15(1): 1089-96. doi: 10.3892/ol.2017.7411. PMID: 29399169
- Loginov V.I., Pronina, I.V., Filippova E.A., Burdenny A.M., Lukina S.S., Kazubskaya, T.P., et al. Aberrant Methylation of 20 miRNA Genes Specifically Involved in Various Steps of Ovarian Carcinoma Spread: From Primary Tumors to Peritoneal Macroscopic Metastases. *Int. J. Mol. Sci*. 2022, 23, 1300. doi: 10.3390/ijms23031300
- Braga E.A., Burdenny A.M., Pronina I.V., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., Fridman M.V., et al. 4 Markers system based on the methylation of the group of pro-apoptotic genes in combination with miRNA in the diagnosis of breast cancer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2019; 168(9): 338-42.
- Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenny A.M., Fridman M.V., Senchenko V.N., Kazubskaya T.P., et al. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene*. 2017; 604: 1-8. doi: 10.1016/j.gene.2016.12.018
- Kontos C.K., Fendri A., Khabir A., Mokdad-Gargouri R., Scorilas A. Quantitative expression analysis and prognostic significance of the BCL2-associated X gene in nasopharyngeal carcinoma: a retrospective cohort study. *BMC Cancer*. 2013; 13, e293. doi: 10.1186/1471-2407-13-293
- Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenny A.M., Fridman M.V., Kazubskaya T.P., Dmitriev A.A., et al. Expression and DNA methylation alterations of seven cancer-associated 3p genes and their predicted regulator miRNAs (miR-129-2, miR-9-1) in breast and ovarian cancers. *Gene*. 2016 576(1 Pt 3): 483-91. doi: 10.1016/j.gene.2015.10.059
- Daniunaite K., Sestokaite A., Kubiliute R., Stuopelyte K., Ketunien E., Husgafvel-Pursiainen K., et al. Frequent DNA methylation changes in cancerous and noncancerous lung tissues from smokers with non-small cell lung cancer. *Mutagenesis*. 2020:geaa022. doi: 10.1093/mutage/geaa022. PMID: 32914849
- Huang X., Wu C., Fu Y., Guo L., Kong X., Cai H. Methylation analysis for multiple gene promoters in non-small cell lung cancers in high indoor air pollution region in China. *Bull Cancer*. 2018; 105(9): 746-54. doi: 10.1016/j.bulcan.2018.05.004. PMID: 3012660
- San José-Eneriz E., Agirre X., Jiménez-Velasco A., Cordeu L., Martín V., Arqueros V., et al. Epigenetic downregulation

- of BIM expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer*. 2009; 45: 1877–89. doi: 10.1016/j.ejca.2009.04.005
22. Richter-Larrea J.A., Robles E.F., Fresquet V., Beltran E., Rullán A.J., Agirre X., et al. Reversion of epigenetically mediated BIM silencing overcomes chemoresistance in Burkitt lymphoma. *Blood*. 2010; 116: 2531–42. doi: 10.1182/blood-2010-02-268003
 23. Lökk K., Voeder T., Kolde R., et al. Methylation markers of early-stage non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2012; 7:e39813/
 24. Pargol M., Zare Karizi S., Akbari M., Nourmohammadi B., Shadmehr M.B., Karimipour M., et al. Investigation the Role of Autophagy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2021; 22(3): 947–55. doi: 10.31557/APJCP.2021.22.3.947. PMID: 33773561
 25. Loginov V.I., Dmitriev A.A., Senchenko V.N., Pronina I.V., Khodyrev D.S., Kudryavtseva A.V., et al. Tumor suppressor function of the SEMA3B gene in human lung and renal cancers: influence on cancer progression and angiogenesis. *PLoS ONE*. 2015, 10(5):e0123369
 26. Paul I., Jones J.M. Apoptosis block as a barrier to effective therapy in non small cell lung cancer. *World J Clin Oncol*. 2014; 5(4): 588–94. doi: 10.5306/wjco.v5.i4.588. PMID: 25302163
 27. Zhang J., Yu X.L., Zheng G.F., Zhao F. DAPK promoter methylation status correlates with tumor metastasis and poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Biomark*. 2015; 15(5): 609–17. doi: 10.3233/CBM-150501. PMID: 26406950

Сведения об авторах:

Губенко Марина Сергеевна, мл. науч. сотр. лаб. Патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

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

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

Пронина Ирина Валерьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. Патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Филиппова Елена Александровна, канд. мед. наук, науч. сотр. лаб. Патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Казубская Татьяна Павловна, доктор мед. наук, врач-онкогенетик, ст. науч. сотр. лаб. клинической онкогенетики ФГБУ «НМИЦ центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

Перцов Сергей Сергеевич, чл.-корр. РАН, доктор. мед. наук, проф. РАН, гл. науч. сотр. лаб. системных механизмов эмоционального стресса ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина»

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Белозор О.С.¹, Шуваев А.Н.², Фрицлер Я.В.², Шуваев А.Н.¹

Мутантный Атаксин-1 с патологически удлинённой полиглутаминовой цепочкой нарушает морфологию и эндоканнабиноид-опосредованную синаптическую пластичность в клетках Пуркинье СЦА1 модельных мышей

¹ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, НИИ Молекулярной медицины и патобиохимии,

660022, Красноярск, Россия, ул. Партизана Железняка, д. 1;

²ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»,

660041, Красноярск, Россия, пр. Свободный, д. 79

Введение. Спиноцеребеллярная атаксия первого типа (СЦА1) представляет собой нейродегенеративное заболевание, которое обычно поражает мозжечок. В Российской Федерации СЦА1 является наиболее часто наблюдаемым заболеванием среди аутосомно-доминантно наследуемых атаксий. Причиной заболевания является экспансия CAG-повторов в кодирующей области гена белка атаксина-1. Ранее на модели СЦА3 было показано, что CRAG является фактором, ограничивающим скорость деградации патологических форм полиглутаминовых белков, а направленная экспрессия CRAG является потенциальной генной терапией полиглутаминовых болезней. В этой работе для выявления патологии мутантного атаксина-1 и установления влияния экспрессии CRAG на этот процесс охарактеризованы электрофизиологические аномалии зрелых мышей СЦА1. **Цель работы** – изучение влияния молекулы CRAG на морфологию клеток Пуркинье (КП) и эндоканнабиноид-опосредованную синаптическую пластичность в мозжечке СЦА1 модельных животных.

Методика. В исследованиях была использована трансгенная модель СЦА1 с экспрессией гена белка атаксина-1 с 82 повторами CAG. Для исследования влияния CRAG, мышам на 1-2-й постнатальный день внутривенно вводили векторную конструкцию pAAV/MSCV-GFP-P2A-CRAG. Исследование выполнено на 4-месячных мышах линии CD1, которые были разделены на 3 группы: 1-я группа (контрольная) – дикий тип (ДТ), 2-я и 3-я группы – СЦА1 модельные мыши: 2-я группа без экспрессии молекулы CRAG, 3-я – экспрессирующая молекулу CRAG: СЦА1 CRAG (–) и СЦА1 CRAG (+) соответственно. Влияние CRAG оценивали с помощью методов электрофизиологии: оценивали пассивные и активные свойства мембраны, эндоканнабиноид-опосредованную кратковременную пластичность (SSE).

Результаты. Установлено, что экспрессия мутантного атаксина-1 способствует уменьшению ёмкости мембраны КП мозжечка, вследствие чего уменьшаются время нарастания и время спада возбуждающих постсинаптических токов в синапсах КП с параллельными волокнами. Также в этих синапсах наблюдалось нарушение SSE. Было выявлено, что экспрессия CRAG в модельных мышах СЦА1 способствует восстановлению морфологии КП и нормализации кратковременной пластичности SSE.

Заключение. СЦА1 модельные мыши демонстрируют выраженное нарушение морфологии КП и SSE в мозжечке. Экспрессия CRAG вызывает нейропротекторное действие в виде восстановления морфологии и синаптической пластичности КП.

Ключевые слова: спиноцеребеллярная атаксия 1-го типа; клетки Пуркинье; электрофизиология; кратковременная синаптическая пластичность

Для цитирования: Белозор О.С., Шуваев А.Н., Фрицлер Я.В., Шуваев А.Н. Мутантный Атаксин-1 с патологически удлинённой полиглутаминовой цепочкой нарушает морфологию и эндоканнабиноид-опосредованную синаптическую пластичность в клетках Пуркинье СЦА1 модельных мышей. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 13-19.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.13-19

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Шуваев А.Н.; сбор и обработка материала – Белозор О.С., Шуваев А.Н., Шуваев А.Н.; подготовка иллюстративного материала – Шуваев А.Н., Фрицлер Я.В.; написание текста – Белозор О.С.;

редактирование – Белозор О.С., Шуваев А.Н. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

Для корреспонденции: Белозор Ольга Сергеевна, e-mail: olsbelor@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 23-25-00047.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.06.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Belozor O.S.¹, Shuvaev A.N.², Fritsler Ya.V.², Shuvaev A.N.¹**Mutant Ataxin-1 with an abnormally expanded polyglutamine chain disrupts morphology and endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in Purkinje cells of SCA1 model mice**¹Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Partizana Zheleznyaka St. Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation;²Siberian Federal University, Svobodny Prospekt 79, Krasnoyarsk, 660041, Russian Federation

Background. Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) is a neurodegenerative disease that affects the cerebellum and brainstem. It is the most common disease among autosomal dominant inherited ataxias in the Russian Federation. The disease is caused by expansion of CAG repeats in the coding region of the ataxin-1 protein gene. Previously, it was shown on a SCA3 model that CRAG is a molecule that limits the degradation rate of pathological forms of polyglutamine proteins. For this reason, the directed expression of CRAG may be a potential gene therapy for polyglutamine diseases. In this study, we characterized the electrophysiological abnormalities of mature SCA1 mice to elucidate the effect of pathological mutant ataxin-1 and the impact of CRAG expression on this process.

Aim. To study the effect of the CRAG molecule on Purkinje cell (PC) morphology and endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the cerebellum of SCA1 model mice.

Methods. In this study, we used a transgenic SCA1 murine model with the expression of the ataxin-1 protein gene with 82 CAG repeats. For the CRAG expression, mice were intravenously injected with the pAAV/MSCV-GFP-P2A-CRAG vector at the first or second postnatal day. The study was performed on 4-month-old CD1 mice, which were divided into three groups: control, wild type (WT); SCA1 model mice without the CRAG molecule expression (SCA1 CRAG (-)); and SCA1 model mice expressing the CRAG molecule (SCA1 CRAG (+)). We examined the effect of CRAG using electrophysiological studies: determination of passive and active properties of membranes and endocannabinoid-mediated environmental plasticity (SSE).

Results. The mutant ataxin-1 expression decreased the cerebellar PC membrane capacitance, which led to decreases in the rise and decay times of the excitatory postsynaptic currents in PC synapses to parallel fibers. Also, SSE was altered in these synapses. It was found that the CRAG expression in SCA1 model mice partly restored the PC morphology and normalized SSE.

Conclusions. SCA1 model mice show a pronounced impairment of PC morphology in the cerebellum. The CRAG expression provides restoration of PC morphology and synaptic plasticity.

Keywords. Spinocerebellar ataxia type 1; Purkinje cell; electrophysiology; short-term synaptic plasticity

For citation: Belozor O.S., Shuvaev A.N., Fritsler Ya.V., Shuvaev A.N. Mutant Ataxin-1 with an abnormally expanded polyglutamine chain disrupts morphology and endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in Purkinje cells of SCA1 model mice. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(4): 13-19. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.13-19

Author' contribution: The concept and design of the study – Shuvaev A.N.; collection and material processing – Belozor O.S., Shuvaev A.N., Shuvaev A.N.; preparation of illustrative material – Shuvaev A.N., Fritsler Ya.V.; writing the text – Belozor O.S.; editing – Belozor O.S., Shuvaev A.N. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence. **Belozor O.S.**, e-mail: olsbelor@gmail.com

Financing. This work was supported by grant No. 20-415-242905 r_mk_Krasnoyarsk of the Russian Foundation for Basic Research and the Government of the Krasnoyarsk Krai.

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

Information about the authors:

Belozor O.S., <https://orcid.org/0000-0001-8384-5962>

Fritsler Ya.V., <https://orcid.org/0000-0003-3299-1200>

Shuvaev A.N., <https://orcid.org/0000-0002-3887-1413>

Shuvaev A.N., <https://orcid.org/0000-0003-0078-4733>

Received 09.06.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

Спиноцеребеллярная атаксия (СЦА) представляет собой нейродегенеративное заболевание, обычно поражающее мозжечок. При прогрессировании заболевания страдают и другие области ЦНС, например, ствол головного мозга и спинной мозг. Около трети случа-

ев СЦА носят наследственный характер, при котором наиболее часто наблюдаются полиглутаминовые заболевания. Причиной полиглутаминовых заболеваний является аномальная экспансия тринуклеотидных CAG-повторов в кодирующей области гена [1, 2]. СЦА 1 типа (СЦА1) – наиболее часто наблюдаемое заболевание среди аутосомно-доминантно наследуемых

атаксий и вызывается экспансией CAG-повторов в кодирующей области гена белка атаксина-1 [3].

Ранее на созданных модельных мышах СЦА3, которые экспрессируют укороченный на N-конце атаксин-3 с аномально удлиненной полиглутаминовой последовательностью, специфически в клетках Пуркинье (КП) мозжечка, было выявлено, что постнатальное накопление мутантного атаксина-3 в ядре нарушает дифференцировку дендритов и передачу сигналов mGluR в КП мышей СЦА3, и это нарушение может быть вызвано дефектом пути транскрипции, управляемого ROR α [4]. Нам удалось удалить отложения мутантных полиглутаминовых белков из пораженных КП и значительно уменьшить развитие атаксии у СЦА3 мышей посредством мозжечковой инъекции аденоассоциированных вирусных векторов, экспрессирующих CRAG. CRAG – молекула медиатора ответа коллапсина, ассоциированная с гуанозинтрифосфатазой и содержит последовательность сигнала ядерной локализации. CRAG участвует в механизмах, лежащих в основе ядерной транслокации, деградации белков через убиквитин-протеасомный путь и образования агрегатов полиглутаминовых белков [5]. Однако то, как мутантный атаксин-1 с аномально удлиненной полиглутаминовой последовательностью влияет на функцию КП, еще не полностью изучено. В этом исследовании мы охарактеризовали электрофизиологические аномалии зрелых мышей СЦА1, чтобы прояснить патологию мутантного атаксина-1 и влияние экспрессии CRAG на этот процесс.

Методика

Экспериментальные животные. В исследовании использованы мыши линии CD1 B05, экспрессирующие ген белка атаксина-1, с 82 повторами CAG и их однопородных дикого типа [6]. Животных содержали на 12-часовом цикле свет/темнота при свободном доступе к пище и воде. Исследования выполняли после утверждения заявки и протокола на использование лабораторных животных на заседании биоэтической комиссии по работе с животными при локальном этическом комитете ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого».

Было сформировано 3 группы животных: группа «ДТ» – контрольная группа, мыши дикого типа; группа «СЦА1 CRAG (–)» – мыши СЦА1, которым не вводили генетические конструкции; группа «СЦА1 CRAG(+)» – мыши СЦА1, которым вводили rAAV/MSCV-GFP-P2A-CRAG.

Производство векторов AAV. Вирусные конструкции предоставлены лабораторией проф. Х. Хирай (Gunma University, Dep. of Neurophysiology and Neural

repair, Japan). Для экспрессии терапевтического гена в КП с помощью аденоассоциированного вирусного вектора серотипа-9 (AAV9) нами использован промотор вируса стволовых клеток мышей (MSCV), который обладает сильной транскрипционной активностью в КП [7]. Плазмида для экспрессии rAAV/MSCV-GFP-P2A-CRAG была получена ферментативными реакциями с использованием pNAV [8] и pCL20c/MSCV-GFP-P2A-CRAG [9]. Первоначально rAAV/MSCV получали путем вставки фрагмента промотора MSCV с тупыми концами MluI и BamHI в сайты с тупыми концами XhoI и BamHI pNAV. Затем кассету GFP-P2A-CRAG с тупыми концами NotI и BamHI субклонировали в rAAV/MSCV с тупыми концами EcoRI и BamHI. Рекомбинантные одноцепочечные векторы AAV9 были получены путем котрансфекции клеток HEK293 тремя плазмидами: rAAV/MSCV-GFP-P2A-CRAG, pHelper и rAAV2/9 (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния, США). Вирусные частицы очищали, используя осаждение сульфатом аммония и центрифугирование в непрерывном градиенте йодиксанола, как описано ранее [10]. Геномный титр очищенного вектора AAV9, определенный с помощью ПЦР в реальном времени, составил $9,9 \times 10^{14}$ векторных геномов/мл.

Введение векторов. Детенышей мышей, получавших вирусные инъекции, выводили скрещиванием гетерозиготных мышей B05 с мышами дикого типа. Мышам P1-2 вводили очищенный раствор AAV9 через наружную яремную вену с помощью шприца Hamilton объемом 0,1 мл (Hamilton Company, Рино, Невада, США) с иглой 30 калибра (Becton Dickinson & Co, Франклин Лейкс, Нью-Джерси, США). Через 3 нед после инъекции генотипы мышей (гетерозиготные или дикого типа) определяли с помощью ПЦР с использованием специфических праймеров 5'-GTGAGTTTGGGTCTGGCATC-3' (смысловой) и 5'-CCAAAAGTTAGGATCACAGCCC-3' (антисмысловой). В качестве контроля использовали неинъектированных гетерозиготных мышей и мышей дикого типа.

Электрофизиологические эксперименты. Для электрофизиологических исследований подготавливали парасагитальные срезы мозжечка (толщиной 250 μ m), как детально описано ранее [11, 12]. Вкратце, 4-месячных мышей глубоко анестезировали изофлураном (3%). Вскрывали черепную коробку, извлекали мозг и погружали его на минуту в ледяной раствор, состав раствора в мМ: 234 сахарозы; 26 NaHCO₃; 2,5 KCl; 1,25 NaH₂PO₄; 11 D-глюкозы; 10 MgSO₄ и 0,5 CaCl₂ (pH 7,4), с аэрацией смесью газов 95% O₂ и 5% CO₂. Парасагитальные срезы червя мозжечка получали с помощью

вибротомы (Thermo Scientific; Microtom CU65, США). Срезы при комнатной температуре в течение не менее 45 мин до начала записи выдерживали во внеклеточном растворе, содержащем (в мМ) 125 NaCl; 2,5 KCl; 2 CaCl₂; 1 MgCl₂; 1,25 NaH₂PO₄; 26 NaHCO₃; 10 D-глюкозы и 0,1 пикротоксина, который непрерывно перфузировали смесью 95% O₂ и 5% CO₂. Для записи использовались стеклянные электроды, заполненные внутриклеточным раствором ((в мМ) 65 К-глюконата; 65 Cs-метансульфоната; 10 KCl; 1 MgCl₂; 4 Na₂ATP; 1 NaGTP; 20 HEPES; 0,4 EGTA и 5 сахарозы (pH 7,3)). Электроды имели сопротивление от 2 до 4 МΩ.

Потенциал КП фиксировался на 70 мВ для записи возбуждающих постсинаптических токов в синапсах КП с параллельными волокнами (ПВ ВПСТ). Парное усиление амплитуд ВПСТ (PPF) проводилось с межстимуляционным интервалом в 50 мс. Пассивные свойства мембраны, такие как емкость мембраны (Cm) и сопротивление мембраны (Rm), были получены путем изменения гиперполяризующего напряжения от 70 до 80 мВ в течение 500 мс.

Для синаптически вызванного подавления возбуждения (SSE) регистрировали стабильный базовый ответ ВПСТ в течение 1 мин, а затем применяли высокочастотную стимуляцию ПВ (50 импульсов с частотой 100 Гц). ПВ ВПСТ регистрировали в течение 100 с после стимуляции.

Статистический анализ. Результаты выражены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (m±SEM), n указывает количество исследованных КП. Статистический анализ различий между группами проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным тестом Тьюки. Во всех случаях различия принимали значимыми при p<0,05.

Результаты

Изменение пассивных и активных свойств мембраны КП мозжечка мышей СЦА1. При проведении элект-

трофизиологических экспериментов было выявлено (табл. 1) уменьшение ёмкости мембраны (Cm) в КП мышей СЦА1 CRAG (-) по сравнению с мышами дикого типа (p=0,00002), что свидетельствует, в первую очередь, о серьезном нарушении роста дендритов. AAV9-опосредованная экспрессия CRAG в КП трансгенных мышей значительно увеличила мембранную ёмкость КП. Были выявлены статистически значимые различия в ёмкости мембран между КП, экспрессирующими CRAG, и КП неинъецированных мышей СЦА1 (p=0,03). Другие свойства пассивной мембраны, такие как сопротивление мембраны (Rm) и сопротивление доступа (Ra), существенно не различались между генотипами, и экспрессия CRAG на них не влияла (табл. 1).

Анализ кинетики ПВ ВПСТ показал значительно более быстрое время нарастания и спада у мышей СЦА1, чем у однопомётных животных дикого типа (p=0,036 и p=0,0035, соответственно) (табл. 2), что можно объяснить заметно нарушенным развитием дендритов и, следовательно, более маленькой ёмкостью мембран КП мышей СЦА1. У мышей СЦА1, экспрессирующих CRAG, также отличались от контрольной группы время нарастания (p=0,037) и время спада (p=0,009).

Нарушение эндоканнабиноид-опосредованного пресинаптического ингибирования у мышей СЦА1. Кратковременная стимуляция ПВ вызывает в КП активацию mGluR1 пути передачи сигналов и локальное повышение Ca²⁺. Эти эффекты активируют продукцию и секрецию эндоканнабиноидов постсинаптической мембраной и приводят к ретроградному подавлению высвобождения глутамата из пресинаптических окончаний ПВ (синаптически вызванное подавление возбуждения, SSE) [13–16]. В ответ на тетаническую стимуляцию амплитуды ПВ ВПСТ в группе «ДТ» снижались до 49±3,7 % от контрольной амплитуды, и возвращались к контрольным достимуляционным значениям через 80 с (рисунок). В модельных мышях СЦА1

Таблица 1/Table 1

Сравнение пассивных свойств мембраны клеток Пуркинью
Comparison of passive properties of Purkinje cell membrane

Группы / показатели Groups / indicators	Ёмкость Cm(pF)	Ra (mΩ)	Rm (mΩ)
ДТ – контроль (control) (n = 10/3)	683,8±57,8***	10,9±0,6	207,5±15,4
СЦА1 CRAG (-) (n = 8/3)	296,6±29,0	10,3±1,4	210,8±34,3
СЦА1 CRAG(+) (n = 9/3)	422,0±44,0†	9,6±0,9	212,5±27,7

Примечание/Note. *** – p<0,001; † – p<0,05; membrane capacitance (Cm) and resistance; ДТ (wild-type mice).

Обсуждение

деполяризация вызывала снижение амплитуды значительно меньше – только до $77 \pm 11,2\%$ ($p=0,039$), и через 20 с значения возвращались к достимуляционным.

Также мы оценили влияние экспрессии CRAG в КП мышей СЦА1 на SSE (рисунок). Экспрессия CRAG у мышей СЦА1 приводила к восстановлению SSE – амплитуда снижалась до $49,2 \pm 11,4\%$, что статистически не различалось с контрольной группой ($p=0,984$). Время восстановления амплитуд также изменилось у мышей СЦА1, экспрессирующих CRAG, – через 20 с амплитуда восстановилась до $71,9 \pm 7,7\%$, тогда как у мышей СЦА без экспрессии CRAG амплитуда в этот временной промежуток восстановилась до базальных значений ($98,8 \pm 9,3\%$, $p=0,046$).

Трансгенные мыши B05 сверхэкспрессируют человеческий атаксин 1 с 82 повторами глутамин только в КП благодаря специфичному промотору [6]. У этих мышей развивается неврологический дефицит начиная с 6-й недели, наблюдается прогрессирующая потеря КП и нарушение функции мозжечка. Удлиненная полиглутаминовая последовательность в атаксине-1 приводит к неправильной структуре мутантного белка, вследствие чего образуются растворимые и нерастворимые агрегаты в клетках. Нарушение функции белка, накопление агрегатов, нарушение деградации мутантных белков вносит вклад в патогенез СЦА1 [6, 17, 18].

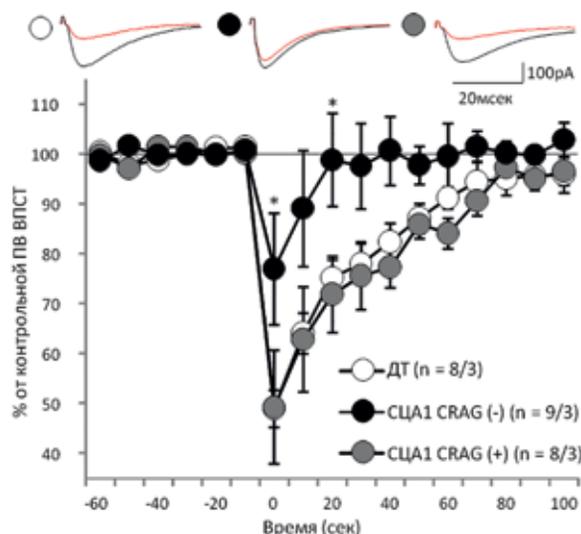


График динамики нормированных амплитуд ПВ ВПСТ у мышей дикого типа, модельных мышей СЦА1 без введения AAV(CRAG (-)) и экспрессирующих CRAG (CRAG (+)). Количество исследованных КП (n) и животных показано в скобках. Сверху представлены репрезентативные кривые до (черный цвет) и после (красный цвет) стимуляции; * – $p<0,05$.

Graph of the dynamics of the normalized SP amplitudes PF EPSC of in wild-type, model CCA1 mice without AAV(CRAG (-)) and expressing CRAG (CRAG (+)). The number of Purkinje cells (n) and animals studied are shown in parentheses. Above are representative traces before (black) and after (red) stimulation. * – $p<0.05$.

Таблица 2/ Table 2

Сравнение характеристик возбуждающих постсинаптических токов в синапсах КП с параллельными волокнами (ПВ ВПСТ)
Comparison of the characteristics of the excitatory postsynaptic currents parallel fibers-PC synapse (PF EPSC)

Группы Groups	Амплитуда Amplitude (pA)	Коэф. коэффициент PPF	Время подъёма/ Rise time (ms)	Время спада Decay time (ms)
ДТ – контроль (control) (n = 10/3)	666,8±78,9	1,6±0,1	2,0±0,2*	10,5±0,8**
СЦА1 CRAG (-) (n = 8/3)	707,3±191,5	1,6±0,1	1,7±0,1	6,3±0,9
СЦА1 CRAG(+)(n = 9/3)	846,2±144,4	1,6±0,1	1,6±0,1	7,1±0,9**

Примечание/Note. * – $p<0,05$, ** – $p<0,01$, ** – $p<0,01$.

Наш анализ срезов мозжечка с помощью метода локальной фиксации потенциала показал значительно меньшую ёмкость мембраны КП у мышей СЦА1, по сравнению с мышами дикого типа, что свидетельствует о уменьшении размера дендритов в КП мышей СЦА1. Наше исследование четко показало функциональное нарушение эндоканнабиноид-опосредованного пресинаптического ингибирования (SSE) у мышей СЦА1. Так как эндоканнабиноиды модулируют синаптическую передачу и опосредуют множественные формы синаптической пластичности [19–22], то такое нарушение может способствовать развитию атаксии, наблюдаемой у пациентов с СЦА1.

Для уменьшения количества мутантного атаксина-1 в КП мышей СЦА1 мы использовали AAV9, поскольку его внутривенное введение позволяет доставлять трансген в ЦНС на ранних этапах развития до формирования гематоэнцефалического барьера [23–25]. AAV9-опосредованная экспрессия CRAG в КП СЦА1-мышей восстанавливала размеры КП и значительно улучшала экспрессию SSE. Эти результаты подтверждают, что постнатальное отложение мутантного атаксина-1 с аномально удлинённой полиглутаминовой последовательностью в КП *in vivo* нарушает развитие дендритов и кратковременную синаптическую пластичность в синапсах ПВ-КП.

Заключение

Охарактеризованы электрофизиологические нарушения у СЦА1 зрелых мышей, которые экспрессируют в КП мутантный ген атаксина-1 с 82 повторами CAG, что и обуславливает тяжелую атаксию. Электрофизиологическое исследование КП мышей СЦА1 выявило значительное снижение ёмкости мембраны КП и нарушение эндоканнабиноид-опосредованного пресинаптического ингибирования возбуждения в синапсах ПВ-КП. Постнатальное снижение количества мутантного атаксина-1 за счет AAV9-опосредованной экспрессии CRAG способствовало частичному восстановлению размеров КП и полному восстановлению эндоканнабиноид-опосредованной кратковременной синаптической пластичности.

Литература/References

1. Zoghbi H.Y., Orr H.T. Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience*. 2000; 23: 217–47.
2. Buijssen R.A.M., Toonen L.J.A., Gardiner S.L., van Roon-Mom W.M.C. Genetics, mechanisms, and therapeutic progress in polyglutamine spinocerebellar ataxias. *Neurotherapeutics*. 2019; 16(2): 263–86.
3. Kawaguchi Y., Okamoto T., Taniwaki M., Aizawa M., Inoue M., Katayama S., et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genetics*. 1994; 8: 221–8.

4. Konno A., Shuvaev A.N., Miyake N., Miyake K., Iizuka A., Matsuura S., et al. Mutant Ataxin-3 with an Abnormally Expanded Polyglutamine Chain Disrupts Dendritic Development and Metabotropic Glutamate Receptor Signaling in Mouse Cerebellar Purkinje Cells. *Cerebellum*. 2014; 13(1): 29–41.
5. Qin Q., Inatome R., Hotta A., Kojima M., Yamamura H., Hirai H., et al. A novel GTPase, CRAG, mediates promyelocytic leukemia protein-associated nuclear body formation and degradation of expanded polyglutamine protein. *Journal of Cell Biology*. 2006; 172: 497–504.
6. Burridge E.N., Clark H.B., Servadio A., Matilla T., Feddersen R.M., Yunis W.S., et al. SCA1 transgenic mice: a model for neurodegeneration caused by an expanded CAG trinucleotide repeat. *Cell*. 1995; 82(6): 937–48.
7. Takayama K., Torashima T., Horiuchi H., Hirai H. Purkinje-cell-preferential transduction by lentiviral vectors with the murine stem cell virus promoter. *Neuroscience Letter*. 2008; 443: 7–11.
8. Tamayose K., Hirai Y., Shimada T. A new strategy for large-scale preparation of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors by using packaging cell lines and sulfonated cellulose column chromatography. *Human Gene Therapy*. 1996; 7: 507–13.
9. Torashima T., Koyama C., Iizuka A., Mitsumura K., Takayama K., Yanagi S., et al. Lentivector-mediated rescue from cerebellar ataxia in a mouse model of spinocerebellar ataxia. *EMBO Reports*. 2008; 9: 393–9.
10. Miyake K., Miyake N., Yamazaki Y., Shimada T., Hirai Y. Serotype-independent method of recombinant adeno-associated virus (AAV) vector production and purification. *Journal of Nippon Medical School*. 2012; 79: 394–402.
11. Iizuka A., Takayama K., Torashima T., Yamasaki M., Koyama C., Mitsumura K., et al. Lentiviral vector-mediated rescue of motor behavior in spontaneously occurring hereditary ataxic mice. *Neurobiology of Disease*. 2009; 35: 457–65.
12. Torashima T., Iizuka A., Horiuchi H., Mitsumura K., Yamasaki M., Koyama C., et al. Rescue of abnormal phenotypes in $\delta 2$ glutamate receptor-deficient mice by the extracellular N-terminal and intracellular C-terminal domains of the $\delta 2$ glutamate receptor. *Eur J Neurosci*. 2009; 30: 355–65.
13. Maejima T., Hashimoto K., Yoshida T., Aiba A., Kano M. Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron*. 2001; 31: 463–75.
14. Brown S.P., Brenowitz S.D., Regehr W.G. Brief presynaptic bursts evoke synapse-specific retrograde inhibition mediated by endogenous cannabinoids. *Nature Neuroscience*. 2003; 6: 1048–57.
15. Marcaggi P., Attwell D. Endocannabinoid signaling depends on the spatial pattern of synapse activation. *Nature Neuroscience*. 2005; 8: 776–81.
16. Marcaggi P., Attwell D. Short- and long-term depression of rat cerebellar parallel fibre synaptic transmission mediated by synaptic cross-talk. *The Journal of Physiology*. 2007; 578: 545–50.
17. Lim J., Crespo-Barreto J., Jafar-Nejad P., Bowman A.B., Richman R., Hill D.E., et al. Opposing effects of polyglutamine expansion on native protein complexes contribute to SCA1. *Nature*. 2008; 452(7188): 713–8.
18. Cummings C.J., Reinstein E., Sun Y., Antalffy B., Jiang Y., Ciechanover A., et al. Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice. *Neuron*. 1999; 24: 879–92.
19. Albergaria C., Silva N.T., Darmohray D.M., Carey M.R. Cannabinoids modulate associative cerebellar learning via alterations in behavioral state. *eLife*. 2020; 9: e61821.

20. Steinmetz A.B., Freeman J.H. Cannabinoid agonist administration within the cerebellar cortex impairs motor learning. *Neurobiology of Learning and Memory*. 2020; 170: 106896.
21. Rodríguez-Cueto C., Hernández-Gálvez M., Hillard C.J., Maciel P., Valdeolivas S., Ramos J.A., et al. Altered striatal endocannabinoid signaling in a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia type-3. *PLoS One*. 2017; 12: e0176521.
22. Gómez-Ruiz M., Rodríguez-Cueto C., Luna-Piñel E., Hernández-Gálvez M., Fernández-Ruiz J. Endocannabinoid System in Spinocerebellar Ataxia Type-3 and Other Autosomal-Dominant Cerebellar Ataxias: Potential Role in Pathogenesis and Expected Relevance as Neuroprotective Targets. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2019; 12: 94.
23. Foust K.D., Nurre E., Montgomery C.L., Hernandez A., Chan C.M., Kaspar B.K. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nature Biotechnology*. 2009; 27: 59–65.
24. Gray S.J., Matagne V., Bachaboina L., Yadav S., Ojeda S.R., Samulski R.J. Preclinical differences of intravascular AAV9 delivery to neurons and glia: a comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Molecular Therapy*. 2011; 19: 1058–69.
25. Miyake N., Miyake K., Yamamoto M., Hirai Y., Shimada T. Global gene transfer into the CNS across the BBB after neonatal systemic delivery of single-stranded AAV vectors. *Brain Research*. 2011; 1389: 19–26.

Сведения об авторах:

Белозор Ольга Сергеевна, науч. сотр. НИИ Молекулярной медицины и патобиохимии, e-mail: olsbelor@gmail.com;

Шуваев Андрей Николаевич, канд. физ.-мат. наук, доцент каф. медико-биологических систем и комплексов Института фундаментальной биологии и биотехнологии;

Фрицлер Яна Викторовна, аспирант каф. биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии;

Шуваев Антон Николаевич, канд. мед. наук, руководитель НИИ Молекулярной медицины и патобиохимии.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 612.115.3: 615.273.5: 577.112.384.2

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

Влияние композита хитозана с аспарагиновой кислотой на изменение реакций системы гемостаза в условиях экспериментальной гипокоагуляции

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

Введение. Геморрагические состояния, обусловленные нарушением реакций сосудисто-тромбоцитарного и/или плазменного гемостаза при бактериальных инфекциях, воспалении и травмах различного генеза являются серьезной проблемой физиологии и медицины. Представляет интерес использование биополимеров на основе хитозана, обладающих высокой гемостатической активностью.

Цель работы – исследование действия композита хитозана с аспарагиновой кислотой, а также его составных компонентов на противосвертывающий потенциал плазмы крови животных с экспериментальной гипокоагуляцией.

Методика. Исследование выполнено на 48 крысах-самцах Wistar, разделенных на 5 групп. Композит хитозана (100 мг/кг) с аспарагиновой кислотой (2 мг/кг), его составные части в дозах, эквивалентных их содержанию в композите или физиологический раствор (контроль) вводили крысам перорально ежедневно 1 раз в сутки в течение 14 сут. Для моделирования экспериментальной гипокоагуляции через 10 мин после введения исследуемых препаратов животные 1-й – 4-й групп получали ацетилсалициловую кислоту (1,5 мг/кг, перорально). Группу 5-ю составили интактные крысы. Через 20 ч после завершения курса введения в плазме крови животных оценивали АДФ-стимулированную агрегацию тромбоцитов, показатели плазменного гемостаза (АЧТВ, протромбиновое время, тромбиновое время, содержание фибриногена, активность фактора свертывания FXIIIa) и фибринолитическую активность (суммарную, ферментативную и фибриндеполимеризационную).

Результаты. Применение композита хитозана с аспарагиновой кислотой способствовало повышению гемостатического потенциала крови, что выражалось в снижении всех видов фибринолитической активности плазмы крови, ускорении времени свертывания (по АЧТВ и протромбиновому времени), возрастании активности фактора FXIIIa и содержания фибриногена, а также в увеличении агрегации тромбоцитов. Отдельно хитозан также вызывал усиление свертываемости крови животных, но в меньшей степени, чем композит, а аспарагиновая кислота оказывала влияние только на ферментативный фибринолиз и агрегацию тромбоцитов.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности композита хитозана с аспарагиновой кислотой в качестве средства, нормализующего сосудисто-тромбоцитарный и плазменный гемостаз при гипокоагуляционных состояниях.

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов; гемостаз; гипокоагуляция; композит хитозана с аспарагиновой кислотой; фибринолиз

Для цитирования: Оберган Т.Ю., Шубина Т.А., Григорьева М.Е., Ляпина Л.А. Влияние композита хитозана с аспарагиновой кислотой на изменение реакций системы гемостаза в условиях экспериментальной гипокоагуляции. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66 (4): 20-26.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.20-26

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

Для корреспонденции: Оберган Тамара Юрьевна, e-mail: tobergan@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена по госбюджетной фундаментальной теме «Регуляторы свертывающей и противосвертывающей систем в норме и при патологии» № 121032300076-3.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 24.05.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

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

Effect of a chitosan composite with aspartic acid on the change in reactions of the hemostasis system in experimental hypocoagulation

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

Background. Hemorrhagic conditions caused by impaired reactions of vascular-platelet and /or plasma hemostasis in bacterial infections, inflammation and injuries of various origin are a serious challenge to physiology and medicine. It seems promising to use chitosan-based biopolymers with a high hemostatic activity.

The aim of the study was to investigate the effect of a chitosan composite with aspartic acid and its components on the anticlotting potential of blood plasma from animals with experimental hypocoagulation.

Methods. The study was performed on 48 male Wistar rats divided into 5 groups. The chitosan (100 mg/kg) composite with aspartic acid (2 mg/kg), its components at doses equivalent to their content in the composite, or a saline (control) were administered orally to rats daily once a day for 14 days. To simulate experimental hypocoagulation, 10 min after the drug administration, animals of groups 1-4 received acetylsalicylic acid (1.5 mg/kg, orally). Group 5 consisted of intact rats. ADP-stimulated platelet aggregation, plasma hemostasis parameters (APTT, prothrombin time, thrombin time, fibrinogen content, coagulation factor FXIIIa activity) and fibrinolytic activity (total, enzymatic, and fibrin-depolymerization) were evaluated in the blood plasma 20 hours after completion of the course of drug administration.

Results. The chitosan composite with aspartic acid contributed to the increase in the blood hemostatic potential evident as a decrease in all types of plasma fibrinolytic activity, acceleration of clotting (according to APTT and prothrombin time), increased factor FXIIIa activity and fibrinogen content, as well as increased platelet aggregation. Chitosan alone also facilitated blood clotting, although to a lesser extent than the composite, while aspartic acid influenced only enzymatic fibrinolysis and platelet aggregation.

Conclusion. The study showed a high efficacy of the chitosan composite with aspartic acid for normalizing vascular-platelet and plasma hemostasis in hypocoagulation conditions.

For citation: Obergan T.Y., Shubina T.A., Grigorjeva M.E., Lyapina L.A. Effect of a chitosan composite with aspartic acid on the change in reactions of the hemostasis system in experimental hypocoagulation. *Patologicheskaya Fiziologiya Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66 (4): 20-26. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.20-26

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

For correspondence: *Tamara Yu. Obergan*, e-mail: tobergan@mail.ru

Information about the authors:

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

Shubina T.A., <https://orcid.org/0000-0003-0445-2066>

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

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

Financing. The study was carried out on the state budget fundamental topic «Regulators of coagulation and anticoagulation systems in normal and pathological conditions» No. 121032300076-3.

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

Received 24.05.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

Травмы различного генеза, хроническое воспаление, бактериальные инфекции могут приводить к гемокоагуляционным осложнениям с прогрессированием ДВС-синдрома по фибринолитическому типу вследствие нарушения реакций сосудисто-тромбоцитарного и/или плазменного гемостаза [1]. Это может создавать серьезную проблему для эффективного заживления ран и приводить к массивным кровотечениям, угрожающим жизни пациентов.

В настоящее время все более широкое применение получают фармакологические препараты на основе аминокислот. Известно, что аминокислоты входят в состав коферментов, участвуют в образовании гормонов, медиаторов и нейротрансмиттеров, являются источниками метаболитов, принимающих участие в обмене веществ.

Аспарагиновая кислота (аспартат) является алифатической аминокислотой, при физиологических значениях pH несущей отрицательный заряд. Она присутствует в организме человека в составе белков

и в свободном виде, в результате ферментативной деятельности синтезируются и L-, и D-конфигурации, каждая из которых играет свою роль в организме. L-форма аминокислоты необходима для синтеза белка и выведения лишнего аммиака из организма, а D-форма — отвечает за выработку гормонов и нормальное функционирование мозга, являясь нейромедиатором, влияет на уровень цАМФ, в результате чего действие адреналина становится более выраженным. Недостаток аминокислоты проявляется сильной усталостью, депрессиями, частыми инфекционными заболеваниями. На основе аспарагиновой кислоты создан гемостатический гидрогель для остановки кровотечений и уменьшения кровопотери при травматической ране. В его состав входит полиаспарагиновая кислота, неорганический полифосфат и диальдегид. Он показал хорошую биосовместимость, высокие коагулянтными свойствами и адгезию к эндотелию, особенно в раневых перевязочных материалах при восстановлении тканей [2].

В настоящее время в качестве средств с высокой гемостатической активностью также активно изучаются биополимеры на основе хитозана, который представляет собой полисахарид, полученный из хитина ракообразных. Он обладает широким спектром биологических активностей: антимикробной, антибактериальной, противоопухолевой, иммуномодулирующей, гемостатической [3, 4]. Благодаря своей хорошей биосовместимости, биоразлагаемости и нетоксичности хитозан является широко применяемым биополимером для ускорения ранозаживления. При наружном применении (раневые повязки) один из механизмов его кровоостанавливающего действия обусловлен связыванием положительно заряженных групп хитозана с отрицательно заряженными эритроцитами с образованием гелеобразного сгустка в месте контакта с кровью [5]. Показано, что хитозан обладает умеренной прокоагулянтной активностью при введении в организм [6]. Степень влияния хитозана на структуру и функции белков системы гемостаза при поступлении в организм, определяется не только возможностью электростатического взаимодействия с белками крови, но и степенью деполяризации, а также его молекулярной массой [7].

Ранее в наших экспериментах *in vitro* и при пероральном введении хитозана здоровым животным была доказана способность данного соединения вызывать усиление свертываемости крови за счет повышения агрегации тромбоцитов, снижения фибринолитического потенциала крови и возрастания степени полимеризации фибрина [8, 9]. Уникальные биологические

свойства и преимущества препаратов на основе хитозана, такие как стабильность при перепадах температур, длительный срок хранения, менее вязкая структура и полная растворимость в воде делает представителей данного класса биологических веществ перспективными для дальнейшего изучения и создания новых средств, оказывающих влияние на процессы гемостаза. Однако необходимо учитывать, что влияние хитозана и композитов на его основе на систему свертывания крови в условиях гипокоагуляции остается не до конца выясненным.

Цель исследования — изучении действия композита хитозана с аспарагиновой кислотой и его составных компонентов — хитозана и аспарагиновой кислоты на изменение реакций системы гемостаза у животных с экспериментальной гипокоагуляцией, вызванной пероральным введением ацетилсалициловой кислоты (АСК).

Методика

Проведена серия экспериментов по изучению профилактического действия смеси хитозана с аспарагиновой кислотой на гемостаз в условиях пониженной свертываемости крови, индуцированной введением АСК. В работе использованы водорастворимый сукцинил хитозана, полученный из панцирей красных крабов (ООО «Биопрогресс», Россия), D, L-аспарагиновая кислота (Рехим, Россия) и АСК (Hebei Jiheng (Group) Pharmaceutical Co., Китай).

Исследование выполнено на 48 крысах-самцах Wistar (масса тела 250 – 280 г). Животные содержались в контролируемых условиях вивария при температуре окружающего воздуха 24 ± 2 °С, искусственном освещении день/ночь – 12 ч/12 ч, принудительной вентиляции и влажности воздуха $60 \pm 5\%$. Содержание и манипуляции с животными проводили в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики» (приказ Министерства здравоохранения РФ № 199 от 01.04.2016) и «Руководством по содержанию и уходу за лабораторными животными» (согласно Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях, ETS N 123, Страсбург, 18.03.1986, приложение от 15.06.2006). Перед началом исследования животные с экспериментальной гипокоагуляцией были рандомизированы по массе на 4 группы: «Контроль» (группа 1, $n = 10$) — животные, которые получали 0,85%-ый физиологический раствор как растворитель исследуемых препаратов; животные, которые получали раствор композита «хитозан (100 мг/кг) + аспарагиновая кислота (2 мг/кг)» — «ХТЗ + АК» (груп-

па 2, $n = 10$), или хитозана (100 мг/кг) – «ХТЗ» (группа 3, $n = 10$), или аспарагиновой кислоты (2 мг/кг) – «АК» (группа 4, $n = 9$). Дополнительно использовались интактные крысы «ИК» (группа 5, $n = 9$), с которыми не производили никаких манипуляций. Исследуемый композит, хитозан и аспарагиновую кислоту ежедневно растворяли в физиологическом растворе и вводили крысам перорально в объеме 0,5 мл 1 раз в день в течение 14 сут. Животные первых четырех групп через 10 мин после введения исследуемых препаратов перорально получали АСК в терапевтической дозе 1,5 мг/кг для моделирования экспериментальной гипokoагуляции.

Через 20 ч после 14-го введения исследуемых препаратов у крыс производили забор крови из яремной вены с последующим получением плазмы и измерением в богатой тромбоцитами плазме АДФ-стимулированной агрегации тромбоцитов (конечная концентрация 5 мкМ) методом *G. Born* с использованием лазерного агрегометра «АЛАТ-2 ЛА 220» (НПФ «Биола», Россия) по инструкции к прибору. Далее в бедной тромбоцитами плазме определяли активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ), содержание фибриногена по Клауссу с помощью стандартных наборов реактивов («Технология-Стандарт», Россия) на анализаторе свертывания крови АСКа 2-02-Астра (Россия) и уровень активности фактора свертывания FXIIIa с применением набора ре-

активов (НПО «Ренам», Россия) в соответствии с рекомендациями производителей наборов. Фибринолитический потенциал плазмы оценивали по тестам суммарного (СФА) и ферментативного фибринолиза (ФФ), фибриндеполимеризационной активности (ФДПА) согласно стандартным методам [10].

Статистическая обработка результатов исследования выполнена с использованием пакета статистических программ Statistica 8 (StatSoft Inc., США). Соответствие вариационных рядов закону нормального распределения оценивали по критерию Шапиро–Уилка. Для описания данных, распределение которых отличалось от нормального, использованы медиана (Me), первый и третий квартили [Q1; Q3]. Значимость различий в исследуемых группах определяли по тесту Краскела–Уоллиса с последующими апостериорными сравнениями (непараметрический вариант критерия Данна). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

У животных с экспериментальной гипokoагуляцией, которым вводили АСК, (группа 1) по отношению к интактным крысам (группа 5) выявлено повышение ФДПА – на 15% (табл. 1) и удлинение АЧТВ – на 30%, ПВ – на 47%, ТВ – на 34% при снижении уровня активности FXIIIa – на 18% ($p < 0,05$) соответственно (табл. 2). Это сопровождалось снижением агрегации тромбоцитов на 30% ($p < 0,05$, что свидетельствова-

Таблица 1/Table 1

Фибринолитическая активность плазмы крови после введения композита хитозана с аспарагиновой кислотой и его составных компонентов крысам с гипokoагуляцией, (Me [Q1; Q3])

Fibrinolytic activity of blood plasma after administration of chitosan composite with aspartic acid and its constituent components to rats with hypocoagulation, (Me [Q1;Q3])

Показатели Indicators	Группа 1 Контроль $n = 10$ Group 1, Control	Группа 2 Композит «ХТЗ+АК» $n = 10$ Group 2 Composite	Группа 3 Хитозан $n = 10$ Group 3 Chitosan	Группа 4 Аспарагиновая кислота $n = 9$ Group 4 aspartic acid	Группа 5 Интактные крысы $n = 9$ Group 5 Intact rats
СФА, мм ² TFA mm ²	41 [36; 42]	25 [24; 26]**	25,5 [25; 28]*	33 [32; 36]	36 [32; 42]
ФДПА, мм ² FDPA, mm ²	27 [20; 30] $p_{1-5} < 0,05$	16 [15,5; 17]**	20,5 [17; 24,5]*	23 [20; 24]	23,5 [20; 25]
ФФ, мм ² EF, mm ²	15 [12; 16]	8 [5; 9]*	6,5 [5; 9]**	10,5 [7; 16]*	14 [8; 22]

Примечание. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с группой 1 (контроль), p_{1-5} – достоверность различий между группами 1-5; n – количество животных в группе; СФА – суммарная фибринолитическая активность, ФДПА – фибриндеполимеризационная активность, ФФ – ферментативная фибринолитическая активность.

Note. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ compared to the group 1 (control), p_{1-5} – the reliability of differences between groups 1-5; n – the number of animals in the group; TFA – total fibrinolytic activity, FDPA – fibrindepolymerization activity, EF – enzymatic fibrinolytic activity. Composite – chitosan + aspartic acid.

ло о развитии гипокоагуляции, т.е. повышении анти-тромбоцитарного, антикоагулянтного и фибринолитического потенциала крови животных после введения им АСК.

Введение животным композита «ХТЗ + АК» способствовало статистически значимому укорочению АЧТВ и ПВ на 21% ($p < 0,05$) и 34% ($p < 0,01$) соответственно при увеличении уровня активности FXIIIa на 33% ($p < 0,05$) и содержания фибриногена на 53% ($p < 0,01$) в плазме крови относительно контрольных значений. Также применение указанного композита привело к снижению всех видов фибринолитической активности плазмы крови животных: СФА уменьшилась на 39% ($p < 0,01$), ФДПА – на 41% ($p < 0,01$), а ФФ – на 47% ($p < 0,05$) относительно группы «Контроль». При этом у животных группы «ХТЗ + АК» выявлено повышение агрегации тромбоцитов на 58% ($p < 0,05$).

У животных группы «ХТЗ», получавших препарат хитозана, отмечено укорочение ПВ и ТВ на 25 и 23% ($p < 0,05$), соответственно, а также уменьшение уровня активности FXIIIa – на 24% ($p < 0,05$) и возрастание концентрации фибриногена – на 31% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Указанные эффекты были менее выраженными, чем у крыс группы «ХТЗ + АК». В то же время снижение СФА и ФФ на 38% ($p < 0,01$) и 57% ($p < 0,01$), соответственно, относительно группы «Контроль» было сравнимо с группой «ХТЗ+АК», а ослабление ФДПА было меньшим – на 24% ($p < 0,05$) относительно контрольных значений. При этом введение хитозана не оказало значимого влияния ни на АЧТВ, ни на агрегацию тромбоцитов.

На фоне введения животным аспарагиновой кислоты (группа «АК») наблюдалось повышение агрегации тромбоцитов на 36% и снижение фибринолитической активности крови ферментативной природы

Таблица 2/Table 2

Параметры гемостаза после введения композита хитозана с аспарагиновой кислотой и его составных компонентов крысам с гипокоагуляцией, (Me [Q1; Q3])

Hemostasis parameters after administration of chitosan composite with aspartic acid and its constituent components to rats with hypocoagulation, (Me [Q1;Q3])

Показатели Indicators	Группа 1 Контроль $n = 10$ Group 1, Control	Группа 2 Композит «ХТЗ + АК» $n = 10$ Group 2 Composite	Группа 3 Хитозан $n = 10$ Group 3 Chitosan	Группа 4 Аспарагиновая кислота $n = 9$ Group 4 aspartic acid	Группа 5 Интактные крысы $n = 9$ Group 5 Intact rats
АЧТВ, Activated partial thromboplastin time	33,9 [27,8; 42,2] $p_{1-5} < 0,05$	26,7* [24,2; 30,3]	33,8 [27,0; 39,5]	31,9 [24,3; 39,8]	25,9 [22,9; 33,2]
Протромбиновое время (ПВ), с Prothrombin time, c	26,4 [25,4; 27,2] $p_{1-5} < 0,01$	17,3** [14,6; 24,1]	19,9* [16,0; 22,4]	24,2 [23,5; 25,1]	17,9 [15,6; 20,1]
Тромбиновое время, с Thrombin time, c	21,6 [19,5; 23,5] $p_{1-5} < 0,05$	23,2 [19,5; 25,6]	16,6* [15,7; 17,0]	21,1 [19,5; 22,5]	16,1 [15,7; 16,4]
Фибриноген, г/л Fibrinogen, g/l	3,2 [3,0; 3,7]	5,0** [4,7; 5,2]	4,2* [3,5; 4,8]	3,3 [2,9; 4,0]	3,4 [2,8; 4,0]
Активность FXIIIa, Ед/мл FXIIIa activity, units/ml	103 [95; 110] $p_{1-5} < 0,05$	137,5* [117,5; 155]	128* [125; 160]	112,5 [100; 120]	125 [110; 132]
Агрегация тромбоцитов, % Platelet aggregation %	100 [89; 145] $p_{1-5} < 0,05$	158* [103; 170]	122 [81; 156]	136* [89; 158]	143 [133; 178]

Примечание. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ по сравнению с группой 1 (контроль), p_{1-5} – значимость различий между группами 1-5; n – количество животных в группе.

Note. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ compared to the group 1 (control), p_{1-5} – the reliability of differences between groups 1-5; n – the number of animals in the group;

Composite – chitosan + aspartic acid.

на 30% ($p < 0,05$) относительно значений в контрольной группе, но слабее, чем в группе «ХТЗ + АК». Следует отметить, что на изменение АЧТВ, ПВ, ТВ, концентрации фибриногена и уровня активности FXIIIa применение аспарагиновой кислоты значимого влияния не оказало.

Обсуждение

Нарушение реакций сосудисто-тромбоцитарного и/или плазменного гемостаза вследствие травм различного генеза, возникновения инфекций могут приводить к гемокоагуляционным осложнениям как в сторону гипер-, так и гипокоагуляции [1].

В нашем исследовании для моделирования гипокоагуляции была использована АСК, которая является наиболее широко используемым антиагрегантным препаратом с хорошо известным механизмом действия. Основной антитромботический эффект АСК реализуется за счет необратимого ингибирования циклооксигеназы-1, что блокирует образование тромбоксана А₂ из арахидоновой кислоты, снижает активацию и агрегацию тромбоцитов, препятствуя образованию тромбов [11]. Кроме того, показано, что интрагастральное введение АСК приводит к снижению активности фактора FXIIIa, усилению фибриндеполимеризационной активности крови и активности плазмينا [12].

Результаты настоящего исследования вполне согласуются с данными литературы, поскольку моделирование состояния гипокоагуляции пероральным введением здоровым животным АСК вызывало уменьшение агрегации тромбоцитов с одновременным повышением фибриндеполимеризационной (неферментативной фибринолитической) активности плазмы крови. Следует отметить, что в данных условиях эксперимента длительность применения АСК в течение 14 сут в дозе 2 мг/кг способствовало снижению активности факторов свертывания как внешнего, так и внутреннего пути, что выражалось в удлинении ПВ, АЧТВ, ТВ и возрастании активности FXIIIa. Итак, антиагрегационные и фибринолитические эффекты АСК вызывали ослабление свертывающего потенциала крови.

Применение на этом фоне композита хитозана с аспарагиновой кислотой способствовало восстановлению реакций коагуляционного гемостаза, что выражалось в увеличении агрегации тромбоцитов, повышении содержания фибриногена, активности фактора FXIIIa, укорочении АЧТВ и ПВ, ослаблении фибринолитической и фибриндеполимеризационной активности крови. При этом выраженность эффектов от применения композита была сопоставима с таковы-

ми от применения одного хитозана в отношении ферментативного фибринолиза и свертыванию по внешнему пути (изменение ПВ).

Однако композит обнаруживал более выраженное по сравнению со своими составными частями – хитозаном и аспарагиновой кислотой влияние на первичный гемостаз, значительно усиливая агрегацию тромбоцитов, и факторы свертывания крови, повышая содержание фибриногена, активность фибринстабилизирующего фактора FXIIIa, одновременно снижая ФДПА. Эти факты свидетельствуют о восстановлении плазменного гемостатического потенциала крови за счет усиления как полимеризации, так и стабилизации фибрина, а также активации сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза [1, 13].

В настоящее время известно, что прокоагулянтная функция хитозана, входящего в состав исследуемого композита, обусловлена его катионной структурой и наличие аминогрупп в составе его молекулы индуцирует адсорбцию фибриногена, активацию тромбоцитов, высвобождение факторов коагуляции, что приводит к запуску внешнего пути свертывания [7], что мы и наблюдали в нашем исследовании.

Таким образом, композит на основе хитозана проявляет заметный прокоагулянтный эффект, восстанавливая нарушенный в результате применения АСК гемостатический баланс (гипокоагуляция). Активация процессов агрегации тромбоцитов и повышение факторов свертывания может являться потенциальным механизмом, посредством которого композит хитозана с аспарагиновой кислотой нормализует гемостатические реакции в условиях гипокоагуляции в эксперименте.

Впервые выявлено, что в данных условиях эксперимента у исследуемого композита установлено наличие эффекта синергии, а именно более высокий гемостатический эффект по сравнению с его составными частями. На основании этого композит хитозана с аспарагиновой кислотой может считаться перспективным гемостатическим средством.

Заключение

Проведенное исследование показало, что применение композита хитозана с аспарагиновой кислотой в условиях экспериментальной гипокоагуляции у крыс способствует активации тромбоцитарного и плазменного компонентов гемостаза, что выражалось в повышении агрегационной способности тромбоцитов, увеличении активности фибринстабилизирующего фактора свертывания FXIIIa и факторов свертывания внешнего и внутреннего путей коагуляции, повыше-

нии содержания фибриногена. При этом установлено ослабление фибринолитического потенциала крови, обусловленного как ферментативным фибринолизом, так и фибриндеполимеризационным действием неферментативного характера. Таким образом, комплексы на основе хитозана могут быть отнесены к потенциальным прокоагулянтным средствам, восстанавливающим реакции системы гемостаза в условиях гипокоагуляции.

Литература

(п.п. 2-6; 8; 13 см. References)

1. Бокарев И.Н. *Гематология для практического врача*. М.: Медицинское информационное агентство; 2018.
7. Толстенков С.А., Дрозд Н.Н., Макаров В.А., Банникова Г.Е. Биоспецифичный электрофорез комплексов между низкомолекулярными гепаринами и хитозанами. *Матер. Восьмой Межд. конф.* М.: Изд-во ВНИРО, 2006: 253–56.
9. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Исследование гемостатических свойств препарата на основе хитозана. *Биофармацевтический журнал*. 2022; 14 (1): 3-7. doi: 10.30906/2073-8099-14-1-3-7
10. Шубина Т.А., Оберган Т.Ю. *Функциональное состояние противосвертывающей системы крови. Практические вопросы*. М.: Ким Л.А.; 2021.
12. Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Шубина Т.А., Андреева Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е. Сравнительное действие пептида Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro варфарина и ацетилсалициловой кислоты при интрагастральном введении на параметры гемостаза и уровень глюкозы крови на фоне развития метаболического синдрома у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная медицина*. 2021; 65(1): 52-9. doi: 10.25557/0031-2991.2021.01.52-59

References

1. Bokarev I.N. *Hematology for a practical doctor [Gematologiya dlya prakticheskogo vracha]*. Moscow: Medical Information Agency; 2018. (In Russian)
2. Chen D., Liu X., Qi Y., Ma X., Wang Y., Song H., Zhao Y., Li W., Qin J. Poly(aspartic acid) based self-healing hydrogel with blood coagulation characteristic for rapid hemostasis and wound healing applications. *Colloids Surf Biointerfaces*. 2022; 214: 112430. doi: 10.1016/j.colsurfb.2022.112430
3. Naveed M., Phil L., Sohail M., Hasnat M., Baig M., Ihsan A.U. et al. Chitosan oligosaccharide (COS): An overview. *Int J Biol Macromol*. 2019; 15(129): 827-43. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.192
4. Wang W., Xue C., Mao X. Chitosan: Structural modification, biological activity and application. *Int J Biol Macromol*. 2020; 164: 4532-46. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.042
5. Zhang W., Zhong D., Liu Q., Zhang Y. Effect of chitosan and carboxymethyl chitosan on fibrinogen structure and blood coagulation. *J Biomater Sci Polym. Ed.* 2013; 24 (13): 1549-63. doi: 10.1080/09205063.2013
6. Guo X., Sun T., Zhong R., Ma L., You C., Tian M. et al. Effects of chitosan oligosaccharides on human blood components. *Front Pharmacol*. 2018; 3(9): 1412. doi: 10.3389/fphar.2018.01412
7. Tolstenkov S.A., Drozd N.N., Makarov V.A., Bannikova G.E. Biospecific electrophoresis of complexes between low molecular weight heparins and chitosans. *Materials of the 8th Intern Conf. Moscow: Izdvo VNIRO*, 2006: 253–56. (In Russian)
8. Lyapina L., Grigorjeva M., Lyapina G., Obergan T., Shubina T. Aggregation effects of chitosan in the blood. *Norwegian Journal Development International Science*. 2021; 61: 13-6. (In Russian)
9. Lyapina L.A., Grigorieva M.E., Obergan T.Yu., Shubina T.A. Investigation of the hemostatic properties of the chitosan-based drugs. *Biopharm J*. 2022; 14 (1): 3-7. (In Russian) doi: 10.30906/2073-8099-14-1-3-7
10. Shubina T.A., Obergan T.Y. *Functional state of the blood anticoagulation system. Practical issues [Funktional'noe sostoyanie protivosvertvyayuschey sistemy krovi. Prakticheskie voprosy]*. Moscow: Kim L.A.; 2021. (in Russian)
11. Wang M.M., Xue M., Xu Y.G., Miao Y., Kon N., Yang L., et al. Panax notoginseng saponin is superior to aspirin in inhibiting platelet adhesion to injured endothelial cells through COX pathway in vitro. *Thrombosis research*. 2016; 141: 146-52. doi: 10.1016/j.thromres.2016.03.022
12. Lyapina L.A., Myasoedov N.F., Shubina T.A., Andreeva L.A., Obergan T.Yu., Grigorieva M.E. Comparative effects of intragastric Lys-ARG-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro peptides, warfarin, and acetylsalicylic acid on hemostasis indexes and blood glucose in development of metabolic syndrome in rats. *Patologicheskaya Fizyologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2021; 65(1): 52-9. (In Russian) doi: 10.25557/0031-2991.2021.01.52-59
13. Chou T.C., Fu E., Wu C.J., Yeh J.H. Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 302(3): 480-3. doi: 10.1016/s0006-291x(03)00173-6

Сведения об авторах:

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

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

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

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

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

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

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

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616.1/9:616-005.6

Осиков М.В.^{1,2}, Антонов В.Н.^{3,4}, Зотов С.О.^{1,4}, Игнатова Г.Л.^{3,4}

Роль сахарного диабета 2 типа в эскалации дисфункции тромбоцитов у больных с covid-19-ассоциированным поражением легких

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 454048, Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 64;

²ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», 454048, Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 70, Челябинск, Россия;

³ИДПО ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 454048, Челябинск, Россия, ул. Воровского д. 64;

⁴ГБУЗ «Областная клиническая больница № 3», 454136, Челябинск, Россия, просп. Победы, д. 287

Изменения в функциональной активности тромбоцитов у больных с COVID-19 и сахарным диабетом 2 типа широкоизвестны, но механизм дисфункции тромбоцитов при сочетании этих заболеваний не исследован. **Цель работы** – изучение функциональной активности тромбоцитов и содержания продуктов окислительной деструкции липидов и белков в тромбоцитах у больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких высокой степени тяжести при наличии сахарного диабета 2 типа.

Методика. В исследовании принимали участие больные COVID-19 ($n = 55$) в возрасте от 51 до 75 лет с поражением легочной ткани более 50%. В зависимости от наличия или отсутствия сахарного диабета 2 типа больные разделены на 2 группы. Контрольная группа – практически здоровые лица ($n = 24$), сопоставимые по полу и возрасту с больными COVID-19. У всех пациентов исследовали: количество тромбоцитов в крови; агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ, коллагеном, адреналином и ристомидином; содержание в тромбоцитах продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах экстракта; продукты окислительной модификации белков (ОМБ) в спонтанном и металл-индуцированном режимах детекции.

Результаты. У больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких тяжелой степени тяжести количество тромбоцитов в крови значимо не изменяется, но ускоряется агрегация тромбоцитов, индуцированная коллагеном и ристомидином; в обогащенной тромбоцитами плазме увеличивается суммарное содержание продуктов ОМБ, уровень первичных и вторичных продуктов ПОЛ в тромбоцитах. У больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких в сочетании с СД 2 типа значимо снижается количество тромбоцитов в крови, ускоряется агрегация тромбоцитов, индуцированная АДФ, коллагеном, адреналином и ристомидином; происходит значимый рост уровня ранних и поздних продуктов ОМБ в спонтанном и металл-индуцированном режиме детекции в тромбоцитах, увеличивается уровень первичных, вторичных и конечных маркеров ПОЛ в тромбоцитах в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта. Выявлено, что у больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких, в том числе при сочетании с СД 2 типа, агрегация тромбоцитов, индуцированная АДФ, коллагеном, адреналином и ристомидином ускоряется по мере увеличения содержания в них продуктов окислительной деструкции липидов и белков. Наличие СД 2 типа у больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких в 2 раза увеличивает количество прямых связей умеренной и заметной силы между агрегацией тромбоцитов и содержанием в них продуктов ПОЛ и ОМБ.

Ключевые слова: COVID-19; сахарный диабет 2 типа; тромбоциты; агрегация; редокс-статус; окислительный стресс

Для цитирования: Осиков М.В., Антонов В.Н., Зотов С.О., Игнатова Г.Л. Роль сахарного диабета 2 типа в эскалации дисфункции тромбоцитов у больных с COVID-19 ассоциированным поражением легких. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 27-35.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.27-35

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, редакция текста – Осиков М.В.; анализ полученных данных, диагностические исследования, редакция текста – Антонов В.Н.; сбор и обработка материалов, написание текста, обзор литературы – Зотов С.О.; анализ полученных данных, написание текста – Игнатова Г.Л. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

Для корреспонденции: Зотов Семён Олегович, e-mail: semenz2007@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 24.05.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Osikov M.V.^{1,2}, Antonov V.N.^{3,4}, Zotov S.O.^{1,4}, Ignatova G.L.^{3,4}

The role of type 2 diabetes in the escalation of platelet dysfunction in patients with covid-19-associated lung damage

¹Department of Pathophysiology, South-Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovskogo str., 64, Chelyabinsk, 454092, Russian Federation;

²Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Vorovskogo str., 81, Chelyabinsk, 454021, Russian Federation;

³Department of therapy IDPO, South-Ural State Medical University of Ministry of Health of the Russian Federation, Vorovskogo str., 64, Chelyabinsk, 454092, Russian Federation;

⁴Chelyabinsk Regional Clinical Hospital № 3, Pobedy str., 271, Chelyabinsk, 454021, Russian Federation

Changes in the functional activity of platelets in patients with COVID-19 and type 2 diabetes mellitus are widely known, but the mechanism of platelet dysfunction in the combination of these diseases has not been studied. The **aim of the work** is to investigate the effect of the presence of type 2 diabetes mellitus on the aggregation and content of products of oxidative degradation of lipids and proteins in platelets in patients with severe COVID-19-associated lung disease.

Methods. The study involved patients with COVID-19 ($n = 55$) aged 51 to 75 years with more than 50% lung tissue damage. Depending on the presence or absence of type 2 diabetes mellitus, patients were divided into 2 groups. The control group consisted of practically healthy people ($n = 24$), matched by sex and age with patients with COVID-19. In all individuals, the number of platelets in the blood, platelet aggregation induced by ADP, collagen, adrenaline and ristomycin, the content of lipid peroxidation products in the hepatic and isopropanol phases of the extract, and protein oxidative modification products (PMP) products in spontaneous and metal-induced detection modes were studied. The data obtained were analyzed using the IBM SPSS Statistics v. 23.

Results. In patients with severe COVID-19-associated lung disease, the number of platelets in the blood does not change significantly, but platelet aggregation induced by collagen and ristomycin is accelerated; in platelet-rich plasma, the total content of OMP products, the level of primary and secondary LPO products in platelets increases. In patients with COVID-19-associated lung injury in combination with type 2 diabetes, the number of platelets in the blood is significantly reduced, platelet aggregation is accelerated, induced by ADP, collagen, adrenaline, and ristomycin; there is a significant increase in the level of early and late PMP products in the spontaneous and metal-induced detection mode in platelets, the level of primary, secondary and final LPO markers in platelets increases in the heptane and isopropanol phases of the lipid extract. It was found that in patients with COVID-19-associated lung injury, including those associated with type 2 diabetes, platelet aggregation induced by ADP, collagen, adrenaline, and ristomycin accelerates as the content of oxidative degradation products of lipids and proteins in them increases. The presence of type 2 diabetes in patients with COVID-19-associated lung damage doubles the number of direct links of moderate and noticeable strength between platelet aggregation and the content of LPO and PMP products in them.

Keywords: COVID-19; type 2 diabetes mellitus; platelets; aggregation; redox status; oxidative stress

For citation: Osikov M.V., Antonov V.N., Zotov S.O., Ignatova G.L. The role of type 2 diabetes in the escalation of platelet dysfunction in patients with covid-19-associated lung damage. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological physiology and experimental therapy)*. 2022; 66(4): 27-35.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.27-35

Author's contribution: concept and design of the study, text editor – Osikov M.V.; analysis of the obtained data, diagnostic studies, text editing – Antonov V.N.; collection and processing of materials, writing the text, literature review – Zotov S.O.; analysis of the obtained data, writing the text – Ignatova G.L. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: **Semyon O. Zotov**, Senior Laboratory Assistant, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, e-mail: semenz2007@yandex.ru

Information about the authors:

Osikov M.V., <https://orcid.org/0000-0001-6487-9083>

Antonov V.N., <https://orcid.org/0000-0002-3531-3491>

Zotov S.O., <https://orcid.org/0000-0001-7469-2386>

Ignatova G.L., <https://orcid.org/0000-0002-0877-6554>

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

Financing. The study had no sponsorship.

Received 24.05.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

Снижение уровня тромбоцитов в крови выявляется приблизительно у 42% пациентов с COVID-19 (частота варьирует в зависимости от тяжести заболевания) и обычно имеет легкую форму (выше $150 \times 10^9/\text{л}$). Легкая тромбоцитопения выявляется в 58–95% тяжелых случаев COVID-19 [1]. Тяжелая тромбоцитопения редко встречается у пациентов с COVID-19, например, в связи с иммунным тромбоцитопеническим пурпуроподобным состоянием [2]. Снижение уровня тромбоцитов в крови при поступлении у пациентов с COVID-19 связано с 4-х-кратным увеличением риска летального исхода, пациенты с тромбоцитопенией (медиана $105 \times 10^9/\text{л}$) чаще были пожилого возраста, мужчины, с высоким баллом по шкале APACHE II, низким абсолютным количеством нейтрофилов и лимфоцитов в крови, высоким уровнем С-реактивного белка и низким соотношением $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ [3]. При COVID-19 в крови увеличивается содержание молодых форм тромбоцитов (сетчатые тромбоциты) и снижается количество зрелых форм. Молодые тромбоциты проявляют высокий уровень активации в ответ на агонисты и таким образом способствуют образованию агрегатов [4]. Показана независимая связь между количеством тромбоцитов в крови, тяжестью заболевания и риском летального исхода госпитализированных пациентов с COVID-19 [5].

В единичных исследованиях сообщалось, что у пациентов с COVID-19 агрегация тромбоцитов ускоряется [6, 7]. В исследовании В. Манне и соавт. показано, что агрегация тромбоцитов ускоряется в ответ на низкие дозы агонистов (АДФ, тромбин и коллаген) у пациентов с COVID-19, потенцирование агрегации более выражено у пациентов с высокой степенью тяжести болезни [8].

Среди пациентов, госпитализированных с COVID-19, значительное число страдает сахарным диабетом (СД) 2 типа, для которого характерны изменения со стороны системы гемостаза с преимущественным риском тромботических осложнений. Важнейшими причинами изменений гемостаза при СД являются нарушения в сосудисто-тромбоцитарном звене: гиперагрегация тромбоцитов (за счет гипергликемии и/или инсулинорезистентности, ожирения, увеличения числа юных форм, повреждения эндотелия и снижения его антиагрегационных свойств) [9]. Показано, что тромбоциты при СД имеют повышенный уровень экспрессии маркеров активации на своих мембранах [9]. В связи с этим, СД 2 типа может рассматриваться как отдельное тромбофилическое состоя-

ние с вероятностью тромбоэмболических осложнений. Поскольку COVID-19 является новым заболеванием, знания о нём все еще неполны и постоянно углубляются. Многие исследования показали, что у пациентов с COVID-19 в сочетании с СД 2 типа развивается тяжелое течение заболевания и отмечается повышенная смертность [11].

В ряде исследований показано, что производство избыточного количества активных радикалов и эскалация окислительного стресса оказывают влияние на патогенез респираторных вирусных инфекций, таких как SARS-CoV, аналогичные процессы может вызывать SARS-CoV-2 [12]. Окислительный стресс может быть ключевым фактором в патогенезе COVID-19 из-за его важной роли в воспалении и активации тромбоцитов [11]. Сочетание факторов гиперреактивности тромбоцитов при СД 2 типа с изменением редокс-статуса тромбоцитов при COVID-19 может вызывать осложнения, в том числе тромботические, у лиц с подобной сочетанной патологией.

Вышеизложенное определяет актуальность проблемы сочетания COVID-19-ассоциированным поражением легких и СД 2 типа, указывает на необходимость изучения патофизиологических особенностей клеточного звена системы гемостаза при данной сочетанной патологии и совершенствования на основе этих знаний диагностических, профилактических мероприятий, а также поиска рациональных путей предотвращения тромботических осложнений.

Цель работы – изучение функциональной активности тромбоцитов и содержания продуктов окислительной деструкции липидов и белков в тромбоцитах у больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких высокой степени тяжести при наличии сахарного диабета 2 типа.

Методика

В исследовании приняли участие 55 больных COVID-19, госпитализированных в ГАУЗ ОКБ №3 г. Челябинск (31 женщина и 24 мужчины), в возрасте от 51 до 75 лет, не принимавших препараты, влияющих на функцию тромбоцитов, перед госпитализацией. Всеми пациентами было подписано информированное согласие. Все исследования проводились в соответствии с «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 №266. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом Южно-Уральского Государственного Медицинского Университета Минздрава России (протокол №4 от 24.05.2021). У всех пациентов методом мультиспиральной компьютерной томо-

графии грудной клетки (аппарат «Siemens SOMATOM Definition AS 64») выявлено двустороннее вирусное поражение легких объемом более 50% (высокая степень тяжести) согласно временным методическим рекомендациям «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Диагноз COVID-19 подтверждался обнаружением на слизистых оболочках зева и носовой полости РНК вируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции (РеалБест РНК SARS-CoV-2, АО Вектор Бест). В контрольную группу вошли 24 клинически здоровых добровольца (группа 1), сопоставимых по полу и возрасту с больными COVID-19. В зависимости от наличия СД 2 типа больные с COVID-19-ассоциированным поражением легких были разделены на группы: группа 2 без СД 2 типа ($n=34$) и группа 3 с СД 2 типа ($n=21$). Критериями включения в группу 3 было наличие клинического диагноза СД 2 типа со стажем заболевания 1-5 лет (с целью исключения осложнений диабета – ангиопатий). Критериями исключения являлись наличие ранее выявленных онкологических заболеваний, хронических заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной систем и органов желудочно-кишечного тракта, крайне тяжелое течение сочетанной патологии, требующее госпитализации пациента в ОРИТ, наличие у пациента артериальной гипертензии 2-й степени и выше, индекс массы тела более 30 кг/м^2 , анемия (гемоглобин менее 119 г/л).

Забор крови проводился в 1-е сутки поступления больного в стационар. Стандартная тромбопрофилактика нефракционированным гепарином начиналась после забора крови на исследование. Помимо антикоагулянтной терапии больные получали стандартную терапию фавибирином и глюкокортикоидами, антибактериальную терапию.

Количества тромбоцитов в крови подсчитывали по методу Фонио. Агрегацию тромбоцитов оценивали на лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов «АЛАТ-2» («БИОЛА», Россия), в качестве индукторов агрегации использовали АДФ ($2,5 \text{ ммоль/мл}$), коллаген ($3,3 \text{ мкг/мл}$), адреналин (5 мкг/мл), ристомицин ($7,5 \text{ мг/мл}$) (ООО «Технология Стандарт», Россия), учитывали количество единиц среднего размера агрегатов в минуту (ед/мин), за единичный радиус принимался средний радиус тромбоцитов до начала агрегации.

Окислительную модификацию белков (ОМБ) и перекисное окисление липидов (ПОЛ) оценивали в обогащенной тромбоцитами плазме с использованием спектрофотометра «СФ56» («ЛОМО – Спектр», Санкт – Петербург, Россия) [13]. ОМБ исследовали по содержанию альдегид-динитрофенилгидразонов (АДНФГ)

и кетондинитрофенилгидразонов (КДНФГ). Содержание липопероксидов в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта рассчитывали в виде индексов окисления (е.и.о.), которые отражают относительный уровень продуктов ПОЛ: $E232/E220$ – относительное содержание диеновых конъюгатов (ДК, первичные продукты), $E278/220$ – кетодиены и сопряженные триены (КДиСТ, вторичные продукты), $E400/E220$ – Шиффовы основания (ШО, конечные продукты).

Статистическая обработка результатов проведена с использованием IBM SPSS Statistics v. 23 («SPSS: An IBM Company»; США), Характеристика выборок представлена в формате «Me ($Q_{25} - Q_{75}$)», где Me – медиана, Q_{25} , Q_{75} – значение нижнего и верхнего квартиля соответственно. Для оценки распределения непрерывных переменных использовался тест Шапиро-Уилка. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса. Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Сила связи оценивалась по шкале Чеддока. При множественных сравнениях вводили поправку Бонферрони. Отличия считали статистически значимыми при уровне $p \leq 0,01$.

Результаты

У больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких количество тромбоцитов в крови значимо не менялось (табл. 1). При оценке агрегации тромбоцитов у больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких выявлено ускорение индуцированной коллагеном и ристомицином агрегации тромбоцитов на 24% и 14% соответственно по медиане относительно значений в контрольной группе. Агрегация тромбоцитов с АДФ и адреналином в этой группе значимо не меняется.

У больных с COVID-19-ассоциированным повреждением легких в спонтанном режиме детекции суммарное содержание продуктов ОМБ в обогащенной тромбоцитами плазме больше по медиане на 15%, при этом суммарное содержание АДНФГ выросло на 21% по медиане относительно контроля, а суммарное содержание КДНФГ значимо не изменялось (табл. 2). В металл-зависимом режиме суммарное содержание продуктов ОМБ в этой группе по медиане выросло на 15%, суммарное содержание АДНФГ – на 12% и КДНФГ – на 23% от значений группы контроля. В гептановой фазе липидного экстракта тромбоцитов уровень первичных и вторичных продуктов ПОЛ вырос по медиане на 22% и 60% соответственно по сравнению со значениями группы контроля. В изо-

пропанольной фазе экстракта значимый рост первичных и вторичных продуктов ПОЛ – 24% и 27% соответственно. Уровень конечных продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах значимо не менялся.

У больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких в сочетании с СД 2 типа выявлено статистически значимое снижение количества тромбоцитов в крови на 19% по медиане. Значимым было ускорение агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, коллагеном, адреналином и ристомицином – на 134%, 317%, 257% и 143% соответственно по медиане при сравнении с контролем (табл. 1). В спонтанном режиме детекции суммарное содержание продуктов ОМБ в обогащенной тромбоцитами плазме больше по медиане на 81% по сравнению с группой контроля (табл. 2). Суммарное содержание АДНФГ выросло на 89%, суммарное содержание КДНФГ – на 93% по медиане от значений группы контроля. В металл-зависимом режиме детекции суммарное содержание продуктов ОМБ по медиане выросло на 35%, суммарное содержание АДНФГ – на 32%, суммарное содержание КДНФГ – на 53% относительно контроля. В гептановой фазе липидного экстракта обогащенной тромбоцитами плазмы уровень первичных продуктов ПОЛ значимо увеличивается по медиане на 58%, вторичных – на 140%, конечных – на 100% по сравнению со значениями группы 1. В изопропанольной фазе экстракта значимый рост первичных и вторичных продуктов ПОЛ составил 55% и 47% соответственно. Уровень конечных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе значимо не изменялся.

В группе больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких в сочетании с СД 2 типа относительно группы больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких без диабета значимо снижается количество тромбоцитов в крови – на 15%, ускоряется индуцированная АДФ (на 123%), коллагеном (на 236%), адреналином (на 213%) и ристомицином (на 105%) агрегация тромбоцитов (табл. 1). Кроме этого, отмечается значимый рост продуктов ОМБ в спонтанном режиме детекции – на 58%, рост уровня АДНФГ и КДНФГ составляет 56% и 86% соответственно, в металл катализируемом режиме детекции рост уровня аналогичных продуктов в обогащенной тромбоцитами плазме составил 20%, 18% и 25% соответственно. В гептановой фазе липидного экстракта в группе 3 относительно группы 2 выросло содержание первичных (на 30%), вторичных (на 50%) и третичных (на 71%) продуктов ПОЛ, в изопропанольной фазе – вторичных продуктов ПОЛ (на 16%) (табл. 2).

У больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких выявлена прямая связь между скоростью агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ и уровнем вторичных продуктов ПОЛ в гептановой фазе умеренной силы, сильная связь с общим содержанием продуктов ОМБ в металл-индуцированном режиме детекции (табл. 3). Связь умеренной силы обнаружена между скоростью агрегации тромбоцитов, индуцированной коллагеном, с первичными продуктами ПОЛ в гептановой фазе и с общим содержанием продуктов ОМБ в металл-индуцированном режиме. Прямая связь умеренной силы обнаружена между скоростью

Таблица 1/ Table 1

Количество в крови и агрегация тромбоцитов при COVID-19-ассоциированном поражении легких в зависимости от наличия СД 2 типа (Ме (Q25; Q75))

Blood count and platelet aggregation in COVID-19-associated lung injury depending on the presence of type 2 diabetes (Me (Q25; Q75))

Показатели Indicators	Группа 1 / Group 1 (n=24) Control	Группа 2/ Group 2 (n=34)	Группа 3 / Group 3 (n=21)
Тромбоциты, ·10 ⁹ /л Platelets, ·10 ⁹ /l	324 (202;428)	311 (196; 425)	263 (166; 376)*#
АДФ-индуцированная агрегация, ед/мин ADP-induced aggregation, units/min	20,32 (11,46; 28,40)	21,34 (12,21; 26,80)	47,61 (34,22; 52,55)*#
Коллаген-индуцированная агрегация, ед/мин Collagen-induced aggregation, units/min	10,86 (5,38; 14,21)	13,50 (7,74;22,60)*	45,31 (39,72; 56,12)*#
Адреналин-индуцированная агрегация, ед/мин Adrenaline-induced aggregation, units/min	6,21 (1,88; 9,36)	7,10 (2,16; 11,30)	22,20 (12,91; 40,06)*#
Ристомицин-индуцированная агрегация, ед/мин Ristomycin-induced aggregation, units/minute	31, 09 (24,41; 39,12)	35, 31 (28,74; 41,17)*	72,52 (44,58; 85,19)*#

агрегации тромбоцитов, индуцированной адреналином с общим содержанием продуктов ОМБ в спонтанном режиме. Прямая связь средней силы ристомицин-индуцированной агрегации выявлена с первичными продуктами ПОЛ в гептановой фазе, вторичными продуктами ПОЛ – в изопропанольной фазе, а также с общим содержанием продуктов ОМБ в металл-индуцированном режиме.

У больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких в сочетании с СД 2 типа прямая связь умеренной силы обнаружена между скоростью агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ, и уровнем первичных и вторичных продуктов ПОЛ в гептановой фазе липидного экстракта, вторичных продуктов ПОЛ в изопропанольной фазе, общим содержанием продуктов ОМБ в металл-индуцированном режиме детекции. Выявлена прямая связь коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов с первичными и вторичными продуктами ПОЛ в гептановой фазе, вторичными продуктами ПОЛ – в изопропанольной фазе, продуктами ОМБ в спонтанном режиме детекции. Прямая связь

средней силы адреналин-индуцированной агрегации выявлена с вторичными продуктами ПОЛ в гептановой фазе, с общим содержанием продуктов ОМБ в спонтанном и металл-индуцированном режимах; умеренной силы – с первичными продуктами ПОЛ в изопропанольной фазе. Связь ристомицин-индуцированной агрегации средней силы прямого характера обнаружена с первичными, вторичными и конечными продуктами ПОЛ в гептановой фазе, а также общим уровнем продуктов ОМБ в спонтанном режиме детекции (табл. 3).

Следует отметить разное количество значимых связей между скоростью агрегации тромбоцитов и показателями ПОЛ и ОМБ в группах 2 и 3. Так, в группе 2 с адреналин-индуцированной агрегацией выявлена 1 связь, с коллаген- и АДФ-индуцированной агрегацией по 2 связи, с ристомицин-индуцированной агрегацией 3 связи. В группе 3 выявлено по 4 связи с АДФ-, коллаген- и адреналин-индуцированной агрегацией, и 5 - с ристомицин-индуцированной агрегацией. Таким образом, наибольшее количество связей обнаружено в группе 3 – 17 связей против 8 в груп-

Таблица 2/Table 2

Показатели ОМБ и ПОЛ в обогащенной тромбоцитами плазме при COVID-19-ассоциированном поражении легких в зависимости от наличия СД 2 типа (Me (Q25; Q75))

Indicators of oxidative modification of proteins and lipid peroxidation in platelet-rich plasma in COVID-19-associated lung injury depending on the presence of type 2 diabetes (Me (Q25; Q75))

Показатели Indicators	Группа 1 Group 1 Контроль Control (n=24)	Группа 2 Group 2 (n=34)	Группа 3 Group 3 (n=21)	
Продукты ОМБ в спонтанном режиме детекции PMP products in spontaneous detection mode	S, у.е./мг белка	29,92 (25,11; 39,67)	34,33 (31,55; 37,41)*	54,17 (43,28;66,71)*#
	S АДНФГ, у.е./мг белка	27,37 (25,17; 37,43)	33,21 (29,86; 36,49)*	51,82 (39,11;60,08)*#
	S КДНФГ, у.е./мг белка	1,05 (0,95; 1,14)	1,09 (1,02; 1,17)	2,03 (1,69; 2,73)*#
Продукты ОМБ в металл-катализируемом режиме детекции PMP products in metal-catalyzed detection mode	S, у.е./мг белка	63,2 (60,81; 66,51)	71,31 (58,21; 79,73)*	84,72 (75,16; 96,13)*
	S АДНФГ, у.е./мг белка	54,09 (52,21; 56,40)	61,06 (55,09;74,33)*	72,29 (63,70; 82,43)*#
	S КДНФГ, у.е./мг белка	8,3 (8,12; 9,06)	10,17 (7,29; 12,87)*	12,72 (9,57; 14,78)*#
Продукты ПОЛ POL products	ДК (г), е.и.о.	0,55 (0,49; 0,58)	0,67 (0,59; 0,73)*	0,87 (0,65; 0,95) *#
	КДиСТ (г), е.и.о.	0,05 (0,04; 0,08)	0,08 (0,06; 0,10)*	0,12 (0,08; 0,15)*#
	ШО (г), е.и.о.	0,06 (0,04; 0,08)	0,07 (0,05; 0,09)	0,12 (0,10; 0,13)*#
	ДК (и), е.и.о.	0,51 (0,42; 0,71)	0,63 (0,54; 0,75)*	0,79 (0,63; 0,84)*
	КДиСТ (и), е.и.о.	0,30 (0,22; 0,39)	0,38(0,33; 0,42)*	0,44(0,38; 0,49)*#
	ШО (и), е.и.о.	0,03 (0,03; 0,04)	0,04(0,03; 0,04)	0,04 (0,03; 0,04)

Примечание. S – суммарное содержание; г – гептановая фаза экстракта; и – изопропанольная фаза экстракта; * - значимые (p < 0,01) различия с группой 1; # – с группой 2.

Note. S is the total content; г – heptane phase of the extract; и - isopropanol phase of the extract; * – significant (p < 0.01) differences with group 1; # – with group 2; PMP – protein oxidative modification products.

пе 2, среди индукторов агрегации максимальное количество связей даёт ристомицин-индуцированная агрегация (8 связей).

Обсуждение

Вирусная инфекция вызывает снижение уровня тромбоцитов разными механизмами. Развитие тромбоцитопении на ранних стадиях COVID-19 обычно обусловлено усиленным потреблением и разрушением тромбоцитов, однако на поздних стадиях заболевания наблюдается уменьшение их продукции [14]. Тромбоциты при COVID-19 могут активироваться комплексами антиген-антитело, повреждением эндотелия и воспалительными медиаторами, кроме того, активированные тромбоциты легче выводятся из кровотока системой мононуклеарных фагоцитов. Возбудитель COVID-19 также может обладать способностью взаимодействовать с мегакариоцитами и напрямую ингибировать тромбоцитопоэз [11].

Тромбоциты пациентов с диабетом демонстрируют более сильный ответ на классические агонисты и более заметную мембранную экспрессию адгезивных молекул, таких как тромбоспондин, Р-селектин, GPIIb-

IIIa, GPIIb и CD40L [15]. Механизмы гиперактивности тромбоцитов при диабете разнообразны. В исследованиях Buch et al. и Nekimsoy et al. показано, что уровень тромбоцитов в крови у пациентов с СД 2 типа ниже, чем у здоровых людей [16, 17]. Гипергликемия, связанная с СД 2 типа, влияет на экспрессию ключевых рецепторов и активность ферментов тромбоцитов. Уровни экспрессии рецепторов простаглицина снижены при СД 2 типа, что усиливает агрегацию тромбоцитов [18]. Вместе с этим сообщалось, что активность P2Y₁₂, ключевого рецептора вторичного агониста аденозиндифосфата, значительно повышена в тромбоцитах больных СД 2 типа [19]. Повышение экспрессии P2Y₁₂ поддерживается активацией зависимого от окислительного стресса ядерного фактора-κB (NF-κB) в мегакариоцитах. У пациентов с СД 2 типа повышена активность рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R), что делает тромбоциты этих пациентов более чувствительными к IGF1. IGF1 описан как положительный регулятор передачи сигналов и ответов тромбоцитов, его активация IGF1R способствует гиперактивности тромбоцитов при СД 2 типа [20]. При СД на тромбоцитах изменяется экспрессия интегрин β₃, компо-

Таблица 3/Table 3

Корреляционная матрица между агрегацией тромбоцитов и содержанием в них продуктов ОМБ и ПОЛ

Correlation matrix between platelet aggregation and the content of oxidative modification of proteins and lipid peroxidation in them

Показатели Indicators	АДФ-индуцированная агрегация / ADP-induced aggregation, units/min	Коллаген-индуцированная агрегация / Collagen-induced aggregation, units/min	Адреналин-индуцированная агрегация / Adrenaline-induced aggregation, units/min	Ристомицин-индуцированная агрегация / Ristomycin-induced aggregation, units/minute
ДК (г), е.и.о.	$R=0,21$ $R=0,46^*$	$R=0,53^*$ $R=0,48^*$	$R=0,13$ $R=0,29$	$R=0,50^*$ $R=0,46^*$
КДиСТ (г), е.и.о.	$R=0,39^*$ $R=0,56^*$	$R=0,11$ $R=0,43^*$	$R=0,31$ $R=0,68^*$	$R=0,36$ $R=0,64^*$
ШО (г), е.и.о.	$R=0,06$ $R=0,13$	$R=0,14$ $R=0,18$	$R=0,13$ $R=0,11$	$R=0,15$ $R=0,39^*$
ДК (и), е.и.о.	$R=0,18$ $R=0,31$	$R=0,11$ $R=0,27$	$R=0,32$ $R=0,41^*$	$R=0,31$ $R=0,43^*$
КДиСТ (и), е.и.о.	$R=0,26$ $R=0,38^*$	$R=0,33$ $R=0,59^*$	$R=0,25$ $R=0,33$	$R=0,52^*$ $R=0,28$
ШО (и), е.и.о.	$R=0,11$ $R=0,07$	$R=0,06$ $R=0,14$	$R=0,12$ $R=0,10$	$R=0,11$ $R=0,19$
S ОМБ, у.е./мг белка	$R=0,16$ $R=0,35$	$R=0,27$ $R=0,45^*$	$R=0,40^*$ $R=0,51^*$	$R=0,42^*$ $R=0,59^*$
S общ.МКО, у.е./мг белка	$R=0,52^*$ $R=0,46^*$	$R=0,44^*$ $R=0,28$	$R=0,32$ $R=0,61^*$	$R=0,66^*$ $R=0,27$

Примечание. В числителе значения коэффициента корреляции Спирмена (R) в группе 2, в знаменателе – в группе 3; * – значимая связь ($p < 0,05$); МКО – металл-катализируемое окисление.

Note. In the numerator, the values of the Spearman correlation coefficient (R) in group 2, in the denominator – in group 3; * – significant relationship ($p < 0.05$); MCO – metal catalyzed oxidation.

нента гликопротеина Пб/IIIa, обеспечивающих агрегацию тромбоцитов [21]. Тромбоциты пациентов с СД с плохим контролем гликемии экспрессируют значительно более высокие уровни прооксидантного фермента НАДФН-оксидазы-1 (NOX1) – важного регулятора активности тромбоцитов *in vitro* и *in vivo* [22].

Выводы:

1. У больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких тяжелой степени количество тромбоцитов в крови значимо не изменяется, но ускоряется агрегация тромбоцитов, индуцированная коллагеном и ристомицином; в обогащенной тромбоцитами плазме увеличивается суммарное содержание продуктов ОМБ в спонтанном режиме детекции, преимущественно за счет ранних продуктов; в металл-индуцированном режиме детекции увеличивается содержание ОМБ в тромбоцитах за счет ранних и поздних продуктов. В гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта тромбоцитов увеличивается уровень первичных и вторичных продуктов ПОЛ.

2. У больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких в сочетании с СД 2 типа значимо снижается количество тромбоцитов в крови, ускоряется агрегация тромбоцитов, индуцированная АДФ, коллагеном, адреналином и ристомицином; происходит значимый рост уровня продуктов ОМБ в спонтанном режиме детекции в тромбоцитах за счет АДНФГ и КДНФГ. У больных этой группы выявлено накопление ранних и поздних продуктов металл-индуцированной ОМБ в тромбоцитах; в гептановой фазе липидного экстракта увеличивается уровень первичных, вторичных и конечных маркеров ПОЛ в тромбоцитах; в изопропанольной фазе увеличивается уровень первичных и вторичных маркеров ПОЛ в тромбоцитах.

3. В группе больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких в сочетании с СД 2 типа относительно группы больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких без диабета меньше количество тромбоцитов в крови, ускоряется индуцированная АДФ, коллагеном, адреналином и ристомицином агрегация тромбоцитов; больше в тромбоцитах суммарное содержание продуктов ОМБ в спонтанном режиме детекции, в том числе ранних и поздних; больше содержание первичных, вторичных и конечных продуктов ПОЛ в гептановой фазе липидного экстракта, в изопропанольной фазе – вторичных продуктов ПОЛ.

4. Выявлено, что у больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких, в том числе при сочетании с СД 2 типа, агрегация тромбоцитов, индуцированная АДФ, коллагеном, адреналином и ристомици-

ном ускоряется по мере увеличения содержания в них продуктов окислительной деструкции липидов и белков. Наличие СД 2 типа у больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких в 2 раза увеличивает количество прямых связей умеренной и заметной силы между агрегацией тромбоцитов и содержанием в них продуктов ПОЛ и ОМБ.

Литература

(п.п. 1–12; 14–22 см. References)

13. Дубинина Е.Е. *Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты.* СПб.: Издательство «Медицинская пресса», 2006.

References

1. Wool G.D., Miller J.L. The Impact of COVID-19 Disease on Platelets and Coagulation. *Pathobiology.* 2021; 88(1): 15-27. doi:10.1159/000512007
2. Levi M., Thachil J., Iba T., Levy J.H. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol.* 2020 Jun; 7(6):e438-e440. doi: 10.1016/S2352-3026(20)30145-9.
3. Liu Y., Sun W., Guo Y., et al. Association between platelet parameters and mortality in coronavirus disease 2019: Retrospective cohort study. *Platelets.* 2020; 31(4): 490-6. doi:10.1080/09537104.2020.1754383
4. Lador A., Leshem-Lev D., Spectre G., Abelow A., Kornowski R., Lev EI. Characterization of surface antigens of reticulated immature platelets. *J Thromb Thrombolysis.* 2017 Oct; 44(3): 291-7. doi: 10.1007/s11239-017-1533-x
5. Tang N., Li D., Wang X., Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost.* 2020 Apr; 18(4): 844-7. doi: 10.1111/jth.14768. Epub 2020 Mar 13.
6. Barrett T.J., Lee A.H., Xia Y., et al. Platelet and Vascular biomarkers associate with thrombosis and death in coronavirus disease. *Circ Res.* 2020 Sep 11; 127(7): 945-7. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.317803
7. Comer S.P., Cullivan S., Szklanna P.B., Weiss L., Cullen S., Kelliher S., et al: COVID-19 induces a hyperactive phenotype in circulating platelets. *PLoS Biol.* 2021 Feb 17; 19(2):e3001109. doi: 10.1371/journal.pbio.3001109
8. Manne B.K., Denorme F., Middleton E.A., Portier I., Rowley J.W., Stubben C., et al. Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood.* 2020 Sep 10; 136(11): 1317-29. doi: 10.1182/blood.2020007214
9. Gaiz A., Mosawy S., Colson N., Singh I. Thrombotic and cardiovascular risks in type two diabetes; Role of platelet hyperactivity. *Biomed Pharmacother.* 2017 Oct; 94: 679-86. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.121
10. Kaur R., Kaur M., Singh J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: Molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc. Diabetol.* 2018; 17: 1–17. doi: 10.1186/s12933-018-0763-3
11. Lima-Martínez M.M., Carrera Boada C., Madera-Silva M.D., Marín W., Contreras M. COVID-19 and diabetes: A bidirectional rela-

- tionship. COVID-19 y diabetes mellitus: una relación bidireccional. *Clin Investig Arterioscler.* 2021; 33(3): 151-7. doi:10.1016/j.arteri.2020.10.001
12. Zhang S., Liu Y., Wang X., et al. SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19. *J Hematol Oncol.* 2020; 13(1): 120. Published 2020 Sep 4. doi:10.1186/s13045-020-00954-7
 13. Dubinina E.E. *Products of oxygen metabolism in the functional activity of cells (life and death, creation and destruction). Physiological and clinical and biochemical aspects [Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты]*. Sankt-Peterburg: Medical Press, 2006. (in Russian)
 14. Giannis D., Ziogas I.A., Gianni P. Coagulation disorders in coronavirus infected patients: COVID-19, SARS-CoV-1, MERS-CoV and lessons from the past. *J Clin Virol.* 2020; 127: 104362. doi:10.1016/j.jcv.2020.104362
 15. Konieczynska M., Fil K., Bazanek M., Undas A. Prolonged duration of type 2 diabetes is associated with increased thrombin generation, prothrombotic fibrin clot phenotype and impaired fibrinolysis. *Thromb. Haemost.* 2014; 111: 685–93. doi: 10.1160/TH13-07-0566
 16. Buch A., Kaur S., Nair R., et al. Platelet volume indices as predictive biomarkers for diabetic complications in type 2 diabetic patients. *J Lab Physicians.* 2017; 9: 84–8.
 17. Hekimsoy Z., Payzin B., Ornek T., et al. Mean platelet volume in type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications.* 2004; 18: 173–6.
 18. Knebel S.M., Sprague R.S., Stephenson A.H. Prostacyclin receptor expression on platelets of humans with type 2 diabetes is inversely correlated with hemoglobin A1c levels. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2015; 116: 131–5. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2014.12.002
 19. Hu L., Chang L., Zhang Y., et al. Platelets express activated P2Y12 receptor in patients with diabetes mellitus. *Circulation.* 2017; 136: 817–33. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026995
 20. Gligorijevic N., Robajac D., Nedic O. Enhanced platelet sensitivity to IGF-1 in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Biochemistry.* 2019; 84: 1213–9. doi: 10.1134/S0006297919100109
 21. Magwenzi S., Woodward C., Wraith K.S., Aburima A., Raslan Z., Jones H., et al. Oxidized LDL activates blood platelets through CD36/NOX2-mediated inhibition of the cGMP/protein kinase G signaling cascade. *Blood.* 2015; 125: 2693–703. doi: 10.1182/blood-2014-05-574491
 22. Vara D., Cifuentes-Pagano E., Pagano P.J., Pula G. A novel combinatorial technique for simultaneous quantification of oxygen radicals and aggregation reveals unexpected redox patterns in the activation of platelets by different physiopathological stimuli. *Haematologica.* 2019; 104: 1879–91. doi: 10.3324/haematol.2018.208819

Сведения об авторах:

Осиков Михаил Владимирович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патологической физиологии, начальник отдела научной и инновационной работы, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России;

Антонов Владимир Николаевич, доктор мед. наук, проф., гл. внештатный пульмонолог Управления здравоохранения администрации г. Челябинск, зав. учебной частью и проф. каф. терапии института ДПО, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России;

Зотов Семён Олегович, пульмонолог ГБУЗ «Областная клиническая больница № 3», ст. лаборант каф. патологической физиологии, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России;

Игнатова Галина Львовна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. терапии Института ДПО, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092.4

Попова И.А., Литвицкий П.Ф., Будник И.А., Андриуца Н.С.

Этиопатогенетическое обоснование алгоритма специфической противовирусной терапии хронических воспалительных форм патологии ротоглотки, ассоциированных с герпесвирусной инфекцией

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

В связи с доказанной существенной ролью герпесвирусной инфекции в возникновении и рецидивировании различных форм патологии ротоглотки в настоящем исследовании поставлена **цель** – сформулировать, с учетом данных об этиологии и патогенезе герпетической инфекции, и апробировать алгоритм применения специфических противовирусных препаратов для лечения хронических форм воспаления ротоглотки, ассоциированных с герпесвирусной инфекцией.

Методика. В исследование включены 170 пациентов с хроническими воспалительными формами патологии ротоглотки, которые предварительно прошли клиническое и вирусологическое обследование: ПЦР Real-time и культуральная диагностика. При проведении культуральной диагностики в качестве биологической модели использована перевиваемая культура клеток VERO, в которую вводился исследуемый материал. До и после лечения оценивалось состояние инфицированного клеточного монослоя биологической модели для выявления цитопатического действия герпесвируса. Пациенты были разделены на 3 группы: основную, сопоставления и контрольную. В основной группе пациентов (с хроническими воспалительными формами патологии ротоглотки, ассоциированными с герпесвирусной инфекцией) проводили специфическую противовирусную терапию; пациентов группы сопоставления (с хроническими воспалительными формами патологии ротоглотки, ассоциированными с герпесвирусной инфекцией) лечили по стандартной схеме. В контрольной группе пациентов (с хроническими воспалительными формами патологии ротоглотки без герпесвирусной инфекции) также проводилась стандартная терапия. По результатам клинического и вирусологического обследований до и после курса лечения оценивали эффективность специфической противовирусной терапии у пациентов с хроническими формами воспаления ротоглотки, ассоциированными с герпесвирусной инфекцией.

Результаты. В группе пациентов с проведением специфической противовирусной терапии была характерна значительно более высокая клиническая эффективность в сравнении с пациентами, лечившимися стандартно: значительно уменьшилась выраженность боли в горле и воспалительного процесса ротоглотки, отсутствовали рецидивы заболевания, улучшилось качество жизни. Обнаружена корреляция между результатами вирусологического обследования (значительное снижение на слизистой оболочке ротоглотки количества штаммов различных типов герпесвирусов, менее выраженные признаки их цитопатического действия, либо их отсутствие) и показателями динамики клинической картины заболевания (нормализации состояния ротоглотки, снижение выраженности боли в горле).

Заключение. Результаты исследования послужили основанием для выделения самостоятельной нозологической формы: «вирусный тонзиллофарингит». Для этой формы патологии разработан и успешно апробирован алгоритм лечения хронического воспаления ротоглотки, ассоциированного с герпесвирусной инфекцией. Он заключается в назначении пациентам препарата Валацикловира по новой схеме: в дозе 500 мг два раза в сутки в течение 10 суток. Такая схема лечения обеспечивала высокую клиническую эффективность и выздоровление.

Ключевые слова: этиология; патогенез; хронический тонзиллит; хронический фарингит; герпесвирусная инфекция; специфическая противовирусная терапия

Для цитирования: Попова И.А., Литвицкий П.Ф., Будник И.А., Андриуца Н.С. Этиопатогенетическое обоснование алгоритма специфической противовирусной терапии хронических воспалительных форм патологии ротоглотки, ассоциированных с герпесвирусной инфекцией. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 36-48. DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.36-48

Участие авторов: концепция и дизайн работы – Литвицкий П.Ф., Андриуца Н.С., Попова И.А., Будник И.А.; сбор данных – Попова И.А.; анализ и интерпретация данных – Литвицкий П.Ф., Будник И.А., Попова И.А., Андриуца Н.С.; написание статьи – Попова И.А.; редактирование статьи – Литвицкий П.Ф. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Для корреспонденции: *Попова Инга Александровна*, e-mail: ainessa77@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.06.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Popova I.A., Litvitsky P.F., Budnik I.A., Andriutsa N.S.

Etiopathogenetic substantiation of the algorithm for specific antiviral therapy of chronic inflammatory forms of oropharyngeal pathology associated with herpesvirus infection

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University),
Trubetskaya St. 8, p. 2, Moscow, 119991, Russian Federation

Due to the proven significant role of herpesvirus infection in the occurrence and recurrence of various forms of oropharyngeal pathology, the present study **aimed** to substantiate, taking into account data on the etiology and pathogenesis of herpetic infection, formulate, and test an algorithm for the use of specific antiviral drugs for the treatment of chronic forms of oropharyngeal inflammation associated with herpesvirus infection.

Methods. The study included 170 patients with chronic inflammatory forms of oropharyngeal pathology, who underwent a prior clinical and virological examination with real-time PCR and cultural diagnostics. For the cultural diagnostics, a transferable VERO cell culture was used as a biological model, into which the studied material was introduced. Before and after the treatment, the condition of the infected cell monolayer of the biological model was assessed to identify the cytopathic effect of the herpesvirus. The patients were divided into 3 groups: main, comparison, and control. The main group (patients with chronic inflammatory forms of oropharyngeal pathology associated with herpesvirus infection) received a specific antiviral therapy; the comparison group (patients with chronic inflammatory forms of oropharyngeal pathology associated with herpesvirus infection) received a standard treatment. The control group (patients with chronic inflammatory forms of oropharyngeal pathology without herpesvirus infection) also received a standard treatment. Based on results of clinical and virological examinations before and after the course of treatment, the efficacy of the specific antiviral therapy was evaluated in patients with chronic forms of oropharyngeal inflammation associated with herpesvirus infection.

Results. In the group of patients after specific antiviral therapy, the clinical efficacy of the treatment was significantly higher compared to the standard therapy group: the severity of throat soreness and oropharyngeal inflammation significantly decreased, there were no relapses of the disease, and the quality of life improved. Also, a correlation was found between the results of virological examination (significant decrease in the number of various types of herpesviruses on the oropharyngeal mucosa and less pronounced or absent signs of cytopathic action of viruses), and changes in the clinical picture of the disease (normalization of the oropharynx; reduced severity of throat soreness).

Conclusion. The results of the study justified isolation of an independent nosological form of “viral tonsillopharyngitis”. For this condition, an algorithm was developed and successfully tested for the treatment of chronic inflammatory oropharyngeal pathology associated with herpesvirus infection. This algorithm includes the administration of valacyclovir according to a new schedule: 500 mg twice a day for 10 days. This treatment regimen provided a high clinical efficacy.

Keywords: etiology; pathogenesis; chronic tonsillitis; chronic pharyngitis; herpesvirus infection; specific antiviral therapy; biological model

For citation: Popova I.A., Litvitskiy P.F., Budnik I.A., Andriutsa N.S. Etiopathogenetic substantiation of the algorithm for specific antiviral therapy of chronic inflammatory forms of oropharyngeal pathology associated with herpesvirus infection. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(4): 36-48. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.36-48

Author's contribution: concept and design of the work – Litvitsky P.F., Andriutsa N.S., Popova I.A., Budnik I.A.; data collection – Popova I.A.; analysis and interpretation of data – Litvitsky P.F., Budnik I.A., Popova I.A., Andriutsa N.S.; writing of the article – Popova I.A.; editing of the article – Litvitsky P.F. All co-authors — approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

For correspondence: *Inga A. Popova*, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation; Trubetskaya str., 8, p. 2, e-mail: ainessa77@gmail.com

Information about the authors:Popova I.A., <https://orcid.org/0000-0002-6899-9012>Litvitskiy P.F., <https://orcid.org/0000-0003-0151-9114>Budnik I. A., <https://orcid.org/0000-0002-6652-2667>Andriutsa N.S., <https://orcid.org/0000-0001-5425-7707>**Financing.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 29.06.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

Хронические воспалительные формы патологии ротоглотки (ХВФПР) широко распространены во всех странах и возрастных группах населения. Характерна чрезвычайная разнородность сведений и большой разброс данных о распространенности этих заболеваний. Так, например, по оценкам разных авторов, распространенность хронического тонзиллита (ХТ) в популяции варьирует от 5 до 24% [1–3]. При этом остается неясным, имеют ли они в виду одно и то же заболевание с общими этиологией и патогенезом. Помимо этого, из всех типов ХВФПР критерии оценки их клинической картины четко определены только для ХТ токсико-аллергической формы II степени (ТАФ II) [4]. У большинства остальных форм хронического воспаления ротоглотки признаки неспецифичны, они не всегда коррелируют с клинической картиной. Таким образом, ХВФПР не имеют определенных клинико-диагностических критериев. Антибактериальная терапия, рекомендованная при обострениях ХТ и хронического фарингита (ХФ), не приводит к полной санации очагов инфекции и не препятствует рецидивированию заболевания. Эти факты свидетельствуют о возможной недооценке роли других инфекционных (не бактериальных) агентов, таких, например, как возбудитель герпесвирусной инфекции (ГИ).

Актуальность проблемы диагностики и лечения ХВФПР, ассоциированной с ГИ, обусловлена широкой ее распространенностью, а также рядом патогенных особенностей герпесвирусов, таких как их тропность к слизистым оболочкам и способность длительно в них персистировать. Развивающиеся при герпесвирусной инфекции нарушения в иммунной системе также могут способствовать поддержанию хронического воспаления в ротоглотке и в других регионах организма. За последние годы во всех странах мира отмечается устойчивая тенденция к росту заболеваемости ГИ. Первичное инфицирование, как правило, протекает бессимптомно, а рецидив заболевания развивается у 20–30% больных в течение последующих 2–3 лет от момента манифестации заболевания. В свя-

зи с этим установить истинное число первично заболевших не представляется возможным. Рост заболеваемости в значительной мере связан с распространением недиагностированных и бессимптомных форм патологии, однако это не сопровождается формированием настороженности по отношению к этому заболеванию ни у врачей, ни у населения [5]. Вместе с тем, как фактор риска летального исхода, по данным Всемирной организации здравоохранения, ГИ занимают второе место (15,8%) после гриппа (35,8%) [6].

В настоящее время известно 8 типов герпесвирусов человека. В зависимости от особенностей их репродукции, структуры генома, типа инфицируемых ими клеток, а также антигенных и других свойств герпесвирусы подразделяются на 3 подсемейства: альфа, бета и гамма [7–9]. Проникнув в клетки слизистых оболочек человека, вирус может длительно в них персистировать, вызывая рецидивирующие воспалительные формы патологии [10, 11]. Так, вирус простого герпеса (ВПГ) может попадать в организм через поврежденные кожные покровы и слизистые оболочки. Вначале вирус внедряется в клетки эпителия, где начинается процесс его размножения и реализуется цитопатический эффект [6, 12], затем вирусные частицы проникает в нейроны, в ядрах которых происходит репликация вирусной ДНК. В нейронах паравертебральных ганглиев возбудитель может сохраняться в течение всей жизни человека. В процессе реактивации ВПГ перемещается по нервным волокнам к клеткам эпителия слизистой оболочки ротоглотки (ворота инфекции) с инициацией рецидива специфического инфекционно-воспалительного процесса и возможной диссеминацией возбудителя инфекции [6, 13]. ВПГ может реактивироваться, вызывая как острую, так и хроническую персистирующую инфекцию [14, 15].

Наиболее перспективным направлением в лечении и профилактике ГИ может быть использование противовирусных препаратов из группы ациклических нуклеозидов [6]. Представителем препаратов этой группы является препарат «Валацикловир» [16, 17]. В организме

человека он превращения в активную форму — ацикловира трифосфат, который, будучи аналогом нуклеозида, встраивается в вирусную ДНК и конкурентно ингибирует вирусную ДНК-полимеразу. Это приводит к терминации синтеза ДНК и, следовательно, прекращению репликации вируса [18]. Применение Валацикловира показало высокую эффективность в лечении различных заболеваний, вызванных герпесвирусами, в том числе офтальмологического кератита [14, 16, 19], опоясывающего герпеса [20, 21] и ряда других форм патологии. Специфическая противовирусная терапия позволяет заблокировать процесс репликации вируса, тем самым снижая вирусную нагрузку на организм. Эффекты этиотропного и патогенетического лечения обеспечивают значительное уменьшение выраженности и продолжительности воспаления, а также снижение темпа прогрессирования расстройств, возникающих под влиянием ГИ в организме [22]. При этом сведения о применении указанного препарата в лечении ХВФП весьма ограничены.

В связи с существенной ролью персистирующей ГИ в возникновении и рецидивировании хронических воспалительных форм патологии ротоглотки в настоящей работе поставлена **цель**: сформулировать, учетом данных об этиологии и патогенезе герпетической инфекции, и апробировать алгоритм применения специфических противовирусных препаратов для лечения пациентов с хроническими формами воспаления ротоглотки, ассоциированными с ГИ. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) определить частоту встречаемости ГИ у пациентов с ХВФП;
- 2) Используя высокочувствительную к ГИ культуру клеток VERO доказать вирусную природу ряда хронических форм воспаления ротоглотки и оценить эффективность препарата «Валациклоvir» в терапии заболеваний, ассоциированных с ГИ и предотвращении развития рецидивов.
- 3) определить корреляции между клиническим течением заболевания, результатами диагностики ПЦР Real-time и цитологическими изменениями в культуре клеток;
- 4) оценить частоту рецидивов через 6 мес после проведенного курса лечения.

Методика

В исследование включено 170 пациентов с ХВФП. На данное исследование было получено одобрение со стороны локального этического комитета (протокол № 2 от 15.11.2021 г.). Все исследования выполнялись по международным правилам работы с биоматериалом людей.

Критериями включения в исследование были диагностированные у пациентов нозологии: хронический фарингит, гипертрофическая форма; хронический фарингит, катаральная форма; хронический тонзиллит, простая форма; хронический тонзиллит, токсико-аллергическая форма I степени (ТАФ I).

Критериями исключения были: возраст менее 18 и более 65 лет; хронический тонзиллит, ТАФ II степени; стрептококковая инфекция ротоглотки, подтверждаемая одним или несколькими критериями: выявление бета-гемолитического стрептококка группы А в ходе бактериологического исследования отделяемого с поверхности небных миндалин, повышение уровня в крови одного или нескольких показателей: антистрептолизина-О (АСЛО), ревматоидного фактора (РФ), С-реактивного белка (СРБ); гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ); тяжелые соматические заболевания; беременность; противопоказания к использованию для лечения препарата, применяемого в исследовании.

Ключевым моментом данного исследования являлся факт отсутствия достоверных клинических различий между ХВФП бактериальной, грибковой или вирусной этиологии. В связи с чем нами определены диагностические методы, позволяющие выявить присутствие вируса в биологическом образце и подтвердить наличие морфологических изменений эпителиального слоя пораженного локуса, а также доказать в ходе динамической контрольной диагностики эффект специфической противовирусной терапии.

ПЦР-диагностика Real-time. На основе PCR-диагностики Real-time дифференцировали типы герпесвирусной инфекции в соскобах со слизистой оболочки ротоглотки: HSV-1, HSV-2, EBV, CMV, HHV-6. Соскобы при ХТ, простой либо токсико-аллергической форме I степени проводились со слизистой оболочки небных миндалин, при катаральной форме ХФ — с участков наиболее выраженных изменений слизистой оболочки ротоглотки (зоны гиперемии, отека и сосудистой инъеции слизистой оболочки ротоглотки), при гипертрофической форме ХФ — с гипертрофированных участков лимфоидной ткани глотки или боковых валиков глотки). Материал для исследования, забранный с помощью одноразовых стерильных зондов, переносился в пробирку с раствором для транспортировки. Пробирки с биологическим материалом доставлялись в молекулярно-биологическую лабораторию. ДНК герпесвирусов различных типов выделяли с помощью набора реагентов «РеалБест» методом ПЦР в режиме реального времени. ПЦР в режиме реального времени для определения количества копий генов

и ПЦР-скрининга в ходе клонирования проводили в детектирующем амплификаторе DTprime (ДНК-технология, Российская Федерация). Принцип действия набора «РеалБестДНК-экстракция-3» для определения различных типов герпесвирусов (ЗАО «ВекторБест», Новосибирск-117) состоит в температурной обработке пробы многокомпонентным лизирующим раствором, который разрушает комплексы нуклеиновых кислот с белками, с последующей сорбцией на магнитные частицы, покрытые силикагелем, спиртовой отмывкой и элюцией. В реакционную смесь добавлялись праймеры для амплификации ДНК герпесвирусов. С помощью специального программного обеспечения производилась количественная оценка ДНК/кДНК, по результатам сформированы протоколы исследования с автоматической трактовкой полученных результатов.

Культуральная диагностика. В ходе исследования была использована высокочувствительная для герпесвирусной инфекции перевиваемая культура клеток VERO, выращиваемая в среде Игла MEM, содержащей 5% сыворотки эмбрионов коровы, 2 мМ глутамин, 50 мкг/мл гентамицина. Материал от пациентов вводился в клеточную культуру со средой до и после лечения пациента Валацикловиром. Проводилась световая микроскопия зараженного клеточного монослоя с целью выявления цитопатического действия герпесвируса и оценки эффективности используемого противовирусного препарата.

Клиническая диагностика. Все пациенты ($n=170$) осмотрены врачом отоларингологом и у них были выявлены фарингоскопические признаки ХВФПР (хронического фарингита и/или хронического тонзиллита), признаками хронического тонзиллита являлись:

- признак Гизе (гиперемия передних небных дужек);
- признак Зака (отечность слизистой оболочки над верхним полюсом небных миндалин и верхних частей небных дужек);
- признак Преображенского (дугообразная инфильтрация и гиперемия верхних половин дужек).

Данные признаки носят строго неспецифический характер, клинически не представляется возможным достоверно дифференцировать бактериальную (в частности, стрептококковую) или вирусную этиологию. Этот факт объясняет неэффективность традиционно проводимого лечения при воспалительных формах патологии ротоглотки. Таким образом, диагнозы “хронический тонзиллит” и “хронический фарингит” могут быть установлены лишь на основании визуального осмотра (фарингоскопии), что предполагает дальнейший диагностический поиск и установление этиологического фактора.

Современная классификация хронического тонзиллита в Российской Федерации также включает в себя лишь тонзиллит стрептококковой природы, другие этиологические факторы не рассматриваются. Учитывая, что бета-гемолитический стрептококк группы А (БГСА) в качестве этиологического фактора составляет лишь 5-10 % в популяции, остается неясным каким образом следует рассматривать нозологические формы другой этиологии (в частности, вирусной), и как вести данную категорию больных. В связи этим данные диагнозы будут пересмотрены в ходе диагностических процедур согласно методике нашего исследования.

У всех больных проведена субъективная оценка ощущения боли в горле с помощью 10-балльной авторской визуальной аналоговой шкалы (ВАШ), в которой 0 баллов означало отсутствие боли, а 10 баллов — максимально выраженную боль в горле (рис. 1).

В ходе ПЦР-исследования у 136 из 170 пациентов с ХВФПР обнаружено наличие герпесвируса, что было также подтверждено в ходе культуральной диагностики (наличие специфических цитопатических изменений клеточного монослоя культуры, характерных для ГИ). Выявление данных признаков, а также отсутствие клинических и лабораторных данных о других этиологических факторах позволило нам выделить новую нозологическую форму “вирусный тонзиллофарингит”.

На основании выявления герпесвируса и коррелирующих с этими данными результатами биологического моделирования все обследованные пациенты ($n=170$) разделены на группы А, Б и В. *Группу А* составили 70 пациентов с ХВФПР (28 пациентов с хроническим тонзиллитом простой или ТАФ I степени, 42 — с хроническим фарингитом гипертрофической или катаральной формы) и выявленной ГИ ротоглотки, которые получали Валацикловир (500 мг 2 раза в сутки в течение 10 суток). *Группу Б* составили 66 пациентов с ХВФПР (26 пациентов с хроническим тонзиллитом простой или ТАФ I степени, 40 — с хроническим фарингитом гипертрофической или катаральной формы) и выявленной ГИ ротоглотки, которые получали стандартное лечение, включавшее при хроническом тонзиллите промывание лакун миндалин антисептическими растворами (курс из 10 процедур), при хроническом фарингите лизоцима гидрохлорид (20 мг) и 10 мг пиридоксина гидрохлорид (оба препарата 4 раза в сутки в течение 10 сут). *Группу В* составили 34 пациента с ХВФПР (14 пациентов с хроническим тонзиллитом простой или ТАФ I степени и 20 — с хроническим фарингитом гипертрофической или катаральной формой) и отрицательными результатами тестов на наличие

ГИ ротоглотки, которые получали такое же стандартное лечение, как и пациенты группы Б. Этим пациентам проводили стандартное лечение: при хроническом тонзиллите – курс приема препарата, содержащего лизозим гидрохлорид в дозе 20 мг и пиридоксин гидрохлорид – 10 мг, ежедневно 4 раза в сутки сублингвально в течение 10 сут.

Осмотр ЛОР-органов выполняли на 10-е, 20-е, 30-е сутки, оценку состояния пациента и наличие рецидивов – через 6 мес от начала лечения. Субъективную оценку пациентами динамики клинической картины и самочувствия пациента выполняли с использованием визуальной аналоговой шкалы оценки выраженности боли и цифровой рейтинговой шкалы субъективной оценки комплексного улучшения состояния (уменьшения выраженности симптомов воспаления) ротоглотки (уменьшение першения и дискомфорта в горле при хроническом фарингите и хроническом тонзиллите, исчезновение пробок в лакунах миндалин при хроническом тонзиллите) на 10-е сут наблюдения (таблица).

После завершения лечения у всех пациентов методом PCR-диагностики Real-time выявляли наличие возбудителя герпесвирусной инфекции в соскобах со слизистой оболочки ротоглотки на 30-е сут от момента начала лечения.

Также на 30-е сут у всех пациентов проводили взятие биологического материала и внесение его в культуру клеток VERO. В ходе контрольного биологического моделирования определялось состояние клеточного монослоя и выявление признаков регресса цитопатического действия герпесвируса у пациентов, получавших специфическое лечение, и сравнение полученных результатов с показателями групп контроля.

Статистический анализ

Статистический анализ выполнен с помощью программы IBM SPSS Statistics 26 (IBM corp., США). Количественные переменные были представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей; качественные переменные – в виде частот и (или) процентов.

Сравнения между группами А, Б и В по визуальной аналоговой шкале оценки выраженности боли в горле и по цифровой рейтинговой шкале субъективной оценки комплексного уменьшения симптомов хронического воспалительного процесса ротоглотки проводили с помощью критерия Краскела–Уоллиса и апостериорного критерия Данна. Для оценки изменений выраженности боли после лечения в группах А, Б и В применяли двусторонний критерий Уилкоксона (отдельно для каждой группы). Сравнения долей пациентов с полным купированием симптомов ХВФПР после лечения в группах А, Б и В проводили с помощью критерия однородности хи-квадрат (2×3) и апостериорного z-критерия для двух долей (с поправкой Бонферрони). Сравнения долей пациентов с положительным ПЦР-тестом на наличие вируса в соскобах со слизистой оболочки ротоглотки в группах А и Б проводили с помощью критерия однородности хи-квадрат (2×2). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Масштабы заболеваемости ГИ требуют проведения ее своевременной диагностики и эффективной терапии, основанной на понимании этиологии и патогенеза заболевания. В связи с этим, можно выделить основные цели лечебных мероприятий в отношении таких заболеваний, как воспалительные формы патологии ротоглотки, ассоциированные с ГИ. К ним относятся: а) подавление репродукции возбудителя ГИ в период обострения заболевания; б) инициирование эффективного иммунного ответа и его длительное поддержание с целью блокады реактивации герпесвируса в очаге воспаления и его персистенции; в) предотвращение осложнений, связанных с активацией и персистенцией возбудителя ГИ в организме; г) купирование рецидивов воспалительных форм патологии ротоглотки, ассоциированных с ГИ [3].

Наиболее перспективным направлением в лечении заболеваний, ассоциированных с ГИ, является проти-

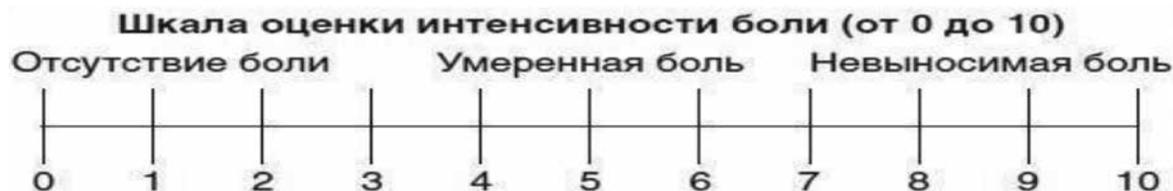


Рис. 1. Визуальная аналоговая шкала оценки ощущения выраженности боли

Fig. 1. Visual analog scale for assessing the sensation of pain severity

вовирусная терапия с использованием высокоспецифичных препаратов, обладающих доказанным противовирусным эффектом – ациклических нуклеозидов [4].

Совокупность результатов клинических и лабораторных данных, таких как метод PCR Real-time и создание биологической модели культуры клеток, позволили нам выделить новую нозологическую форму “вирусный тонзиллофарингит”. Выявление этой формы патологии потребовало высокоспецифического терапевтического подхода. В связи с этим нами предложен лечебно-диагностический алгоритм при хронической воспалительной форме патологии ротоглотки, ассоциированной с ГИ. Алгоритм основан на этиологическом и патогенетическом принципах лечения именно таких пациентов (рис. 2).

Фарингоскопическая картина на 10-е сут после начала лечения. В группе А у всех 28 пациентов с хроническим тонзиллитом отмечалось уменьшение выраженности признаков Гизе, Зака и Преображенского, у 25 из них (89,3%) уменьшилось или отсутствовало казеозное отделяемое. У всех 42 пациентов с хроническим фарингитом также отмечалось существенное улучшение фарингоскопической картины, что выражалось в уменьшении инъекции сосудов слизистой оболочки глотки (18 пациентов с катаральной формой заболевания) и уменьшении степени гипертрофии и гиперемии лимфоидных образований и боковых валиков глотки (24 пациента с гипертрофической формой). Та-

ким образом, результатом применения специфического противовирусного препарата Валацикловира при ХВФПР на фоне ГИ ротоглотки явилось значительное уменьшение выраженности фарингоскопических признаков воспалительного процесса у всех пациентов.

В группе Б у 15 из 26 пациентов (57,7%) с хроническим тонзиллитом отмечалось уменьшение выраженности признаков Гизе, Зака и Преображенского, у 13 из них (50 %) – снижение объема или отсутствие казеозного отделяемого из миндалин; улучшение состояния наблюдалось также у 19 из 40 пациентов (47,5%) с хроническим фарингитом, что выражалось в уменьшении инъекции сосудов слизистой оболочки глотки у 12 из 25 пациентов (48%) с катаральной формой заболевания и уменьшении степени гипертрофии и гиперемии лимфоидных образований и боковых валиков глотки у 7 из 15 пациентов (46,6%) с гипертрофической формой. Таким образом, применение стандартного лечения при ХВФПР на фоне ГИ ротоглотки обеспечивало уменьшение выраженности фарингоскопических признаков воспалительного процесса у значительно меньшей части пациентов по сравнению с применением терапии, включавшей Валацикловир.

В группе В у всех 14 пациентов с хроническим тонзиллитом наблюдалось снижение выраженности признаков Гизе, Зака и Преображенского, у 10 из них (71,4%) – уменьшение или отсутствие казеозного отделяемого; уменьшение выраженности симптомов воспаления отмечалось также у 15 из 20 пациентов (75%)

Таблица /Table

Цифровая рейтинговая шкала субъективной оценки комплексного улучшения состояния (уменьшения симптомов воспалительного процесса) ротоглотки

Digital rating scale for subjective assessment of complex improvement of the condition (reduction of symptoms of the inflammatory process) oropharynx

Выраженность симптомов хронического воспалительного процесса глотки	Баллы
Полное купирование симптомов (Complete relief of symptoms)	7
Практически полное купирование симптомов (Practically complete relief of symptoms)	6
Значительное улучшение, уменьшение выраженности симптомов (Significant improvement, symptom reduction)	5
Временное улучшение, уменьшение выраженности симптомов (Temporary improvement, decrease in symptoms)	4
Легкое улучшение (Mild Improvement)	3
Незначительное улучшение (Slight improvement)	2
Минимальное улучшение (Minimal improvement)	1
Отсутствие улучшения (No improvement)	0

с хроническим фарингитом, что выражалось в уменьшении выраженности инъекции сосудов слизистой оболочки глотки у всех 9 пациентов с катаральной формой заболевания и уменьшении степени гипертрофии, гиперемии лимфоидных образований и боковых валиков глотки у 10 из 11 пациентов (90,9%) с гипертрофической формой. Таким образом, применение стандартного лечения у пациентов с ХВФПР без ГИ ротоглотки позволяло достичь желаемого терапевтического эффекта в значительно большей части случаев по сравнению с его применением у пациентов с ХВФПР на фоне ГИ ротоглотки.

Результаты субъективной оценки интенсивности боли в горле до и на 10-е сут после начала лечения. Стоит отметить, что существенных клинических различий в оценке болевого синдрома при различных воспалительных формах патологии ротоглотки также как и при клиническом осмотре выявлено не было.

До лечения все пациенты ХВФПР, включенные в исследование, предъявляли жалобы на боль в горле. Во всех 3 группах ее интенсивность составила 8 (7–9) баллов (рис. 3). На 10-е сут после начала лечения во всех группах отмечалось снижение интенсивности боли: в группе А она составила 0 (0–1,25) баллов, в группе Б – 3 (2–4) балла, в группе В – 2 (1–3) балла ($p < 0,001$ для каждой группы при сравнении с показателем до начала лечения). При этом необходимо отметить, что различия в степени снижения интенсивности боли в группах А и Б также были статистически значи-

мыми ($p < 0,001$), что свидетельствует о более высокой клинической эффективности применения Валацикловира для лечения ХВФПР на фоне ГИ по сравнению с применением стандартного лечения.

Результаты субъективной оценки комплексного уменьшения симптомов хронического воспалительного процесса в ротоглотке на 10-е сут после начала лечения. Применение цифровой рейтинговой шкалы субъективной оценки комплексного уменьшения симптомов хронического воспалительного процесса в ротоглотке показало, что на 10-е сут после начала лечения состояние ротоглотки в группе А оценивалось пациентами на 7 (6–7) баллов, что было статистически значимо больше, чем в группе Б, в которой этот показатель составил 5 (4–7) баллов ($p < 0,001$), но меньше, чем в группе В, в которой он был 7 (7–7) баллов ($p = 0,032$) (рис. 4, А). При этом пациенты группы А статистически значимо чаще отмечали признаки полного купирования симптомов по сравнению с группой Б ($p < 0,05$). Наибольшая частота полного купирования симптомов заболевания наблюдалась в группе В, в которой она составила 94,1%, что было статистически значимо больше, чем в группах А и Б ($p < 0,05$ для обоих сравнений) (рис. 4, Б). Представленные данные подтверждают большую эффективность применения Валацикловира в лечении пациентов с ХВФПР при ГИ по сравнению со стандартным лечением, а также свидетельствуют о более легком течении и быстром разрешении воспалительного процесса у пациентов с ХВФПР без ГИ

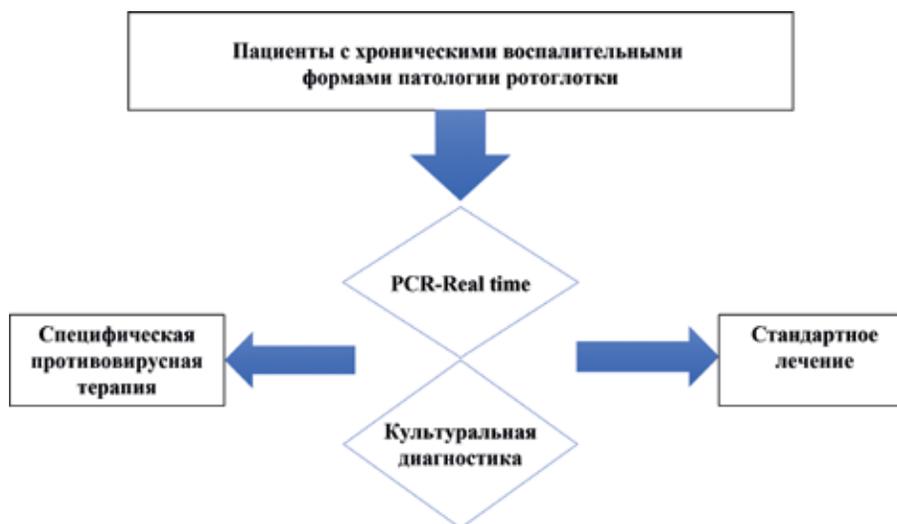


Рис. 2. Алгоритм ведения пациентов с хроническими воспалительными формами патологии ротоглотки, ассоциированными с герпесвирусной инфекцией.

Fig. 2. Algorithm of management of patients with chronic inflammatory forms of oropharyngeal pathology associated with herpesvirus infection.

по сравнению с пациентами с ХВФПР на фоне ГИ при назначении стандартного лечения.

В целом, полученные у пациентов группы А данные свидетельствуют о высокой клинической эффективности специфической противовирусной терапии при хронической воспалительной патологии ротоглотки, ассоциированной с ГИ. Это подтверждается фактами закономерной тенденции к нормализации фарингоскопической картины заболевания, снижением выраженности боли в горле и признаков местного воспаления в ротоглотке.

Диагностика наличия возбудителя вирусной инфекции в слизистой оболочке ротоглотки методом ПЦР Real-time до и на 30-е сут после начала лечения. До начала лечения у всех 70 пациентов группы А и 66 пациентов группы Б в слизистой оболочке ротоглотки был выявлен вирус из семейства *Herpesviridae*. При повторном обследовании, проведенном на 30-е сут после начала лечения, в группе А вирус обнаруживался лишь

у 10 пациентов (14,3%), а в группе Б – у 53 (80,3%) ($p < 0,001$ для обеих групп при сравнении с соответствующим значением до начала лечения) (рис. 5).

Важно отметить, что приведенные различия между долями положительных тестов в группах А и Б также были статистически значимыми ($p < 0,001$). Эти данные также указывают на большую эффективность специфического противовирусного препарата «Валацикловир» при ХВФПР с ГИ по сравнению со стандартным лечением.

Таким образом, специфическая противовирусная терапия пациентов группы А обеспечивает элиминацию вируса, в отличие от больных группы Б. Также обращает на себя внимание факт высокой противовирусной эффективности препарата «Валацикловир» в отношении вирусов семейства *Herpesviridae*.

Моделирование биологического процесса заражения возбудителем ГИ в культуре клеток VERO. В ходе инфицирования культуры клеток VERO материалом от всех

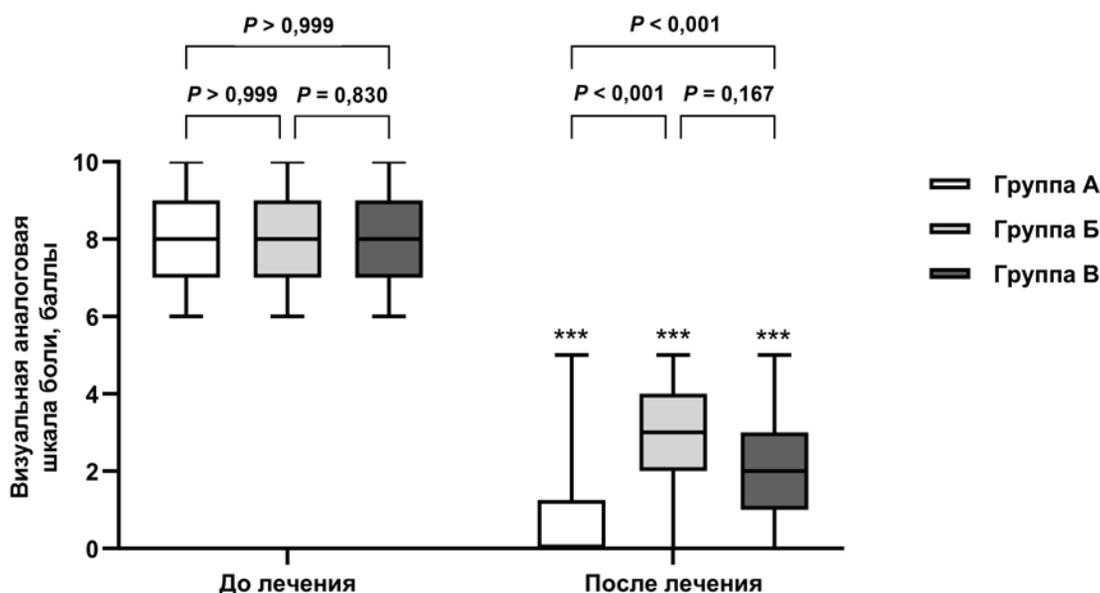


Рис. 3. Результаты субъективной оценки боли в горле по визуальной аналоговой шкале у пациентов групп А, Б и В до и на 10-е сут после начала лечения. Данные представлены в виде диаграммы размаха («ящика с усами»), в которой границы «ящика» указывают 25-й и 75-й процентиля, «усы» – минимальное и максимальное значения, линия внутри «ящика» – медиану. Сравнения групп А, Б и В до и после лечения проводили с помощью критерия Краскела–Уоллиса и апостериорного критерия Данна (значения p представлены на рисунке). Изменения выраженности боли после лечения в каждой группе пациентов оценивали с помощью критерия Уилкоксона ($*** p < 0,001$, сравнение с показателем до лечения в соответствующей группе).

Fig. 3. The results of subjective assessment of pain in the throat by the visual analog scale in the patient groups A, B and C before and on day 10 of treatment. The data are presented as a range chart (“box and whiskers”) in which the boundaries of the “box” indicate the 25th and 75th percentiles, the “whiskers” indicate the minimum and maximum values, and the line inside the “box” indicates the median. Comparisons of groups A, B, and C before and after treatment were made using the Kruskal-Wallis test and Dunn’s posterior criterion (P values are shown in the figure). Changes in pain severity after treatment in each patient group were assessed using the Wilcoxon test ($*** p < 0,001$; comparison with the rate before treatment in the corresponding group).

пациентов с ХВФПР и подтвержденной ГИ до лечения в клеточном монослое выявлены признаки цитопатического действия вируса герпеса. Это проявлялось слиянием клеток в виде синцития, лизисом клеточных мембран, увеличением размеров ядра (цитомегалия или “совиный глаз”), появлением внутриядерных включений. На 30-е сут после начала курса специфической терапии пациентов Валацикловиром установлено, что клеточная культура с внесенным от пациентов материалом стала более однородной, значительно уменьшились либо полностью отсутствовали признаки цитопатического действия вируса.

Отдаленные результаты. Был проведен анализ частоты рецидивов ХВФПР у пациентов с ХВФПР при ГИ и без ГИ после проведения специфической и стандартной терапии через 6 мес от начала лечения (рис. 6). При анализе частоты рецидивов ХВФПР

в течение 6 мес наблюдения установлено, что в группе у пациентов с ХВФПР и ГИ (*группа А*) после специфической терапии отсутствовали рецидивы у 58 пациентов (82,9%), что существенно превышает количество пациентов с отсутствием рецидивов в *группе Б* с ХВФПР и ГИ после курса стандартной терапии: отсутствие рецидивов наблюдалось у 38 пациентов (57,6%), $p < 0,05$. У пациентов с ХВФПР с отрицательными результатами ПЦР Real-time после проведения стандартной терапии (*группа В*) отсутствие рецидивов наблюдалось у 28 пациентов (82,4%), что значимо превышает аналогичный показатель в *группе Б*.

Заключение

Как показали наши исследования, после курсового применения Валацикловира в апробированной нами дозе возможна ремиссия в течение полугода. Этот

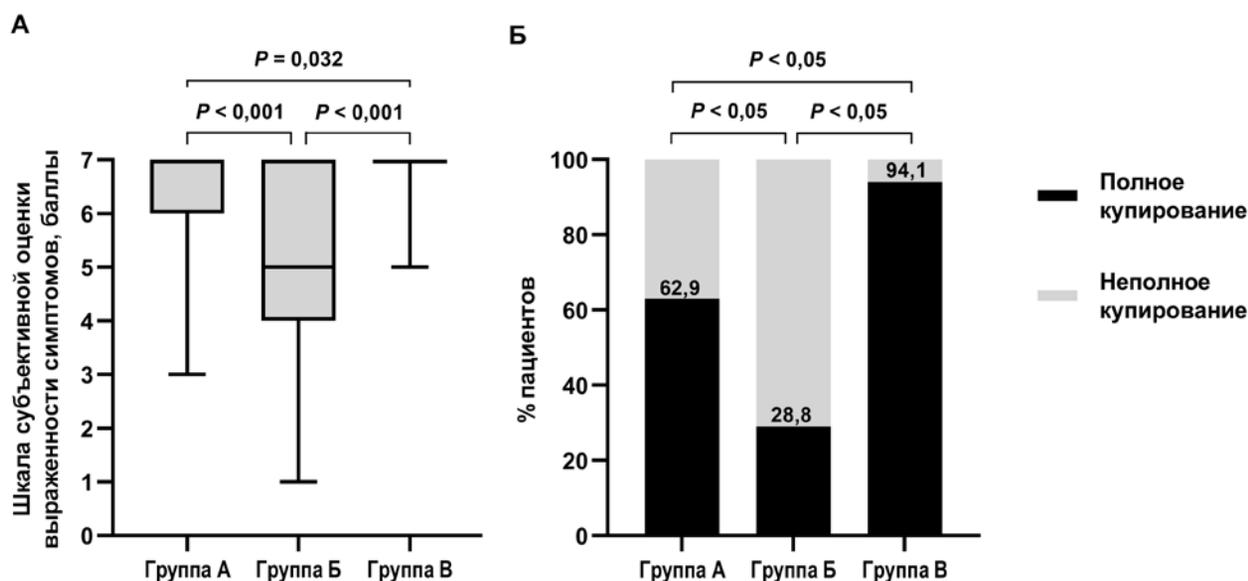


Рис. 4. Результаты субъективной оценки комплексного уменьшения симптомов хронического воспалительного процесса в ротоглотке по цифровой рейтинговой шкале у пациентов групп А, Б и В на 10-е сут после начала лечения.

4 А – баллы по шкале субъективной оценки комплексного улучшения симптомов в исследуемых группах. Данные представлены в виде диаграммы размаха («ящика с усами»), в которой границы «ящика» указывают 25-й и 75-й перцентили, «усы» – минимальное и максимальное значения, линия внутри «ящика» – медиану. Сравнения групп проводили с помощью критерия Краскела–Уоллиса и апостериорного критерия Данна; 4 Б представлена доля пациентов с полным купированием симптомов. Сравнения долей проводили с помощью критерия однородности хи-квадрат (2×3) и апостериорного z-критерия для двух долей (с поправкой Бонферрони на три попарных сравнения).

Fig. 4. The results of subjective assessment of resolution of the sore throat symptoms by the digital rating scale in the patient groups A, B and C on day 10 of treatment.

4 A – scores on the scale of subjective evaluation of the complex improvement of symptoms in the studied groups. The data are presented as a scaling diagram (“box and whiskers”), in which the boundaries of the “box” indicate the 25th and 75th percentiles, the “whiskers” indicate the minimum and maximum values, and the line inside the “box” indicates the median. The groups were compared using the Kruskal–Wallis criterion and the Dunn’s posterior criterion; 4 B presents the proportion of patients with complete resolution of symptoms. Fractional comparisons were made using the chi-square homogeneity test (2×3) and the posterior z-criterion for the two fractions (with Bonferroni correction for three pairwise comparisons).

эффект обусловлен способностью Валацикловира подавлять репродукцию возбудителя ГИ, формировать оптимальный иммунный ответ и длительно стабильно его поддерживать, что блокирует процессы реактивации и персистенции ГИ в очаге воспаления. Такие свойства Валацикловира предотвращают также развитие осложнений, связанных с активацией и со-

хранением ГИ в организме, купирует рецидивы воспаления ротоглотки, ассоциированные с ГИ. Важно, что и при ХВФПР, сочетающихся с ГИ, противовирусная терапия Валацикловиrom в дозе 500 мг 2 раза в сут в течение 10 сут предотвращает рецидивы заболевания, уменьшает выраженность боли в горле и симптомов воспаления ротоглотки (першение и диском-

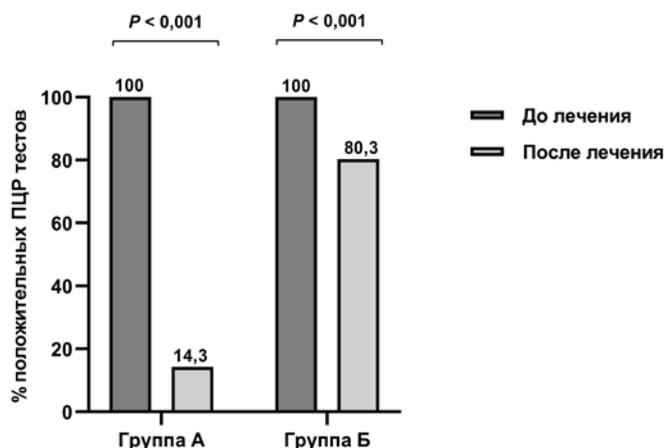


Рис. 5. Процент положительных ПЦР тестов в группах А и Б до и после лечения. Валацикловиrom. Сравнение проводили с помощью критерия однородности хи-квадрат (2 × 2). Сравнение степени снижения доли пациентов с положительным тестом на 30-е сут в группе А и отдельно в группе Б проводили с помощью теста McNemar.

Fig. 5. Percentage of positive PCR tests in groups A and B before and after Valacyclovir treatment.

The proportions of patients with a positive test between groups A and B were compared using the chi-square test (2 × 2). The degree of decrease in the proportion of patients with a positive test on day 30 in group A and separately in group B was compared using the McNemar test (p < 0.001 for both groups).

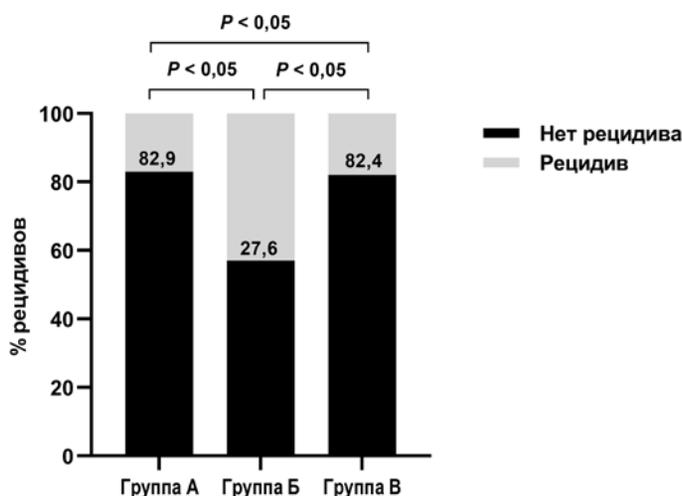


Рис. 6. Частота рецидивов (%) у пациентов с хроническими воспалительными формами патологии ротоглотки после проведения специфической или стандартной терапии через 6 мес от начала лечения. Черный цвет – отсутствие рецидивов, серый – наличие рецидивов у пациентов групп А, Б и В.

Fig. 6. Frequency of recurrence (%) in patients with chronic inflammatory forms of the oropharynx pathology after specific or standard therapy 6 months after the start of treatment. Black – no recurrence, gray – recurrence in patients in groups A, B and C.

форт в горле). Оценка состояния пациентов и наличия у них рецидивов через 6 мес от момента начала лечения показала в группе А высокую клиническую эффективность и отсутствие рецидивов воспаления ротоглотки у 82,85% обследованных. В группе Б, где проводилось «классическое» (стандартное) лечение, в течение 6 мес отсутствие рецидива заболевания наблюдалось только у 57,6 % больных.

Отсутствие рецидивов инфекции в условиях применения препарата способствует существенному снижению частоты и выраженности психоэмоциональных переживаний по поводу заболевания, комплаентности пациентов при проведении психологической реабилитации, что значительно повышает качество жизни.

Полученные в настоящем исследовании данные позволяют заключить, что у пациентов с ХВФПР, ассоциированными с ГИ при проведении специфической противовирусной терапии обеспечивается значительно более высокая эффективность лечения, по сравнению с группой пациентов, у которых проводилось стандартное лечение воспаления. Это подтверждается результатами фарингоскопической картины, показателями ВАШ и субъективной оценки выраженности симптомов. Показано также, что стандартная терапия ХВФПР, осложненных ГИ неэффективна. Успех лечения этой формы патологии обеспечивается лишь в условиях одновременной или предварительной эрадикации вируса.

В целом, результаты настоящей работы позволили предложить эффективный алгоритм терапии хронических воспалительных форм патологии ротоглотки, развивающихся на фоне герпесвирусной инфекции. Важно, что применение препарата Валациклоvir предотвращает развитие осложнений, связанных с активацией и персистенцией возбудителя ГИ в организме, а также купирует рецидивы воспаления ротоглотки, ассоциированные с ГИ.

Выводы:

1. Совокупность результатов клинических и лабораторных данных является основанием для выделения новой нозологической формы: «Вирусный тонзиллофарингит».

2. Моделирование биологического процесса заражения на культуре клеток VERO и ПЦР-диагностика в режиме Real-time доказывают роль герпесвируса как причины ХВФПР, а также эффективность проведения специфической противовирусной терапии Валациклоvirом.

3. Реализация алгоритма лечения хронических форм воспаления ротоглотки, ассоциированных с гер-

песвирусной инфекцией, предложенного в настоящей работе, обеспечивает высокую эффективность назначения Валацикловира в дозе 500 мг 2 раза в сутки ежедневно в течение 10 сут.

Литература

(п.п. 2–15; 17–22 см. References)

1. Хасанов С.А., Асроров А.А., Вохидов У.Н. Распространенность хронического тонзиллита в семье и его профилактика. *Вестник оториноларингологии*. 2006; 4: 38–40.
16. Белоусова Т.А., Горячкина М.В. Этиотропная терапия простого герпеса: фокус на валациклоvir. *Российский медицинский журнал*. 2015; 9: 520.

References

- 1.. Khasanov S.A., Asrorov A.A., Vokhidov U.N. Prevalence of chronic tonsillitis in the family circle and its prevention. *Vestnik otorinolaringologii*. 2006; 4: 38–40. (in Russian)
2. Georges Aoun, Ibrahim Nasseh, Hicham A. Diab., et al. Palatine Tonsilloliths: A Retrospective Study on 500 Digital Panoramic Radiographs. *J Contemp Dent Pract*. 2018; 19(10): 1284–7.
3. Abu Bakar M., McKimm J., et al. Chronic tonsillitis and biofilms: a brief overview of treatment modalities. *J Inflamm Res*. 2018; 11: 329–37. doi: 10.2147/JIR.S162486
4. Cole S. Herpes Simplex Virus: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Nurs Clin North Am*. 2020; 55(3): 337–45. doi: 10.1016/j.cnur.2020.05.004
5. Whitley R., Baines J. Clinical management of herpes simplex virus infections: past, present, and future. *F1000Res*. 2018; 7:F1000 Faculty Rev-1726. doi: 10.12688/f1000research.16157.1
6. Zhu S., Viejo-Borbolla A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence*. 2021;12(1):2670–2702. doi: 10.1080/21505594.2021.1982373
7. Rousseau A., Labetoulle M. Ocular manifestations of herpes simplex viruses. *Virologie (Montrouge)*. 2020; 24(5): 295–306. doi: 10.1684/vir.2020.0863
8. Sibley D., Larkin D.F.P. Update on Herpes simplex keratitis management. *Eye (Lond)*. 2020; 34(12): 2219–26. doi: 10.1038/s41433-020-01153-x
9. Luyt C.E. Herpes simplex virus pneumonia. *Virologie (Montrouge)*. 2020; 24(5): 307–13. doi: 10.1684/vir.2020.0860
10. Huang C.W., Hsieh C.H., Lin M.R., Huang Y.C. Clinical features of gingivostomatitis due to primary infection of herpes simplex virus in children. *BMC Infect Dis*. 2020; 20(1): 782. doi: 10.1186/s12879-020-05509-2
11. Zhang S.Y. Herpes simplex virus encephalitis of childhood: inborn errors of central nervous system cell-intrinsic immunity. *Hum Genet*. 2020; 139(6–7): 911–8. doi: 10.1007/s00439-020-02127-5
12. Proenca-Modena J.L., Cardoso Pereira Valera F., Gerhardinger Jacob M., et al. High Rates of Detection of Respiratory Viruses in Tonsillar Tissues from Children with Chronic Adenotonsillar Disease. *PLoS One*. 2012; 7(8): e42136.
13. Needham C.A., McPherson K.A., Webb K.H. Streptococcal pharyngitis: impact of a high-sensitivity antigen test on physician

- outcome. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(12): 3468-73. doi: 10.1128/JCM.36.12.3468-3473.1998
14. Michael Tsatsos, Cheryl MacGregor, et al. Herpes simplex virus keratitis: an update of the pathogenesis and current treatment with oral and topical antiviral agents. *Clin Exp Ophthalmol.* 2016; 44(9): 824-37. doi: 10.1111/ceo.12785
 15. Yao H., Zhu C., Liu L., Hu H. Different dosages of valaciclovir for the treatment of herpes zoster in adults: A randomized clinical study. *J Clin Pharm Ther.* 2021; 46(3): 717-23. doi: 10.1111/jcpt.13336
 16. Belousova T.A., Goryachkina M.V. Etiotropic therapy of herpes simplex: focus on valacyclovir. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal.* 2015; 9: 520. (in Russian)
 17. Bist A., Savitha A., Gumma K.M. Efficacy of valacyclovir and famciclovir in herpes zoster: A comparative study. *Indian J Pharmacol.* 2020; 52(6): 472-5. doi: 10.4103/ijp.IJP_555_18
 18. Shannon Cole. Herpes Simplex Virus: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Nurs Clin North Am.* 2020; 55(3): 337-45. doi: 10.1016/j.cnur.2020.05.004
 19. Kalezic T., Mazen M., Kuklinski E., Asbell P. Herpetic eye disease study: lessons learned. *Curr Opin Ophthalmol.* 2018; 29(4): 340-6. doi: 10.1097/ICU.0000000000000482
 20. Henrique Pott Junior, Monalisa F Bocchi de Oliveira, Sheley Gambero, et al. Randomized clinical trial of famciclovir or acyclovir for the treatment of herpes zoster in adults. *Int J Infect Dis.* 2018; 72: 11-5. doi: 10.1016/j.ijid.2018.04.4324
 21. Kimiyasu Shiraki, Long Tan, Tohru Daikoku, et al. Viral ribonucleotide reductase attenuates the anti-herpes activity of acyclovir in contrast to amenamevir. *Antiviral Res.* 2020; 180: 104829. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104829
 22. Christina M. Hunt, Hannah M. Gregory, William Gannon, et al. Oral Valacyclovir Treatment of Herpes Zoster Ophthalmicus-Induced Optic Neuritis. *Cureus.* 2021; 13(8):e17033. doi: 10.7759/cureus.5tce17033

Сведения об авторах:

Попова И.А., канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии Института биодизайна и моделирования сложных систем, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);

Литвицкий П.Ф., член-кор. РАН, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии Института биодизайна и моделирования сложных систем, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);

Будник И.А., доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии Института биодизайна и моделирования сложных систем, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет);

Андриуца Н.С., канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии Института биодизайна и моделирования сложных систем, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092.9

Лобанов А.В.¹, Перепеченова Н.А.², Захарова И.А.¹, Лобанова Н.Н.¹, Морозов С.Г.¹

Влияние пренатального и постнатального воздействия антител к белку S100B на формирование поведения мышей в гнездовом и ювенильном периодах развития

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

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

²Филиал ФГБНУ «Институт биоорганической химии им. академ. М.М. Шемякина и академ. Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, 142290, Московская область, Россия, Пущино, пр. Науки, д. 6

Введение. Моделирование аутоиммунных процессов у самок животных во время беременности используется для воспроизведения различных нарушений развития нервной системы их потомства.

Цель исследования – изучение влияния материнских антител к белку S100B у мышей в пренатальном и постнатальном периодах на формирование поведения потомства в гнездовом и ювенильном периодах развития.

Методика. В исследовании были использованы мыши, которые развивались в условиях воздействия материнских антител к S100B до рождения за счет материнско-фетального переноса или после рождения за счет передачи антител с молоком. Поведение мышей изучали в гнездовом и ювенильном периодах в тестах: Y-образный лабиринт, приподнятая платформа, удерживание за хвост, открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт.

Результаты. Характер нарушений поведения животных зависел от сроков воздействия антител к S100B в их онтогенезе. Депрессивный, нетревожный фенотип в гнездовом и ювенильном периодах развития был связан с влиянием антител до рождения. Воздействие антител после рождения вызывало развитие гиперактивности в незнакомой обстановке в подростковом возрасте.

Заключение. Наиболее вероятной причиной выявленных поведенческих особенностей является нарушение созревания серотонинергической системы за счет изменения модулирующего действия белка S100B на разных этапах формирования мозга. Полученные результаты имеют значение для понимания особенностей адаптации к условиям окружающей среды в онтогенезе.

Ключевые слова: мыши; антитела к S100B; нарушение развития поведения; депрессивный, нетревожный фенотип; гиперактивность

Для цитирования: Лобанов А.В., Перепеченова Н.А., Захарова И.А., Лобанова Н.Н., Морозов С.Г. Влияние пренатального и постнатального воздействия антител к белку S100B на формирование поведения мышей в гнездовом и ювенильном периодах развития. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 49-60.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.49-60

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Морозов С.Г., Лобанов А.В.; сбор и обработка материала – Лобанов А.В., Перепеченова Н.А., Захарова И.А., Лобанова Н.Н., подготовка иллюстративного материала – Лобанов А.В., Захарова И.А., Лобанова Н.Н., статистическая обработка – Лобанов А.В., Перепеченова Н.А., написания текста – Лобанов А.В., редактирование – Морозов С.Г., Лобанов А.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Лобанов Александр Владимирович, e-mail: lobanov-av@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке ФГБНУ «НИИОПП» по теме НИР FGFU-2022-0011.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.08.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Lobanov A.V.¹, Perepechenova N.A.², Zakharova I.A.¹, Lobanova N.N.¹, Morozov S.G.¹**Effect of prenatal and postnatal exposure to S100B protein antibodies on the behavior of mice in nesting and juvenile periods of development**¹Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya St. 8, Moscow, 125315, Russian Federation²Branch of the Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Prospekt Nauki 6, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russian Federation

Models of autoimmune processes in female animals during pregnancy are used to simulate various neurodevelopmental disorders in their offspring. The aim of this study was to investigate the effect of maternal S100B protein antibodies of mice in the prenatal and postnatal periods on the formation of offspring behavior during the nesting and juvenile periods of development.

Methods. The study used mice that developed under the exposure to maternal S100B antibodies before birth through the maternal-fetal transfer or after birth through the antibody transfer with milk. The behavior of the mice was studied during the nesting and juvenile periods using the tests of Y-shaped maze, elevated platform, tail holding, open field, and elevated cross-maze. Results. The pattern of behavioral disorders depended on the timing of the exposure to S100B antibodies in their ontogenesis. The depressive, non-anxious phenotype in the nesting and juvenile periods of development was associated with prenatal exposure to antibodies. Postnatal exposure to antibodies caused the development of hyperactivity in unfamiliar environments during adolescence.

Conclusion. The most probable cause of the observed behavioral disorders is impaired maturation of the serotonergic system due to changed modulating action of the S100B protein at different stages of brain formation. The results obtained are of great importance for understanding the peculiarities of adaptation to environmental conditions in ontogenesis.

Keywords: mice; antibodies to S100B; disorders of behavioral development; depressive, non-anxiety phenotype; hyperactivity

For citation: Lobanov A.V., Perepechenova N.A., Zakharova I.A., Lobanova N.N., Morozov S.G. Effect of prenatal and postnatal exposure to S100B protein antibodies on the behavior of mice in nesting and juvenile periods of development.

Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2022; 66(4): 49-60. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.49-60

Authors' contributions: the concept and design of the study – Morozov S.G., Lobanov A.V., collection and processing of material – Lobanov A.V., Perepechenova N.A., Zakharova I.A., Lobanova N.N., preparation of illustrative material – Lobanov A.V., Zakharova I.A., Lobanova N.N., statistical processing – Lobanov A.V., Perepechenova N.A., text writing – Lobanov A.V., editing – Morozov S.G., Lobanov A.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Aleksandr V. Lobanov*, Senior Researcher, Laboratory of General and Perinatal Neuroimmunopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology, e-mail: lobano-av@yandex.ru

Information about the authors:Lobanov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5159-3227>Perepechenova N.A., <https://orcid.org/0000-0001-9239-2926>Zakharova I.A., <https://orcid.org/0000-0002-5648-4214>Lobanova N.N., <https://orcid.org/0000-0001-5860-0453>Morozov S.G., <https://orcid.org/0000-0001-5822-5729>

Financing. The work was financially supported by the FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology» on the research topic FGUFU-2022-0011.

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

Received 03.08.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

S100B относится к семейству кальций-связывающих белков, экспрессируется преимущественно в астроглиальных клетках центральной нервной системы и составляет до 0,5% всех белков мозга [1]. В развивающемся мозге грызунов S100B начинает вырабатываться в клетках предшественниках нейронов и глии

начиная с 7,5 эмбриональных суток (ЭС) [2]. Известно, что белок S100B оказывает нейротрофическое действие в отношении серотонинергических нейронов [3], улучшает формирование отростков нейронов в гиппокампе и коре, защищает нейроны от токсического действия алкоголя в пренатальном периоде [3]. S100B опосредует модулирующее действие серотонина (5-HT) на формирование и поддержание синаптической пластично-

сти [4]. Изменение активности 5-HT в чувствительные периоды развития нервной системы влияет на формирование функций мозга [5] и может быть связано с нарушением метаболизма S100B [6].

Снижение уровня внеклеточного S100B за счет использования антител к белку S100B (АТ к S100B) является одним из способов изменений эффектов белка. Возможно как экзогенное введение антител (АТ) животным [7], так и стимулирование выработки собственных аутоантител [8]. До рождения у грызунов активное проникновение АТ в мозг происходит с 12 по 15,5 ЭС [9]. Ограничение переноса связано с формированием гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [9]. После рождения перенос АТ от матери детенышам происходит с молоком [10]. АТ к белку S100B в крови потомства иммунизированных мышей находятся на высоком уровне не менее 35 сут. после рождения [11]. Проникновение АТ в мозг после барьерогенеза составляет 0,1-0,2 % от концентрации в циркулирующей в крови [12], зависит от уровня АТ в крови и, как мы предполагаем, увеличивается при моделировании аутоиммунного ответа.

В предыдущем исследовании на мышах нами было показано, что у потомства иммунизированных S100B мышей формировался фенотип сниженного чувства страха и тревожности в гнездовом периоде [12]. Такой фенотип мог формироваться как за счет материнско-фетального переноса АТ к S100B в пренатальном периоде, так и в результате передачи АТ через молоко в постнатальном периоде. Нами было сделано предположение, что эффекты АТ к S100B на формирование поведения у животных зависят от периода воздействия АТ на развивающийся мозг. Вызванные дефицитом S100B нарушения поведенческих фенотипов в детском возрасте, могут также сохраняться в подростковом периоде.

Цель исследования – изучение влияния материнских АТ к S100B у мышей в пренатальном и постнатальном периодах на формирование поведения в гнездовом и ювенильном периодах развития.

Методика

В исследовании были использованы свободные от специфических патогенов половозрелые самки и самцы мышей ICR, полученные из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, Пушкино. Работы на животных проводили в лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН, в соответствии с регламентом декларации ЕС от 22 сентября 2010 г. об использовании лабораторных животных в научных целях. Протокол исследований одобрен локальным этическим комитетом института.

Было сформировано 4 группы мышей: «Контроль»; воздействие АТ к S100B после рождения – группа «Выкармливание S100B»; воздействие АТ к S100B до рождения – группа «Вынашивание S100B» и группа «S100B» – воздействие АТ к S100B до и после рождения). Распределение животных по группам в эксперименте и протоколы иммунизации представлены в **таблице 1**.

Иммунизация. Для получения аутоиммунного ответа к белку S100B самок мышей четырехкратно иммунизировали. 1-ю иммунизацию проводили с использованием полного адьюванта Фрейнда, 2-, 3- и 4-ю – с использованием неполного адьюванта Фрейнда. Возраст мышей при 1-й иммунизации 8 нед. Интервал между первыми тремя иммунизациями составлял 10 сут, между 3-й и 4-й – 1 мес. Ложную иммунизацию проводили по аналогичной схеме. На следующие сутки после 4-й иммунизации животных ссаживали. До ссажки допускались животные с титром АТ не менее 1:3200 после 3-й иммунизации. Суспензия для подкожного введения готовилась (на одно животное) из расчета 10 мкг белка S100B (Sigma, США), 150 мкл физиологического раствора и 150 мкл адьюванта Фрейнда (Sigma, США). Суспензию для ложной иммунизации готовили из физиологического раствора и адьюванта Фрейнда без добавления белка.

Получение и тестирование потомства. Самок группы «Выкармливание S100B» и группы «S100B» иммунизировали белком S100B. Самок группы «Контроль» и «Вынашивание S100B» подвергали ложной иммунизации. Затем животных всех групп ссаживали с самцами для получения потомства. Ссадку проводили на следующие сутки после 4-й иммунизации.

Потомство, полученное от самок контрольной группы и группы «S100B» оставляли в домашней клетке. Потомство группы «Вынашивание S100B» и «Выкармливание S100B» на следующие сутки после рождения меняли местами. Таким образом, в группе «Вынашивание S100B» самка с ложной иммунизацией выкармливала детенышей, рожденных от иммунизированной самки. В группе «Выкармливание S100B» иммунизированная S100B самка выкармливала детенышей, рожденных от ложноиммунизированной самки (**табл. 1**).

Полученное потомство исследовали в гнездовом периоде с 1-х по 21-е постнатальные сутки (ПС). Исследование пометов начинали на следующие сутки после рождения (1 ПС). Определяли пол мышей и наносили цветные метки нетоксичным маркером, которые возобновляли ежедневно. Тест спуска животных с приподнятой платформы в чистую клетку или клетку

с домашними опилками проводили с 10-х по 18-е ПС. Мышей сначала тестировали на спуск в чистую, а затем домашнюю клетку. Животное помещали в центр приподнятой платформы (куб 10x10x10) и наблюдали в течение 120 с. Определяли способность спуска с приподнятой платформы. Тестирование в Y-лабиринте (размер рукава 6x6 см) проводили с 9-х по 14-е ПС (до момента открытия глаз). В одном рукаве находились опилки из домашней клетки, два другие отсека были пустыми. Тест состоял из трех подходов по 30 с, интервал между попытками – 60 с. При 2-м и 3-м проходе расположение отсека с «домашними» опилками меняли на противоположное относительно предыдущего тестирования и оценивали способность животного найти отсек с «домашними» опилками. Если животное не находило домашний отсек, а попадало в чистый, засчитывалась ошибка. Определяли время захода в каждый из рукавов лабиринта.

В возрасте 5-6 нед (ювенильный период у грызунов), поведение животных изучали в открытом поле (ОП), приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ),

тесте «удерживания за хвост». Исследования в каждом тесте проводили в отдельный день. Порядок тестирования был одинаковым для всех животных.

Тест ОП проводили с использованием многофункциональной системы исследования поведения (TSE MultiConditioning, Германия). Размер квадратной арены ОП составлял 40 x 40 см, тестирование проводили при освещении 500 лк, тест длился 10 мин и начинался в центре площадки. В ОП определяли общую дистанцию, дистанцию в центре, время в центре и на периферии, число заходов в центр, среднюю скорость передвижения, число стоек. Тест ПКЛ проводили в приподнятом на 50 см лабиринте из серого пластика с рукавами 30 x 6 см. Продолжительность теста составляла 5 мин при интенсивности освещения 200 лк; в начале тестирования животное помещали в центральную часть мордой в сторону открытого отсека. В тесте оценивали время пребывания в открытых, закрытых рукавах и на центральной площадке, число заходов в открытые и закрытые рукава. В тесте «удерживания за хвост» животных поднимали за хвост над горизон-

Таблица 1/ Table 1

Распределение животных по группам и протоколы иммунизации

Distribution of animals by groups and immunization protocols

Группы Group	Иммунизация/ложная иммунизация Immunization / false immunization	Перемещение потомства после рождения / Moving the offspring after birth	Число самок в эксперименте / Number of females in the experiment
Контроль Control	150 мкл физраствора + 150 мкл адьюванта Фрейнда* 150 µl saline solution + 150 µl Freund's adjuvant*	Свое потомство (нет воздействия АТ-S100В) Your offspring (no AT-S100B exposure)	5 + 3 ^β
Выкармливание S100B Feeding S100B	10 мкг белка S100B + 150 мкл физраствора + 150 мкл адьюванта Фрейнда* 10 µg S100B protein + 150 µl saline + 150 µl Freund's adjuvant*	Потомство от ложно-иммунизированной самки (воздействие АТ к S100B после рождения) Offspring from a falsely immunized female (exposure to AT to S100B after birth)	5
Вынашивание S100B α Carrying S100B α	150 мкл физраствора + 150 мкл адьюванта Фрейнда* 150 µl saline solution + 150 µl Freund's adjuvant*	Потомство от иммунизированной самки (воздействие АТ к S100B до рождения) Offspring from an immunized female (exposure to AT to S100B before birth)	4
S100B	10 мкг белка S100B + 150 мкл физраствора + 150 мкл адьюванта Фрейнда* 10 µg S100B protein + 150 µl saline + 150 µl Freund's adjuvant*	Свое потомство (воздействие АТ к S100B до и после рождения) Their offspring (exposure to AT to S100B before and after birth)	4 + 3 ^β

Примечание. * – было проведено 4 иммунизации, 1-я иммунизация проводилась с использованием полного адьюванта Фрейнда, 2-я, 3-я и 4-я – с использованием неполного адьюванта Фрейнда, α – ложная иммунизация; β – животные для исследования содержания белка S100B в крови и молоке.

Note. * – four immunizations were carried out, the first immunization was carried out using complete Freund's adjuvant, the second, third and fourth using incomplete Freund's adjuvant, α – sham immunization; β – additional animals for the study of the S100B protein content in blood and milk.

тальной поверхностью на высоту 30 см и удерживали в течение 60 с. Оценивали число и продолжительность смыкания конечностей за время теста.

ИФА исследования. Антитела к белку S100B определяли в крови животных всех групп через 10 сут после 3-й иммунизации (или ложной иммунизации). Образцы крови забирали из орбитального синуса для получения сыворотки. Антитела в сыворотке крови определяли стандартным твердофазным методом ИФА [13].

Дополнительно в контрольной группе и группе «S100B» у 3 животных каждой из этих групп на 9-е сут после родов собирали молоко и брали образцы крови. Образцы сыворотки крови и молока анализировали на количество белка S100B методом ИФА с использованием коммерческого набора «Mouse soluble Protein-100B (S-100B) ELISA Kit» 11 птCSB-EL020643МО (Cusabio Biotech Co., Ltd, США). Анализ проводили в соответствии с инструкцией производителя.

Статистическая обработка данных. Для результатов, которые оценивались бинарно, вычисляли средние значения для группы в процентах и определяли модифицированный доверительный интервал. Для численных данных рассчитывали средние значения и стандартные ошибки среднего. Бинарные данные сравнивали по Фишеру с определением критерия χ^2 , численные – методом ANOVA, ANOVA2 тест Дункана или Kruskal-Wallis ANOVA тест (программа Statistica 7.1 (StatSoft, США)).

Исследование было проведено с использованием оборудования ЦКП «Прикладная Генетика» МФТИ. (Соглашение № 075-15-2021-684).

Результаты

Влияние иммунизации мышшей на формирование поведения их потомства в гнездовом периоде. При тестировании спуска мышшей с приподнятой платформы в клетку с домашними опилками или чистую клетку изучалась способность животных избегать ограниченное обрывами пространство и спускаться вниз, преодолевая страх высоты. В контрольной группе в первые дни тестирования (10-е – 12-е ПС) большинство животных спускалось с платформы в домашнюю клетку, затем, на 13-е ПС наблюдалось снижение числа животных, способных спуститься, восстановление этой способности отмечалось на 15-е – 16-е ПС. Для контрольной группы различия в изучаемой способности были определены между 11-ми и 13-ми ПС ($\chi^2=12,54$; $p=0,0004$), 13-ми и 16-ми ПС ($\chi^2=10,73$; $p=0,0011$) (рис. 1, А). У мышшей экспериментальных групп наблюдалось постепенное увеличение числа спускающихся

животных с 10-х по 15-е ПС без периода снижения способности. Сравнительный анализ выявил значительно меньшее число спусков в «домашние опилки» относительно контрольной группы в группе «S100B» на 10-е, 11-е, 13-е, 14-е ПС и группе «Вынашивание S100B» – на 11-е, 13-е, 14-е ПС. У животных группы «Выкармливание S100B» значимых отличий от контрольной группы не выявлено. На 14-е ПС животные группы «Выкармливание S100B» реже спускались с платформы, чем животные групп «S100B» и «Вынашивание S100B» (рис. 1, А).

Динамика формирования спуска с приподнятой платформы в чистую клетку у животных контрольной группы и группы «Выкармливание S100B» характеризовалась этапом снижения способности спускаться с последующим этапом восстановления. На 14-е ПС животные контрольной группы значительно меньше спускались в чистую клетку, чем на 10-е ПС ($\chi^2=10,58$; $p=0,001$) и на 16-е ПС ($\chi^2=12,01$; $p=0,0005$) (рис. 1, Б). Мыши группы «Выкармливание S100B» на 13-е ПС реже спускались с платформы чем на 10-е ПС ($\chi^2=9,82$; $p=0,0017$), на 14-е ПС число спусков значительно увеличилось в сравнении с 13-ми ПС ($\chi^2=5,35$; $p=0,02$). У животных групп «Вынашивание S100B» и «S100B» значимого снижения способности к спуску в течение периода тестирования не обнаружено. Межгрупповое сравнение показало, что животные группы «S100B» значительно чаще спускались в чистую клетку в сравнении с контролем на 13-е – 17-е ПС и группой «Выкармливание S100B» на 13-е ПС (рис. 1, Б). Мыши группы «Вынашивание S100B» чаще спускались в чистую клетку в сравнении с животными контрольной группы на 13–15-е ПС и группой «Выкармливание S100B» на 13–14 ПС (рис. 1, Б). У мышшей группы «Выкармливание S100B» значимых различий в тестах спуска в домашнюю и чистую клетки в сравнении с контрольной группой не было.

Результаты этого теста показали, что пренатальное воздействие АТ нарушало формирование «поведения страха» в детском возрасте. У мышшей контрольной группы усиление «страха перед обрывом» на приподнятой платформе возникало на 13-е – 15-е ПС, что соответствовало норме [14]. У мышшей, которые подвергались воздействию АТ к S100B до рождения, «страх перед обрывом» не формировался, и животные продолжали преодолевать его и спускаться с платформы в «домашнюю» или «чистую» клетки. Снижение страха не исключало повышенной исследовательской активности, связанной со стремлением изучать неизвестную область внизу под обрывом.

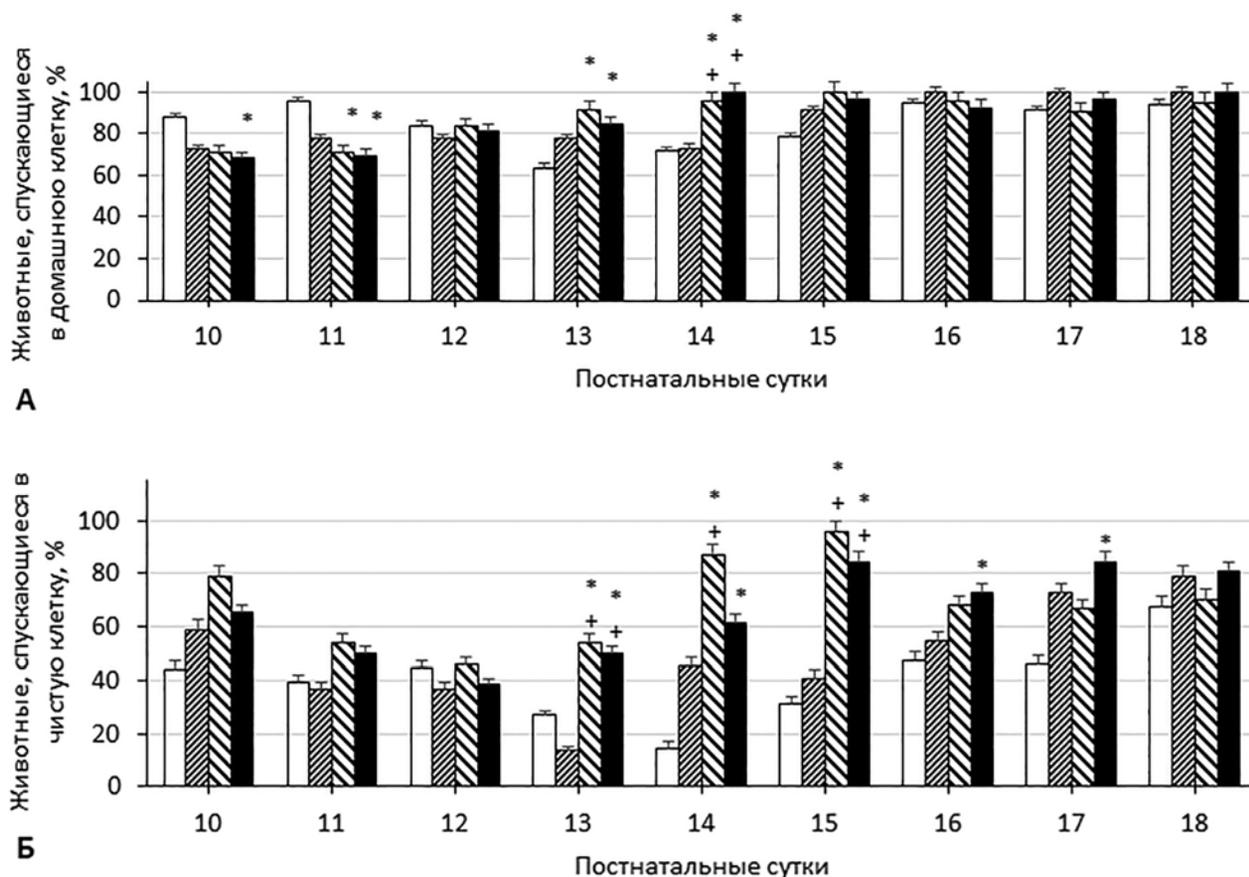


Рис. 1. Спуск мышей с приподнятой платформы в домашнюю (А) и чистую (Б) клетки.

Число спускающихся животных (в % ± доверительный интервал); n – количество животных в группе; * – p<0,05 относительно контрольной группы; + – p<0,05 относительно группы «Выкармливание S100B» (по Фишеру, критерий Chi²).

Fig. 1. Descending mice from an elevated platform into a home cage (A) and a clean cage (B).

Data are presented as percentage of descending animals ± confidence interval; n is the number of animals in the group; * – p<0.05 relative to the control group; + – p<0.05 relative to the group “S100B Feeding” (according to Fisher, Chi2 criterion).

В Y-образном лабиринте изучалась пространственная ориентация мышей, функционирование у них рабочей памяти, исследовательская активность на 13-е -14-е ПС. При первом помещении в лабиринт животные ориентировались и выбирали направление движения преимущественно в отсек с «домашним запахом». Ошибочный выбор чистого отсека перед заходом в домашний рукав указывал на сложности в пространственной ориентации или стремлении исследовать незнакомые (без домашнего запаха) области в лабиринте. У большинства животных во всех группах способность ориентироваться в лабиринте была сформирована на 13-е ПС. На 14-е ПС при первом помещении в лабиринт животные группы «S100B» значимо хуже находили домашний отсек в сравнении с контролем. Количество животных, со-

вершающих ошибки в лабиринте на 14-е ПС, было значимо больше у мышей группы «Вынашивание S100B» и «S100B» в сравнении с контролем (табл. 2).

При 2-м и 3-м помещении мышей в Y-образный лабиринт после смены стороны размещения «домашних опилок» на противоположную, изучалась способность мышей ориентироваться в пространстве с участием рабочей памяти, а также исследовательская активность. Оценивали безошибочный выбор домашнего отсека или ошибку выбора. Ошибка выбора указывала на ориентацию по памяти в направлении расположения «домашних опилок» при предыдущем тестировании (чистого отсека в момент исследования). Исследовательскую активность оценивали по посещению животными чистого отсека после захода в до-

машин. Представлены результаты тестирования мышей при 3-м помещении в лабиринт. Анализировалось поведение только тех животных, которые были обучены находить домашний отсек при предыдущем посещении лабиринта. Статистически значимых различий в выборе домашнего отсека и выборе чистого отсека (ориентация по памяти) между животными всех групп на 13-е–14-е ПС не выявлено. Животные группы «S100B» за период тестирования после посещения домашнего отсека чаще заходили в чистый отсек в сравнении с контрольными (табл. 2).

Исследованием незнакомой области при 1-м помещении в Y-образный лабиринт, а также посещение чистого рукава после захода в домашний рукав при 3-м помещении в лабиринт являлись показателями повышенной исследовательской активности. Наибольшую исследовательскую активность при 1-м и 3-м посещениях лабиринта проявляли мыши с сочетанным воздействием АТ к S100B до и после рождения. У мышей

только с пренатальным влиянием АТ повышенная исследовательская активность возникала при 1-м посещении лабиринта (табл. 2).

Влияние иммунизации мышей на формирование поведения в ювенильном периоде. Результаты тестирования мышей в возрасте 5–6 нед (ювенильный период) представлены только для самцов из-за формирования полового диморфизма в поведении в этом возрасте.

Поведение мышей в ОП оценивали двумя методами: поминутно (в работе приведены результаты для 1-, 5- и 10-й минутами) и целиком за весь период тестирования в течение 10 мин. Исследование поведения животных сразу после помещения в ОП позволяло оценить реакцию животных на новую анксиогенную обстановку. В 1-ю мин исследования мыши группы «Выкармливание S100B» реагировали на новую обстановку повышенной двигательной активностью (рис. 2, А-В). За 1-ю мин эти животные проходили большую общую дистанцию и большую дистанцию в центре поля при бо-

Таблица 2/Table 2

Поведение мышей в Y-образном лабиринте в гнездовом периоде
Behavior of mice in a Y-maze in the nesting period

Группа Group	1-й проход в Y-лабиринте Pass 1 in the Y-maze		3-й проход в Y-лабиринте, только обученные животные Pass 3 in the Y-maze, only trained animals		
	Выбор домашнего отсека, % Choice of home compartment, %	Ошибка выбора домашнего отсека, % Error in selecting the home compartment, %	Выбор домашнего отсека, % Choice of home compartment, %	Ошибка выбора домашнего отсека, % Error in selecting the home compartment, %	Выбор чистого отсека после домашнего, % Choice of clean compartment after home, %
13-е ПС (13 postnatal day)					
Контроль	75±16	18±14	59±21	32±19	4±4
Выкармливание S100B / Feeding S100B	81±17	19±17	62±21	19±17	5±5
Вынашивание S100B / Carrying S100B α	71±18	17±15	70±19	26±18	9±9
S100B	73±17	23±16	75±17	21±16	19±17
14-е ПС (14 postnatal day)					
Контроль Control	91±9	7±7	61±15	37±15	2±2
Выкармливание S100B / Feeding S100B	87±27	10±10	75±25	25±25	0±0
Вынашивание S100B / Carrying S100B α	71±24	29±24 *	79±21	20±20	14±14
S100B	53±24 *	41±23 *	81±19	19±19	25±21 *

Примечание. Данные представлены в процентах ± доверительный интервал; * – $p < 0,05$ относительно контрольной группы (по Фишеру, критерий Chi2).

Note. The data are presented as a percentage ± confidence interval; * – $p < 0.05$ relative to the control group (according to Fischer, Chi2 criterion).

лее высокой средней скорости в сравнении с животными контрольной группы, группами «Вынашивание S100B» и «S100B», а также собственными показателями на 5-й и 10-й мин. Вертикальная активность у мышей всех групп в 1-ю мин в ОП была ниже, чем в последующие периоды. Межгрупповых различий в вертикальной активности мышей не выявлено (рис. 2, Г).

Результаты тестирования мышей в ОП в течение 10 мин представлены в таблице 3. У самцов мышей, рожденных от иммунизированных самок (группа «Вынашивание S100B» и группа «S100B»), отмечено увеличение общей дистанции передвижения на площадке и более активное поведение в центральном квадрате в сравнении с контролем. Выявленное уве-

личение продолжительности пребывания, частоты посещения и большей дистанции в центре ОП являлись признаками снижения тревожности и усиления поведения, связанного с риском [15]. Увеличение общей дистанции было связано с повышенной исследовательской активностью [16]. Различий в количестве стоек на периферии между экспериментальными и контрольной группами не было. При этом мыши групп «Вынашивание S100B» и «S100B» проявляли большую исследовательскую активность, которая характеризовалась увеличением числа стоек, в сравнении с поведением животных группы «Выкармливание S100B». У мышей группы «Выкармливание S100B» по всем исследуемым параметрам поведения значимых различий с животны-

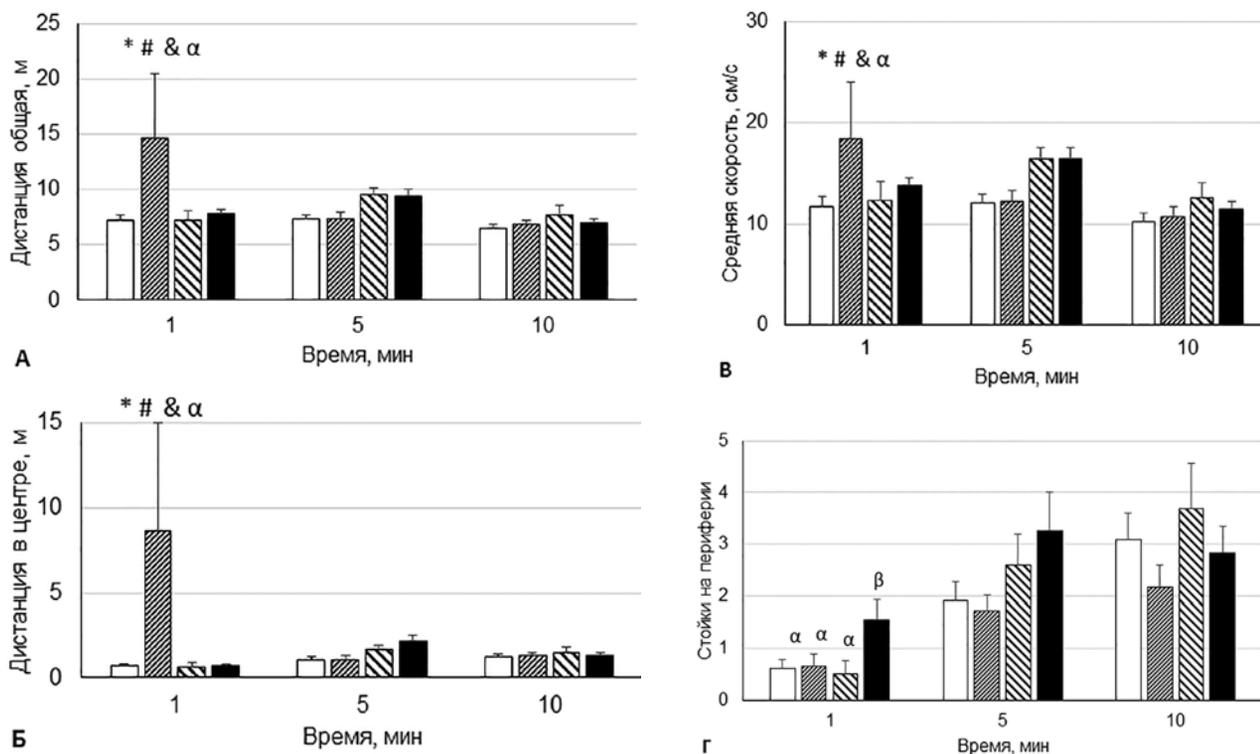


Рис. 2. Поведение самцов мышей в возрасте 5 нед в ОП за 1-, 5- и 10-ю минуты.

А – Общая дистанция в ОП, Б – дистанция в центре, В – средняя скорость передвижения в ОП, Г – стойки на периферии. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего; n – количество животных в группе; * – $p < 0,05$ относительно значений в контрольной группе за 1-ю мин, # – $p < 0,05$ относительно значений группы «Вынашивание S100B» за 1-ю мин, & – $p < 0,05$ относительно значений группы «S100B» за 1-ю мин, α – $p < 0,05$ относительно собственных значений за 5-ю и 10-ю мин, β – $p < 0,05$ относительно собственных значений за 5-ю мин (ANOVA-2, Duncan’s test).

Fig. 2. Behavior of male mice at the age of 5 weeks in OF for the 1-st, 5-th, 10-th minutes.

(A) is the total distance in the OF, (B) is the distance in the center, (B) is the average speed of movement in the OF, (Г) is the rears on the periphery. The data is presented as an arithmetic mean ± standard error of the mean; n is the number of animals in the group; * – $p < 0.05$ relative to the values in the control group for the first minute, # – $p < 0.05$ relative to the values of the group “Bearing S100B” for the first minute, & – $P < 0.05$ relative to the values of the group “S100B” for the first minute, α – $p < 0.05$ relative to the eigenvalues for the fifth and tenth minutes, β – $p < 0.05$ relative to the eigenvalues for the fifth minute (ANOVA-2, Duncan’s test).

ми контрольной группы не было. В сравнении с животными групп «Вынашивание S100B» и «S100B» мыши группы «Выкармливание S100B» реже посещали и меньше времени находились в центральном квадрате.

Исследование поведения животных в тесте подвешивания за хвост в подростковом возрасте показало, что мыши групп «Вынашивание S100B» и «S100B» меньше времени боролись, пытаясь избежать опасного положения. Время смыкания задних конечностей у животных этих групп было продолжительнее, чем у животных контрольной группы и группы «Выкармливание S100B» (табл. 4). Такое увеличение периода иммобилизации считается показателем отчаяния [17].

В тесте ПКЛ животные групп «Вынашивание S100B» и «S100B» больше времени проводили в открытых рукавах и в центральной части лабиринта в сравнении с контролем и группой «Выкармливание S100B» (табл. 5). Увеличение времени в открытых рукавах является показателем меньшей тревожности, а нахождение в центральной части лабиринта указывает на сложности в принятии решения по выбору направления исследования лабиринта [18].

Влияние иммунизации мышей на содержание белка S100B в крови и молоке. Концентрация белка S100B в молоке иммунизированных животных была значительно ниже, чем в молоке самок контрольной группы. Межгрупповых различий по содержанию белка S100B в крови не обнаружено. У одной из трех самок контрольной группы содержание белка в сыворотке крови составляло 1,5 пг/мл. В крови иммунизированных самок белок S100B выявлен не был (табл. 6).

Обсуждение

Результаты проведенного исследования позволили выявить различия пренатального и постнатального воздействия материнских антител к белку S100B на развитие и поведение потомства в гнездовом и подростковом периодах.

Иммунизация самок мышей белком S100B вызвала значительное увеличение уровня АТ к этому белку в крови животных через 10 сут после введения антигена. Садка животных проводилась на следующий день после последней иммунизации, поэтому наиболее выраженный иммунный ответ совпадал с периодом

Таблица 3/ Table 3

Поведение в открытом поле у самцов мышей в возрасте 5 недель за 10 мин теста

Behavior in the open field for 10 minutes of the test in male mice at the age of 5 weeks

Параметры тестирования поведения Behavior testing parameters	Группы / Group			
	Контроль / Control	Выкармливание S100B / Feeding S100B	Вынашивание S100B / Carrying S100B ^α	S100B
	n=24	n=15	n=11	n=10
Общая дистанция, м Total distance, m	72,7±2,7	76,4±3,9	85,0±2,7 *	84,0±3,1 *
Дистанция в центре, м Distance in center, m	10,6±1,0	11,4±1,1	14,6±0,7 *	14,1±0,7 *
Заходы в центр Entries in the center	45,7±3,6	49,7±6,4	70,2±4,9 * +	61,2±3,0 * +
Время в центре, с Time in the center, s	30,4±2,8	30,4±10,1	44,9±5,4 * +	51,2±4,4 * +
Средняя скорость на всей площадке, см/с Average speed over the whole site, cm/s	0,11±0,01	0,11±0,01	0,12±0,01	0,11±0,01
Число стоек на периферии Number of racks in the periphery	20,3±2,9	17,4±2,3	29,4±3,8 +	30,7,0±7,5 +

Примечание. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка; пол тестируемых животных – самцы, n – количество животных в группе; * – p<0,05 относительно контрольной группы; + – p<0,05 относительно группы «Выкармливание S100B», & – p<0,05 относительно группы «S100B» (ANOVA-2, Duncan's test).

Note. The data are presented as arithmetic mean ± standard error of the mean; the sex of the tested animals is male, n is the number of animals in the group; * – p<0.05 relative to the control group; + – p<0.05 relative to the "Feeding S100B" group, & – p<0.05 relative to the "S100B" group (ANOVA-2, Duncan's test).

активного материнско-фетального переноса АТ на 12-15,5 ЭС и периодом формирования нервной системы детенышей [10]. Дефицит S100B в молоке являлся показателем действия АТ к S100B у иммунизированных самок после родов. Передача АТ к S100B потомству с молоком рассматривается как основной фактор, который приводил к дефициту S100B у детенышей после рождения. Снижение белка S100B в молоке мышей могло оказывать дополнительное действие на созревание мозга их потомства. Предполагается, что у людей белок S100B в материнском молоке может оказывать нейротрофическое действие и важен для созревания мозга ребенка [19].

Основная гипотеза эффектов иммунизации АТ к S100B на формирование поведения мышей связана с нарушениями в развитии 5-НТ системы мозга, вызванной изменением модулирующего действия S100B [4].

Причинами нарушения формирования страха у мышей при спуске с приподнятой платформы могли быть отставание в созревании адренокортикального ответа, развитие которого связано с функционированием 5-НТ системы [20] и недоразвитие лимбо-кортикальные связей (цепей тревожности) [21], обеспечивающих 5-НТ передачу между префронтальной корой, гиппокампом, миндалиной, энториальной корой и, как следствие, нарушением обработки анксиогенных стимулов. Известно, что в норме у грызунов эти связи, а также гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система начинают функционировать в возрасте 2 нед [14]. Нарушение взаимодействия между миндалиной, латеральной энториальной корой и вентральным гиппокампом у гетерозиготных нокауты Ah1 вызывало снижение тревожности и страха в ОП, ПКЛ [22]. Напротив, гиперсвязность в лобно-лимби-

Таблица 5/Table 5

Поведение самцов мышей в возрасте 5 недель в приподнятом крестообразном лабиринте

Behavior of male mice at the age of 5 weeks in the elevated plus maze

Параметры поведения	Группы Group			
	Контроль, Control	Выкармливание S100B Feeding S100B	Вынашивание S100B Carrying S100B ^α	S100B, самцы
	n=36	n=15	n=17	n=25
Время в центре, с, Time in center, c	85,4±8,0	98,9±11,4	128±8 **	115±7 **
Время в открытом рукаве, с Time in an open sleeve, c	61,2±4,1	64,0±8,1	94,2±6,8 **	93,8±8,1 **

Примечание. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка ; пол тестируемых животных – самцы, n – количество животных в группе; * – p<0,05 относительно контрольной группы; + – p<0,05 относительно группы «Выкармливание S100B» (ANOVA, Duncan’s test).

Note. The data are presented as arithmetic mean ± standard error of the mean; the sex of the tested animals is male, n is the number of animals in the group; * – p<0.05 relative to the control group; + – p<0.05 relative to the “Feeding S100B” group (ANOVA, Duncan’s test).

Таблица 6/Table 6

Концентрация белка S100B в крови и молоке самок на 9-е сутки после рождения потомства

The concentration of S100B protein in the blood and milk of females on the 9th day offspring birth

Группа Group	Концентрация S100B пг/мл S100B concentration pg/ml	
	Кровь / Blood	Молоко / Milk
Контрольная, n=3 Control, n=3	0,5±0,5	235±43,3
S100B, n=3	0±0	13,3±13,3 *

Примечание. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего; n – количество животных в группе; * – p<0,05 относительно контрольной группы (Kruskal-Wallis ANOVA тест).

Note. The data are presented as arithmetic mean ± standard error of the mean; n is the number of animals in the group; * – p<0.05 relative to the control group (Kruskal-Wallis ANOVA test).

ческих цепях являлась причиной повышенной тревожности у мышей [23].

Исследование животных в тесте удерживания за хвост в подростковом возрасте выявило депрессивное поведение у мышей, связанное с воздействием АТ к S100B до рождения. Одной из причин такого депрессивного поведения могло быть снижение активности серотонинергической системы [24]. Известно, что селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (СИОЗС), которые препятствуют выведению 5-НТ из синаптической щели, используются как препараты первой линии при лечении депрессии. Эффективность такой терапии зависит от уровня экспрессии ауторецептора 5-НТ1А [25] и связана с влиянием S100B [26]. Предполагается, что увеличение экспрессии S100B при использовании СИОЗС стимулирует восстановление нейропластической функции серотонинергической системы и улучшает поведение при депрессии [26].

В подростковом возрасте мыши с пренатальным воздействием АТ к S100B, которые ранее показывали сниженный страх и большую исследовательскую активность, сохраняли анксиолитический фенотип при тестировании в ОП и ПКЛ. Взаимосвязь уровня тревожности, исследовательского поведения, избытка белка S100B и нарушения формирования 5-НТ иннервации была показана в исследованиях на трансгенных животных [27]. Повышение экспрессии 5-НТ у грызунов вызывало поведение, связанное с тревогой в ПКЛ в различные периоды онтогенеза. И наоборот, гипофункция 5-НТ системы в вентральном гиппокампе в раннем периоде развития приводило к снижению поведения, связанного с тревогой [28].

Обобщающий анализ влияния активности 5-НТ системы, включая рецепторы 5-НТ1А на тревожность и депрессию в различных экспериментальных моделях (нокауты, супрессия, сверхэкспрессия, мутация генов 5-НТ системы) был проведен Альбертом с коллегами [29]. Авторами была создана модель, которая постулирует, что поведенческий фенотип изменяется по мере увеличения активности 5-НТ от нулевого (депрессивный/агрессивный, нетревожный) до низкого (тревожный/депрессивный) и высокого (тревожный, недепрессивный). В нашем исследовании пренатальное воздействие АТ к S100B вызывало формирование депрессивного, нетревожного фенотипа, что согласуется с поведением нокаутных по 5-НТ животных в представленной модели.

Исследование поведения животных сразу после помещения в ОП позволило оценить реакцию животных на новую анксиогенную обстановку. У животных с постнатальным воздействием АТ наблюдалось гипе-

рактивное поведение в первую минуту в ОП. Нормальное исследовательское поведение и поведение оценки риска у этих животных было нарушено и заменялось высокоскоростным перемещением по всей площадке, включая центральный квадрат. Взаимосвязь между возникновением гиперактивного расстройства и снижением уровня S100B у детей была установлена в клинических исследованиях [30]. Изучение причин возникновения гиперактивного расстройства показали, что наряду с норадреналином и дофамином в механизм нарушения вовлечен также 5-НТ [31]. Недостаток 5-НТ в период развития нервной системы вызывает структурные и функциональные реорганизации таламокортикальных афферентов и внутрикорковых связей и связан с гиперактивными нарушениями поведения [32].

Результаты проведенного исследования дополнили данные о роли белка S100B в развитии функций нервной системы в онтогенезе животных. Экспериментальное моделирование дефицита S100B у мышей за счет воздействия материнских АТ вызывало нарушения в формировании поведения животных, характер которых зависел от сроков воздействия АТ. Депрессивный, нетревожный фенотип в гнездовом и ювенильном периодах развития был связан с дефицитом S100B до рождения. Воздействие АТ к S100B после рождения вызывало развитие гиперактивности в незнакомой обстановке в подростковом возрасте. Полученные результаты важны для понимания развития адаптации к условиям окружающей среды в онтогенезе. Будущие исследования, которые позволят оценить влияние АТ к S100B на созревание 5-НТ системы и формирование поведения в раннем онтогенезе, помогут охарактеризовать взаимодействия белка S100B и системы 5-НТ в период развития мозга.

Литература

(п.п. 1–12; 14–32 см. References)

13. Морозов С. Г., Сидякин А. А., Аникина О. М., Грибова И. Е., Клошник Т. П. Влияние антител к фактору роста нервов и основному белку миеллина у самок мышей на постнатальное развитие потомства. *Патогенез*. 2011; 9(1): 27-9.

References

1. Sorci G., Riuzzi F., Arcuri C., Tubaro C., Bianchi R., Giambanco I., et al. S100B protein in tissue development, repair and regeneration. *World J Biol Chem*. 2013; 4(1): 1-12.
2. Patro N., Naik A., Patro I.K. Differential temporal expression of S100B in developing rat brain. *Front Cell Neurosci*. 2015; 18(9): 87.
3. Eriksen J.L., Gillespie R., Druse M.J. Effects of ethanol and 5-HT1A agonists on astroglial S100B. *Brain Res Dev Brain Res*. 2002; 139(2): 97-105.
4. Whitaker-Azmitia P.M. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull*. 2001; 56(5): 479-85.

5. Shapiro L.A., Bialowas-McGoey L.A., Whitaker-Azmitia P.M. Effects of S100B on Serotonergic Plasticity and Neuroinflammation in the Hippocampus in Down Syndrome and Alzheimer's Disease: Studies in an S100B Overexpressing Mouse Model. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010; 2010: 153657.
6. Brummelte S., Mc Glanaghy E., Bonnin A., Oberlander T.F. Developmental changes in serotonin signaling: Implications for early brain function, behavior and adaptation. *Neuroscience.* 2017; 342: 212-31.
7. Rocha M., Vieira A., Michels M., Borges H., Goulart A., Fernandes F., et al. Effects of S100B neutralization on the long-term cognitive impairment and neuroinflammatory response in an animal model of sepsis. *Neurochem Int.* 2021; 142: 104906.
8. Jones K.L., Pride M.C., Edmiston E., Yang M., Silverman J.L., Crawley J.N., et al. Autism-specific maternal autoantibodies produce behavioral abnormalities in an endogenous antigen-driven mouse model of autism. *Mol Psychiatry.* 2020; 25(11): 2994-3009.
9. Ben-Zvi A., Lacoste B., Kur E., Andreone B.J., Mayshar Y., Yan H., et al. Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature.* 2014; 509(7501): 507-11.
10. Pentsuk N., van der Laan J.W. An interspecies comparison of placental antibody transfer: new insights into developmental toxicity testing of monoclonal antibodies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2009; 86(4): 328-44.
11. Davydov D.M., Lobanov A.V., Morozov S.G., Gribova I.E., Murashev A.N. Neurodevelopment and phenotype-modulating functions of S100B protein: a pilot study. *Physiol Behav.* 2015; 140: 188-96.
12. Yu Y.J., Watts R.J. Developing therapeutic antibodies for neurodegenerative disease. *Neurotherapeutics.* 2013; 10(3): 459-72.
13. Morozov S.G., Sidiyakin A.A., Anikina O.M., Gribova I.E., Klyushnik T.P. Effect of antibodies to nerve growth factor and myelin basic protein in female mice on the postnatal development of offspring. *Patogenez.* 2011; 9(1): 27-9. (in Russian)
14. Bajic D., Craig M.M., Borsook D., Becerra L. Probing Intrinsic Resting-State Networks in the Infant Rat Brain. *Front Behav Neurosci.* 2016; 10: 192.
15. Luckhart C., Philippe T.J., Le François B., Vahid-Ansari F., Geddes S.D. Sex-dependent adaptive changes in serotonin-1A autoreceptor function and anxiety in Deaf1-deficient mice. *Mol Brain.* 2016; 9(1): 77.
16. Ennaceur A. Tests of unconditioned anxiety – pitfalls and disappointments. *Physiol Behav.* 2014; 135: 55-71.
17. Krishnan V., Nestler E.J. Animal models of depression: molecular perspectives. *Curr Top Behav Neurosci.* 2011; 7: 121-47.
18. Pati S., Saba K., Salvi S.S., Tiwari P., Chaudhari P.R., Verma V., et al. Chronic postnatal chemogenetic activation of forebrain excitatory neurons evokes persistent changes in mood behavior. *Elife.* 2020; 9: 56171.
19. Kim S.Y., Yi D.Y. Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. *Clin Exp Pediatr.* 2020; 63(8): 301-9.
20. Pawluski J.L., Brain U.M., Underhill C.M., Hammond G.L., Oberlander T.F. Prenatal SSRI exposure alters neonatal corticosteroid binding globulin, infant cortisol levels, and emerging HPA function. *Psychoneuroendocrinology.* 2012; 37(7): 1019-28.
21. Klune C.B., Jin B., DeNardo L.A. Linking mPFC circuit maturation to the developmental regulation of emotional memory and cognitive flexibility. *Elife.* 2021; 10: 64567.
22. Lotan A., Lifschytz T., Slonimsky A., Broner E.C., Greenbaum L., Abedat S., et al. Neural mechanisms underlying stress resilience in Ah1l knockout mice: relevance to neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry.* 2014; 19(2): 243-52.
23. Johnson F.K., Delpech J.C., Thompson G.J., Wei L., Hao J., Herman P., et al. Amygdala hyper-connectivity in a mouse model of unpredictable early life stress. *Transl Psychiatry.* 2018; 8(1): 49.
24. Mosienko V., Bert B., Beis D., Matthes S., Fink H., Bader M., et al. Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. *Transl Psychiatry.* 2012; 2(5): 122.
25. Vahid-Ansari F., Zhang M., Zahrai A., Albert P.R. Overcoming Resistance to Selective Serotonin Reuptake Inhibitors: Targeting Serotonin, Serotonin-1A Receptors and Adult Neuroplasticity. *Front Neurosci.* 2019; 13: 404.
26. Ambrée O., Bergink V., Grosse L., Alferink J., Drexhage H.A., Rothermundt M., et al. S100B Serum Levels Predict Treatment Response in Patients with Melancholic Depression. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2015; 19(3): 103.
27. Buschert J., Hohoff C., Touma C., Palme R., Rothermundt M., Arolt V., et al. S100B overexpression increases behavioral and neural plasticity in response to the social environment during adolescence. *J Psychiatr Res.* 2013; 47(11): 1791-9.
28. Altieri S.C., Yang H., O'Brien H.J., Redwine H.M., Senturk D., Hensler J.G., et al. Perinatal vs genetic programming of serotonin states associated with anxiety. *Neuropsychopharmacology.* 2015; 40(6): 1456-70.
29. Albert P.R., Vahid-Ansari F., Luckhart C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Front Behav Neurosci.* 2014; 8: 199.
30. Al-Ayadhi L.Y., Mostafa G.A. A lack of association between elevated serum levels of S100B protein and autoimmunity in autistic children. *J Neuroinflammation.* 2012; 9:54.
31. Dinu L.M., Phattharakulnij N., Dommert E.J. Tryptophan modulation in individuals with attention deficit hyperactivity disorder: a systematic review. *J Neural Transm (Vienna).* 2022; 129(4):361-377.
32. Hanswijk S.I., Spoelder M., Shan L., Verheij M.M., Muilwijk O.G., Li W., et al. Gestational Factors throughout Fetal Neurodevelopment: The Serotonin Link. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(16): 5850.

Сведения об авторах:

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

Перепеченова Наталья Александровна, мл. науч. сотр. лаб. биологических испытаний ФИБХ РАН;

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

Лобанова Наталья Николаевна, мл. науч. сотр. научно-аналитического отдела ФГБНУ НИИОПП;

Морозов Сергей Георгиевич, доктор мед. наук, член-корр. РАН, директор ФГБНУ НИИОПП

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616.43

Быков Ю.В.^{1,2}, Батурич В.А.¹

Определение уровней аутоантител к нейрорецепторам у детей больных сахарным диабетом 1-го типа

¹ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России, 355017, Ставрополь, Россия, ул. Мира, д. 310;

²ГБУЗ ГК «Детская городская клиническая больница им. Г.К. Филиппского», 355002, Ставрополь, Россия, ул. Пономарева, д. 5

Цель исследования – сравнительный анализ уровней аутоантител (ААТ) к дофаминовым и NMDA рецепторам, а также к белку S-100В у детей с сахарным диабетом (СД) 1-го типа на этапе терапевтической ремиссии.

Методика. Исследована сыворотка крови 42 детей в возрасте от 4 до 17 лет (20 мальчиков и 22 девочки). Из них у 21 ребёнка был диагностирован СД 1-го типа (инсулинозависимый) в стадии терапевтической ремиссии (1-я группа). В группу «условно здоровых детей» были включены дети без СД (21 ребенок) (2-я группа). ААТ к дофаминовым и NMDA рецепторам и белку S-100В, определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Результаты. Средние показатели исследуемых ААТ были выше у больных с СД 1-го типа, по сравнению с «условно здоровыми детьми». Средние значения ААТ к NMDA рецепторам в 1-й группе составили $31,70 \pm 6,07$ Ед/мл, во 2-й – $3,30 \pm 0,89$ Ед/мл ($p=0,0021$). Средние значения уровня ААТ к дофаминовым рецепторам второго типа, были значимо выше ($p=0,0082$) у пациентов с СД по сравнению с «условно здоровыми детьми» ($49,47 \pm 2,31$ и $4,73 \pm 0,12$ Ед/мл соответственно). Средние значения ААТ к белку S-100В, были также значимо выше ($p=0,0045$) у детей 1-й группы ($36,84 \pm 3,54$ Ед/мл), при сравнении со 2-й ($6,39 \pm 0,15$ Ед/мл). Выявлена зависимость уровня ААТ от длительности заболевания – при длительности заболевания более 5 лет, средние значения ААТ были существенно выше. Более высокие показатели ААТ к NMDA рецепторам у больных с СД 1-го типа, могут указывать на активацию глутаматергической системы, а повышенный уровень ААТ к дофаминовым рецепторам – на активацию дофаминергической системы. Высокие средние показатели ААТ к белку S-100В, могут свидетельствовать о повреждении мозговой ткани при СД 1-го типа в детском возрасте на фоне процессов эксцитотоксичности.

Заключение. Выявленные нарушения свидетельствуют о поражении центральной нервной системы у детей с СД 1-го типа, при этом отмечается тенденция к росту уровня исследуемых ААТ по мере прогрессирования заболевания.

Ключевые слова: сахарный диабет; дети; аутоантитела; головной мозг

Для цитирования: Быков Ю.В., Батурич В.А. Определение уровней аутоантител к нейрорецепторам у детей больных сахарным диабетом 1-го типа. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 2022; 66(4): 61-66.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.61-66

Участие авторов: написание статьи и статистическая обработка результатов исследования – Быков Ю.В.; иммуноферментный анализ антител к нейромедиаторам и белку S-100, руководство по проведению исследований, редактирование статьи – Батурич В.А. Утверждение окончательного варианта статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Быков Юрий Витальевич, e-mail: yubykov@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 28.09.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Bykov Yu.V.^{1,2}, Baturin V.A.¹

Concentrations of autoantibodies to neural receptors in children with diabetes mellitus

¹Stavropol State Medical University, Mira St. 310, Stavropol, 355017, Russian Federation;

²Filippsky Children's City Clinical Hospital, Ponomareva St. 5, Stavropol, 355002, Russian Federation

Aim: to compare concentrations of autoantibodies (AAB) to dopamine and NMDA receptors and to the S-100 protein in children with diabetes mellitus (DM) in therapeutic remission.

Methods. Blood serum from 42 children aged 4 to 17 years (20 boys and 22 girls) was tested. 21 of these children had been diagnosed with type 1 DM (insulin-dependent) and were in therapeutic remission. The group of “apparently healthy children” consisted of children without DM (21 children). AAB to dopamine and NMDA receptors and to the S-100B protein were measured by ELISA.

Results. Mean AAB concentrations were higher in patients with type 1 DM compared with the “apparently healthy children”. The concentration of AAB to NMDA receptors was 31.70 ± 6.07 U/mL in group 1 and 3.30 ± 0.89 U/mL in group 2 ($p=0.0021$). The concentration of AAB to type 2 dopamine receptors (DAR2) was significantly higher ($p=0.0082$) in patients with DM than in “apparently healthy children”: 49.47 ± 2.31 U/mL in the study group and 4.73 ± 0.12 U/mL in the reference group. The concentration of AAB to the S-100B protein was significantly higher ($p=0.0045$) in children of group 1 (36.84 ± 3.54 U/mL) compared with group 2 (6.39 ± 0.15 U/mL). The difference between concentrations of AABs depended on the disease duration: AAB concentrations were significantly higher in patients with a DM history longer than 5 years.

Conclusion. The increase in AAB to NMDA receptors in patients with type 1 DM may indicate the activation of the glutamatergic system while the increase in AAB to dopamine receptors indicates the activation of the dopaminergic system. The increased concentrations of AAB to the S-100B protein may indicate damage to brain tissue in children with type 1 DM due to excitotoxicity. The observed abnormalities evidence a damage to the central nervous system in children with type 1 DM with a tendency towards increases in the studied AABs with the progression of the disease.

Keywords: diabetes mellitus; children; autoantibodies; brain

For citation: Bykov Yu.V., Baturin V.A. Concentrations of autoantibodies to neural receptors in children with diabetes mellitus. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(4): 61-66. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.61-66

Author's contribution: wrote the manuscript and performed statistical processing of results – Bykov Yu.V.; performed ELISA analysis of antibodies to the neurotransmitters and the S-100 protein, oversaw the research, edited the manuscript – Baturin V.A. All authors have approved the final version of the manuscript.

For correspondence: Yuri V. Bykov, e-mail: yubykov@gmail.com

Information about the authors:

Bykov Yu.V., <https://orcid.org/0000-0003-4705-3823>

Baturin V.A., <https://orcid.org/0000-0003-4705-3823>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 28.09.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

Сахарный диабет (СД) 1-го типа и связанные с этим заболеванием осложнения – одна из актуальных проблем современной эндокринологии [1]. Одним из основных, но редко диагностируемых осложнений при СД 1-го типа является поражение центральной нервной системы (ЦНС) [2]. Поскольку детский возраст – это период серьезных изменений в развитии ЦНС, нарушения метаболизма глюкозы в этот «чувствительный» период развития могут иметь негативные последствия для развития головного мозга ребенка и формирования мозговой дисфункции [3]. К основным патофизиологическим механизмам повреждения головного мозга на фоне СД можно отнести окислительный и нитратный стресс, воспалительные реакции, хроническую гипергликемию, нарушение процессов аутофагии и дисфункцию нейротрансмиттеров [4].

Также предполагается, что хроническая гипергликемия может приводить к индуцированной глутама-

том эксайтотоксичности (в том числе и за счет активации NMDA рецепторов), – патологическому процессу, приводящему к дегенерации и последующей гибели нейронов головного мозга [5]. С другой стороны, обнаружение циркулирующих аутоантител (ААТ) к структурам островков поджелудочной железы позволило внедрить скрининг ААТ для клинической диагностики СД 1-го типа и выявления лиц, подверженных риску данного заболевания [6]. Однако, выявление специфических ААТ в качестве маркеров осложнения СД, в том числе при поражении ЦНС, является нерешенной задачей при диагностике данного осложнения, исследований в этом направлении практически нет. Показано, что повышение уровня нейроспецифических белков в крови указывает на повреждение ткани головного мозга и позволяет дать прижизненную оценку состояния ЦНС [7]. Известно, что пациенты с неудовлетворительными показателями углеводного обмена на фоне СД 1-го типа имеют повышенное содержание нейроспецифических белков (глиальный

фибрилярный кислый белок S100B, а также основной белок миелина – индикатор повреждения олигодендроцитов), указывающих на косвенные признаки повреждения головного мозга [8]. Ранее нами было показано, что у детей с СД 1-го типа на фоне диабетического кетоацидоза (ДКА) и отека головного мозга выявлены высокие показатели ААТ к белку S100B [9]. В связи с этим представлялось перспективным изучение уровня ААТ в сыворотке крови у детей с СД 1-го типа к некоторым нейрорецепторам: NMDA (NR2A) и дофаминовым (DR2) рецепторам и к белку S-100B, для оценки выраженности эксайтотоксичности и повреждения головного мозга.

Цель исследования – анализ уровня сывороточных ААТ к дофаминовым и NMDA рецепторам, а также к белку S-100B у детей с СД 1-го типа на этапе терапевтической ремиссии.

Методика

В открытое сравнительное исследование были включены 42 ребёнка в возрасте от 4 до 17 лет, средний возраст $11,7 \pm 0,96$ лет (здесь и далее по тексту: $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – ошибка средней), из них 20 мальчиков (47,6%) и 22 девочки (42,4%). 21 ребёнок с СД 1-го типа: 10 мальчиков и 11 девочек, средний возраст $13,01 \pm 0,72$ лет – составили группу исследования (1-я группа), остальные 21 ребенок составили группу сравнения (2-я группа), 10 мальчиков и 11 девочек, средний возраст $10,01 \pm 0,32$ лет, не страдающих СД 1-го типа. Средняя длительность заболевания у детей с СД 1-го типа составила $9,6 \pm 0,36$ лет. Родители (или их законные представители) всех детей давали информированное согласие на участие детей в исследовании. На данное исследование было получено одобрение со стороны локального этического комитета Ставропольского Государственного Медицинского Университета. Все исследования выполнялись по международным правилам работы с биоматериалом людей.

Критерии включения детей в группу исследования:

Диагноз СД 1-го типа, подтвержденный клинико-лабораторными данными.

Длительность заболевания не менее 1 года.

Возраст пациентов от 4 до 17 лет.

Стадия ремиссии по СД 1-го типа.

Критерии исключения детей из группы исследования:

Возраст детей менее 4 лет.

Наличие других сопутствующих хронических заболеваний.

Декомпенсация по СД с явлениями дисгликемии и ДКА.

Отказ со стороны родителей или их законных представителей от участия детей в исследовании.

Критерии включения детей в группу сравнения:

Отсутствие сопутствующих хронических соматических и эндокринных (в том числе СД) заболеваний.

Возраст детей от 4 до 17 лет.

Критерии исключения детей из группы сравнения:

Возраст детей менее 4 лет.

Отказ со стороны родителей или их законных представителей от участия детей в исследовании.

Все дети группы исследования, были в плановом порядке госпитализированы в эндокринологическое отделение Ставропольской городской клинической больницы им. Г. К. Филиппского с диагнозом «Сахарный диабет 1-го типа. Хроническое течение. Стадия ремиссии», для коррекции доз инсулиносодержащих препаратов. Группу сравнения («условно здоровые дети») составили дети, госпитализированные на плановое малое оперативное вмешательство в хирургическое отделение (грыжесечение). Забор венозной крови для определения уровня ААТ в группе исследования и в контрольной группе, проводился однократно в утренние часы (9:00), при плановом поступлении пациентов в больницу.

Количественное определение уровня ААТ в сыворотке крови детей проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Методика определения уровня ААТ (IgG) к NMDA рецепторам (субъединица NR2A), к дофаминовым рецепторам второго типа (DR2), и к белку S-100B основывалась на иммунологической реакции между ААТ в сыворотке крови пациентов и человеческими рекомбинантными антигенами (производство Cloud-Clone Corp, США) в ИФА тест-системах. Полученные результаты фиксировали с помощью фотометра вертикального сканирования «Лазурит» (США), с длиной волны 450 нм. Результаты выражали в Ед/мл.

Статистический анализ результатов измерений проводился с применением прикладных программ STATISTICA 10.0. (StatSoft Inc., США). Количественные признаки описывались с помощью среднего арифметического и ошибки средней, медианы и квартилей. С помощью критериев Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова оценивали нормальность распределения. При несоответствии показателей нормальному распределению применяли U-критерий Манна–Уитни. Различия между группами считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Как показывает проведенный анализ, средние показатели ААТ были статистически значимо выше

у больных с СД 1-го типа, по сравнению с «условно здоровыми детьми» (табл. 1). Минимальное значение уровня ААТ к NMDA рецепторам в 1-й группе составило 7,08 Ед/мл, максимальное – 98,48 Ед/мл, во 2-й группе – 3,05 Ед/мл и 43,14 Ед/мл соответственно, $p=0,0021$). Диагностируемые нами высокие уровни ААТ к NMDA рецепторам могут указывать на изменение активности глутаматергической системы у детей с СД 1-го типа, что, в свою очередь, позволяет предполагать наличие эксайтотоксичности.

Средние значения ААТ к DR2, так же были значительно выше ($p=0,0082$) у детей с СД по сравнению с «условно здоровыми детьми» (табл. 1). Минимальное значение – 1,42 Ед/мл, максимальное – 119,46 Ед/мл в группе исследования и соответственно 1,03 Ед/мл, и 86,3 Ед/мл – в группе сравнения. Высокие показатели ААТ к дофаминовым рецепторам позволяют думать, что у детей больных СД изменяется также активность дофаминергической системы.

Средние значения ААТ к белку S-100B, также были существенно выше ($p=0,0045$) у детей 1-й группы. Так, у пациентов с СД 1-го типа минимальное значение уровня ААТ к белку S-100B составило 1,42 Ед/мл, максимальное 19,34 Ед/мл, у «условно здоровых детей» – 42 Ед/мл и 76,81 Ед/мл соответственно. Высокие средние показатели ААТ к белку S-100B, могут свидетельствовать о повреждении мозговой ткани, возможно вследствие равивающейся эксайтотоксичности при СД 1-го типа у детей.

На втором этапе исследования пациенты с СД 1-го типа (21 ребенок), были разделены на две подгруппы в зависимости от длительности заболевания. В I подгруппу были отнесены 10 пациентов, у которых длительность заболевания составила от 1 года до 5 лет, средняя длительность (U-крите-

рий Манна–Уитни) – 2 [1-4] лет, во II подгруппу – 11 пациентов с длительностью заболевания свыше 5 лет (средняя длительность 7 [6-9] лет). В ходе исследования были выявлены статистически значимые различия в средних значениях ААТ, в зависимости от длительности заболевания. Так, уровень аутоантител к NMDA и DR2 рецепторам у детей с длительностью СД 1-го типа свыше 5 лет, а также средние показатели ААТ к белку S-100B были значимо выше, по сравнению с пациентами с меньшей длительностью заболевания (табл. 2).

Обсуждение

Таким образом, можно сделать вывод, что с увеличением длительности заболевания СД 1-го типа, параллельно происходит увеличение содержания ААТ к NMDA (субъединица NR2A) и дофаминовым рецепторам, а также к белку s100B. Диагностируемое нами повышение ААТ к NMDA и дофаминовым рецепторам, может говорить о том, что при СД в детском возрасте, происходит нарастание активности дофаминергической и глутаматергической системы. Это, как полагают, может вызывать повреждение нейронов головного мозга и приводить к когнитивному дефициту [10]. Кроме этого, полученные нами данные подтверждают результаты предыдущих исследований, в которых было показано повышение уровня сывороточных ААТ к NMDA и дофаминовым рецепторам, а также ААТ к белку S-100B на фоне ДКА в детском возрасте [9; 11]. Не исключено, что обнаруженные нами высокие титры ААТ к нейромедиаторам и нейроспецифическому белку S-100B являются следствием прогрессирующего повреждения головного мозга на фоне хронического течения СД 1-го типа в детском возрасте.

Таблица 1/Table 1

Содержание ААТ к мозговым рецепторам и белку S-100B в сыворотке крови у детей с СД1 и «условно здоровых детей», (M±m)

The content of auto-antibodies to brain receptors and protein S-100B in the blood serum in children with diabetes mellitus and «conditionally healthy children», (M±m)

Показатели Indicats	ААТ к NMDA рецепторам/A-AT to NMDA receptors (Ед/мл, U/ml)	ААТ к DAR2 рецепторам/A-AT to DAR2 receptors (Ед/мл, U/ml)	ААТ к белку S100B A-AT to protein S100B (Ед/мл, U/ml)
Группа исследования Study group (n=21)	31,70±6,07*	49,47±2,31*	36,84±3,54*
Группа сравнения Comparison group (n=21)	3,30±0,89	4,73±0,12	6,39±0,15

Примечание. * – $p<0,01$ статистически значимые различия между больными и здоровыми детьми.

Note. * – $p<0,01$ statistically significant differences between sick and healthy children.

Содержание ААТ к NMDA и DAR2 рецепторам, к белку S-100B в сыворотке крови у детей с СД 1-го типа в зависимости от длительности заболевания, Me[25-75]

The content of auto-antibodies to NMDA and DAR2 receptors, to the S-100B protein in the blood serum of children with diabetes mellitus, depending on the duration of disease, Me [25-75]

Показатели Indicats	Длительность заболевания до 5 лет Duration of disease up to 5 years Подгруппа I	Длительность заболевания свыше 5 лет Disease duration over 5 years Подгруппа II
ААТ к NMDA рецепторам A-AT to NMDA receptors (Ед/мл, U/ml)	6,92 [3,45-9,13]	57,21* [10,15-92,26]
ААТ к DAR2 рецепторам A-AT to DAR2 receptors (Ед/мл, U/ml)	7,045 [1,42-10,29]	54,79* [13,64-81,31]
ААТ к белку S100B A-AT to protein S100B (Ед/мл, U/ml)	19,12 [5,654-39,133]	92,74 * [30,51-127,62]

Примечание. * – $p < 0,01$ – статистически значимые отличия между больными с длительностью заболевания до 5 лет и свыше 5 лет (критерий Манна–Уитни).

Note. * – $p < 0,01$ – statistically significant differences between patients with disease duration up to 5 years and over 5 years (Mann–Whitney test).

Следовательно, ААТ к NR2A, DR2 и к белку S-100B, могут являться косвенными признаками повреждения мозговой ткани на фоне течения СД 1-го типа в детском возрасте.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у детей с СД 1-го типа в состоянии ремиссии, имеется статистически значимое увеличение концентрации в крови ААТ к мозговым рецепторам (NR2A и DR2), а также к белку S-100B. При этом отмечается тенденция к росту уровня ААТ по ходу прогрессирования заболевания. Обнаруженное нами повышение концентрации ААТ к NMDA и дофаминовым рецепторам, может свидетельствовать об активации глутаматергической и дофаминергической систем, как проявления оксидативного стресса и эксайтоксичности [12] на фоне хронического течения СД в детском возрасте. Увеличение уровня ААТ к рецепторам белка S-100B, может быть маркером повреждения головного мозга [13]. Таким образом, выявленные нарушения свидетельствуют о поражении ЦНС у детей с СД 1-го типа, в основе которого могут лежать процессы оксидативного стресса и эксайтоксичности.

Литература

(п.п. 1-6; 8; 10-13; см References)

7. Попова Н.Г., Самусевич А.Н., Игнатко И.В. Роль биохимических маркеров в прогнозировании поражения ЦНС новорожденных при преждевременных родах. *Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева*. 2016; 3(4): 209.

9. Быков Ю. В., Углова Т. А. Аутоантитела к белку S-100B как предиктор тяжести сахарного диабета 1 типа у детей. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2022; 17(1): 31-3.

References

1. Stefaniak A.A., Zubkiewicz-Kucharska A., Matusiak L., Noczyńska A., Szeptietowski J.C. Itch in Children with Type 1 Diabetes: A Cross-Sectional Study. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2020; 10(4): 745-56. <https://doi.org/10.1007/s13555-020-00403-w>
2. Northam E.A., Rankins D., Lin A., Wellard R.M., Pell G.S., Finch S.J., et al. Central Nervous System Function in Youth With Type 1 Diabetes 12 Years After Disease Onset. *Diabetes Care*. 2009; 32(3): 445–50. <https://doi.org/10.2337/dc08-1657>
3. Foland-Ross L.C., Tong G., Mauras N., Cato A., Aye T., Tansey M. et al. Diabetes Research in Children Network (DirecNet). Brain Function Differences in Children With Type 1 Diabetes: A Functional MRI Study of Working Memory. *Diabetes*. 2020; 69(8): 1770-8. <https://doi.org/10.2337/db20-0123>
4. Miao C., Chen H., Li Y., Guo Y., Xu F., Chen Q. et al. Curcumin and its analog alleviate diabetes-induced damages by regulating inflammation and oxidative stress in brain of diabetic rats. *Diabetol. Metab. Syndr*. 2021; 13(1): 21. <https://doi.org/10.1186/s13098-021-00638-3>
5. Rorbach-Dolata A., Piwowar A. Neurometabolic Evidence Supporting the Hypothesis of Increased Incidence of Type 3 Diabetes Mellitus in the 21st Century. *Biomed. Res. Int*. 2019; 2019: 1435276. <https://doi.org/10.1155/2019/1435276>
6. Foland-Ross L.C., Buckingham B., Mauras N., Arbelaez A.M., Tamborlane W.V., Tsalikian E., et al. Diabetes Research in Children Network (DirecNet). Executive task-based brain function in children with type 1 diabetes: An observational study. *PLoS Med*. 2019; 16(12): e1002979. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002979>
7. Popova N.G., Samusevich A.N., Ignatko I.V. The role of biochemical markers in predicting CNS damage in newborns in preterm la-

- bor. *Arhiv akusherstva i ginekologii im. V.F. Snegireva*. 2016; 4(3): 209-10. (In Russian)
8. Matveeva M.V., Samoilo Yu.G. Interrelation of neurospecific proteins and indicators of carbohydrate metabolism in patients with type 1 diabetes mellitus. *Cognitive Disorders*. 2015; 164.
 9. Bykov Yu.V., Uglova T.A. Autoantibodies to the S100B protein as a predictor of the severity of type 1 diabetes mellitus in children. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza*. 2022; 17(1): 31-3. (In Russian)
 10. Robinson R., Krishnakumar A., Paulose C.S. Enhanced dopamine D1 and D2 receptor gene expression in the hippocampus of hypoglycaemic and diabetic rats. *Cell Mol. Neurobiol*. 2009; 29(3): 365-72. <https://doi.org/10.1007/s10571-008-9328-4>
 11. Kaya C., Atas A., Aksoy N., Kaya E.C., Abuhandan M. Evaluation of Pre-Treatment and Post-Treatment S100B, Oxidant and Antioxidant Capacity in Children with Diabetic Ketoacidosis. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol*. 2015; 7: 109-13. <https://doi.org/10.4274/jcrpe.1716>
 12. Qaddumi W.N., Jose P.A. The Role of the Renal Dopaminergic System and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Hypertension. *Biomedicines*. 2021; 9(2): 139. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9020139>
 13. Hu W., Lin C. S100a8 silencing attenuates inflammation, oxidative stress and apoptosis in BV2 cells induced by oxygen-glucose deprivation and reoxygenation by upregulating GAB1 expression. *Mol. Med. Rep*. 2021; 23(1): 64. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11702>

Сведения об авторах:

Быков Юрий Витальевич, канд. мед. наук, ассистент каф. анестезиологии, реаниматологии, с курсом ДПО Ставропольского государственного медицинского университета, ФГБОУ ВО Минздрава России, e-mail: yubykov@gmail.com;

Батури Владимир Александрович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. клинической фармакологии, с курсом ДПО Ставропольского государственного медицинского университета, e-mail: prof.baturin@gmail.com

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092.9

Сухопарова Е.П.¹, Зиновьев Е.В.², Князева Е.С.²

Прогностическая значимость элементного состава волос для оценки риска развития послеоперационных раневых осложнений

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

²ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И. И. Джанелидзе», 196128, Санкт-Петербург, Россия, ул. Будапештская, д. 3, Россия

Введение. Снижение уровня микро- и макроэлементов является одним из факторов увеличения сроков заживления послеоперационных ран, поскольку это препятствует пролиферации фибробластов, синтезу коллагена и эпителизации.

Цель – оценить прогностическую значимость элементного состава волос для оценки риска осложненного и замедленного течения раневого процесса после хирургического вмешательства.

Методика. В исследование включено 49 женщин в возрасте 30-60 лет ($46,98 \pm 7,10$ лет) с избыточной массой тела, которым выполнены плановые хирургические вмешательства по эстетическим показаниям, направленные на коррекцию контуров тела, в ожоговом отделении с пластической хирургией ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России. Всем пациенткам проведен спектральный анализ волос на микро- и макроэлементы.

Результаты. У пациенток с замедленным и осложненным заживлением ран выявлены значимые сдвиги в элементном составе волос. Высокую прогностическую значимость в отношении риска замедления раневого процесса и развития длительно незаживающих ран имеют снижение уровней лития ($Li < 0,04$), германия ($Ge < 0,07$), бора ($B < 1,11$) и йода ($I < 0,06$) с уровнями абсолютного риска более 58,1%.

Заключение. Пациентам с запланированным хирургическим вмешательством необходим тщательный мониторинг содержания макро- и микроэлементов с целью выявления их дефицита и своевременной коррекции лечебной тактики, что позволит уменьшить риск неблагоприятного течения раневого процесса. Доступным и неинвазивным методом изучения элементного состава организма является спектральный анализ волос.

Ключевые слова: заживление ран; хирургические вмешательства; макроэлементы; микроэлементы; спектральный анализ волос

Для цитирования: Сухопарова Е.П., Зиновьев Е.В., Князева Е.С. Прогностическая значимость элементного состава волос для оценки риска развития послеоперационных раневых осложнений. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 67-72.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.67-72

Участие авторов: подготовка иллюстративного материала, написание текста, сбор и обработка материала, концепция и дизайн исследования – Сухопарова Е.П.; редактирование, концепция исследования – Зиновьев Е.В.; статистическая обработка материала – Князева Е.С. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Сухопарова Елена Петровна, e-mail: suhoparova.e@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 30.05.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Sukhoparova E.P.¹, Zinoviev E.V.², Knyazeva E.S.²**Prognostic significance of the elemental composition of hair for assessing the risk of postoperative wound complications**¹Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,
L'va Tolstogo St. 6-8, Saint Petersburg 187022, Russian Federation;²Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine,
Budapeshtskaya St. 3, Saint Petersburg 196128, Russian Federation

Introduction. Decreased concentrations of micro- and macroelements are one of the factors for delayed postoperative wound healing since this factor prevents fibroblast proliferation, collagen synthesis, and epithelization. **The aim** of this study was to evaluate the prognostic significance of the elemental composition of hair to assess the risk of complicated and delayed postoperative wound healing.

Methods. The study included 49 overweight women aged 30-60 years (46.98±7.10 years) who underwent elective surgical interventions for aesthetic indications aimed at correcting body contours in the department of burns and plastic surgery of the Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, EMERCOM of Russia. Spectral analysis of hair for micro- and macroelements was performed for all patients.

Results. In patients with delayed and complicated wound healing, significant shifts in the elemental composition of hair were revealed. Reduced levels of lithium (Li <0.04), germanium (Ge <0.07), boron (B <1.11), and iodine (I <0.06) with levels of absolute risk over 58.1% showed a high prognostic significance with respect of the risk for delayed healing and development of persistent wounds.

Conclusion. Patients scheduled for a surgical intervention need thorough monitoring of the content of macro- and microelements for identification of their deficiency and timely correction of the therapeutic tactics, which will reduce the risk of an unfavorable course of the wound process. An affordable and non-invasive method for studying the elemental composition of the body is the spectral analysis of hair.

Keywords: wound healing; surgical intervention; major elements; trace elements; spectral analysis of hair

For citation: Sukhoparova E.P., Zinoviev E.V., Knyazeva E.S. Prognostic significance of the elemental composition of hair for assessing the risk of postoperative wound complications. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(4): 67-72. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.67-72

Author's contribution: preparation of illustrative material, writing the text, collection and processing of material, concept and design of the study – Sukhoparova E.P.; editing, conceptual research – Zinoviev E.V.; statistical processing of the material – Knyazeva E.S.; approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: **Elena P. Sukhoparova**, candidate of Medical Sciences, The First St. Petersburg State Medical University named after Academician I.P. Pavlov, 6-8 Lev Tolstoy str., St. Petersburg, 197022, Russian Federation, e-mail: suhoparova.e@gmail.com

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

Financing. The study had no sponsorship.

Received 30.05.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

Заживление ран происходит за счет каскада последовательных взаимосвязанных молекулярных и клеточных событий [1]. Различные местные и системные факторы, в том числе инфекция, хроническое воспаление, пониженное содержание биоэлементов и плохая перфузия краев раны могут оказывать негативное влияние на процесс заживления [2]. Элементный состав волос отражает состояние обмена биоэлементов в организме человека за длительный промежуток времени [3, 4]. Развитие воспалительной реакции, окислительного стресса и гиперметаболического состояния в процессе заживления хирургических ран, среди прочего, приводят к отклонениям

в содержании основных микро- и макроэлементов, что, в свою очередь, может привести к более частым инфекционным осложнениям или нарушениям в процессах заживления ран [5].

Спектральный анализ химического состава волос является современным неинвазивным методом интегральной оценки минерального обмена в организме за продолжительный период времени и позволяет оценивать содержание микро- и макроэлементов в организме. Определение элементного состава волос можно использовать для клинической и донологической диагностики заболеваний, а также как вспомогательный инструмент при выборе тактики системно-

го лечения пациентов с нарушениями течения раневого процесса.

Цель исследования – оценка прогностической значимости элементного состава волос при определении степени риска развития осложнений течения раневого процесса после хирургического вмешательства.

Методика

В исследование включены 49 женщин от 30 до 60 лет с индексом массы тела более 25 кг/м² (31,64±5,04 кг/м²) и окружностью талии более 80 см. Все пациентки добровольно подписывали форму информированного согласия на анонимное участие в исследовании. Исследование одобрено локальным этическим комитетом. Все исследования выполнялись по международным правилам работы с биоматериалом людей. Пациенткам в ожоговом отделении с пластической хирургией ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России в период с 2019 по 2020 гг. выполнены плановые хирургические вмешательства по эстетическим показаниям, направленные на коррекцию контуров тела – подтяжка молочных желез, уменьшение молочных желез, абдоминопластика. Длительность наблюдения в послеоперационном периоде составила 6 мес. Пациентки были разделены на 3 группы в зависимости от особенностей течения раневого процесса: 1-я группа – осложненный раневой процесс ($n=21$, 42,86%); 2-я группа – замедленный раневой процесс ($n=16$, 32,65%); 3-я группа – стандартно протекающий раневой процесс ($n=12$, 24,49%).

Отбор волос, подготовку и анализ проб осуществляли согласно утвержденным методикам. Элементный анализ волос исследовали методом атомно-абсорбционной спектроскопии на поверенных приборах «Spectr 240 FS» и «Spectr 280 Z» с предварительной минерализацией проб в микроволновой системе «MDS-2000».

Статистическая обработка данных выполнена с использованием пакетов прикладных программ Statistica 10 и SAS JMP 11. Для описания количественных данных использовали среднее арифметическое значение (M) и стандартное отклонение (δ). Качественные характеристики показателей выражены абсолютными (n) и относительными величинами (%). В отношении количественных переменных проверяли нормальность распределения, использовали χ^2 -критерий Пирсона, t -критерий Стьюдента, критерий многочисленных сравнений. Различия между группами считали значимыми при $p < 0,05$. В случае, когда выборки из переменных не подчинялись

нормальному закону распределения, использовали непараметрические методы: U -критерий Манна-Уитни, H -критерий Краскела-Уоллеса, медианный тест. Для оценки прогностической значимости нескольких независимых факторов в отношении неблагоприятного заживления раны в послеоперационном периоде использовали метод множественного регрессионного анализа.

Результаты

По данным спектрального анализа состава волос в категории «Микроэлементы» выявлены статистически значимые сравнительные отличия между группами пациенток по двум показателям: для показателя литий «Li» во 2-й группе по сравнению с 1-й группой – $0,05 \pm 0,05$ мг/кг против $0,03 \pm 0,03$ мг/кг, соответственно ($p=0,025$), а также для показателя германий «Ge» во 2-й группе по отношению к 1-й – $0,08 \pm 0,01$ мг/кг против $0,07 \pm 0,02$ мг/кг, соответственно ($p=0,014$). Относительно содержания макроэлементов статистически значимых отличий в исследуемых группах получено не было.

С помощью статистического однофакторного прогнозирования развития раневых осложнений в послеоперационном периоде были выделены 20 ключевых прогнозных факторов (таблица).

Из таблицы видно, что 11 факторов (элементов) статистически значимо повышают риск развития неблагоприятного исхода заживления раны – от 35,7% до 100,0%.

Наиболее значимыми факторами высокого риска осложненного и замедленного течения раневого процесса являются $Ag \geq 0,28$ (уровень риска 100,0%), $Si < 62,30$ (уровень риска 100,0%) и $I < 0,06$ (уровень риска 87,5%). Меньшее влияние оказывают статистически значимые факторы $Va < 4,41$, $B < 1,11$ и $Cd \geq 0,03$, которые повышают уровень риска послеоперационных осложнений с 52,6% до 60,0%.

Результаты проведенного однофакторного анализа для группы показателей «Микро- и макроэлементы» свидетельствуют, что ключевыми статистически значимыми факторами риска развития замедления раневого процесса в послеоперационном периоде и развития длительно незаживающих ран являются снижение уровня лития, снижение уровня германия, снижение уровня бора и снижение уровня йода с уровнями абсолютного риска более 58,1% (рисунок).

Наличие одного из данных ключевых факторов повышает риск замедления процессов репарации и формирования хронических, длительно незаживающих ран более чем в 3 раза.

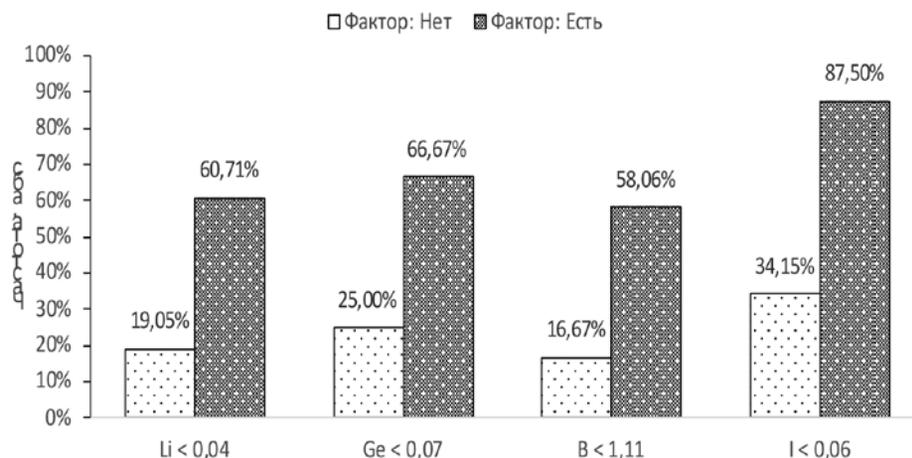
Ключевые факторы, влияющие на развитие осложнений в послеоперационном периоде

Key factors influencing the development of complications in the postoperative period

Фактор Factor	Развитие осложнений в послеоперационном периоде (абсолютный риск, %) Development of complications in the postoperative period (absolute risk, %)		Изменение риска (95% ДИ) Change in risk (95% CI) (95% CI)	Относительный риск Relative risk (95% confidence interval)	Значимость, <i>p</i>
	Фактор: Нет There is no factor	Фактор: Есть There is a factor			
Li < 0,04	4 (19,05%)	17 (60,71%)	41,67 (17,0; 66,4)%	3,19 (1,26; 8,08)	0,004*
Ge < 0,07	7 (25,00%)	14 (66,67%)	41,67 (15,9; 67,4)%	2,67 (1,31; 5,42)	0,004*
B < 1,11	3 (16,67%)	18 (58,06%)	41,40 (16,9; 65,9)%	3,48 (1,19; 10,21)	0,005*
I < 0,06	14 (34,15%)	7 (87,50%)	53,35 (26,2; 80,5)%	2,56 (1,56; 4,22)	0,005*
Ba < 4,41	1 (9,09%)	20 (52,63%)	43,54 (20,3; 66,8)%	5,79 (0,87; 38,44)	0,010*
Cu < 6,58	15 (35,71%)	6 (85,71%)	50,00 (20,3; 79,7)%	2,4 (1,45; 3,98)	0,013*
Rb ≥ 0,03	6 (85,71%)	15 (35,71%)	-50,00 (-79,7; -20,3)%	0,42 (0,25; 0,69)	0,013*
Ag ≥ 0,28	17 (37,78%)	4 (100,00%)	62,22 (48,1; 76,4)%	2,65 (1,82; 3,85)	0,016*
Si < 62,30	17 (37,78%)	4 (100,00%)	62,22 (48,1; 76,4)%	2,65 (1,82; 3,85)	0,016*
Cd ≥ 0,03	9 (31,03%)	12 (60,00%)	28,97 (1,7; 56,3)%	1,93 (1,01; 3,70)	0,044*
Na ≥ 675,80	15 (36,59%)	6 (75,00%)	38,41 (5,0; 71,8)%	2,05 (1,16; 3,62)	0,045*
Ti < 0,68	14 (35,90%)	7 (70,00%)	34,10 (2,0; 66,2)%	1,95 (1,09; 3,50)	0,052
K ≥ 74,93	5 (26,32%)	16 (53,33%)	27,02 (0,4; 53,7)%	2,03 (0,89; 4,62)	0,063
Co < 0,03	6 (28,57%)	15 (53,57%)	25,00 (-1,7; 51,7)%	1,88 (0,88; 4,01)	0,080
As < 0,01	3 (23,08%)	18 (50,00%)	26,92 (-1,2; 55,1)%	2,17 (0,76; 6,16)	0,093
Mn < 3,63	2 (20,00%)	19 (48,72%)	28,72 (-0,6; 58,1)%	2,44 (0,68; 8,77)	0,102
Sr ≥ 10,44	12 (35,29%)	9 (60,00%)	24,71 (-4,8; 54,2)%	1,7 (0,92; 3,14)	0,107
Sn < 0,41	13 (36,11%)	8 (61,54%)	25,43 (-5,3; 56,2)%	1,7 (0,92; 3,14)	0,112
Ni ≥ 0,73	14 (36,84%)	7 (63,64%)	26,79 (-5,5; 59,1)%	1,73 (0,94; 3,18)	0,114
Mo < 0,03	8 (32,00%)	13 (54,17%)	22,17 (-4,9; 49,2)%	1,69 (0,86; 3,34)	0,117

Примечание. * – статистически значимые отличия.

Note. * – statistically significant differences.



Оценки рисков развития осложненного и замедленного раневого процесса по ключевым факторам: «Li < 0,04», «Ge < 0,07», «B < 1,11» и «I < 0,06». Risk estimates of complicated and delayed wound development by key factors: «Li < 0.04», «Ge < 0.07», «B < 1.11», and «I < 0.06».

Обсуждение

Несмотря на пристальный интерес медицинско-го хирургического сообщества к различным аспектам раневого процесса и определенные успехи в области лечения послеоперационных ран, некоторые вопросы по-прежнему остаются не решенными [6]. Осложненное и длительное заживление ран является одной из наиболее актуальных научных и практических проблем современной хирургии, особенно у пациентов с избыточной массой тела и ожирением [7]. Известно, что ожирение как один из компонентов метаболического синдрома ухудшает процесс заживления ран [8].

Физиологическое течение раневого процесса сопровождается фазовым изменением строения ее структурных элементов — эпидермиса, дермы и гиподермы, зависит от реактивности тканей и клеток в их составе [1]. Процесс заживления ран хорошо изучен и включает фазу воспаления, пролиферативную фазу, а также фазу организации рубца и эпителизации. На процесс заживления раны влияет множество различных факторов, в том числе содержание микро- и макроэлементов. Снижение уровня микроэлементов приводит к удлинению сроков заживления послеоперационных ран, препятствуя пролиферации фибробластов, синтезу коллагена и эпителизации [9,10]. В настоящем исследовании показано существенное влияние содержания ряда микро- и макроэлементов на процесс заживления хирургических ран у больных с повышенным ИМТ. В другой работе, выполненной С.А. Точило и соавт. (2020), выявлены значимые отклонения уровня макро- и микроэлементов у пациентов после

абдоминальных хирургических вмешательств, имеющих в послеоперационном периоде серьезные жизнеугрожающие осложнения в виде сепсиса и синдрома полиорганной недостаточности [11].

Поиск причины длительно незаживающих хирургических ран является важной задачей хирурга. Перспективным решением этой проблемы является изучение элементного состава волос, позволяющее выявить сдвиги в обмене макро- и микроэлементов и своевременно провести их коррекцию.

Заключение

У пациенток, имеющих избыточную массу тела, с осложненным и замедленным течением раневого процесса выявлены значимые отклонения в содержании микроэлементов. Высокую прогностическую значимость в отношении риска замедления раневого процесса и развития длительно незаживающих ран имеют снижение уровней лития (Li < 0,04), германия (Ge < 0,07), бора (B < 1,11) и йода (I < 0,06) с уровнями абсолютного риска более 58,1%. Пациентам с запланированным хирургическим вмешательством необходим тщательный мониторинг содержания макро- и микроэлементов с целью выявления их дефицита.

Литература

(п.п. 1–10 см. References)

- Точило С.А., Марочков А.В., Ливинская В.А. Динамика макро- и микроэлементов у пациентов с синдромом полиорганной недостаточности в абдоминальной хирургии. *Хирургия. Восточная Европа*. 2020; 9(4): 425-38. <https://doi.org/10.34883/PE.2020.9.4.024>

References

1. Han G., Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther.* 2017; 34(3): 599-610. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>
2. Wang P.H., Huang B.S., Horng H.C., Yeh C.C., Chen Y.J. Wound healing. *J Chin Med Assoc.* 2018; 81(2): 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.11.002>
3. Derakhshandeh H., Kashaf S.S., Aghabaglou F., Ghanavati I.O., Tamayol A. Smart Bandages: The Future of Wound Care. *Trends Biotechnol.* 2018; 36(12): 1259-74. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.07.007>
4. Bi H., Li H., Zhang C., Mao Y., Nie F., Xing Y., et al. Stromal vascular fraction promotes migration of fibroblasts and angiogenesis through regulation of extracellular matrix in the skin wound healing process. *Stem Cell Res Ther.* 2019; 10(1): 302. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1415-6>
5. Rech M., To L., Tovbin A., Smoot T., Mlynarek M. Heavy metal in the intensive care unit: a review of current literature on trace element supplementation in critically ill patients. *Nutr Clin Pract.* 2014; 29(1): 78-89. doi: 10.1177/0884533613515724
6. Sandy-Hodgetts K. Surgical wound complications: a 21st century problem? *J Wound Care.* 2019; 28(10): 645. <https://doi.org/10.12968/jowc.2019.28.10.645>
7. Hirt P.A., Castillo D.E., Yosipovitch G., Keri J.E. Skin changes in the obese patient. *J Am Acad Dermatol.* 2019; 81(5): 1037-57. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.12.070>
8. Chen S.J., Yen C.H., Huang Y.C., Lee B.J., Hsia S., Lin P.T., et al. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010; 89(3): 219-29. <https://doi.org/10.1177/0022034509359125>
9. Kavalukas S.L., Barbul A. Nutrition and wound healing: an update. *Plast Reconstr Surg.* 2011; 127, Suppl 1: 38-43. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e318201256c>
10. Medlin S. Nutrition for wound healing. *Br J Nurs.* 2012; 21(12): 11-5. <https://doi.org/10.12968/bjon.2012.21.Sup12.S11>
11. Tochilo S.A., Marochkov A.V., Livinskaya V.A. Dynamics of macro- and microelements in patients with multiple organ dysfunction syndrome in abdominal surgery. *Khirurgiya. Vostochnaya Evropa.* 2020; 9(4): 425-38. (in Russian). <https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.4.024>

Сведения об авторах:

Сухопарова Елена Петровна, канд. мед. наук, ФГБОУ ВО «Первый СпбГМУ им. акад. И.П. Павлова»;
Зиновьев Евгений Владимирович, доктор мед. наук, проф., ГБУ СПб НИИ СП им. И.И. Джанелидзе;
Князева Екатерина Сергеевна, ординатор, каф. пластической хирургии ГБУ СПб НИИ СП им. И.И. Джанелидзе.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092.9

Крюков И.А.^{1,2}, Ершов А.В.^{2,3}, Лобанов А.В.⁴, Гребенчиков О.А.²

Влияние продолжительности экспозиции ксенона на объем ишемического повреждения головного мозга в эксперименте

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

117198, Москва, Россия, ул. Саморы Машела, д. 1;

²ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии»,

107031, Москва, Россия, ул. Петровка, д. 25, стр. 2;

³ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет),

127994, ГСП-4, Москва, Россия, Рахмановский пер, д. 3;

⁴ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,

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

Введение. Разработка новых подходов к терапии и профилактике острого ишемического повреждения центральной нервной системы остается актуальной задачей в связи с ростом частоты инсультов и черепно-мозговых травм в популяции.

Цель исследования – оценка влияния ингаляции ксенона 0,5 МАК на объем поражения и отек головного мозга при экспериментальном инсульте для изучения возможностей его применения в комплексе лечебных мероприятий.

Методика. Исследование было выполнено на 70 крысах путем моделирования фокальной ишемии-реперфузии по методу Лонга и последующей ингаляции ксенона 0,5 МАК в течение 30, 60 и 120 мин. Для оценки степени поражения головного мозга использованы магнитно-резонансная томография и метод сканирования срезов головного мозга, окрашенных 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом.

Результаты. По данным томографии экспозиция ксенона 0,5 МАК в течение 30 мин приводила к уменьшению объема очага ишемического инсульта на 17% ($p=0,07$) и уменьшению объема перифокального отека головного мозга на 15% ($p=0,065$) по сравнению с контрольной группой, экспозиция в течение 60 мин – на 27% ($p=0,03$) и 25% ($p=0,025$), в течение 120 мин – на 30,6% ($p=0,045$) и 30,6% ($p=0,045$) соответственно. Результаты, полученные при помощи окрашивания трифенилтетразолием хлоридом, подтвердили уменьшение объема ишемического инсульта под влиянием ксенона 0,5 МАК при увеличении длительности экспозиции.

Заключение. На основании выполненных исследований сделано заключение о нейропротекторном эффекте ксенона 0,5 МАК при экспозиции 60 мин, что создает предпосылки для дальнейшего его изучения в клинической практике. Увеличение времени экспозиции до 120 мин не усиливает нейропротекторные свойства ксенона.

Ключевые слова: ксенон; ишемическое повреждение; головной мозг

Для цитирования: Крюков И.А., Ершов А.В., Лобанов А.В., Гребенчиков О.А. Влияние продолжительности экспозиции ксенона на объем ишемического повреждения головного мозга в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66 (4): 73-78.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.73-78

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Гребенчиков О.А., Ершов А.В.; сбор и обработка материала – Крюков И.А.; подготовка иллюстративного материала – Гребенчиков О.А., Крюков И.А.; статистическая обработка – Крюков И.А., Лобанов А.В.; написание текста – Крюков И.А., Гребенчиков О.А.; редактирование – Крюков И.А., Лобанов А.В., Ершов А.В., Гребенчиков О.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Крюков Иван Александрович, e-mail: ia.kriukov@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии» по теме НИР «Анестетическая нейропротекция ксеноном и севофлураном при тяжелых повреждениях головного мозга. Клинико-экспериментальное исследование» (№ 0427-2019-0035).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.05.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Krukov I.A.^{1,2}, Ershov A.V.^{2,3}, Lobanov A.V.⁴, Grebenchikov O.A.²

The effect of xenon exposure duration on the volume of ischemic brain injury in experiment

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Samory Mashela St. 1, Moscow, 117198, Russian Federation;

²Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, Petrovka St. 25, Bldg. 2, Moscow, 107031, Russian Federation;

³Sechenov First Moscow State Medical University, Rakhmanovsky Pereulok 3, GSP-4, Moscow, 127994, Russian Federation;

⁴Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya St. 8, Moscow, 125315, Russian Federation

The development of new approaches to treatment and prevention of acute ischemic damage to the central nervous system remains relevant due to the increasing incidence of stroke and traumatic brain injury in the population. **The aim** of this study was to evaluate the effect of the duration of xenon 0.5 MAC inhalation on the volume of lesion and cerebral edema in experimental stroke.

Methods. The study was performed on 70 rats by modeling focal ischemia-reperfusion by the Long method with subsequent inhalation of xenon 0.5 MAC for 30, 60 or 120 minutes. Magnetic resonance imaging and scanning of brain sections stained with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) were used to assess the degree of brain damage.

Results. According to the tomography data, the 30-min exposure to xenon 0.5 MAC decreased the volume of the ischemic stroke focus by 17% ($p=0.07$) and the volume of perifocal cerebral edema ($p=0.065$) by 15% compared to the control group; a 60-min exposure induced decreases by 27% ($p=0.03$) and 25% ($p=0.025$); and a 120-min exposure induced decreases by 30.6% ($p=0.045$) and 30.6% ($p=0.045$), respectively. The results obtained with the TTS staining demonstrated a decrease in ischemic stroke produced by the xenon 0.5.MAC exposure of increased duration.

Conclusion. The study showed a neuroprotective effect of a 60-min exposure to xenon 0.5 MAC, which makes it promising for further study in clinical practice. Increasing the exposure time to 120 min does not enhance the neuroprotective effect of xenon.

Keywords: xenon; ischemic damage; brain

For citation: Krukov I.A., Ershov A.V., Lobanov A.V., Grebenchikov O.A. The effect of xenon exposure duration on the volume of ischemic brain injury in experiment. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(4): 73-78. (in Russian)
DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.73-78

Author's contribution: research concept and design – Grebenchikov O.A., Ershov A.V.; collection and processing of material – Krukov I.A.; preparation of illustrative material – Grebenchikov O.A., Krukov I.A.; statistical processing – Lobanov A.V., Krukov I.A.; text writing – Krukov I.A., Grebenchikov O.A.; editing – Krukov I.A., Lobanov A.V., Ershov A.V., Grebenchikov O.A. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article –all authors.

For correspondence: *Ivan A. Krukov*, anesthesiologist–resuscitator of the intensive care unit, Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia, 1 Samory Mashela St., Moscow, 117198, Russian Federation, e-mail: ia.kriukov@yandex.ru

Information about the authors:

Krukov I. A., <https://orcid.org/0000-0003-3121-2981>

Lobanov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5159-3227>

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

Grebenchikov O.A., <https://orcid.org/0000-0001-9045-6017>

Financing. The work was carried out with the financial support of the Federal Scientific and Clinical Center for Resuscitation and Rehabilitation on the topic of research and development “Anesthetic neuroprotection by xenon and sevoflurane in severe brain injuries. Clinical and experimental study” (No. 0427-2019-0035).

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

Received 27.05.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

Проблема инсульта имеет высокую медико-социальную значимость, что обусловлено его широким распространением во всех странах мира. В Российской Федерации заболеваемость инсультом входит в число лидеров среди всех видов сердечно-сосудистых заболеваний, а смертность занимает одно

из первых мест в зависимости от региона. К концу 1-го года после перенесенного инсульта умирает 50% заболевших, а через 7 лет – почти 80% пациентов. Прогнозируется увеличение абсолютного числа инсультов в ближайшие годы на 11% в связи со старением населения [1, 2]. Кроме инсульта ишемическое повреждение мозга характерно для черепно-мозговых травм, частота которых возрастает

с каждым годом из-за влияния техногенных факторов и затрагивает, прежде всего, лиц трудоспособного возраста [3]. Все вышеизложенное обуславливает необходимость более детальной разработки новых подходов к терапии и профилактике острого ишемического повреждения центральной нервной системы. На сегодняшний день ни один нейропротекторный препарат, испытанный в мультифокальных клинических исследованиях, не доказал свою абсолютную эффективность, в связи с чем поиск новых подходов к терапии ишемических повреждений головного мозга остается актуальной задачей медицины. Согласно большому количеству недавних исследований, выраженными нейропротекторными свойствами обладает ингаляционный анестетик ксенон [4–8]. Установлено, что ксенон обладает противовоспалительным эффектом, его воздействие на зону перифокального воспаления и ограничение избыточного воспаления в этой зоне является значимым фактором в защите мозга [9]. Дэвид Х.Н. с соавторами установили, что ксенон обладает нейропротекторным эффектом в концентрации 50 об.% за счет ингибирования активности тканевого плазминогена [10]. На наш взгляд, необходимо изучить нейропротекторный эффект субанестетической дозы ксенона (0,5 МАК) при различных экспозициях.

Цель исследования – оценка влияния ингаляции ксенона 0,5 МАК при различной длительности экспозиции на объем поражения и выраженность отека головного мозга при экспериментальном инсульте.

Методика

Эксперимент выполнен на 70 SPF крысах самцах массой 300–350 г. Проведение работ осуществлялось в соответствии с приказом Минздрава России №199 от 1 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и в соответствии с регламентом декларации ЕС от 2010 г. об использовании лабораторных животных в научных целях. Протокол исследования одобрен этической комиссией Института. Фокальную ишемию моделировали по методу Лонга с незначительными модификациями. В качестве анестезии использовали 12% раствор хлоралгидрата (300 мг/кг) внутривенно. Операционную область на поверхности шеи обрабатывали 0,05% раствором хлоргексидина. Проводили срединный разрез, с правой стороны общую сонную артерию пережимали сосудистой клипсой, на внутреннюю сонную артерию накладывали лигатуру из викрила, внешнюю сонную артерию перерезали сосудистыми ножницами на расстоянии 3–5 мм от бифуркации. Через отрезок внешней сонной ар-

терии на глубину внутренней сонной артерии (19–21 мм, до перекрытия средней мозговой артерии) вводили нейлоновую нить диаметром 0,25 мм, покрытую силиконом и смоченную в растворе гепарина и фиксировали к внутренней сонной артерии сосудистой клипсой. Кровоток перекрывали на 60 мин, после извлечения нити из сосуда, кровоснабжение в бассейне средней мозговой артерии восстанавливалось. Культю внешней сонной артерии коагулировали электрокаутером до полной герметичности и снимали все клипсы. Средний разрез шеи зашивали викрилом № 4 и обрабатывали 5% раствором бриллиантового зеленого. Сразу после извлечения нити животных помещали в герметичную камеру. Группе «контроль» подавалась кислородно-воздушная смесь, группе «исследования» – ксенон 0,5 МАК. Ложнооперированным животным ($n=10$) проводили те же процедуры, но без введения силиконовой нити. Объем ишемического инсульта у наркотизированных животных оценивали по стандартному протоколу через 24 ч на томографе с индукцией магнитного поля 7 Тесла и градиентной системой 105 мТл/м (BioSpec 70/30, Bruker) в течение 25 мин. На 7-е сут после моделирования ишемии животных декапитировали, мозг промывали физиологическим раствором, с помощью специальной формы готовили корональные срезы толщиной 2 мм, которые окрашивали 1%-м раствором 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТС, «Sigma») на ФСБ pH 7,4 в течение 10 мин при 37 °С и фиксировали в растворе 10% формалина в 0,1 М ФСБ. Затем срезы сканировали с обеих сторон на сканере hp scanjet 4500 с. Анализ цифровых изображений проводили с помощью свободно распространяемой программы анализа медицинских изображений «ImageJ» (НИН, Бетесда, США). Неокрашенные ТТС участки принимали за некротические зоны. Площадь повреждения обводили вручную. Объем ишемического инфаркта определяли по формуле:

Инфаркта = $\sum A \cdot d$, где $\sum A$ – сумма площадей всех МР-срезов, d – ширина срезов.

Объем отека мозга определяли по формуле:

Отек мозга = $((S_{ип} - S_{кп}) / S_{кп}) \cdot 100$, где:

$S_{ип}$ – площадь ипсилатерального полушария;

$S_{кп}$ – площадь контралатерального полушария.

Исследование было проведено с использованием оборудования ЦКП «Прикладная Генетика» МФТИ. (Соглашение № 075-15-2021-684).

Для статистического анализа использовали программу Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.). Средние значения представлены как медиана (нижний квартиль; верхний квартиль). Межгрупповые различия показателей оценивали по U-критерия Уитни–Манна, статистически

значимыми считали показатели при $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили с расчетом коэффициента корреляции Спирмена.

Результаты

По данным магнитно-резонансной томографии (МРТ) наибольший размер очага ишемического повреждения выявлен у животных группы контроля, в группе ложнооперированных животных признаки ишемического повреждения мозга отсутствовали. После экспозиции ксенона 0,5 МАК в течение 30 мин объём очага ишемического инсульта уменьшился на 17% ($p=0,07$), в течение 60 мин – на 27% ($p=0,03$), в течение 120 мин – на 30,6% ($p=0,045$) по сравнению с контрольными показателями. Ингаляция ксенона в течение 60 мин позволила сократить очаг ишемического повреждения на 12,3% ($p=0,23$), а в течение 120 мин – на 16,7% ($p=0,071$) по сравнению с экспозицией 30 мин (таблица). Различия в объеме ишемического повреждения при экспозиции 60 и 120 мин составили 5,1% ($p=0,65$). Установлена обратная корреляционная связь слабой степени между временем экспозиции и объемом инсульта ($R=-0,22, p=0,014$).

Объем перифокального отека по данным магнитно-резонансной томографии МРТ после экспозиции ксенона 0,5 МАК в течение 30 мин уменьшился на 15% ($p=0,065$), в течение 60 мин – на 25% ($p=0,025$), в течение 120 мин – на 24% ($p=0,03$) по сравнению с контрольными показателями. Ингаляция ксенона в течение 60 мин позволила сократить очаг ишемического повреждения на 16,1% ($p=0,08$), а в течение 120 мин – на 17,6% ($p=0,069$) по сравнению с экспозицией 30 мин. Различия в объеме перифокального отека при экспозиции 60 и 120 мин составили 1,8% ($p=0,98$). Установлена обратная корреляционная связь слабой степени между временем экспозиции ксенона 0,5 МАК и объемом перифокального отека ($R=-0,17, p=0,038$).

По данным ТТС-метода также не выявлено ишемического повреждения в группе ложнооперированных животных, а наибольший очаг отмечался в контрольной группе. Объем очага ишемического инсульта после экспозиции ксенона 0,5 МАК в течение 30 мин уменьшился на 5% ($p=0,7$), в течение 60 мин – на 20% ($p=0,04$), в течение 120 мин – на 24% ($p=0,009$). Ингаляция ксенона в течение 60 мин позволила сократить очаг ишемического поврежде-

Таблица/Table

Оценка объема ишемического инсульта и перифокального отека при экспозиции ксенона 0,5 МАК различной продолжительности (Me (LQ; HQ))

Assessment of ischemic stroke and perifocal edema volume at xenon 0,5 MAC exposure of different duration (Me (LQ; HQ))

Показатели Indicators	Группа животных Animal group					
	Время экспозиции 30 мин / Exposure time 30 min		Время экспозиции 60 мин / Exposure time 60 min		Время экспозиции 120 мин / Exposure time 120 min	
	Контроль (n=10) control	Ксенон (n=10) xenon	Контроль (n=10) control	Ксенон (n=10) xenon	Контроль (n=10) control	Ксенон (n=10) xenon
Объем очага ишемического инсульта по данным МРТ, мм ³ / The volume of the ischemic stroke focus according to MRI, mm ³ .	245,0 (186,0; 271,0)	203,0 (178,0; 245,0)	243,5 (179,0; 269,0)	178,0 (158,0; 205,0)*	241,5 (170,0; 267,0)	169,0 (151,0; 191,0)*
Объем перифокального отека по данным МРТ, мм ³ / Volume of perifocal edema by MRI, mm ³	117,0 (100,5; 128,0)	99,5 (79,0; 118,0)	111,0 (101,5; 121,0)	83,5 (71,0; 91,0)*	108,0 (99,5; 120,0)	82,0 (73,0; 92,0)*
Объем очага ишемического инсульта по данным ТТС-метода, мм ³ / The volume of the ischemic stroke focus according to the TTS method is mm ³	188,0 (165,5; 235,0)	179,0 (158,0; 240,0)	203,0 (185,5; 225,0)	162,0 (151,0; 213,0)*	207,5 (180,5; 227,0)	158,0 (141,0; 198,0)*

Примечание. Данные представлены как медиана (нижний квартиль; верхний квартиль), * – наличие статистически значимых различий по сравнению с группой контроля, $p < 0,05$, критерий Манна–Уитни.

Note. The data is presented as median (lower quartile; upper quartile), * – presence of statistically significant differences compared to the control group, $p < 0.05$, Mann–Whitney test.

ния на 9,5% ($p=0,79$), а в течение 120 мин – на 11,7% ($p=0,61$) по сравнению с экспозицией 30 мин. Различия в объеме ишемического повреждения при экспозиции 60 и 120 мин составили 2,5% ($p=0,8$). Установлена обратная корреляционная связь слабой степени между временем экспозиции и объемом инсульта ($R=-0,20$, $p=0,025$).

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что экспозиция ксенона 0,5 МАК в течении 30 мин в группе исследования практически не влияла на уменьшение объема очага ишемического инсульта и объема перифокального отека головного мозга. Увеличение экспозиции до 60 мин способствовало статистически значимому снижению объема перифокального отека головного мозга и очага ишемического инсульта в среднем на четверть по данным двух методов исследования. Дальнейшее увеличение времени экспозиции до 120 мин не оказывало существенного влияния на объем ишемического повреждения головного мозга.

Обсуждение

Нейропротективные свойства подразумевают под собой способность предотвращать гибель нервных клеток за счет изменения в патогенетической цепи реакций, приводящих к нарушению функций и возможной смерти. Защитные свойства ксенона основываются на его способности ингибировать NMDA-рецепторы [5, 8] и tPA-индуцированный тромболизис [11], сохранять калиевые каналы [11, 12], инактивировать (фосфорилировать) фермент гликоген-синтазу киназу и увеличивать активность ферментов антиоксидантной защиты (гемоксигеназы, супероксиддисмутазы, каталазы) [13, 14], снижать экспрессию провоспалительных генов, оказывая противовоспалительный эффект [6, 9].

Отрицательное влияние ксенона на показатели интракраниальной системы не установлено, показано, что он не повышает внутричерепное давление, не изменяет объем крови и мозговой кровотока, не стимулирует эпилептогенность [4, 15]. Не выявлено токсичности и тератогенности ксенона, а также существенного влияния на сердечный и церебральный метаболизм [4, 16, 17]. Рядом исследователей показано кардиопротективное действие ксенона при миокардиальной ишемии, а также снижение ренального повреждения в модели ишемически-реперфузионного повреждения почки [18–20]. Установлено защитное действие ксенона в субанестетических дозировках при ингаляции до и после возникновения ишемии головного мозга [21–23].

Заключение

Показано, что для реализации нейропротекторных свойств ксенона в дозе 0,5 МАК при моделируемом ишемическом инсульте длительность ингаляции не должна быть менее 60 мин. Увеличение времени экспозиции до 120 мин не усиливает нейропротекторный эффект ксенона. Поиск фармакологических средств защиты мозга, которые были бы эффективны и безопасны, а также просты и удобны для использования в клинической практике – важная задача для исследователей. Однако экстраполяция результатов, полученных экспериментальным путем, в клиническую практику требует осторожности и дальнейшего углубленного изучения.

Литература

1. Ключихина О.А., Стаховская Л.В. Анализ эпидемиологических показателей инсульта по данным территориально-популяционных регистров 2009–2012 гг. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2014; 114: 63–9.
2. Пирадов М.А., Крылов В.В., Белкин А.А., Петриков С.С. *Инсульты. Интенсивная терапия. Национальное руководство*. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2017; 288–309.
3. Мирзаева Н.С. Некоторые аспекты патогенеза черепно-мозговой травмы. *Клиническая и профилактическая медицина*. 2018; 1(4): 79–84.
4. Буров Н.Е., Потапов В.Н., Макеев Г.П. Ксенон в анестезиологии. *Пульс*. 2000.
5. Гребенчиков О.А., Молчанов И.В., Шпичко А.И., Евсеев А.К. и др. Нейропротективные свойства ксенона по данным экспериментальных исследований. *Журнал им. Н.В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь*. 2020; 9(1): 85–95. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2020-9-1-85-95>
6. Кузовлев А.Н., Шпичко А.И., Рыжков И.А., Гребенчиков О.А. и др. Влияние ксенона на фосфорилирование киназы гликогенсинтазы-3 β и антиоксидантные ферменты в мозге крыс. *Журнал им. Н.В. Склифосовского Неотложная медицинская помощь*. 2020; 9(4): 564–72. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2020-9-4-564-572>
7. Рылова А.В., Лубнин А.Ю., Салова Е.М. Динамика ВЧД во время ксеноанестезии у нейрохирургических больных без внутричерепной гипертензии. *Анестезиол. и реаниматол.* 2010; 2: 36–9.
8. Стец В.В., Руденко М.И. Ксеноанестезия у кардиохирургических пациентов со сниженной фракцией выброса. *Материалы 3-й конф. анестезиологов-реаниматологов медицинских учреждений МО РФ «Ксенон и инертные газы в медицине»*. М.; 2012; 47–52.
9. Мизиков В.М., Вяткин А.А., Петросян Л.Г., Винницкий Л.И. и др. Комбинированная анестезия на основе ксенона и оценка возможности ее применения как метода нейропротективного воздействия при внутричерепных операциях. *Клиническая и экспериментальная хирургия. Журн. им. акад. Б.В. Петровского*. 2013; 1: 58–69.

References

- Klochikhina OA, Stakhovskaya LV. An analysis of epidemiological indices of stroke based on the data of a regional population register from 2009 to 2012. *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2014; 114(6): 63-9. (In Russian)
- Piradov M.A., Krylov V.V., Belkin A.A., Petrikov S.S. *Strokes. Intensive care. National guidance. [Insulty. Intensivnaya terapiya. Nacionalnoe rukovodstvo]*. Moscow: GEOTAR-Media. 2017; 288-309. (In Russian)
- Mirzayeva N.S. Some aspects of the pathogenesis of traumatic brain injury. *Klinicheskaya i profilakticheskaya meditsina*. 2018; 1(4): 79-84. (In Russian)
- Burov N.E., Potapov V.N., Makeev G.P. *Xenon in anesthesiology [Ksenon v anesteziologii]*. Pulse. 2000. (In Russian)
- Wilhelm S., Ma D., Maze M., Franks N.P. Effects of xenon in vitro and in vivo models of neuronal injury. *Anesthesiology*. 2002; 96(6): 1485-91. <https://doi.org/10.1097/0000542-200206000-00031>
- Homi H.M., Yokoo N., Ma D., et al. The neuroprotective effect of xenon administration during transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Anesthesiology*. 2003; 99(4): 876-81. <https://doi.org/10.1097/0000542-200310000-00020>
- Sheng S.P., Lei B., James M.L., Lascola C.D., Venkatraman T.N., Jung J.Y., et al. Xenon neuroprotection in experimental stroke: interactions with hypothermia and intracerebral hemorrhage. *Anesthesiology*. 2012; 117(6): 1262-75. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3182746b81>
- Grebenchikov O.A., Molchanov I.V., Shpichko A.I., Yevseyev A.K., et al. Neuroprotective Properties of Xenon According to Experimental Studies. *Zhurnal im. N.V. Sklifosovskogo Neotlozhnaya meditsinskaya pomoshch*. 2020; 9(1): 85-95. (In Russian). <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2020-9-1-85-95>
- Yang O., Huang O., Hu Z., Tang X. Potential Neuroprotective Treatment of Stroke: Targeting Excitotoxicity, Oxidative Stress, and Inflammation. *Front Neurosci*. 2019; 13:1036. PMID: 31611768. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01036>
- David H.N., Haelewyn B., Risso J.J., Colloc'h N., et al. Xenon is an inhibitor of tissue-plasminogen activator: adverse and beneficial effects in a rat model of thromboembolic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010; 30(4): 718-28. PMID: 20087367. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.275>
- Gruss M., Bushell T.J., Bright D.P., et al. Two-pore-domain K⁺ channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane. *Mol. Pharmacol*. 2004; 65(2): 443-52. DOI: 10.1124/mol.65.2.443
- Bantel C., Maze M., Trapp S. Neuronal preconditioning by inhalational anesthetics: evidence for the role of plasmalemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Anesthesiology*. 2009; 110(5): 986-95. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31819dadc7>
- Kuzovlev A.N., Shpichko A.I., Ryzhkov I.A., Grebenchikov O.A., et al. Effect of Xenon on the Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase 3 β and Antioxidant Enzymes in Rat Brain. *Zhurnal im. N.V. Sklifosovskogo Neotlozhnaya meditsinskaya pomoshch*. 2020; 9(4): 564-72. (In Russian). <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2020-9-4-564-572>
- Filev A.D., Silachev D.N., Ryzhkov I.A., Lapin K.N., et al. Effect of Xenon Treatment on Gene Expression in Brain Tissue after Traumatic Brain Injury in Rats. *Brain Sci*. 2021; 11(7): 889. <https://doi.org/10.3390/brainsci11070889>
- Rylova A.V., Lubnin A.Yu., Salova E.M. Dynamics of intracranial pressure during xenon anesthesia in neurosurgical patients without intracranial hypertension. *Anesteziologiya i reanimatologiya*. 2010; 2: 36-9. (In Russian)
- Wappler F., Rossaint R., Baumert J., et al. Multicenter randomized comparison of xenon and isoflurane on left ventricular function in patients undergoing elective surgery. *Anesthesiology*. 2007; 106: 463-71.
- Stets V.V., Rudenko M.I. Xenon anesthesia in cardiac surgery patients with reduced ejection fraction. *Materials of the 3rd conf. anesthesiologists-resuscitators of medical institutions of the Ministry of Defense of the Russian Federation "Xenon and inert gases in medicine" [Materialy 3 konferentsii anesteziologov-reanimatologov meditsinskikh uchrezhdeniy MO RF «Ksenon i inertnye gazy v meditsine»]*. Moscow, 2012; 47-52. (In Russian)
- Ma D., Lim T., Xu J., et al. Xenon preconditioning protects against renal ischemic-reperfusion injury via hif-1 α activation. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2009; 20(4): 713-20.
- Preckel B., Mullenheim J., Moloschavij A., et al. Xenon administration during early reperfusion reduces infarct size after regional ischemia in the rabbit heart in vivo. *Anesth. Analg*. 2000; 91: 1327-32.
- Weber N.C., Toma O., Wolter J.I., et al. The noble gas xenon induces pharmacological preconditioning in the rat heart in vivo via induction of PKC-epsilon and p38 MAPK. *Br. J. Pharmacol*. 2005; 144: 123-32.
- Mizikov V.M., Vyatkin A.A., Petrosyan L.G., et al. Combined anesthesia based on xenon and evaluation of its application as a method of neuroprotective effect in intracranial operations. *Klinicheskaya i eksperimental'naya khirurgiya. Zhurn. im. akad. B.V. Petrovskogo*. 2013; 1: 58-69. (In Russian)
- Laitio T., Maze M. Xenon limits brain damage following cardiac arrest. *Shock*. 2018; 18(1s3): 192-5.
- Dingley J., Tooley J., Porter H., Thoresen M. Xenon provides short-term neuroprotection in neonatal rats when administered after hypoxia-ischemia. *Stroke*. 2006; 37: 501-6.

Сведения об авторах:

Крюков Иван Александрович, врач анестезиолог-реаниматолог отд-ния реанимации и интенсивной терапии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва» Минздрава России, e-mail: ia.kriukov@yandex.ru;

Ершов Антон Валерьевич, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. экспериментальных исследований ФГБНУ «ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии», проф. каф. патологической физиологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет);

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

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

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092.9

Алилуев А.В.¹, Семенова Л.Ю.², Мальцева Н.В.³, Порядин Г.В.²

Влияние гипоксических тренировок на уровень метаболизма дофамина в структурах мозга крыс

¹ГБУЗ «Областной психоневрологический диспансер»,

456304, Челябинская область, Миасс, Гвардейская ул., д. 2;

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России,

117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1;

³ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)»,

454080, Челябинская область, Челябинск, просп. им. В.И. Ленина, д. 76

Введение. Повышенная тревожность относится к числу наиболее часто встречаемых симптомов посттравматического стрессового расстройства (ПТСР). Роль DA в развитии тревожного поведения до конца не ясна, однако есть данные свидетельствующие о его значимой роли в патогенезе тревожных расстройств. **Цель работы** – исследование влияния гипоксических тренировок на уровень метаболизма дофамина в структурах мозга крыс.

Методика. Исследование выполнено на 34 половозрелых самцах крыс Вистар, разделенных на 4 группы («Контроль», «ПТСР», «АПГ (адаптация к периодической гипоксии)», «ПТСР+АПГ»). В качестве модели экспериментального ПТСР была использована модифицированная модель хронического предаторного стресса. Состояние тревожности животных оценивали при помощи теста «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), рассчитывали индекс тревожности (ИТ). Концентрацию дофамина и его метаболитов (диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК/ДОПАС) и гомованилиновой кислоты (ГВК/HVA) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты. При исследовании влияния адаптации к периодической гипоксии на обмен дофамина и его метаболитов установлено снижение данных показателей в коре головного мозга, гиппокампе и гипоталамусе стрессированных животных. В среднем мозге хроническое стрессовое воздействие не привело к изменению уровня дофамина и его метаболитов по сравнению с контролем. При этом гипоксические тренировки сопровождалось снижением индекса тревожности.

Заключение. Представленные данные позволяют рассматривать адаптацию к гипоксии как эффективный способ коррекции посттравматического стрессового расстройства в церебральных структурах.

Ключевые слова: ПТСР; гипоксия; головной мозг; дофамин

Для цитирования: Алилуев А.В., Семенова Л.Ю., Мальцева Н.В., Порядин Г.В. Влияние гипоксических тренировок на уровень метаболизма дофамина в структурах мозга крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 79-85.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.79-85

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Семенова Л.Ю., Порядин Г.В.; сбор и обработка материала, подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка, написание текста – Алилуев А.В., Мальцева Н.В.; редактирование – Семенова Л.Ю., Порядин Г.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Алилуев Анатолий Владимирович, e-mail: aliluev@semena74.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.04.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Aliluev A.V.¹, Semenova L.Yu.², Maltseva N.V.³, Poryadin G.V.²

Effect of hypoxic training on dopamine metabolism in rat brain structures

¹Regional Neuropsychiatric Dispensary,

Gvardeyskaya St., 2, Miass 456304, Chelyabinsk Region, Russian Federation;

²Pirogov Russian National Research Medical University,

Ostrovityanova St. 1, Moscow, 117997, Russian Federation;

³South Ural State University (National Research University),

454080, Chelyabinsk Region, Chelyabinsk, prosp. V.I. Lenina, 76, Russian Federation

Increased anxiety is one of the most common symptoms of post-traumatic stress disorder (PTSD). Although the role of DA in the development of anxiety behavior has not been fully identified, some data evidence its significant contribution to the pathogene-

sis of anxiety disorders through the mesolimbic, mesocortical, and nigrostriatal systems. **The aim** of this research is to investigate the effect of hypoxic training on the level of dopamine metabolism in the brain structures of rats.

Methods. The study was performed on 34 sexually mature male Wistar rats divided into 4 groups (control, PTSD, adaptation to intermittent hypoxia (AIH), PTSD + AIH). The chronic predator stress model was used as a model of experimental PTSD. The elevated plus maze (EPM) test was used to assess the anxiety index (AI) of the rats. DA and its metabolites (dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA)) were measured using high performance liquid chromatography.

Results. The study of the effect of adaptation to intermittent hypoxia on the metabolism of dopamine and its metabolites showed the decrease of indices in the cerebral cortex, hippocampus, and hypothalamus of animals exposed to stress. In the midbrain, chronic stress exposure did not lead to changes in the levels of dopamine and its metabolites compared to controls. At the same time, hypoxic training was accompanied by an anxiety index decrease. **Conclusion.** The presented data allow us to consider adaptation to hypoxia as an effective way to correct post-traumatic stress disorder in the cerebral structures.

Keywords: PTSD hypoxia; hippocampus; brain; dopamin

For citation: Aliluev A.V., Semenova L.Yu., Maltseva N.V., Poryadin G.V. Effect of hypoxic training on dopamine metabolism in rat brain structures. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66 (4): 79-85. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.79-85

For correspondence: **Anatoly V. Aliluev**, Psychiatrist, Regional Neuropsychiatric Dispensary, Gvardeyskaya St., 2, Miass 456304, Chelyabinsk Region, Russian Federation, e-mail: aliluev@semena74.com

Author's contribution: study concept and design – Semenova L.Yu., Poryadin G.V.; collection and processing of material, illustrative material preparation, statistical processing – Aliluev A.V., Maltseva N.V.; writing text – Aliluev A.V., Maltseva N.V.; editing – Semenova L.Yu., Poryadin G.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

Information about the authors:

Aliluev A.V., <https://orcid.org/0000-0003-1541-732X>

Semenova L.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-1000-0453>

Maltseva N.V., <https://orcid.org/0000-0003-4745-5013>

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

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 05.04.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

Дофамин (ДА) – нейромедиатор, участвующий в процессах мотивации [1], вознаграждения [2], обучения и памяти [2, 3], зависимости [4, 5], желаний, движения, памяти страха и регуляции тревоги [2, 6]. Повышенная тревожность относится к числу наиболее частых симптомов посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) [7]. Оценка тревожности имеет большое значение для определения устойчивости животных к ПТСР в экспериментальных моделях [8].

Несмотря на то, что на сегодняшний день роль ДА в развитии тревожного поведения до конца не ясна, существует ряд данных, свидетельствующих о его значительном вкладе, (опосредованном мезолимбической, мезокортикальной и nigrostriarной системами), в патогенез тревожных расстройств [9– 11].

Адаптация к периодической гипоксии (АПГ) является широко используемым нефармакологическим методом терапии и профилактики ряда заболеваний [12], обладающим кардио-, нейро- и вазопротекторный эффектами. Так, в некоторых моделях неврологических

расстройств была продемонстрирована способность адаптации к гипобарической периодической гипоксии усиливать нейрогенез и экспрессию нейротрофических факторов, ограничивать оксидативный стресс, повышать толерантность мозга к гипоксии [13]. Однако использование АПГ в клинической практике все еще является эмпирическим, и механизмы действия, обеспечивающие эффективность АПГ, изучены недостаточно.

Цель работы – исследование влияния адаптации к периодической гипоксии на обмен дофамина и его метаболитов в церебральных структурах животных с посттравматическим стрессовым расстройством.

Методика

Исследование выполнено в осенне-зимний период на 34 половозрелых самцах крыс Вистар, содержащихся в отдельных клетках не более, чем по 9 особей в каждой. Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с регламентом декларации ЕС от 2010 г. об использовании лабораторных животных. Исследование одобрено этической комиссией университета.

Было сформировано 4 группы животных: 1-я группа «КОНТРОЛЬ» – интактные животные, 2-я группа «ПТСР» – крысы, у которых моделировали ПТСР, 3-я группа «АПГ» – животные, подвергнутые адаптации к периодической гипобарической гипоксии, 4-я группа «ПТСР+АПГ» – животные, у которых моделировали ПТСР, а затем подвергали АПГ. В качестве модели экспериментального ПТСР была использована модифицированная модель предаторного стресса Nagit Cohen и соавторов [14], в которой было изменено количество сеансов «запаха хищника» (кошачьей мочи) с одного до 10 раз. Животные подвергались стрессу ежедневно в течение 10 мин [15]. Мочевые метки взрослого домашнего кота предъявлялись животным группы «ПТСР» и «ПТСР+АПГ» в чашках Петри накрытых медицинской марлей. Животным из групп «КОНТРОЛЬ» и «АПГ» предъявляли чашку Петри с питьевой водой.

Адаптации к гипобарической гипоксии подвергались крысы из групп «АПГ» и «ПТСР+АПГ». Крыс помещали в гипобарическую барокамеру в течение 14 сут [16]. В группе «ПТСР+АПГ» гипоксические тренировки начинали на следующие сутки после завершения 10-суточного предаторного стресса, в группе «АПГ» – на следующие сутки после 10-суточного предъявления чашки Петри с питьевой водой. В 1-е сут крыс подвергали воздействию «высоты» 1 000 м (барометрическое давление 680 мм рт. ст., парциальное давление O_2 140 мм рт. ст.) в течение 30 минут; на 2-е сут – 2 000 м (барометрическое давление 600 мм рт. ст.; парциальное давление O_2 125 мм рт. ст.) в течение 1 ч; на 3-и сут – 3 000 м (барометрическое давление 530 мм рт. ст.; парциальное давление O_2 110 мм рт. ст.) в течение 1,5 ч; на 4-е сут – 4 000 м (барометрическое давление 460 мм рт. ст.; парциальное давление O_2 98 мм рт. ст.) в течение 2 ч; на 5-е сут – 4 000 м в течение 3 ч и с 6-го по 14-е сутки – 4 000 м за 4 ч. Скорость «подъема» на расчетную высоту не превышала 15 м/с.

Поведенческие реакции животных исследовали в конце эксперимента при помощи теста «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ). Индекс тревожности (ИТ), определяющий наличие тревожных расстройств, вычисляли по формуле [8]:

$$ИТ = 1 - \left(\frac{\left(\frac{\text{ВРЕМЯ В ОТКРЫТЫХ РУКАВАХ}}{\text{ОБЩЕЕ ВРЕМЯ В ПКЛ}} \right) + \left(\frac{\text{ЧИСЛО ЗАХОДОВ В ОТКРЫТЫЕ РУКАВА}}{\text{ОБЩЕЕ ЧИСЛО ЗАХОДОВ В ОТКРЫТЫЕ И ЗАКРЫТЫЕ РУКАВА}} \right)}{2} \right)$$

Концентрацию ДА и его метаболитов (диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК) определяли методом высоко-

эффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Образцы ткани головного мозга гомогенизировали в 0,1М хлорной кислоте и центрифугировали при 10000g и +4 °С в течение 30 мин. Супернатант отбирали и фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0,2 мкм (Whatman, США). На анализ брали 20 мкл образца. Анализ проводили в изократических условиях с использованием обращённо-фазовой колонки (длина алкильной цепи C_{18}) с последующей электрохимической детекцией. Электрохимическая детекция осуществлялась стеклоуглеродным электродом при +700 мВ. Количество ДА, ДОФУК и ГВК в образце выражали в пг/мг ткани.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с использованием post-hoc критерия Tukey для сравнения значимости различий между группами. Предварительная проверка выборки на нормальность распределения проводилась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Изучение взаимосвязей проводили путем расчета коэффициента корреляции по Спирмену (rs) при критическом уровне $p=0,05$.

Результаты

Анализ показателей приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) после воздействия на животных предаторным стрессом выявил снижение уровня тревожности, вызванный экспериментальным ПТСР, который оценивался по индексу тревожности (ИТ). Полученные данные статистически значимо различались между исследуемыми группами. У животных группы «ПТСР» ИТ был повышен на 13 % по сравнению с животными контрольной группы ($p<0,0001$). Хотя сам по себе курс АПГ не оказал существенного влияния на значение ИТ ($p=0,9$), в группе «ПТСР+АПГ» его величина снизилась на 6% относительно группы «ПТСР» ($p=0,01$) и не отличалась от контрольных значений ($p=0,06$). Снижение ИТ было связано с уменьшением времени пребывания в темных и увеличением времени нахождения в светлых рукавах ПКЛ, а также с увеличением количества заходов в светлые рукава лабиринта.

При исследовании обмена ДА в коре головного мозга выявлены различия между исследуемыми группами по уровню ДА, ДОФУК и ГВК (табл. 1). У животных группы «ПТСР» отмечено повышение концентрации ДА на 24% по сравнению с контролем ($p=0,03$). В группе «АПГ» относительно группы «ПТСР» уровень ДА был снижен в 1,4 раза ($p=0,001$). У животных групп «ПТСР+АПГ» и «АПГ» концентрация ДА статистически не отличалась от контрольной группы ($p=0,7$ и $p=0,5$, соответственно).

Концентрация ДОФУК в неокортексе была снижена у животных группы «АПГ» относительно контрольной группы в 1,5 раза ($p = 0,03$) и в 1,8 раз относительно группы «ПТСР» ($p = 0,001$). Также в группе «АПГ» концентрация ГВК также снижалась в 1,4 раза по сравнению с животными группы «ПТСР» ($p = 0,01$). У животных группы «ПТСР+АПГ» концентрация ДОФУК и ГВК достоверно не отличались от контрольной группы ($p = 0,6$ и $p = 0,8$, соответственно).

В гиппокампе животных обнаружены различия между исследуемыми группами по уровню ДА, ДОФУК и ГВК (табл. 1). В группе «ПТСР» выявлено снижение уровня ДА в 1,7 раз ($p = 0,02$) и ГВК в 2 раза ($p = 0,0002$) при одновременном повышении содержания ДОФУК почти на 70 % ($p = 0,02$) по сравнению с контролем. При сравнении животных группы «АПГ» с контролем установлено снижение уровня ДА в 1,8 раз ($p = 0,009$) при статистически недостоверном изменении концентрации ДОФУК и ГВК ($p = 0,6$ и $p = 0,1$, соответственно). При сравнении группы «АПГ» с группой «ПТСР» обнаружены более низкие значения ДОФУК ($p = 0,0007$) и более высокие ГВК ($p = 0,03$). Курс АПГ привел к нормализации уровня нейромедиаторов и их метаболитов в гиппокампе стрессированных жи-

вотных. Это выразилось в снижении уровня ДОФУК в группе «ПТСР+АПГ» по сравнению с группой «ПТСР» ($p = 0,0005$), тогда как уровень ГВК в этой группе был ниже, чем в контроле ($p = 0,003$), но выше, чем в группе «ПТСР».

При изучении обмена ДА в гипоталамусе выявлены статистически значимые различия между исследованными группами (табл. 2). У животных групп «ПТСР» и «АПГ» отмечено 1,5-кратное снижение концентрации ДА относительно контрольной группы ($p = 0,01$ и $p = 0,006$, соответственно).

Курс гипоксических тренировок у животных группы «ПТСР+АПГ» привел к повышению уровня ДА относительно групп «ПТСР» ($p = 0,002$) и «АПГ» ($p = 0,0008$), что свидетельствует о нормализации содержания ДА в гипоталамусе у стрессированных животных. Концентрации ДОФУК и ГВК статистически значимо не различались между группами.

Исследование моноаминов-нейротрансмиттеров в таламусе выявило наличие статистически значимых различий по уровню ДА и ГВК (табл. 2). Курс адаптации к АПГ снижал уровень ДА у нестрессированных животных по сравнению с контролем ($p = 0,04$), с животными групп «ПТСР» ($p = 0,007$) и «ПТСР+АПГ»

Таблица 1/Table 1

Влияние адаптации к периодической гипоксии на содержание дофамина и его метаболитов в структурах конечного мозга животных при экспериментальном посттравматическом стрессовом расстройстве

Effect adaptation to intermittent hypoxia on level of the dopamine and its metabolites in the structures of the telencephalon (terminal brain) of animals in experimental post-traumatic stress disorder

Отдел мозга Brain section	Неокортекс / Neocortex			Гиппокамп / Hippocampus			
	Группа / Показатель Groups / indicators	ДА, пг/мг ткани DA, pg/mg tissue	ДОФУК, пг/мг ткани DOPAC, pg/mg tissue	ГВК, пг/мг ткани HVA, pg/mg tissue	ДА, пг/мг ткани DA, pg/mg tissue	ДОФУК, пг/мг ткани DOPAC, pg/mg tissue	ГВК, пг/мг ткани HVA, pg/mg tissue
Контроль Control		603,0± 35,8	17,3± 1,3	14,0± 0,9	517,1± 27,8	251,4± 25,2	185,7± 8,7
ПТСР PTSD		749,9±52,9 ¹	20,3± 1,9	16,2± 1,6	316,9±65,9 ¹	420,7± 54,8 ¹	88,3± 16,2 ¹
АПГ AIH		536,8±27,9 ²	10,9± 1,4 ^{1,2}	11,5± 0,6 ²	294,4± 40,3 ¹	183,3±38,78 ²	140,0±13,0 ²
ПТСР+АПГ PTSD+AIH		653,2± 6,9	14,4± 1,9	12,6± 0,8	348,9± 24,5	178,0± 20,4 ²	113,3±11,1 ¹

Примечание. ДА – дофамин, ДОФУК – диоксифенилуксусная кислота, ГВК – гомованилиновая кислота. ПТСР – крысы, у которых моделировали ПТСР, АПГ – животные, подвергнутые адаптации к периодической гипобарической гипоксии, ПТСР+АПГ – животные, у которых моделировали ПТСР, а затем подвергали АПГ. 1 – значимые отличия от группы «Контроль», $p < 0,05$; 2 – значимые отличия от группы «ПТСР», $p < 0,05$.

Notes. DA – dopamine, DOPAC – dioxyphenylacetic acid, HVA – homovanillic acid. PTSD -- a rat model of PTSD, AIH – animals exposed to the adaptation to intermittent hypoxia, PTSD+AIH – animals model of PTSD with subsequent exposition to AIH.

1 – statistically significant differences from the group «Controls», $p < 0,05$; 2 – statistically significant differences from the group «PTSD», $p < 0,05$.

($p = 0,03$). Уменьшение концентрации ГВК ($p = 0,007$) у животных группы «ПТСР» связано со снижением обмена ДА. Курс АПГ значимо повышал уровень ГВК у стрессированных животных ($p = 0,002$), приводя его к нормальным значениям.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о вовлечении коры головного мозга, гиппокампа, гипоталамуса и таламуса в антистрессорные механизмы адаптации животных к гипобарической периодической гипоксии.

При анализе содержания ДА в среднем мозге также выявлены различия (табл. 2). У животных групп «АПГ» и «ПТСР+АПГ» обнаружено повышение уровня ДА в 1,1 раза относительно группы «Контроль» ($p = 0,02$ и $p = 0,04$, соответственно). Поскольку само по себе стрессовое воздействие не привело к статистически значимым изменениям ДА в среднем мозге, можно предположить, что его повышение в этих группах является эффектом курса АПГ. При исследовании метаболитов ДА различия не обнаружены. Следовательно, можно предположить, что метаболиты ДА средне-

го мозга не участвуют в механизмах реализации тревожной симптоматики при ПТСР.

Обсуждение

Представленные в настоящем исследовании результаты анализа дофаминового обмена в коре головного мозга показали повышение концентрации самого нейромедиатора в группе стрессированных животных по сравнению с контролем. Полученные данные могут свидетельствовать об активации мезопрефронтальных дофаминергических нейронов в ответ на действие психического стрессора и повышенной скорости выброса ДА по сравнению с другими дофаминергическими проекциями среднего мозга [17]. Эти нейроны преимущественно активируются стрессовыми факторами и характеризуются сниженной плотностью или отсутствием специфических ауторецепторов, способствующих регуляции дофаминергической нейротрансмиссии. Согласно литературным данным мезопрефронтальные дофаминергические нейроны участвуют в адаптации животных в ситуациях, связанных со стрессом [18, 19].

Таблица 2/Table 2

Влияние гипоксического посткондиционирования на содержание дофамина и его метаболитов в стволовых структурах головного мозга животных при экспериментальном посттравматическом стрессовом расстройстве

The hypoxic postconditioning effect on level of the dopamine and its metabolites in the brain stem structures of animals in experimental post-traumatic stress disorder

Отдел мозга Brain section	Гипоталамус Hypothalamus			Таламус Thalamus			Средний мозг Midbrain		
	ДА, пг/мг ткани DA, pg/ mg tissue	ДОФУК, пг/мг ткани DOPAC, pg/ mg tissue	ГВК, пг/ мг ткани HVA, pg/ mg tissue	ДА, пг/мг ткани DA, pg/ mg tissue	ДОФУК, пг/мг ткани DOPAC, pg/mg tissue	ГВК, пг/мг ткани HVA, pg/ mg tissue	ДА, пг/ мг ткани DA, pg/ mg tissue	ДА, пг/мг ткани DA, pg/mg tissue	ГВК, пг/ мг ткани HVA, pg/ mg tissue
Контроль Control	457,9± 19,7	191,9± 18,5	127,8± 9,7	1354,9 ±105,7	855,1± 148,7	232,6± 29,7	131,5± 5,4	4,1± 2,8	1,0± 1,0
ПТСР PTSD	313,4± 39,3 ¹	246,6± 81,9	111,9± 4,5	1448,9 ±133,3	1007,2 ±79,6	105,7± 5,9 ¹	133,7± 5,3	5,3± 2,2	2,1± 1,4
АПГ AIH	305,1± 33,1 ¹	182,3± 19,6	129,8± 14,8	1032,0± 85,7 ^{1,2}	804,0± 80,4	186,8± 28,9	149,6± 6,1 ^{1,2}	1,4± 1,4	1,1± 1,1
ПТСР+АПГ PTSD + AIH	505,1± 27,6 ^{2,3}	221,8± 15,8	128,1± 9,4	1354,2± 102,8 ³	936,9± 48,3	242,9± 21,6 ²	146,8± 4,8 ¹	2,0± 1,4	0,8± 0,8

Примечание. ДА – дофамин, DOPAC – диоксифенилуксусная кислота, HVA – гомованилиновая кислота. ПТСР – крысы, у которых моделировали ПТСР, АПГ – животные, подвергнутые адаптации к периодической гипобарической гипоксии, ПТСР+АПГ – животные, у которых моделировали ПТСР, а затем подвергали АПГ.

1 – статистически значимые отличия от группы «Контроль», $p < 0,05$; 2 – статистически значимые отличия от группы «ПТСР», $p < 0,05$; 3 – статистически значимые отличия от группы «АПГ», $p < 0,05$

Notes. DA – dopamine, DOPAC – dioxyphenylacetic acid, HVA – homovanillic acid. PTSD – a rat model of PTSD, AIH – animals exposed to the adaptation to intermittent hypoxia, PTSD+AIH – animals model of PTSD with subsequent exposition to AIH.

1 – statistically significant differences from the group «Controls», $p < 0,05$; 2 – statistically significant differences from the group «PTSD», $p < 0,05$; 3 – statistically significant differences from the group AIH, $p < 0,05$.

Курс гипоксии сам по себе приводил к снижению уровня ДА и его метаболитов в коре головного мозга по сравнению со стрессированными животными, не отличаясь при этом от контрольных значений по большинству показателей. У стрессированных животных (группа «ПТСР+АПГ») гипоксические тренировки нивелировали эффекты предаторного стресса, приводя к нормализации уровня ДА и его метаболитов.

Также полученные в настоящем исследовании результаты демонстрируют снижение концентрации ДА в гиппокампе у стрессированных животных по сравнению с контролем. Эти данные согласуются с ранее проведенными исследованиями [20], где показано, что сниженная дофаминергическая нейротрансмиссия приводит к нарушению угасания страха. Более того, хронический предаторный стресс приводил к изменению метаболизма этого нейротрансмиттера по сравнению с контролем: отмечалось повышенное содержание ДОФУК и сниженное – ГВК. Ранее показано, что уровень ГВК значительно снижается в ликворе пациентов с боевым ПТСР [21]. Согласно результатам, полученным Ruggiero R.N. и соавт. [22], механизм развития различных психических заболеваний связан с нарушением синаптической пластичности между префронтальной корой и гиппокампом. Стресс угнетает долгосрочное потенцирование (ЛТР) гиппокампа, тем самым ухудшая его функциональную активность [23].

АПГ сама по себе снижала содержание ДА в гиппокампе относительно контроля и при этом наблюдалась тенденция к снижению концентраций его метаболитов. Вероятно, АПГ приводила к уменьшению интенсивности нейротрансмиссии ДА, не изменяя при этом его метаболизм.

Несмотря на более низкие, чем в контроле, величины ДА у стрессированных животных гипоксические тренировки нормализовали уровень ДА. При этом уровень ДОФУК также соответствовал контрольным значениям. Уровень ГВК был снижен по сравнению с контролем, но предположительно это связано с более низким значением самого нейромедиатора.

Основным эффектом предаторного стресса в гипоталамусе является снижение уровня ДА. Воздействие АПГ само по себе также характеризуется снижением данного нейромедиатора. Содержание дофаминовых метаболитов в обеих группах не претерпело статистически значимых изменений. При исследовании обмена ДА в группе «ПТСР+АПГ» не обнаружено отличий от контроля. Ранее упоминалось, что основным поведенческим результатом АПГ у стрессированных животных являлось снижение значения ИТ. Вероятно это связано с тем, что дофаминергическая иннерва-

ция способна сдерживать активность ряда нейроэндокринных ядер гипоталамуса, что приводит к снижению активности релизинг-факторов и тропных гормонов гипофиза [24, 25].

В среднем мозге хроническое стрессовое воздействие не привело к изменению уровня ДА и его метаболитов по сравнению с контролем. Гипоксические тренировки повысили уровень ДА как у интактных, так и стрессированных животных, не изменяя при этом его метаболизм. Вероятно, усиление дофаминовой нейротрансмиссии в среднем мозге у животных группы «ПТСР+АПГ» позволило нивелировать регион-специфические изменения, вызванные хроническим психоэмоциональным воздействием, приводящим к дезадаптивному поведению и другим последствиям стресса.

Выводы:

1. При экспериментальном ПТСР в коре головного мозга, гиппокампе и гипоталамусе стрессированных животных снижен обмен дофамина и его метаболитов.
2. В среднем мозге хроническое стрессовое воздействие не приводит к изменению метаболизма дофамина.
3. Нейропротекторное действие АПГ при экспериментальном ПТСР выражается в снижении индекса тревожности.
4. Адаптация к периодической гипоксии нормализует уровни дофамина и его метаболитов в структурах головного мозга животных, подвергнутых стрессорному воздействию, что позволяет ее рассматривать как эффективный способ коррекции последствий посттравматического стрессового расстройства в церебральных структурах.

Литература/References

1. Cools R., Froböse M., Aarts E., Hofmans L. Dopamine and the motivation of cognitive control. *Handb Clin Neuro*. 2019; 163: 123-43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804281-6.00007-0>
2. Liu C., Kaeser P.S. Mechanisms and regulation of dopamine release. *Curr Opin Neurobiol*. 2019; 57: 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.01.001>
3. Grecksch G., Matties H. The role of dopaminergic mechanisms in the rat hippocampus for the consolidation in a brightness discrimination. *Psychopharmacology (Berl)*. 1981; 75(2):165-8. <https://doi.org/10.1007/BF00432180>
4. Wise R.A., Robble M.A. Dopamine and Addiction. *Annu Rev Psychol*. 2020; 4(71): 79-106. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010418-103337>
5. Volkow N.D., Wise R.A., Baler R. The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. *Nat Rev Neurosci*. 2017; 16; 18(12): 741-52. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.130>
6. Zarrindast M.R.; Khakpai F. The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. *Arch Iran Med*. 2015; 18(9): 591-603.

7. Pitman R.K., Rasmusson A.M., Koenen K.C., Shin L.M., Orr, S.P., Gilbertson M.W., et al. *Biological studies of post-traumatic stress disorder. Nature reviews. Neuroscience.* 2012; 13(11): 769-87. <https://doi.org/10.1038/nrn3339>
8. Cohen H., Matar M.A., Buskila D., Kaplan Z., Zohar J. Early poststressor intervention with high-dose corticosterone attenuates posttraumatic stress response in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Biological psychiatry.* 2008; 64: 708-17. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.05.025>
9. DeGroot S.R., Zhao-Shea R., Chung L., Klenowski P.M., Sun F., Molas S., et al. Midbrain Dopamine Controls Anxiety-like Behavior by Engaging Unique Interpeduncular Nucleus Microcircuitry. *Biol Psychiatry.* 2020; 1, 88(11): 855-66. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.06.018>
10. Brandão M.L., Coimbra N.C. Understanding the role of dopamine in conditioned and unconditioned fear. *Rev Neurosci.* 2019; 24; 30(3): 325-37. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2018-0023>
11. Berry A.S., White R.L.3rd, Furman D.J., Naskolnakorn J.R., Shah V.D., D'Esposito M.; et al. Dopaminergic Mechanisms Underlying Normal Variation in Trait Anxiety. *J Neurosci.* 2019; 3; 39(14): 2735-44. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2382-18.2019>
12. Mallet R.T., Manukhina E.B., Ruelas S.S., Caffrey J.L., Downey H.F. Cardioprotection by intermittent hypoxia conditioning: evidence, mechanisms, and therapeutic potential. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology.* 2018; 315 (2): H216-H232. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00060.2018>
13. Baillieux S., Chacaroun S., Doutreleau S., Detante O., Pépin J.L., Verges. S. Hypoxic conditioning and the central nervous system: A new therapeutic opportunity for brain and spinal cord injuries? *Exp Biol Med (Maywood).* 2017; 242 (11): 1198–206. <https://doi.org/10.1177/1535370217712691>
14. Cohen H., Kozlovsky N., Alona C., Matar M.A., Joseph Z. Animal model for PTSD: From clinical concept to translational research. *Neuropharmacology.* 2012; 62: 715–24. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.04.023>
15. Tseilikman V., Dremencov E., Maslennikova E., Ishmatova A., Manukhina E., Downey H.F., et al. Post-traumatic stress disorder chronification via monoaminoxidase and cortisol metabolism. *Horm. Metab. Res.* 2019; 51: 618–22. <https://doi.org/10.1055/a-0975-9268>
16. Goryacheva A.V., Kruglov S.V., Pshennikova M.G., Smirin B.V., Malyshev I.Yu., Barskov I.V., et al. Adaptation to intermittent hypoxia restricts nitric oxide overproduction and prevents beta-amyloid toxicity in rat brain. *Nitric Oxide.* 2010; 23: 289–99. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.08.005>
17. Horger B.A., Roth R.H. The role of mesoprefrontal dopamine neurons in stress. *Crit Rev Neurobiol.* 1996; 10(3-4): 395-418. <https://doi.org/10.1615/critrevneurobiol.v10.i3-4.60>
18. Morrow B.A.; Elsworth J.D.; Rasmusson A.M.; Roth, R.H. The role of mesoprefrontal dopamine neurons in the acquisition and expression of conditioned fear in the rat. *Neuroscience.* 1999; 92(2): 553-64. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00014-7](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00014-7)
19. Vermetten E.J., Bremner D. Circuits and systems in stress. I. Pre-clinical studies. *Depress Anxiety.* 2002; 15(3): 126–47. <https://doi.org/10.1002/da.10016>
20. Lin C.C., Tung C.S., Lin P.H., Huang C.L., Liu Y.P. Traumatic stress causes distinctive effects on fear circuit catecholamines and the fear extinction profile in a rodent model of posttraumatic stress disorder. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2016; 26(9): 1484-95. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.06.004>
21. Geraciotti T.D. Jr., Jefferson-Wilson L., Strawn J.R., Baker D.G., Dashesky B.A., Horn P.S., et al. Effect of traumatic imagery on cerebrospinal fluid dopamine and serotonin metabolites in posttraumatic stress disorder. *J Psychiatr Res.* 2013; 47(7): 995-98. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.01.023>
22. Ruggiero R.N., Rossignoli M.T., Marques D.B., de Sousa B.M., Romcy-Pereira R.N., Lopes-Aguiar C., et al. Neuromodulation of Hippocampal-Prefrontal Cortical Synaptic Plasticity and Functional Connectivity: Implications for Neuropsychiatric Disorders. *Front Cell Neurosci.* 2021; 11; 15: 732360. <https://doi.org/10.3389/fn-cel.2021.732360>
23. Diamond D.M., Campbell A.M., Park C.R., Halonen J., Zoladz P.R. The temporal dynamics model of emotional memory processing: a synthesis on the neurobiological basis of stress-induced amnesia, flashback and traumatic memories, and the Yerkes-Dodson law. *Neural Plast.* 2007; 2007: 60803. <https://doi.org/10.1155/2007/60803>
24. Barraclough C.A., Wise P.M. The role of catecholamines in the regulation of pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion. *Endocr Rev.* Winter. 1982; 3(1): 91-119. <https://doi.org/10.1210/edrv-3-1-91>
25. Goudreau J.L., Lindley S.E., Lookingland K.J., Moore K.E. Evidence that hypothalamic periventricular dopamine neurons innervate the intermediate lobe of the rat pituitary. *Neuroendocrinology.* 1992; 56(1): 100-05. <https://doi.org/10.1159/000126214>

Сведения об авторах:

Алилуев Анатолий Владимирович, врач психиатр, e-mail: aliluev@semena74.com;

Семенова Людмила Юрьевна, доктор мед. наук, проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии, e-mail: semenovaly@mail.ru;

Мальцева Наталья Васильевна, канд. мед. наук, доцент, ст. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории Научно-образовательного Российско-китайского центра системной патологии, e-mail: malinanv_1@mail.ru;

Порядин Геннадий Васильевич, доктор мед. наук, чл.-корр. РАН проф. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 796.922.093.642

Дикунец М.А.¹, Дудко Г.А.¹, Вирус Э.Д.², Крючков А.С.¹

Применение расширенного биохимического профиля спортсмена сверхвысокой квалификации для прогнозирования стойкого снижения работоспособности

¹ФГБУ «Федеральный научный центр физической культуры и спорта»,

105005, Москва, Россия, Елизаветинский пер., д. 10, с. 1;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,

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

Введение. Выявление биохимических критериев диагностики ранних симптомов переутомления особенно актуально для спортсменов юношеского возраста. Однако, в комплекс биохимических показателей, регистрируемых в рамках этапного комплексного обследования, и в программу углубленных медицинских обследований спортсменов сборных команд России не включены маркеры, отражающие напряжение адаптационных возможностей организма. **Цель работы** – оценка преимуществ применения расширенного биохимического профиля спортсмена сверхвысокой квалификации при прогнозировании стойкого снижения его работоспособности.

Методика. Объектом исследования являлся спортсмен сборной команды России по лыжным гонкам (18 лет, 175.5 см, 68.2 кг, стаж 6 лет). Спортсмен прошел функциональное тестирование на беговом тредбане h/p/cosmos venus 200/100r с регистрацией уровня потребления кислорода с использованием системы эргоспирометрии MetaMax 3B. Гематологический анализ цельной крови проводили на автоматизированном гематологическом анализаторе XN-1000. Анализ образцов сыворотки для определения АСТ, АЛТ, КФК, КФК-МВ, глюкозы, общего белка, мочевины, триглицеридов и железа проводили на биохимическом анализаторе cobas c 311, определение β -CrossLaps, P1NP, N-MID фрагмента остеокальцина, NT-proBNP и миоглобина – на анализаторе cobas e 411. Концентрацию лактата в капиллярной крови измеряли на полуавтоматическом фотометре BTS-350 с использованием коммерческого набора реагентов. Количественное определение эндогенных стероидных гормонов и жирорастворимых витаминов в сыворотке и нейромедиаторов в плазме осуществляли методом СВЭЖХ-МС/МС.

Результаты. Регистрируемые в рамках этапного комплексного обследования, спортсменов сборной команды России по лыжным гонкам стандартные биохимические маркеры не выходили за границы референсных интервалов. Однако, у обследуемого спортсмена были зафиксированы высокие концентрации P1NP и β -CrossLaps, сопровождавшиеся низким содержанием N-MID фрагмента остеокальцина и метаболита витамина D. Кроме того, уровень NT-proBNP у лыжника превышал границы референсного интервала.

Заключение. Биохимический профиль спортсмена ультравысокой квалификации при проведении этапного комплексного обследования, спортсменов, занимающихся видами спорта на выносливость, не полностью отражает адаптационные процессы, происходящие под воздействием физического стимула. Дополнительный контроль за состоянием ЦНС, ОДА и сердечно-сосудистой системы позволяет не только оценить текущее функциональное состояние организма, но и открывает возможности прогнозирования угрозы срыва адаптации и определения вероятного механизма возникновения состояния стойкого утомления.

Ключевые слова: элитный спортсмен; биохимический профиль; адаптация, утомление; функциональное состояние; снижение работоспособности

Для цитирования: Дикунец М.А., Дудко Г.А., Вирус Э.Д., Крючков А.С. Применение расширенного биохимического профиля спортсмена сверхвысокой квалификации для прогнозирования стойкого снижения работоспособности. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 86-93.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.86-93

Участие авторов: концепция и дизайн обзора, сбор и обработка информации, написание текста – Дикунец М.А. Крючков А.С.; редактирование – Вирус Э.Д., Дудко Г.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Дудко Григорий Алексеевич, e-mail: dudko.g.a@vniifk.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ ФНЦ ВНИИФК № 777-00026-22-00 (тема № 001-22/3).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.09.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Dikunets M.A.¹, Dudko G.A.¹, Viryus E.D.², Kryuchkov A.S.¹

The use of extended biochemical profile for predicting a sustained decline in the performance of highly qualified athlete

¹Federal Science Center for Physical Culture and Sport, Elizavetinsky Pereulok, 10/1, Moscow, 105005, Russian Federation;

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

Introduction. Identification of biochemical parameters to diagnose early symptoms of fatigue is especially important for youth athletes. However, markers for the strain of adaptive capabilities, specifically those involved in the regulation of the central nervous system (CNS), cardiovascular system (CVS), and bone tissue metabolism, are not included into the number of the markers that are recorded as a part of the stepwise complex examination (SCE) or the program of comprehensive medical examination of Russian national teams. These programs are designed for determining an expanded panel of biochemical parameters. **Aim.** To evaluate advantages of an expanded biochemical panel in predicting a persistent performance slowdown of an elite athlete.

Methods. The subject of this study was a member of the Russian junior national cross-country skiing team (age, 18 years; height, 175.5 cm, body weight, 68.2 kg; 6 years in professional sports). As a part of this study, the athlete was tested on a h/p/cosmos venus 200/100r running treadmill with recording the oxygen consumption with a MetaMax 3B spirometer. Hematological tests were performed on a XN-1000 automated hematological analyzer. Serum concentrations of ALT, AST, CK, CK-MB, glucose, total protein, urea, triglycerides, and iron were measured on cobas c 311. Concentrations of β -CrossLaps, P1NP, N-MID fragment of osteocalcin, NT-proBNP, and myoglobin were measured using a cobas e 411 immunochemical analyzer. Lactate concentration in capillary blood was measured on a BTS-350 semi-automatic photometer with a respective reagent kit. Serum concentrations of endogenous steroid hormones, fat-soluble vitamins, and plasma concentrations of neurotransmitters were measured by UPLC-MS/MS.

Results. The concentrations of standard biochemical markers measured as a part of SCE for athletes of the Russian national cross-country skiing team were within the sport-specific reference range. However, this athlete had high concentrations of P1NP, β -CrossLaps and NT-proBNP, and low concentrations of the N-MID fragment of osteocalcin and vitamin D.

Conclusions. The biochemical profile of the ultrahigh-qualification athlete during the complete physical examination is not sufficient to reflect the adaptive processes induced by a physical stimulus. Additional monitoring of the state of CNS, CVS and the locomotor system together with biochemical tests during the training process would not only provide assessment of the current functional state but also predict threatening maladaptation and help identifying a possible mechanism of steady fatigue.

Keywords: competitive athlete; biochemical profile; fatigue; functional state; decreased performance

For citation: Dikunets M.A., Dudko G.A., Viryus E.D., Kryuchkov A.S. The use of extended biochemical profile for predicting a sustained decline in the performance of highly qualified athlete. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(4): 86-93. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.86-93

Author's contribution: study concept and design, information collection and processing, text writing – Dikunets M.A., Kryuchkov A.S.; text editing – Viryus E.D., Dudko G.A. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Dudko Grigoriy Alekseevich*, Senior Scientist, Federal State Budgetary Institution «Federal Science Center for Physical Culture and Sport», Elizavetinsky lane 10/1, 105005, Moscow, Russia, e-mail: dudko.g.a@vniifk.ru

Information about the authors:

Dikunets M.A., <https://orcid.org/0000-0002-5945-0722>

Dudko G.A., <https://orcid.org/0000-0002-1064-3283>

Viryus E.D., <https://orcid.org/0000-0001-9371-6494>

Kryuchkov A.S., <https://orcid.org/0000-0001-9423-8092>

Financing. The current study was carried out within the state task of Federal State Budgetary Institution «Federal Science Center for Physical Culture and Sport» № 777-00026-22-00 (subject № 001-22/3).

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

Received 18.09.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

Подготовка лыжника высокого класса представляет собой многолетний процесс, условно разделенный на периоды и этапы. Каждый этап многолетней

подготовки отличается специфичностью содержания и формой организации физических нагрузок, обеспечивая сложное системное воздействие на физическое состояние и здоровье спортсменов [1]. Начиная с этапа специализированной базовой подготовки трени-

ровочный процесс ориентирован на создание избирательной морфофункциональной специализации систем организма спортсмена в соответствии с требованиями лыжных гонок. В то же время, в возрасте 17–18 лет еще продолжают ростовые процессы, сопровождающиеся психосоматическими и гормональными перестройками организма [2]. Следовательно, создается ситуация, когда на этапе специализированной базовой подготовки процесс естественного онтогенеза начинает активно взаимодействовать с искусственным (тренировочным) процессом, стимулирующим соматическое и функциональное развитие организма в направлении требований лыжного спорта. В случае, если характер акцентов тренирующих воздействий не совпадает с естественными возрастными процессами изменения физического потенциала спортсмена и его текущей готовностью к восприятию тренирующей информации определенного типа, возникает угроза истощения адаптационных ресурсов в нагружаемых системах организма и возрастает риск развития переутомления и перенапряжения организма [3].

Патогенные аспекты перенапряжения до сих пор недостаточно четко определены и не отличаются от тех, которые характеризуют перетренированность. Снижение работоспособности, преждевременная усталость и усиление мышечных болей у спортсменов могут свидетельствовать как о перенапряжении, так и о перетренированности, с той разницей, что в первом случае для восстановления требуется несколько дней или недель, а во втором, в виду тяжелого патологического состояния, на это уходят месяцы [4]. Отличительными чертами перетренированности являются неспособность спортсмена выдерживать интенсивные физические нагрузки и снижение работоспособности даже в условиях существенного снижения силы тренирующих воздействий.

Для диагностики утомления используется комплекс методов, в том числе и биохимический мониторинг. Применяемая практика биохимических обследований спортсменов юношеского возраста и спортсменов сборной команды России по лыжным гонкам и биатлону направлена на оценку общепринятых маркеров, отражающих уровень адаптационных резервов организма спортсмена [5]. Однако ни в программу этапного комплексного обследования (ЭКО), ни даже в программу углубленных медицинских обследований

спортсменов сборных команд России, в рамках которой определяют расширенную панель биохимических показателей¹, не включены маркеры, отражающие напряжение адаптационных возможностей организма, в частности, вовлеченные в регуляцию ЦНС и сердечно-сосудистой (ССС) систем, метаболизма костной ткани. Таким образом, прогнозирование переутомления является актуальной задачей, особенно для спортсменов юношеского возраста, поскольку их организм находится в зоне повышенного риска. Комплексный подход к оценке взаимосвязи физиологических систем в процессе адаптации к физическим нагрузкам для своевременного выявления факторов, лимитирующих физическую деятельность, поможет не только достичь высоких результатов в спорте, но и сохранить здоровье юного спортсмена.

Цель работы – оценка преимуществ использования расширенного биохимического профиля спортсмена сверхвысокой квалификации при прогнозировании стойкого снижения его работоспособности.

Методика

Все исследования выполнялись по международным правилам работы с биоматериалом людей. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ ФНЦ ВНИИФК. В нашем наблюдении участвовал спортсмен сборной команды России по лыжным гонкам (18 лет, 175.5 см, 68.2 кг, стаж 6 лет), подписавший информированное согласие на участие в обследовании. Спортсмен жаловался на быструю утомляемость и низкую работоспособность, сохраняющуюся несколько последних месяцев. Он утверждал, что увеличение периода отдыха между высокоинтенсивными нагрузками в рамках недельного микроцикла не приводило к восстановлению уровня физических кондиций.

Для оценки уровня и выявления возможных причин спада работоспособности спортсмену было предложено пройти функциональное тестирование на беговом тредбане h/p/cosmos venus 200/100r (h/p/cosmos sports & medical gmbh, Германия) с регистрацией уровня потребления кислорода на мощности аэробного (АЭП) и анаэробного (ПАНО) порогов с использованием системы эргоспирометрии MetaMax 3B (Cortex, Германия). Начальная скорость полотна тредбана в ступенчатом тесте составляла 6 км/ч в течение 2 мин,

¹Приказ Министерства здравоохранения РФ от 23 октября 2020 г. №1144н «Об утверждении порядка организации оказания медицинской помощи лицам, занимающимся физической культурой и спортом (в том числе при подготовке и проведении физкультурных и спортивных мероприятий), включая порядок медицинского осмотра лиц, желающих пройти спортивную подготовку, заниматься физической культурой и спортом в организациях и (или) выполнить нормативы испытаний (тестов) Всероссийского физкультурно-спортивного комплекса "Готов к труду и обороне" (ГТО)" и форм медицинских заключений о допуске к участию физкультурных и спортивных мероприятиях».

затем каждую последующую минуту повышалась на 0.5 км/ч при неизменном угле наклона (10 град.) до достижения спортсменом уровня ПАНО. До, во время (3 и 9 мин) и после (3, 7 и 10 мин восстановления) ступенчатого теста у спортсмена проводили забор капиллярной крови для определения текущего уровня лактата. До и после ступенчатого теста (5 мин восстановления) оценивали функциональное состояние и вегетативную ортостатическую устойчивость ССС спортсмена методом электрокардиографии (ЭКГ) с использованием 12-канального электрокардиографа Cardisuny C300 (Fukuda Denshi, Япония).

До проведения функционального тестирования (после 12-часового голодания и 24-часового отсутствия тренировок) у спортсмена проводился забор крови из локтевой вены в вакуумные пробирки (Greiner Bio One, Австрия), содержащие: антикоагулянт К3-ЭДТА для гематологического исследования цельной крови, активатор свертывания и гель-сепаратор для биохимического анализа сыворотки, антикоагулянт лития гепарин для исследования плазмы, фторид натрия и оксалат калия для определения концентрации лактата. Образцы тщательно перемешивали, инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего центрифугировали согласно рекомендациям производителя вакуумных пробирок.

Гематологический анализ цельной крови проводили с использованием автоматизированного гематологического анализатора XN-1000 с технологией флуоресцентной проточной цитометрии (Sysmex, Япония). Анализ образцов сыворотки для определения активностей АСТ, АЛТ, КФК и концентраций КФК-МВ, глюкозы, общего белка, мочевины, триглицеридов и железа проводили на автоматическом биохимическом анализаторе cobas с 311 (Roche/Nitachi, Япония) с использованием коммерческих наборов (Roche, Германия). Количественное определение маркеров метаболизма костной ткани (C-концевой телопептид коллагена I типа (β -CrossLaps), N-терминальный пропептид проколлагена I типа (P1NP), N-MID фрагмент остеокальцина) и повреждения сердечной мышцы (N-концевой полипептид натрийуретического гормона (NT-proBNP), миоглобин) в сыворотке выполняли на автоматическом иммунохимическом анализаторе cobas e 411 (Roche, Германия) с использованием коммерческих наборов (Roche, Германия). Концентрацию лактата в капиллярной крови измеряли на полуавтоматическом фотометре BTS-350 (BioSystems S.A., Испания) с использованием коммерческого набора (АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн», Россия).

Для определения концентраций эндогенных стероидных гормонов и жирорастворимых витаминов в сыворотке и нейромедиаторов в плазме использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией. Анализ выполняли на сверхбыстром жидкостном хромато-масс-спектрометре с тройным квадруполом и внешним источником электрораспылительной ионизации с нагреваемым потоком при атмосферном давлении LCMS-8060 (Shimadzu, Япония).

Результаты

Показатели потребления кислорода на мощности АЭП и ПАНО у лыжника составили 56 и 68 мл/кг/мин, частота сердечных сокращений (ЧСС) для АЭП и ПАНО – 156 и 182 уд./мин соответственно. Биохимический профиль спортсменов сборной команды России по лыжным гонкам, предусмотренный программой ЭКО, включает следующие показатели: гемоглобин, гематокрит, тестостерон, кортизол, мочевины, общий белок, АЛТ, АСТ, КФК, железо, глюкоза, триглицериды, лактат (**рис. 1**). Данная программа была расширена за счет включения маркеров активации ЦНС, метаболизма костной ткани и кардиомаркеров (**рис. 2**).

Обсуждение

Показатели потребления кислорода на мощности АЭП и ПАНО у лыжника указывают на достаточно высокий уровень аэробных возможностей как медленных, так и быстрых мышечных волокон. Показатели ЧСС для АЭП и ПАНО не выходили за границы нормальных для данного спортсмена значений, отклонения от индивидуальных пульсовых коридоров под нагрузкой отсутствовали. В характеристиках ЭКГ, полученных перед функциональным тестированием, также не обнаружено отклонений в работе сердечной мышцы, однако после ступенчатого теста были выявлены признаки ранней реполяризации задней стенки миокарда.

Биохимические маркеры были нами распределены по функциональным системам организма. Регистрируемые в рамках проведения ЭКО спортсменов сборной команды России по лыжным гонкам маркеры энергообеспечения, кислородтранспортной системы и гормонального гомеостаза не выходили за границы референсных интервалов, установленных нами для данного вида спорта, что может служить критерием адекватности реакции организма спортсмена на нагрузки (**рис. 1**). Активности КФК, АЛТ, АСТ и расчетный коэффициент де Ритиса, широко используемые для оценки механического повреждения клеток скелет-

ных мышц и особенностей метаболической адаптации под воздействием физического стимула, параметры глубины воздействия, динамика процесса восстановления, а также адаптационный потенциал и уровень тренированности спортсмена не выявили признаков повреждения скелетных мышц и клеток печени лыжника под воздействием механического или метаболического стресса.

Концентрация мочевины превышала верхнюю границу референсного диапазона, что может указывать на состояние утомления. Вместе с тем, высокое содержание общего белка свидетельствует о том, что повышенный уровень мочевины, скорее всего, вызван употреблением спортсменом пищи, содержащей большое количество белка, и различных форм протеинсодержащих продуктов. Таким образом, полученные пе-

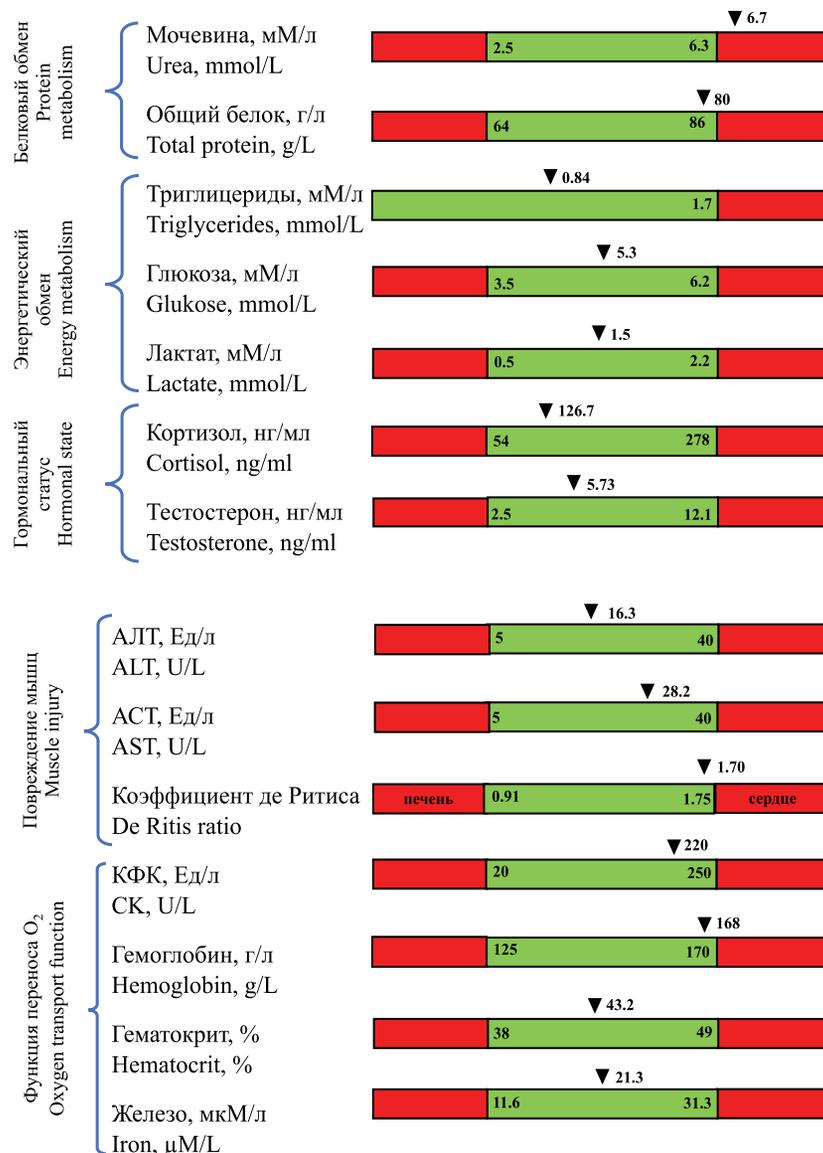


Рис. 1. Биохимический профиль обследуемого спортсмена, регистрируемый в рамках этапного комплексного обследования спортсменов сборной команды России по лыжным гонкам. АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспаратаминотрансфераза; КФК – креатинфосфокиназа; O₂ – кислород.

Fig. 1. Biochemical profile, registered for the tested subject during complete physical examination for the athletes of the Russian national cross-country team. ALT – alanine transaminase (EC 2.6.1.2); AST – aspartate transaminase (EC 2.6.1.1); CK – creatine phosphokinase (EC 2.7.3.2).

ред функциональным тестированием ЭКГ, результаты функциональной диагностики и биохимический профиль с регистрацией показателей, включенных в плановое этапное комплексное обследование сборной команды России по лыжным гонкам, не выявили каких-либо нарушений/напряжений в мышечной и метаболической адаптации у данного спортсмена, а также причин быстрой утомляемости и низкой работоспособности.

Хорошо известно, что главенствующую роль в развитии утомления играет ЦНС. Концентрации нейромедиаторов (адреналин, норадреналин, дофамин, серотонин) рассматривали как предикторы активации симпатoadреналовой, серотонинергической и дофаминергической систем организма спортсмена в ответ

на нагрузки, предшествующие функциональному тестированию. С позиции «гипотезы центрального утомления», основанной на взаимосвязи между серотонином и дофамином [6], у спортсмена наблюдали низкую дофаминергическую активность на фоне высокой серотонинергической. Это может являться причиной возникновения утомления, приводящего к снижению физической работоспособности и сопровождаться колебаниями настроения, самочувствия, желания тренироваться и завышением субъективного восприятия тяжести нагрузки.

Как правило к 18 годам достигается баланс ремоделирования кости, то есть стабилизация остеорезорбтивных и остеосинтетических механизмов. У обследуемого спортсмена высокие концентрации P1NP и β -CrossLaps

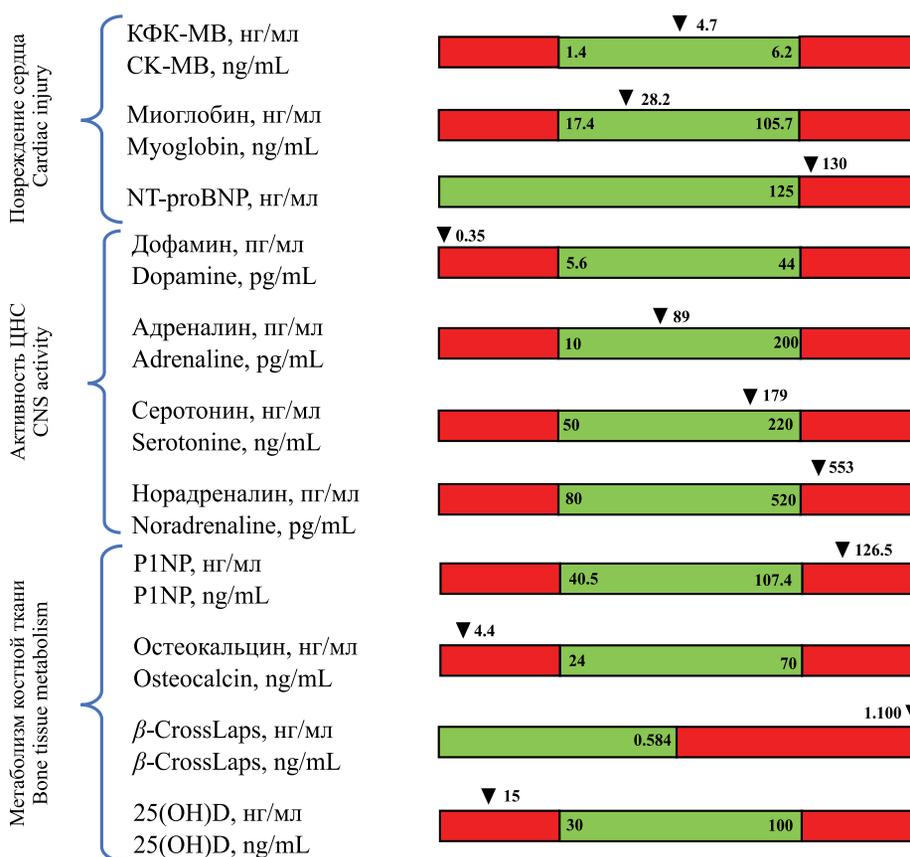


Рис. 2. Панель биомаркеров, предлагаемая нами для расширения биохимического профиля спортсменов, регистрируемого в рамках этапного комплексного обследования спортсменов сборной команды России по лыжным гонкам. КФК-МВ – сердечная изоформа креатинфосфокиназы; ЦНС – центральная нервная система; NT-proBNP – N-концевой полипептид натрийуретического гормона; P1NP – N-терминальный пропептид проколлагена I типа; β -CrossLaps – C-концевой телопептид коллагена I типа; 25(OH)D – 25-гидроксивитамин D.

Fig. 2. A panel of biomarkers to expand the biochemical profile of athletes collected during complete physical examination for the athletes of the Russian national cross-country team. CK-MB – cardiac creatine phosphokinase isoform; CNS – central nervous system; NT-proBNP – N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide; P1NP – N-terminal propeptide of type I procollagen; β -CrossLaps – C-terminal telopeptide of type I collagen; 25(OH)D – 25-hydroxyvitamin D.

сопровождались низким содержанием N-MID фрагмента остеокальцина, что свидетельствует о высоком уровне процесса ремоделирования костной ткани. Повышенное содержание β -CrossLaps является индикатором длительного воздействия нагрузок высокой интенсивности и несоответствия их общему уровню физической подготовленности спортсмена, что может привести к хроническому перенапряжению или микротравмам, нарушающим структуру и функцию тканей.

Концентрация биологически активной формы витамина D – 25(OH)D у спортсмена была в 2 раза ниже нижней границы референтного диапазона (30–100 нг/мл) [7]. Известно, что витамин D влияет на секрецию гормонов, регуляцию экспрессии генов, функционирование нервной, иммунной, эндокринной, сердечно-сосудистой и мышечной систем, включая синтез митохондриальных белков в мышечных клетках человека за счет ингибирования образования активных форм кислорода и митохондриальной дисфункции [8, 9]. Кроме того, истощение витамина D может привести к гипериннервации и ноцицептивной гиперчувствительности в глубоких мышечных тканях и потере равновесия без влияния на мышечную силу, которые во время выполнения физических упражнений могут вызывать ложное появление миалгии. На основании этого мы можем предположить, что снижение работоспособности у лыжника может быть также связано с выявленным у него дефицитом витамина D.

У спортсменов, занимающихся видами спорта на выносливость, гипертрофия миокарда обычно развивается как за счет расширения его полостей, так и за счет утолщения стенок [10]. Высокоинтенсивные нагрузки представляют особую опасность для сердца юных спортсменов в возрасте 14–18 лет, когда прирост объема миокарда существенно опережает увеличение диаметра аорты, при этом за счет возрастного увеличения длины тела сосуды вытягиваются и сужаются. Кроме того, скорость роста сердечных клапанов уступает скорости изменения размера миокарда, что приводит к асинхронности работы сосочковых мышц сердца [11, 12]. При такой «незрелости» кардиореспираторной системы сердце юных спортсменов испытывает повышенное напряжение при выполнении физических упражнений и особенно при работе в циклических высокоскоростных двигательных режимах.

Концентрация изоформы КФК-МВ, которую часто используют в качестве маркера повреждения кардиомиоцитов, не выходила за рамки референтных значений. Содержание белка саркоплазмы скелетных и сердечной мышц – миоглобина, считающегося в клинической практике наиболее информативным

маркером мышечного повреждения и используемого для ранней диагностики острых коронарных синдромов, у спортсмена не отклонялось от нормы. На наш взгляд, в спортивной медицине использовать миоглобин в качестве маркера оценки адаптационных процессов сердца к предлагаемым нагрузкам нецелесообразно, поскольку к его высвобождению и попаданию в кровоток приводит лизис клеток миокарда и/или скелетных мышц, и при отсутствии осложнений его уровень возвращается к физиологическим значениям в течение 24 ч. В тоже время концентрация секретируемого в ответ на стресс кардиомиоцитов NT-proBNP у лыжника была выше верхней границы референтного интервала, что указывает на растяжение стенки левого желудочка и наличие угрозы срыва адаптации сердца спортсмена к предлагаемым нагрузкам.

Заключение

Важным фактором планирования тренировочного процесса и оценки результатов соревновательной деятельности является контроль функционального состояния спортсмена. Биохимический профиль спортсмена, получаемый при проведении ЭКО спортсменов, занимающихся видами спорта на выносливость, не полностью отражает состояние адаптационных процессов, происходящих при воздействии физического стимула. Дополнительный контроль за состоянием ЦНС, ОДА и ССС с традиционной биохимической диагностикой в условиях тренировочного процесса позволяет оценить текущее функциональное состояние организма, и открывает новые возможности прогнозирования угрозы срыва адаптации и установления вероятного механизма возникновения устойчивого состояния утомления. Подход на основе выявления новых факторов, лимитирующих физическую деятельность, позволит спортивным врачам и тренеру использовать адекватные средства коррекции тренировочного процесса и разработать соответствующие средства восстановления для обеспечения максимального сохранения функционального потенциала спортсмена и повышения эффективности тренировочной деятельности и результативности соревновательной деятельности в профессиональном спорте.

Литература

(п.п. 6; 8–10; 12 см. References)

1. Платонов В.Н. Система подготовки спортсменов в олимпийском спорте. Общая теория и ее практическое приложение: учебник для тренеров. В 2 кн. Киев: Олимпийская литература; 2015.
2. Солодков А.С., Сологуб Е.Б. Физиология человека. Общая. Спортивная. Возрастная: учебник. Изд. М.: Спорт; 2016.

3. Бальсевич В.К. *Очерки по возрастной кинезиологии человека*. М.: Советский спорт; 2009.
4. Платонов В.Н. Перетренированность в спорте. *Наука в олимпийском спорте*. 2015; 1: 19–34.
5. Никулин Б.А., Родионова И.И. *Биохимический контроль в спорте: научно-методическое пособие*. М.: Советский спорт; 2011.
7. Пигарова Е.А., Рожинская Л.Я., Белая Ж.Е., Дзеранова Л.К., Каронова Т.Л., Ильин А.В. и др. Клинические рекомендации Российской ассоциации эндокринологов по диагностике, лечению и профилактике дефицита витамина D у взрослых. *Проблемы эндокринологии*. 2016; 62(4): 60–84.
11. Ляксо Е.Е., Ноздрачев А.Д., Соколова Л.В. *Возрастная физиология и психофизиология: учебник для среднего профессионального образования*. М.: Издательство Юрайт; 2020.
5. Nikulin B.A., Rodionova I.I. *Biochemical control in sports: a scientific and methodological guide. [Biohimicheskiy kontrol' v sporte: nauchno-metodicheskoe posobie]*. Moscow; Sovetskiy sport; 2011. (in Russian)
6. Davis J.M., Bailey S.P. Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 1997; 29(1): 45–57. <https://doi.org/10.1097/00005768-199701000-00008>
7. Pigarova E.A., Rozhinskaja L.Ja., Belaja Zh.E., Dzeranova L.K., Karonova T.L., Il'in A.V., et al. Clinical guidelines of the Russian Association of Endocrinologists for the diagnosis, treatment and prevention of vitamin D deficiency in adults. *Problemy endokrinologii*. 2016; 62(4): 60–84. <https://doi.org/10.14341/probl201662460-84>. (in Russian)
8. Caballero-Garcia A., Cordova-Martinez A., Vicente-Salar N., Roche E., Perez-Valdecantos D. Vitamin D, its role in recovery after muscular damage following exercise. *Nutrients*. 2021; 13(7): 2336. <https://doi.org/10.3390/nu13072336>
9. Wrzosek M., Lukaszkiewicz J., Wrzosek M., Jakubczyk A., Matsu-moto H., Piatkiewicz P., et al. Vitamin D and the central nervous system. *Pharmacol. Rep.* 2013; 65(2): 271–8. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(13\)71003-x](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(13)71003-x)
10. McCann G.P., Muir D.F., Hillis W.S. Athletic left ventricular hypertrophy: long-term studies are required. *Eur. Heart J.* 2000; 21(5): 351–3. <https://doi.org/10.1053/euhj.1999.1783>
11. Ljasko E.E., Nozdrachev A.D., Sokolova L.V. *Developmental physiology and psychophysiology: a textbook for secondary vocational education. [Vozrastnaya fiziologiya i psikhofiziologiya: uchebnik dlya srednego professional'nogo obrazovaniya]*. Moscow; Izdatel'stvo Yurayt; 2020. (in Russian)
12. Rodriguez-Lopez A.M., Javier G., Carmen P., Esteban P., Luisa G.C., Tomas F., et al. Athlete heart in children and young athletes. Echocardiographic findings in 331 cases. *Pediatr. Cardiol.* 2022; 43(2): 407–12. <https://doi.org/10.1007/s00246-021-02736-5>

References

1. Platonov V.N. *The system for training athletes in Olympic sports. General theory and its practical application: manual for coaches. [Sistema podgotovki sportsmenov v olimpiyskom sporte. Obshchaya teoriya i ee prakticheskoe prilozhenie: uchebnik dlya trenerov]*. Kiev; Olimpiyskaya literature; 2015. (in Russian)
2. Solodkov A.S., Sologub E.B. *Human physiology. General. Age-specific: textbook. [Fiziologiya cheloveka. Obshhaya. Sportivnaya. Vozrastnaya: uchebnik]*. Moscow; Sport; 2016. (in Russian)
3. Bal'sevich V.K. *Essays on human developmental kinesiology. [Oчерки по возрастнoй кинезиологии cheloveka]*. Moscow; Sovetskiy sport; 2009. (in Russian)
4. Platonov V.N. Overtraining in sports. *Nauka v olimpiyskom sporte*. 2015; (1): 19–34. (in Russian)

Сведения об авторах:

Марина Александровна Дикунец, канд. хим. наук, вед. науч. сотр. лаб. проблем спортивной подготовки, ФГБУ «ФНЦ физической культуры и спорта», e-mail: dikunets.m.a@vniifk.ru;

Григорий Алексеевич Дудко, ст. науч. сотр. лаб. проблем спортивной подготовки, ФГБУ «ФНЦ физической культуры и спорта», e-mail: dudko.g.a@vniifk.ru;

Эдуард Даниэлевич Вирус, доктор хим. наук, вед. науч. сотр. лаб. функциональной протеомики и метаболомики, ФГБУ НИИОПП РАН, e-mail: edwardvirus@yandex.ru;

Андрей Сергеевич Крючков, канд. пед. наук, зав. лаб. проблем спортивной подготовки, ФГБУ «ФНЦ физической культуры и спорта», e-mail: kruchkova_an@mail.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 612.275.1:613.12:616-001.12:616-001.18:616-092.12

Ким А.Е.¹, Шустов Е.Б.², Зайцева И.П.³, Лемещенко А.В.¹

Патофизиологические механизмы неблагоприятного взаимодействия гипоксии и температурных факторов в отношении физической работоспособности

¹ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ, 194044, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6;

²ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии им. акад. С.Н. Голикова ФМБА России», 192019, Россия, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1;

³ФГБОУ ВО «Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова», 150000, Ярославль, Россия, ул. Советская, д. 14

Введение. Статья посвящена решению задачи количественной оценки взаимодействия двух неблагоприятных факторов – гипоксического и температурного, при их сочетанном действии на организм лабораторных животных. Исследовали эффекты нормобарической и гемической гипоксии, воздействия высоких и низких температур. **Цель работы** – количественная оценка взаимодействия гипоксии и температурных факторов при их сочетанном действии на организм лабораторных животных.

Методика. Состояние нормобарической гипоксии моделировали с использованием мембранного гипоксикатора. Установка обеспечивала плавную регулировку концентрации кислорода от 2 до 10% в гипоксической газовой смеси. Гипертермию моделировали путем термостатического поддержания температуры воздуха +40 °С и влажности 30-60%. Гипотермия формировалась в условиях воздушного охлаждения (в холодной камере при температуре воздуха 5±1 °С и влажности 75-80%). Для оценки функционального состояния проводили тестирование физической работоспособности методом вынужденного плавания с грузом 5% от массы тела в воде различной температуры. Оценка взаимодействия факторов проводилась методом двухфакторного дисперсионного анализа с тремя уровнями выраженности каждого фактора.

Результаты. Установлено, что гипоксический и тепловой фактор оказывают влияние независимо друг от друга, при превалировании воздействия гипоксии. Взаимодействие между факторами синергидное умеренное по выраженности, протекает по типу дополняющего эффекта, и может служить основой развития синдрома взаимного отягощения. Воздушная гипотермия слабо влияет на переносимость гипоксического воздействия, влияние иммерсионной гипотермии проявляется более существенно.

Заключение. Критическое ухудшение функционального состояния при действии гипоксии и экстремальных температур сопряжено с активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, интенсификацией катаболизма белков, жиров и углеводов, развитием вторичной тканевой гипоксии и формированием митохондриальных дисфункций. Наиболее вероятным механизмом развития синдрома взаимного отягощения при сочетанном воздействии гипоксии и гипертермии является нарушение генерации АТФ в процессе фосфорилирующего митохондриального окисления, который является общим звеном патогенеза различных экстремальных состояний.

Ключевые слова: взаимодействие факторов; гемическая гипоксия; гипертермия; гипотермия; лабораторные животные; нормобарическая гипоксия; работоспособность; синдром взаимного отягощения

Для цитирования: Ким А.Е., Шустов Е.Б., Зайцева И.П., Лемещенко А.В. Патофизиологические механизмы неблагоприятного взаимодействия гипоксии и температурных факторов в отношении физической работоспособности. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 94-106.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.94-106

Для корреспонденции: Ким Алексей Евгеньевич, e-mail: alexpann@mail.ru

Участие авторов: Ким А.Е. – концепция и дизайн исследования, выполнение экспериментальных исследований, статистическая обработка материала и написание текста; Шустов Е.Б. – написание текста, редактирование; Зайцева И.П. – сбор и обработка материала, написание текста; Лемещенко А.В. – написание текста, подготовка иллюстративного материала. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все со-авторы

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.04.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Kim A.E.¹, Shustov E.B.², Zaitseva I.P.³, Lemeschenko A.V.¹

Pathophysiological mechanisms of adverse interactions of hypoxia and temperature factors in relation to physical working ability

¹Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense of the Russian Federation, Akademiya Lebedeva St. 6, St. Petersburg, 194044, Russian Federation;

²Golikov Research and Clinical Center of Toxicology, Bekhtereva St. 1, St. Petersburg, 192019, Russian Federation;

³Demidov Yaroslavl State University, Sovetskaya St. 14, Yaroslavl, 150003, Russian Federation

Introduction. The article focuses on quantitative assessment of the interaction of two unfavorable factors, hypoxia and temperature, during their combined effect on the body of laboratory animals. The effects of normobaric and hemic hypoxia and of high and low temperatures were studied. **The aim of the study** was to quantify the interaction between hypoxia and temperature factors during their combined effect on the body of laboratory animals.

Methods. Normobaric hypoxia was produced in a membrane hypoxicator. The oxygen concentration in the hypoxic gas mixture was smoothly adjustable from 2 to 10%. Hyperthermia was modeled by thermostatic maintenance of the air temperature at +40°C and the humidity at 30-60%. Hypothermia was produced in a cold chamber at the air temperature of 5±1°C and the air humidity of 75-80%. Physical performance was tested using forced swimming with a load of 5% of body weight at various water temperatures. The interaction of the factors was assessed by a two-factor analysis of variance for three levels of severity of each factor.

Results. The hypoxic and thermal factors exerted independent effects, with hypoxia effects prevailing. The factor interaction was synergistic, moderately severe, complementary, and could underlie the mutual aggravation syndrome. Air hypothermia had a slight effect on the tolerance to hypoxic exposure; the effect of immersion hypothermia was more pronounced.

Conclusion. The critical impairment of the functional state under the action of hypoxia and extreme temperature is associated with the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal system, intensification of protein, lipid and carbohydrate catabolism, development of secondary tissue hypoxia, and the formation of mitochondrial dysfunction. The most likely mechanism for the development of mutual aggravation syndrome under the combined action of hypoxia and hyperthermia is impairment of ATP generation in the process of phosphorylating mitochondrial oxidation, which is a common stage in the pathogenesis of various extreme conditions.

Keywords: interaction of factors; hemic hypoxia; hyperthermia; hypothermia; laboratory animals; normobaric hypoxia; working capacity; mutual aggravation syndrome

For citation: Kim A.E., Shustov E.B., Zaitseva I.P., Lemeschenko A.V. Pathophysiological mechanisms of adverse interaction of hypoxia and temperature factors in relation to physical working ability. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(4): 94-106. (in Russian). DOI:10.25557/0031-2991.2022.04.94-106

Authors' contribution: Kim A.E. – the concept and design of the study, the implementation of experimental studies, statistical processing of the material and writing the text; Shustov E.B. – text writing, editing; Zaitseva I.P. – collection and processing of material, writing the text; Lemeschenko A.V. – writing text, preparing illustrative material. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: **Aleksey E. Kim**, Candidate of Medical Sciences, Senior Research Fellow of the Research Center of the Military Medical Academy; 6 Lebedev Str., St. Petersburg, 194044, Russian Federation, e-mail: alexpann@mail.ru.

Information about the authors:

Kim A.E., <https://orcid.org/0000-0003-4591-2997>

Shustov E.B., <https://orcid.org/0000-0001-5895-688X>

Zaitseva I.P., <https://orcid.org/0000-0001-8361-7409>

Lemeschenko A.V., <https://orcid.org/0000-0001-6786-2332>

Financing. The study had no sponsorship.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest. The materials of the article have not been published anywhere before.

Received 10.04.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

Расширение сферы профессиональной деятельности человека закономерно вызывает повышение актуальности исследований, связанных с оценкой и прогнозированием динамики функционального состояния и работоспособности, повышения устойчивости организма к различным экстремальным воздействиям. Деятельность многих контингентов людей осуществляется в условиях возрастания интенсивности и продолжительности воздействия неблагоприятных факторов среды, в числе которых изменение парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе, воздействие высоких или низких температур. Выполнение в этих условиях задач профессиональной деятельности, особенно связанных с физическими и нервно-эмоциональными нагрузками, может приводить к предельному напряжению и срыву компенсаторно-приспособительных механизмов с развитием экстремальных и критических состояний [1]. Необходимо учитывать также то, что на организм человека могут одновременно воздействовать не изолированные факторы, а их комплекс, суммарный эффект которых в значительной мере определяется характером их взаимодействия, наиболее частым и наименее благоприятным из которых является синдром взаимного отягощения.

В условиях горно-пустынной местности типичным будет комплексное воздействие факторов гипертермии и умеренной гипоксии [2], полярники в Антарктиде на горной станции «Восток» встречаются с одновременным воздействием гипотермии и умеренной гипоксии [3]. Комплексное воздействие высотной гипоксии и низких температур отмечается у альпинистов и военнослужащих горных подразделений, действующих на высотах более 3,5 км над уровнем моря, при разгерметизации кабин самолетов и дирижаблей в полете. Спасатели, работающие в очаге стихийных бедствий и техногенных катастроф в изолирующем снаряжении, подвергаются не только воздействию эндогенной гипертермии и действию измененной газовой среды, но и гипоксии физической нагрузки. Комплексное воздействие гипертермии, гипоксии, гиперкапнии будет отмечаться в очагах пожаров, в том числе при пожарах в гермообъектах (надводных, подводных и подземных объектах).

Все вышеуказанное подчеркивает необходимость разработки методов оценки комплексного действия различных экстремальных факторов на организм человека и моделирования такого воздействия на лабораторных животных в ходе доклинической оценки эффективности различных методов и средств коррекции функционального состояния.

Цель исследования — количественная оценка взаимодействия гипоксии и температурных факторов при их сочетанном воздействии на организм лабораторных животных.

Методика

Для оценки возможного влияния гипертермии на переносимость гипоксии использованы 2 модели: нормобарическая гипоксия при повышении температуры гипоксической газовой смеси, и вынужденное плавание в воде высокой температуры на фоне гемической гипоксии.

Основным критерием устойчивости к нормобарической гипоксии является достижение животными порога переносимости, проявлением которого является боковое положение, появление агонального дыхания. При этом фиксируется то минимальное содержание кислорода в гипоксической газовой среде, которое соответствует порогу переносимости гипоксии.

В ходе исследования в отдельных сериях последовательно решались следующие частные задачи (**табл. 1**).

Наиболее общим показателем функционального состояния может быть способность к осуществлению целесообразной деятельности — работоспособность. Для грызунов маркерным видом работоспособности является физическая. Именно этот показатель был использован в исследовании для оценки функционального состояния организма животных.

Таким образом, организация исследования позволяла на уровне конечных точек переносимости экстремальных воздействий (время жизни, летальность, время выполнения физической нагрузки до отказа) оценить комплексное воздействие экстремальных факторов. Протокол исследования был одобрен биоэтической комиссией Военно-медицинской академии.

Животные, их содержание, порядок обращения. Исследование проводилось на белых беспородных мышках-самцах массой 18–21 г и крысах-самцах массой 180–220 г, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская обл.) и прошедших 14-дневный карантин. Содержание и обращение с животными в эксперименте соответствовали требованиям приказа МЗ РФ от 01.04.2016 г № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Животные содержались в вентилируемых клетках при температуре воздуха 20–22 °С, относительной влажности 40–60%, световом режиме 12:12. Использовался полнорационный корм ПК-120 (ООО «Лабораторкорм») при свободном доступе к водопроводной питьевой воде.

Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы с помощью метода блочной рандомизации. Животные не соответствующие критериям, были исключены из исследования в течение карантина.

После завершения эксперимента животные выводились из исследования в соответствии с утвержденным Протоколом. Биоматериал утилизировался в соответствии с Ветеринарно-санитарными правилами сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов, (в ред. Приказа Минсельхоза РФ от 16.08.2007 N 400).

Моделирование экстремальных воздействий на лабораторных животных. Нормобарическая гипоксия создавалась с использованием мембранного гипоксикатора БИО-НОВА-2004 производства компании БИО-НОВА (Москва), адаптированного для работы с грызунами. Установка обеспечивает плавную регулировку концентрации кислорода от 2 до 10% в гипоксической газовой смеси (ГГС). Производительность ГГС - не менее 5 л/мин. Процентное содержание кислорода в ГГС, подаваемой животным, регулируется и устанавливается с помощью газоанализатора, который встроен

в установку. Ранее было установлено, что гибель лабораторных животных наблюдается при содержании кислорода в ГГС от 5,5% у неустойчивых к гипоксии животных до 3,4% для животных с индивидуально повышенным уровнем устойчивости к гипоксии [4].

В серии 1 в камере гипоксикатора поддерживалась температура воздуха 20, 30 или 40 уВЯ°С (контрольная и экспериментальная группы, соответственно). В сериях 2-5 использована гемическая гипоксия. В основе острой гемической гипоксии лежит уменьшение кислородной емкости крови. Оно вызывается или изменением свойств гемоглобина (например, превращением гемоглобина в карбоксигемоглобин или метгемоглобин), или уменьшением количества гемоглобина (кровопускание). В стандартной модели метгемоглобинемии крысам вводят внутривенно (мышам подкожно) натрия нитрит (200-300 мг/кг), предварительно растворив его в воде очищенной. Допускается подкожное введение раствора NaNO_2 . Учитывается продолжительность жизни животных. При внутривенном пути введения 100%-ная гибель животного наступает через 13-17 мин, при подкожном пути введения — через 27-30 мин.

Таблица 1/Table 1

Серии исследования и решаемые в них задачи**Series of research and tasks solved in them**

№ серии/ Series No.	Решаемая задача/ Problem being solved	Используемые методики/ Methods used	Вид животных/ Animal species	Кол-во животных/ Number of animals
1	Исследование влияния гипертермии на переносимость гипоксии/ Investigation of the effect of hyperthermia on hypoxia tolerance	Нормобарическая гипоксия на фоне гипертермии/ Normobaric hypoxia against the background of hyperthermia	мыши/ mice	45
2		Вынужденное плавание в горячей воде на фоне гемической гипоксии Forced swimming in hot water against the background of hemic hypoxia	крысы/ rats	30
4	Исследование влияния гипоксии на переносимость гипертермии/ Investigation of the effect of hypoxia on hyperthermia tolerance	Вынужденное плавание в горячей воде на фоне гемической гипоксии/ Forced swimming in hot water against the background of hemic hypoxia	крысы/ rats	60
5	Исследование влияния гипоксии на переносимость гипотермии/ Investigation of the effect of hypoxia on hypothermia tolerance	Вынужденное плавание в холодной воде на фоне гемической гипоксии/ Forced swimming in cold water against the background of hemic hypoxia	крысы/ rats	30
6	Влияние гипотермии на переносимость гипоксии/ Effect of hypothermia on hypoxia tolerance	Гемическая гипоксия в условиях охлаждения/ Hemic hypoxia under cold conditions	мыши/ mice	60
	Итого животных/ Total animals		мыши/ mice	105
			крысы/ rats	120

При необходимости моделирования легкой степени (метгемоглобин крови 18-20%) гемической гипоксии животным внутрибрюшинно вводят нитрит натрия (NaNO₂, 3 мг/100 г), для моделирования средней степени гипоксии (метгемоглобин крови 35-36%) используется введение нитрита натрия в дозе 5 мг/100 г массы тела [5]. В сериях исследования 2-4 формировалась легкая степень метгемоглобинемии (доза нитрита натрия 30 мг/кг массы). В серии 5 использовалась летальная доза нитрита натрия – 300 мг/кг.

Моделирование гипертермии. В серии 1 гипертермия создавалась путем термостатического поддержания температуры воздуха в блоке содержания животных нормобарического гипоксикатора «БиоНова» +40 °С и влажности 30-60%.

В сериях исследований 2-3 оценивалась способность животных поддерживать уровень физической работоспособности в условиях гипертермии.

Моделирование гипотермии. В серии 4 гипотермия формировалась в тесте предельного плавания в десатурированной воде с температурой 10-12 °С с грузом 5% от массы тела в соответствии с ранее описанной методикой [6]. Воздействие гипотермии в серии 5 формировалось в условиях воздушного охлаждения (помещением животных в прозрачных клетках в холодную камеру, поддерживающую температуру воздуха 5±1 °С при влажности воздуха 75-80%).

Для оценки функционального состояния организма животных было проведено тестирование их физической работоспособности методом вынужденного плавания с грузом 5% от массы тела в воде разной температуры, методика проведения и интерпретация результатов которого представлена в работах [7, 8].

Статистическая обработка результатов исследования

Полученные экспериментальные материалы были сведены в аналитическую базу данных в процессоре электронных таблиц Excel и обрабатывались с помощью пакета прикладных программ «Анализ данных». Статистическая значимость различий между группами оценивалась для параметрических показателей методом ANOVA, для непараметрических (время жизни) – по критерию Вилкоксона-Мана-Уитни. Для оценки значимости контролируемых факторов и их взаимодействия использовались процедуры однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа.

Результаты исследования

Для оценки влияния гипертермии в камере гипоксикатора устанавливалось термостатируемое устройство нагрева воздуха. В разных экспериментах этой серии поддерживались следующие условия температуры воздуха: +20 °С (термокомфортные условия), +30° С (умеренное тепловое воздействие) и +40 °С (выраженное тепловое воздействие). Влажность воздуха при этом не регулировалась и соответствовала естественным значениям атмосферного воздуха. Результаты данной серии исследований представлены на **рис. 1** и **табл. 2**.

Анализ **рис. 1** показывает, что гипертермия закономерно снижает переносимость острой гипоксии. Умеренное тепловое воздействие (температура +30 °С, теплоощущение тепло) в основном снижает уровень устойчивости к гипоксии у низко- и среднеустойчивых животных. При этом средний уровень гипоксической устойчивости снижается умеренно, на 10% (коэф-

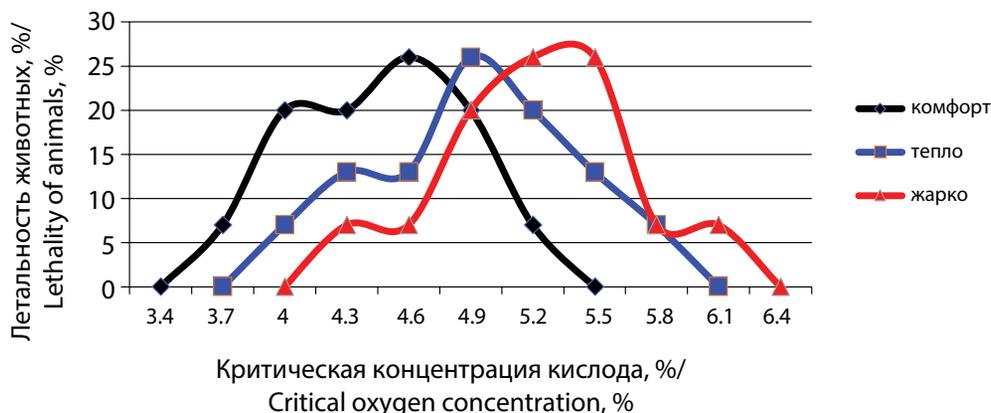


Рис. 1. Частотная кривая распределения гибели животных в зависимости от содержания кислорода в гипоксической газовой смеси для разных уровней теплового состояния.

Fig. 1. Frequency distribution curve of animal death depending on the oxygen content in the hypoxic gas mixture for different levels of the thermal state.

коэффициент детерминации $D=0,22, p=0,009$). Более интенсивное тепловое воздействие (температура $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$, теплоощущение жарко) включает уже все подгруппы высотной устойчивости, в том числе и высокой. Средний уровень гипоксической устойчивости снижается на 15% (коэффициент детерминации $D=0,46, p=4*10^{-5}$). Однофакторный дисперсионный анализ (табл. 2) влияния теплового воздействия на уровень устойчивости к гипоксии показал умеренную степень такого влияния. Им может быть объяснено 35% вариации значений критической концентрации кислорода, а 65% связаны с иными, в том числе не контролируруемыми факторами.

В серии 2 исследований использована гемическая гипоксия легкой степени, вызванная введением животным нитрита натрия в дозе 30 мг/кг. Температурное воздействие создавалось погружением животного в воду с комфортной ($+20\text{ }^{\circ}\text{C}$), теплой ($+30\text{ }^{\circ}\text{C}$) или горячей ($+40\text{ }^{\circ}\text{C}$) водой. Для оценки функционального состояния использован тест вынужденного плава-

ния с грузом 5% от массы тела. Результаты исследования отражены на рис. 2 и табл. 3.

Анализ рис. 2 показывает, что работоспособность животных с гемической гипоксией существенно зависит от уровня дополнительного теплового воздействия, с которым может быть связано 77% общей вариации времени плавания с грузом. Это влияние высокодостоверно ($p=2*10^{-9}$). Результаты однофакторного дисперсионного анализа влияния теплового воздействия на работоспособность животных в условиях гемической гипоксии представлены в табл. 3.

Таким образом, у животных с легкой степенью гемической гипоксии умеренное тепловое воздействие примерно на треть ухудшает функциональное состояние, а при более интенсивном тепловом воздействии такое снижение трехкратно.

Для оценки влияния гипоксии на переносимость гипертермии использована модель плавания животных с грузом 5% от массы тела в воде с повышенной температурой ($+40\text{ }^{\circ}\text{C}$). При этом для оценки влияния гипок-

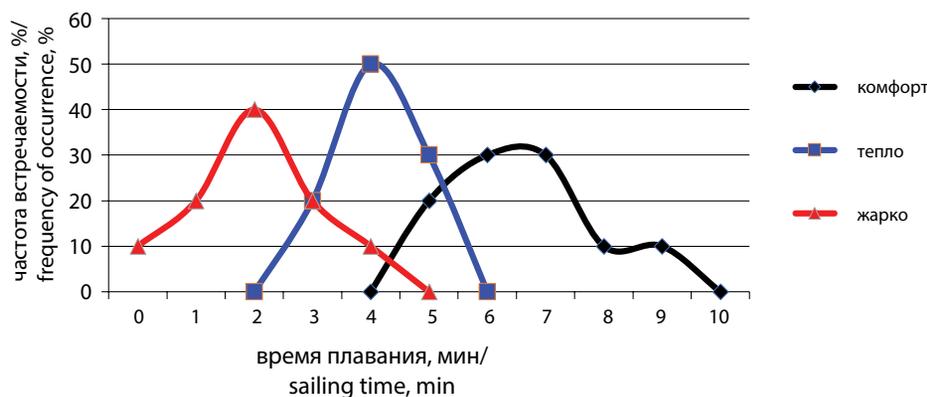


Рис. 2. Физическая работоспособность животных с гемической гипоксией при разном уровне теплового воздействия.

Fig. 2. Physical performance of animals with hemic hypoxia at different levels of thermal exposure.

Таблица 2/ Table 2

Результаты однофакторного дисперсионного анализа влияния температурного воздействия на устойчивость животных к гипоксической гипоксии

The results of one-way analysis of variance of the effect of temperature exposure on the resistance of animals to hypoxic hypoxia

Центроиды групп (критическая концентрация кислорода, %)/ Group Centroids (critical oxygen concentration, %)			F-критерий/ F-criterion	Коэффициент детерминации, D=/ Determination coefficient, D=	Достоверность, p=/ Reliability, p=
комфорт/ comfort	+ 30 °C	+40 °C			
4,35	4,81	5,13	11,1	0,35	0,00014
100%	111%	118%			

сии животным моделировали гемическую гипоксию с легкой и умеренной степенью метгемоглобинемии. Результаты этой серии представлены на **рис. 3** и **табл. 4**.

Анализ **рис. 3** показывает, что гемическая гипоксия негативно сказывается на возможности животных поддерживать свою работоспособность в условиях теплового воздействия. Даже слабый уровень метгемоглобинемии (нитрит натрия, 30 мг/кг), резко снижает тепловую устойчивость, а более интенсивное гипоксическое воздействие становится критичным для животных, так как 50% из них показали практически полное отсутствие работоспособности в условиях иммерсионной гипертермии (время плавания менее 1 мин), еще 40% показали крайне низкую работоспособность (время плавания от 1 до 2 мин), и только у 10% животных демонстрировали низкую работоспособность в условиях эксперимента. Результаты однофакторного дисперсионного анализа влияния фактора гипоксии на функциональное состояние животных в условиях иммерсионной гипертермии представлена в **табл. 4**.

Влиянием гемической гипоксии может быть объяснен 71% всей вариации показателя времени плавания животных в условиях комплексного воздействия гипоксии и гипертермии. Даже легкая степень метгемоглобинемии в два раза снижает способность животных к физической работе, а умеренная степень гемической гипоксии приводит к снижению этого показателя в 7 раз.

Для проведения исследования влияния гипоксии на переносимость гипотермии выбрана модель вынужденного плавания животного с грузом 5% от массы тела в воде низкой температуры (10-12 °С) на фоне предварительного введения нитрита натрия в дозе 30 мг/кг (легкая гемическая гипоксия) или 50 мг/кг (умеренная гемическая гипоксия). Результаты исследования отражены на **рис. 4**.

Анализ **рис. 4** показывает, что гипоксия, вызванная введением метгемоглобинообразователя, существенно влияет на работоспособность лабораторных животных в условиях гипотермии. Причем, при формировании легкой степени гемической гипоксии, ее действие пре-

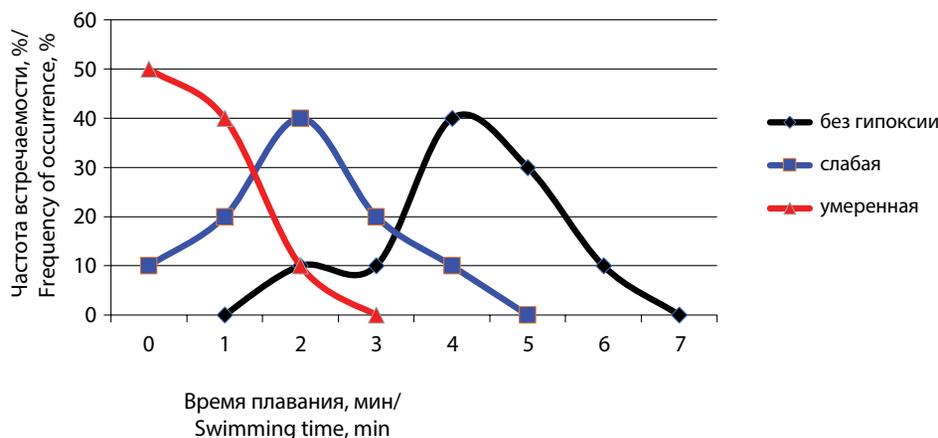


Рис. 3. Влияние уровня гемической гипоксии на функциональное состояние организма животных в тесте вынужденного плавания с грузом 5% от массы тела в воде с температурой +40°С.

Fig. 3. Influence of the level of hemic hypoxia on the functional state of the organism of animals in the test of forced swimming with a load of 5% of body weight in water with a temperature of +40 °C.

Таблица 3/ Table 3

Результаты однофакторного дисперсионного анализа влияния температурного воздействия на функциональное состояние животных с умеренной гемической гипоксией

The results of a one-way ANOVA analysis of the effect of temperature exposure on the functional state of animals with moderate hemic hypoxia

Центроиды групп (время плавания, мин)/ Group Centroids (swimming time, min)			F-критерий/ F-criterion	Коэффициент детерминации, D=/ Determination coefficient, D=	Достоверность, p=/ Reliability, p=
комфорт	+ 30°С	+40°С			
6,6	4,1	2,0	45,7	0,77	2*10 ⁻⁹
100%	62%	30%			

имущественно будет проявляться на животных с низкой и средней устойчивостью к иммерсионной гипотермии, но практически не будет затрагивать животных с высокой степенью холодовой резистентности. Умеренная же степень гемической гипоксии будет существенно влиять на всех животных, вне зависимости от исходного уровня резистентности к гипотермии. Результаты однофакторного дисперсионного анализа представлены в табл. 5.

В целом, фактор гипоксии существенно ухудшал переносимость животными иммерсионной гипотермии, снижая их физическую работоспособность в этих условиях. На влияние гемической гипоксии может быть отнесено 79% всей вариативности времени плавания животных в ходе данного исследования. Легкая степень гипоксии снижает работоспособность животных на 15% ($p=0,017$), ее влияние ограничивается 28% вари-

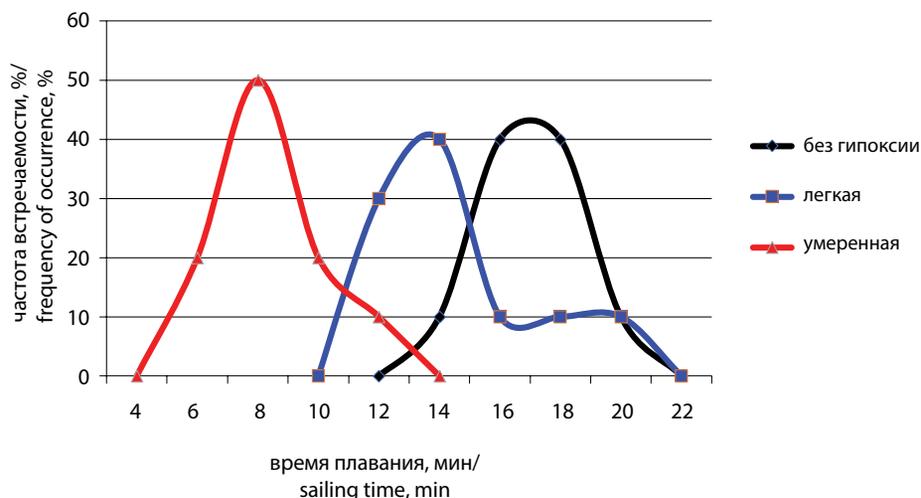


Рис. 4. Влияние гемической гипоксии на функциональное состояние животных в условиях иммерсионной гипотермии.

Fig. 4. Influence of hemic hypoxia on the functional state of animals under immersion hypothermia.

Таблица 4/ Table 4

Результаты однофакторного дисперсионного анализа влияния умеренной гемической гипоксией на переносимость температурного воздействия (+40 °C)

The results of a one-way ANOVA analysis of the effect of moderate hemic hypoxia on the tolerance of temperature exposure (+40 °C)

Центроиды групп (время плавания, мин)/ Group Centroids (swimming time, min)			F-критерий/ F-criterion	Коэффициент детерминации, D=/ Determination coefficient, D=	Достоверность, p=/ Reliability, p=
Без гипоксии/ Without hypoxia	Легкая гипоксия/ Mild hypoxia	Умеренная гипоксия/ Moderate hypoxia			
4,2	2,0	0,6	31,7	0,71	8*10 ⁻⁸
100%	48%	14%			

Таблица 5/ Table 5

Результаты однофакторного дисперсионного анализа влияния гемической гипоксии на функциональное состояние животных в условиях иммерсионной гипотермии

The results of a one-way ANOVA analysis of the effect of hemic hypoxia on the functional state of animals under immersion hypothermia

Центроиды групп (время плавания, мин)/ Group Centroids (swimming time, min)			F-критерий/ F-criterion	Коэффициент детерминации, D=/ Determination coefficient, D=	Достоверность, p=/ Reliability, p=
Без гипоксии/ Without hypoxia	Легкая гипоксия/ Mild hypoxia	Умеренная гипоксия/ Moderate hypoxia			
16,4	14,0	8,0	51,4	0,79	6*10 ⁻¹⁰
100%	85%	49%			

ативности признака. Под влиянием умеренной гемической гипоксии (нитрита натрия, 50 мг/кг) работоспособность животных снижается в 2 раза ($p=5*10^{-10}$), влияние этого фактора объясняет 89% всей вариативности времени плавания животных. Сопоставление результатов, полученных при разных уровнях гемической гипоксии, показывает, что более оптимальной моделью комплексного воздействия гипоксии и гипотермии будет создание у животных умеренной степени гемической гипоксии (50 мг/кг нитрита натрия).

Поскольку в серии исследований по оценке влияния гипотермии на переносимость животными гипоксии не предполагалось воздействие на животных физических нагрузок, то была использована модель оценки устойчивости к гипоксии по времени жизни животных после введения летальной дозы нитрита натрия 300 мг/кг. Для формирования состояния гипотермии животные после введения им метгемоглобинообразователя помещались в прозрачных клетках в холодную камеру

для животных (ILKA, США) в которой создавались для разных групп животных 3 режима: ложный режим (контроль), умеренное холодное воздействие (температура воздуха +10 °C) – экспериментальная группа 1, выраженное холодное воздействие (температура воздуха 0-2 °C) – экспериментальная группа 2. Влажность воздуха не регулировалась и соответствовала естественным значениям, характерным для атмосферного воздуха соответствующей температуры. В каждой группе было по 20 животных (мыши-самцы). Результаты исследований этой серии представлены на **рис. 5**.

Анализ **рис. 5** показывает, что воздушная гипотермия практически не оказывает влияния на переносимость гемической гипоксии, несколько снижая долю высокоустойчивых и сокращая время жизни наименее устойчивых животных. Однофакторный дисперсионный анализ (**табл. 6**) показал, что холодное воздействие не оказывает заметного влияния на время жизни животных при формировании у них гемической

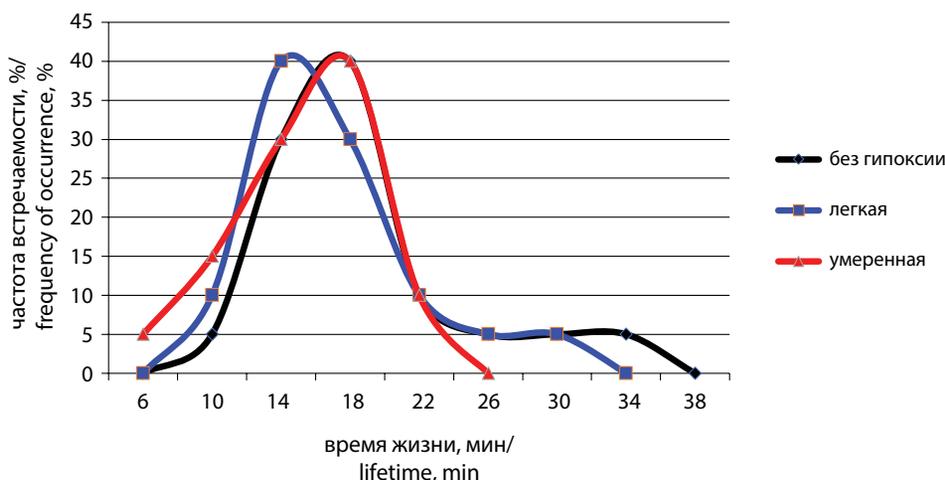


Рис. 5. Влияние воздушной гипотермии на переносимость гемической гипоксии.

Fig. 5. Effect of air hypothermia on the tolerance of hemic hypoxia.

Таблица 6/ Table 6

Результаты однофакторного дисперсионного анализа влияния воздушной гипотермии на время жизни животных в условиях летальной гемической гипоксии

The results of one-way analysis of variance of the effect of air hypothermia on the life time of animals under conditions of lethal hemic hypoxia

Центроиды групп (время жизни, мин)/ Group centroids (lifetime, min)			F-критерий/ F-criterion	Коэффициент детерминации, D=/ Determination coefficient, D=	Достоверность, p=/ Reliability, p=
комфорт/ comfort	прохладно/ chilly	холодно/ cold			
17,1	15,5	13,8	2,2	0,07	0,12
100%	90%	80%			

гипоксии (нитрит натрия 50 мг/кг). Коэффициент детерминации модели $D=0,07$ ($p=0,12$).

При легкой степени охлаждения степень такого влияния составляет только 2% ($p=0,36$), при этом среднее время жизни в условиях гемической гипоксии снижается на 10% по сравнению с уровнем теплового комфорта. Более интенсивное холодное воздействие (температура воздуха 0-2 °C) оказывает несколько более выраженное влияние (10%), достигающее уровня статистической значимости ($p=0,04$), при этом среднее время жизни в условиях гемической гипоксии снижается на 20% по сравнению с уровнем теплового комфорта.

Для выявления феномена взаимного отягощения при одновременном воздействии двух неблагоприятных факторов необходимо количественно оценить взаимодействие двух факторов, что требует проведения двухфакторного дисперсионного анализа. Для его проведения пригодны результаты серий с моделированием гемической гипоксии (фактор А) и теплового воздействия (фактор В), при этом тестируемый показатель функционального состояния животных – время вынужденного плавания животных с грузом 5% от массы тела в воде заданной температуры.

Каждый из анализируемых факторов имеет по 3 градации (отсутствие фактора, легкое воздействие, умеренное воздействие). Результаты двухфакторного дисперсионного анализа взаимодействия гипоксии и теплового воздействия представлены в **табл. 7**.

Оба фактора (гемическая гипоксия и тепловое воздействие) оказывают независимо друг от друга выраженное негативное влияние на функциональное состояние животных, проявляющееся снижением времени вынужденного плавания животных с грузом 5% от мас-

сы тела. Причем фактор гемической гипоксии играет более значимую роль, с ним связано 48% общей вариации анализируемого показателя. Влияние обоих факторов проявляется однонаправленно, что позволяет предполагать возможность развития синдрома взаимного отягощения. Между двумя экстремальными факторами при одновременном комплексном действии установлено статистически значимое, но умеренное по силе взаимодействие, обеспечивающее 5% вариативности показателя времени плавания. На долю неконтролируемых (случайных) факторов, в том числе – разного уровня физической работоспособности животного, приходится 12% общей вариативности анализируемого показателя.

Для уточнения характера взаимодействия между факторами был рассчитан Индекс аддитивности, равный отношению эффекта совместного влияния факторов к сумме их эффектов по отдельности. Количественно расчет эффектов (снижение времени плавания) выполнялся исходя из значений матрицы центроидов экспериментальных групп (**табл. 3, 4**). При этом эффект фактора А будет равен 0,71, эффект фактора В будет равен 0,62, эффект совместного действия факторов будет равен 0,95, сумма эффектов факторов при одновременном действии будет равна 1,33. Следовательно, значение Индекса аддитивности будет равно 0,71. Это позволяет считать, что взаимодействие факторов гемической гипоксии и теплового воздействия носит синергичный (однонаправленный) характер по типу дополняющего действия (сильнее, чем самый сильный из факторов, но меньше, чем их сумма). Выявленные особенности взаимодействия двух экстремальных факторов позволяют охарактеризовать его как синдром взаимного отягощения.

Таблица 7/Table 7

Основные показатели двухфакторного дисперсионного анализа взаимодействия гипоксии и теплового воздействия в модели плавания животных с грузом в воде разной температуры на фоне гемической гипоксии

The main indicators of a two-way analysis of variance of the interaction of hypoxia and thermal exposure in the model of swimming of animals with a load in water of different temperatures against the background of hemic hypoxia

Факторы модели/ Model factors	Коэффициент детерминации, D=/ Determination coefficient, D=	F-критерий/ F-criterion	Достоверность, p=/ Reliability, p=
Фактор А (гемическая гипоксия)/ Factor A (hemic hypoxia)	0,48	162,9	$4 \cdot 10^{-29}$
Фактор В (тепловое воздействие)/ Factor B (thermal effect)	0,34	118,1	$9 \cdot 10^{-25}$
Взаимодействие А*В/ A*B interaction	0,05	8,9	$5 \cdot 10^{-6}$
Неконтролируемые факторы/ Uncontrollable factors	0,12		

Обсуждение

Для экстремальных воздействий характерно развитие как специфических комплексов проявлений, связанных со спецификой исследуемого воздействия, так и неспецифических проявлений. Очевидным представляется предположение, что взаимодействие двух разных, не связанных патогенетически друг с другом экстремальных факторов, может проходить только в зоне неспецифических проявлений. Основными патогенетическими механизмами развития экстремальных состояний являются ослабление реактивности и функциональных резервов нейроэндокринной системы, развитие энергетического дисбаланса с нарастанием проявлений анаэробного катаболизма и вовлечением в реакцию пластических ресурсов организма, активация процессов ПОЛ истощение потенциала АОС с лабилизацией клеточных мембран, прогрессирующие изменения структурно-функциональных взаимоотношений в системе сохранения антигенно-структурного гомеостаза [9].

Критическое ухудшение функционального состояния при гипоксии и экстремальных температурных воздействий физических факторов сопряжено с активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, интенсификацией катаболизма белков, жиров и углеводов, развитием вторичной тканевой гипоксии и формированием митохондриальных дисфункций, играющих важную роль в снижении устойчивости организма к гипертермии и переносимости интенсивных физических нагрузок [10]. Существенную роль в этом процессе будут играть изменения физико-химических свойств липидного компонента мембран и нарушение липид-белковых взаимодействий, изменение кинетических характеристик ферментов, связанных с термодинамическими процессами при нагревании или охлаждении организма [11].

Физическая нагрузка в условиях гипертермии сопровождается терморегуляторной нагрузкой, которая опосредует проблемы с сердечно-сосудистой системой и влияет на функцию головного мозга, увеличивает легочную вентиляцию и изменяет мышечный метаболизм; все это потенциально может способствовать утомлению и ухудшить способность поддерживать эффективную физическую деятельность. На центральное утомление, по-видимому, влияет нейротрансмиттерная активность дофаминергической системы, сигналы от терморцепторов, возникающие в связи с повышенными температурами тела, мышц и кожи, и интенсивная афферентная обратная связь от усиленной легочной вентиляции и стресса сердечно-сосудистой

системы. Стабильность и метаболические изменения в скелетных мышцах, вероятно, являются важными факторами для афферентной обратной связи, опосредующей утомление, вызванное гипоксией и гипертермией, во время упражнений субмаксимальной интенсивности [12].

Наиболее вероятным механизмом развития синдрома взаимного отягощения при комплексном воздействии гипоксии и гипертермии является нарушение генерации АТФ в процессе фосфорилирующего митохондриального окисления, который является общим звеном патогенеза различных экстремальных состояний [1, 13]. Возникающие под влиянием гипоксии изменения реактивности организма и его резистентности к другим экстремальным воздействиям формируют физиологическую основу для развития синдрома взаимного отягощения, проявляющегося снижением как переносимости воздействий, так и функционального состояния организма, характеризуемого его работоспособностью [14, 15].

Известно, что в ответ на холодовой стресс в организме развивается комплекс защитных реакций, связанных с экспрессией генов клеточного ответа [16], обеспечивающих включение в организме нескольких путей. К ним относятся активация выработки разобщающих окисление и фосфорилирование белков [17, 18], а также HIF-1 α -зависимое переключение обмена в условиях гипоксии на сукцинатные пути [19].

Полученные нами экспериментальные данные о взаимодействии гипоксического и температурного фактора, их совместном влиянии на физическую работоспособность хорошо согласуются с известными литературными данными.

Заключение

Взаимодействие двух экстремальных факторов при комплексном воздействии может быть оценено по методологии двухфакторного дисперсионного анализа с количественной оценкой характера взаимодействия по Индексу аддитивности.

Гемическая гипоксия является адекватной моделью для использования в исследованиях с комплексным воздействием различных экстремальных факторов. Оптимальным может быть моделирование гипоксии легкой степени, вызванной введением нитрита натрия в дозе 30 мг/кг или умеренной гипоксии (доза 50 мг/кг), если анализируемые экстремальные факторы характеризуются низким уровнем взаимодействия.

Гипертермия оказывает умеренное модифицирующее воздействие на переносимость нормобарической

гипоксии, снижая порог гипоксической устойчивости животных. Коэффициент детерминации такого воздействия равен 35%. Оптимальным для выявления эффекта является пребывание животных в гипоксической газовой среде с температурой воздуха +40 °С.

Иммерсионная гипертермия является более выраженным экстремальным воздействием, чем воздушная (коэффициент ее влияния на уровень устойчивости животных к гипоксии $D=0,77$), что делает ее более подходящей для исследований с комплексным воздействием экстремальных факторов.

Гемическая гипоксия существенно сказывается негативным образом на возможность животных поддерживать свою работоспособность в условиях теплового воздействия. Даже слабый уровень метгемоглобинемии (нитрита натрия 30 мг/кг), снижает тепловую устойчивость животных в 2 раза. Более интенсивное гипоксическое воздействие становится критическим для животных, так как 50% из них показали практически полное отсутствие работоспособности в условиях иммерсионной гипертермии, а средний уровень времени плавания снижается в 7 раз.

Гемическая гипоксия легкой степени в условиях иммерсионной гипотермии оказывает преимущественное влияние на животных с низким и средним уровнем холодовой устойчивости. Более оптимальны для исследований с комплексным действием гипоксии и гипотермии является режим умеренного метгемоглобинообразования (нитрит натрия 50 мг/кг).

Воздушная гипотермия слабо влияет на устойчивость животных к гемической гипоксии, вызванной введением нитрита натрия в дозе 50 мг/кг. Степень такого влияния была равна 7% вариативности времени жизни животных и не достигала уровня статистической достоверности ($p=0,12$).

Для исследований с оценкой комплексного влияния экстремальных физических факторов в качестве оптимальной может рассматриваться модель с иммерсионной гипертермией (температура воды +40 °С) на фоне действия легкой степени гемической гипоксии (нитрит натрия 30 мг/кг) при анализируемом показателе «время вынужденного плавания с грузом 5% от массы тела».

При комплексном воздействии гемическая гипоксия и тепловое воздействие оказывают существенное негативное влияние на функциональное состояние животных, снижая время выполнения физической нагрузки животными практически в 20 раз. Исследуемые факторы в основном воздействуют на животных независимо, при ведущей роли гемической гипоксии. Однако между ними выявлен умеренный по выраженности

синдром взаимного отягощения (для взаимодействия факторов $D=0,05$, $p=5*10^{-6}$).

Взаимодействие между гипоксическим фактором и тепловым носит синергидный (однонаправленный) характер, что позволяет оценить его как синдром взаимного отягощения, и протекает по дополняющему типу взаимодействия (суммарное воздействие слабее суммы эффектов по отдельности).

Литература

(п.п. 10; 12; 16; 19 см. References)

- Новиков В.С., Сороко С.И., Шустов Е.Б. *Деадаптационные состояния человека при экстремальных воздействиях и их коррекция*. СПб.: Политехника-принт; 2018.
- Ким А.Е., Шустов Е.Б., Лемещенко А.В., Цыган В.Н. Гипоксия и гипертермия как факторы коморбидности у военнослужащих в горно-пустынной местности. *Военно-медицинский журнал*. 2021; СССХЛII(12): 56–63.
- Ким А.Е., Шустов Е.Б., Лемещенко А.В., Цыган В.Н. Патфизиологические основы формирования дезадаптаций в условиях высокогорья и полярных зон. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2021; 23(3): 215–22.
- Титович И.А., Болотова В.Ц. Экспериментальное изучение антигипоксической активности нового производного аминокетона. *Биомедицина*. 2016; (2): 77–83.
- Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Семенов Х.Х. и др. *Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств: методические рекомендации*. МР21-44-2017. М.: ФМБА России; 2017.
- Шустов Е.Б., Капанадзе Г.Д., Фокин Ю.В., Матвеев Е.Л. Методические особенности биомедицинских исследований влияния фармакологических средств на устойчивость организма к острой общей гипотермии. *Биомедицина*. 2017; (3): 4–15.
- Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Берзин И.А., Капанадзе Г.Д., Фокин Ю.В. и др. *Биомедицинское (доклиническое) изучение лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность: методические рекомендации*. МР21.43. М.: ФМБА России; 2017.
- Каркищенко В.Н., Каркищенко Н.Н., Шустов Е.Б., Берзин И.А., Фокин Ю.В., Алимкина О.В. Особенности интерпретации показателей работоспособности лабораторных животных по плавательным тестам с нагрузкой. *Биомедицина*. 2016; (4): 34–6.
- Новиков В.С., Голянич В.М., Шустов Е.Б. *Коррекция функциональных состояний при экстремальных воздействиях*. СПб.: Санкт-Петербургская издательско-книготорговая фирма «Наука»; 1998.
- Козлов Н.Б. *Гипертермия: биохимические основы патогенеза, профилактики, лечения*. Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та; 1990.
- Лукьянова Л.Д. *Сигнальные механизмы гипоксии*. М.: РАН; 2019.
- Бурых Э.А. Проблема оценки индивидуальной чувствительности и устойчивости к гипоксии у животных и человека. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2019; 55(5): 307–15. <https://doi.org/10.1134/S0044452919050024>
- Ушаков И.Б., Штемберг А.С., Шафиркин А.В. *Реактивность и резистентность организма млекопитающих*. М.: Наука; 2007.

17. Афанаскина Л.Н., Деревцова С.Н., Синдеева Л.В., Хапилина Е.А., Медведева Н.Н. Бурая жировая ткань: особенности биологии, участие в энергетическом обмене и ожирении. *Вестник РАМН*. 2020; 75(4): 326–30. <https://doi.org/10/15690/vramn1316>
18. Сонькин В.Д. Разобщенное тканевое дыхание при мышечной работе: потеря эффективности или гомеостатическая выгода? *Ульяновский медико-биологический журнал*. 2016; (S4): 63–4.
9. Novikov V.S., Golyanich V.M., Shustov E.B. *Correction of functional states under extreme influences. [Korreksiya funktsional'nykh sostoyaniy pri ekstremal'nykh vozdeistviyakh]*. Sankt-Peterburg: Sankt-Peterburgskaya izdatel'sko-knigotorgovaya firma «Nauka»; 1998. (in Russian)
10. Foster J., Hodder S.G., Lloyd A.B., Havenith G. Individual Responses to Heat Stress: Implications for Hyperthermia and Physical Work Capacity. *Front. Physiol.* 2020; 11: 541483. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.541483>

References

1. Novikov V.S., Soroko S.I., Shustov E.B. *Disadaptive states of a person under extreme influences and their correction. [Dezadaptatsionnye sostoyaniya cheloveka pri ekstremal'nykh vozdeistviyakh i ikh korrektsiya]*. Sankt-Peterburg: Politehnika-print; 2018. (in Russian)
2. Kim A.E., Shustov E.B., Lemeshchenko A.V., Tsygan V.N. Hypoxia and hyperthermia as comorbidity factors in servicemen in mountainous desert areas. *Voenno-meditsinskii zhurnal*. 2021; CCCX-LII(12): 56–63. (in Russian)
3. Kim A.E., Shustov E.B., Lemeshchenko A.V., Tsygan V.N. Pathophysiological bases of the formation of maladaptation in conditions of high mountains and polar zones. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii*. 2021; 23(3): 215–22. (in Russian)
4. Titovich I.A., Bolotova V.Ts. Experimental study of the antihypoxic activity of a new derivative of aminoethanol. *Biomeditsina*. 2016; (2): 77–83. (in Russian)
5. Karkishchenko N.N., Karkishchenko V.N., Shustov E.B., Kapanadze G.D., Revyakin A.O., Semenov Kh.Kh., i dr. *Biomedical (preclinical) study of the antihypoxic activity of drugs: guidelines. [Biomeditsinskoe (doklinicheskoe) izuchenie antigipoksicheskoy aktivnosti lekarstvennykh sredstv: metodicheskie rekomendatsii]*. MR21-44-2017. Moscow: FMBA Rossii; 2017. (in Russian)
6. Shustov E.B., Kapanadze G.D., Fokin Yu.V., Matveenko E.L. Methodological features of biomedical studies of the effect of pharmacological agents on the body's resistance to acute general hypothermia. *Biomeditsina*. 2017; (3): 4–15. (in Russian)
7. Karkishchenko N.N., Karkishchenko V.N., Shustov E.B., Berzin I.A., Kapanadze G.D., Fokin Yu.V., i dr. *Biomedical (preclinical) study of drugs that affect physical performance: guidelines. [Biomeditsinskoe (doklinicheskoe) izuchenie lekarstvennykh sredstv, vliyayushchikh na fizicheskuyu rabotosposobnost': metodicheskie rekomendatsii]*. MR21.43. Moscow: FMBA Rossii; 2017. (in Russian)
8. Karkishchenko V.N., Karkishchenko N.N., Shustov E.B., Berzin I.A., Fokin Yu.V., Alimkina O.V. Peculiarities of interpretation of performance indicators of laboratory animals according to swimming tests with load. *Biomeditsina*. 2016; (4): 34–36. (in Russian)
11. Kozlov N.B. *Hyperthermia: biochemical basis of pathogenesis, prevention, treatment. [Gipertermiya: biokhimicheskie osnovy patogeneza, profilaktiki, lecheniya]*. Voronezh: Izd-vo Voronezh. un-ta; 1990. (in Russian)
12. Nybo L., Rasmussen P., Sawka M.N. Performance in the heat-physiological factors of importance for hyperthermia-induced fatigue. *V: Comprehensive Physiology*. Wiley; 2014; 4(2): 657–89. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130012>
13. Luk'yanova L.D. *Signaling mechanisms of hypoxia. [Signal'nye mekhanizmy gipoksii]*. Moscow: RAN; 2019. (in Russian)
14. Burykh E.A. The problem of assessing individual sensitivity and resistance to hypoxia in animals and humans. *Zhurnal zvolyutsionnoi biokhimii i fiziologii*. 2019; 55(5): 307–15. (in Russian) <https://doi.org/10.1134/S0044452919050024>
15. Ushakov I.B., Shtemberg A.S., Shafirkin A.V. *Reactivity and resistance of the organism of mammals. [Reaktivnost' i rezistentnost' organizma mlekopitayushchikh]*. Moscow: Nauka; 2007. 493. (in Russian)
16. Adjirackor N.A., Harvey K.E., Harvey S.C. Eukaryotic response to hypothermia in relation to integrated stress responses. *Cell Stress Chaperones*. 2020; 25(6): 833–46. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01135-8>
17. Afanaskina L.N., Derevtsova S.N., Sindeeva L.V., Khapilina E.A., Medvedeva N.N. *Brown adipose tissue: features of biology, participation in energy metabolism and obesity (literature review). [Buraya zhirovaya tkan': osobennosti biologii, uchastie v energeticheskom obmene i ozhireнии (obzor literatury)]*. Vestnik RAMN. 2020; 75(4): 326–30. (in Russian) <https://doi.org/10/15690/vramn1316>
18. Son'kin V.D. Uncoupled tissue respiration during muscle work: loss of efficiency or homeostatic benefit? *Ul'yanovskiy mediko-biologicheskii zhurnal*. 2016; (S4): 63–4. (in Russian)
19. Lukyanova L.D., Kirova Y.I., Germanova E.L. The Role of Succinate in Regulation of Immediate HIF-1 α Expression in Hypoxia. *Bull Exp Biol Med*. 2018; 164(3): 298–303. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-3976-2>

Сведения об авторах:

Ким Алексей Евгеньевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. НИЦ ВМА;

Шустов Евгений Борисович, доктор мед. наук, проф., полковник медицинской службы в запасе, гл. науч. сотр. НКЦ токсикологии им. акад. С.Н. Голикова;

Зайцева Ирина Петровна, доктор биол. наук, проф.;

Лемешенко Алексей Викторович, канд. мед. наук, подполковник медицинской службы, докторант каф. патологической физиологии ВМА.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Абрамян Ш.М.¹, Кандалова О.В.², Волкова Е.Н.¹, Найденов Н.П.¹, Морозов С.Г.¹

Измерение уровня экспрессии вторичных мессенджеров апоптоза в клетках кожи, выделенных из операционного материала при проведении операции лифтинга лица у пациенток разных возрастных групп

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

125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8;

²ФГБУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова»,

127473, Москва, ул. Делегатская, 22, стр. 1

Цель работы – измерение уровня экспрессии проапоптотных сигнальных белков Bad, Bax, Bak, Bim, Bid, 14-3-3, а также каспазы-2 и каспазы-9, в клетках кожи и подкожно-жировой ткани, выделенных из операционного материала при операции по коррекции контуров лица. **Методика.** Из операционного материала в самом начале операции (контрольные образцы), а также после её завершения (опытные образцы), были выделены образцы кожи и подкожной клетчатки, из которых были изолированы жизнеспособные клетки. Эти клетки обрабатывали антителами к сигнальным молекулам апоптоза и затем анализировали на проточном цитометре FACSCalibur по программе SimulSet.

Результаты. По сравнению с контрольными образцами, не подвергавшимися ишемии, клетки кожи, выделенные по завершению операции, подвергались действию ишемии / реперфузии, то есть в них оказались активированы сигналы апоптоза, ассоциированного с митохондриями, на что указывает повышение экспрессии проапоптотных белков и их фосфорилированных форм. Уровень экспрессии этих белков был проанализирован с позиций возраста пациенток. Было установлено, что в возрастной группе старше 50 лет все показатели статистически значимо превышали норму, а также соответствующие показатели пациенток более молодого возраста.

Заключение. Полученные данные указывают на активацию сигнальных путей апоптоза, ассоциированного с митохондриями, в клетках кожи и подкожно-жировой ткани, выделенных из операционного материала при коррекции контуров лица, а также на усугубление процесса апоптоза по мере старения организма пациента.

Ключевые слова: лифтинг лица; апоптоз; клетки кожи; сигнальные молекулы

Для цитирования: Абрамян Ш.М., Кандалова О.В., Волкова Е.Н., Найденов Н.П., Морозов С.Г. Измерение уровня экспрессии вторичных мессенджеров апоптоза в клетках кожи, выделенных из операционного материала при проведении операции лифтинга лица у пациенток разных возрастных групп. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 107-114.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.107-114

Участие авторов: концепция и дизайн работы – Морозов С.Г.; концепция и дизайн работы, сбор и обработка первичных данных статистический анализ, иллюстрации и построение графиков, написание текста статьи Абрамян Ш.М.; статистический анализ, иллюстрации и построение графиков – Найденов Н.П.; сбор и обработка первичных данных – Волкова Е.Н.; сбор и обработка данных, редактирование статьи – Кандалова О.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Морозов Сергей Георгиевич, e-mail: sergey_moroz@list.ru

Финансирование. Работа выполнялась в рамках госзадания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.10.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Abramian Sh.M.¹, Kandalova O.V.², Volkova E.N.¹, Naidenov N.P.¹, Morozov S.G.¹**Measurement of apoptotic second messenger expression in skin cells isolated from tissue collected during face lifting surgery in patients of different age groups**¹Institute of General Pathology and Pathophysiology,
8 Baltiyskaya St., Moscow, 125315, Russian Federation;²Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry,
20/1 Delegatskaya St., Moscow, 127473, Russian Federation

The **aim** of this work was to measure the expression of proapoptotic signaling proteins, Bad, Bax, Bak, Bim, Bid, and 14-3-3, as well as caspase-2 and caspase-9, in skin cells and subcutaneous adipose tissue isolated from tissues collected during face lifting surgery.

Methods. Skin and subcutaneous tissue samples were isolated at the very beginning of the operation and after its completion; then viable cells were isolated from the samples. The cells were stained with antibodies to apoptosis signaling molecules and analyzed with a FACSCalibur flow cytometer using SimulSet software. Statistical analysis was performed with BIostat software.

Results. Skin cells isolated at the end of the operation were more severely damaged compared with control samples (cells isolated at the very beginning of the operation and not subjected to ischemia). In the cells obtained after the surgery, effects of ischemia/reperfusion were observed. The cells isolated after the face lifting surgery contained activated apoptotic signals associated with mitochondria, as indicated by increased expression of proapoptotic proteins and their phosphorylated forms. The proapoptotic protein expression was analyzed based on the patients' age. It was found that in the group older than 50 years, all indexes significantly exceeded both the normal range and respective values in younger female patients.

Conclusion. The study results showed activation of proapoptotic signaling pathways associated with mitochondria in skin cells and subcutaneous adipose tissue isolated during face lifting surgery along with aggravation of apoptosis as the patient ages.

Keywords: face lifting; apoptosis; skin cells; signaling molecules

For citation: Abramian Sh.M., Kandalova O.V., Volkova E.N., Naidenov N.P., Morozov S.G. Measurement of apoptotic second messenger expression in skin cells isolated from tissue collected during face lifting surgery in patients of different age groups. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66 (4): 107-114. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.107-114

Author's contribution: concept and design of the work – Morozov S.G.; concept and design of the work, collection and processing of primary data, statistical analysis, illustrations and graph construction, article text writing – Abramyan Sh.M.; statistical analysis, illustrations and graph construction – Naidenov N.P.; collection and processing of primary data – Volkova E.N.; collection and processing of data, editing of the article – Kandalova O.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

For correspondence: *Sergey G. Morozov*, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 8 Baltiyskaya St., Moscow, 125315, Russian Federation, e-mail: sergey_moroz@list.ru

Information about the authors:Morozov S.G., <https://orcid.org/0000-0001-5822-5729>Kandalova O.V., <https://orcid.org/0000-0003-0723-2800>**Financing.** The study was a part of a State Assignment.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 09.10.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

В хирургической практике актуальна проблема ишемии/реперфузии (I/R), что связано с гибелью клеток и развитием полиорганной недостаточности при восстановлении кровотока в тканях обескровленных в течение длительного периода во время операции. Именно восстановление кровотока обуславливает развитие негативных процессов в клетках не только в зоне оперативного вмешательства, но и в других органах и тка-

нях. Изучению особенностей I/R и молекулярных событий, связанных с I/R при операции по коррекции контуров лица посвящена данная работа. Известно, что основную долю негативных эффектов, связанных с I/R, вносят митохондрии. Окислительный стресс является триггером апоптоза, связанного с митохондриями [1, 2]. Нарушение функциональной активности митохондрий, снижение мембранного потенциала митохондрий, приводит к повышению уровня реактивных форм кислорода в клетке [3], а также нарушению сиг-

налов, связанных с кальцием. Следует отметить, что с кальциевыми сигналами ассоциированы антиапоптотные белки Bcl-2 и Bcl-xL [4].

В регуляции апоптоза, связанного с митохондриями, участвуют как проапоптотные белки, так и антиапоптотные, большинство из них принадлежат семейству белков Bcl-2 (B-cell lymphoma-2), которые регулируют пермеабиллизацию внешней мембраны митохондрий, формирование пор и выход некоторых проапоптотных белков в экстраклеточный матрикс (ЕСМ) [5]. Проапоптотные мультидоменные белки Bax и Bak семейства Bcl-2 участвуют в пермеабиллизации внешней мембраны митохондрий при митохондриальном типе апоптоза. Белок Bax формирует олигомеры и в таком виде перемещается из цитозоля к мембране митохондрий, взаимодействует с белками, формирующими поры во внешней мембране митохондрий, что приводит к выходу ряда белков, в том числе цитохрома *c*, в цитозоль и активации каспазы-9. Вне апоптоза белки Bax и Bak предотвращают активацию программы старения клеток [6].

В семейство Bcl-2, группу “BH3 domain-only”, входят проапоптотные белки Bad, Bid, Bim/Bod, Bik, Hrk, Noxa, имеющие домен BH3, но не имеющие домена BH1 или домена BH2. Белок Bad вызывает диссоциацию комплекса белков Bax с Bcl-2 или Bcl-xL. При активации факторов, способствующих выживанию клетки, белок Bad фосфорилируется у человека по Ser75 (у мышей по Ser112 и Ser136). Это обуславливает связывание белка Bad с белками 14-3-3, что препятствует ассоциации Bad с Bcl-2 или Bcl-xL. Необходимо отметить, что, в отличие от опухолевых клеток, в нормальных клетках кожи проапоптотные стимулы вызывают активации белка Bad, которая не приводит к перемещению белка Bax из цитозоля и не вызывает диссоциации комплекса белков Bax /Bcl-2. Более того, активация Bad в нормальных фибробластах блокирует апоптоз [7].

Белок Bid локализуется в цитозоле в виде неактивного предшественника, он может взаимодействовать как с Bcl-2, так и с Bax. При активации Fas рецептора и проведении сигнала апоптоза Bid он расщепляется каспазой-8 по Asp60 с формированием tBid, который перемещается к внешней мембране митохондрий. tBid вызывает конформационные изменения белка Bak (последний является членом семейства Bcl-2 и локализуется на внешней мембране митохондрий), что приводит к формированию каналов в мембране митохондрий. Далее это приводит к выходу цитохрома *c*, формированию комплекса с Araf-1 и каспазой-9 и активации последней. При воспалении в расщеплении белка Bid

также участвует каспаза-1, что сопрягает сигнальные пути апоптоза и воспаления [8].

Белок Bim играет ключевую роль в апоптозе лимфоцитов, он имеет три изоформы, образуемые при альтернативном сплайсинге – Bim(EL), Bim(L), and Bim(S), последняя является наиболее цитотоксичной формой. Активность изоформ Bim(EL) и Bim(L) при апоптозе регулируется путем их фосфорилирования. Bim может взаимодействовать с белками Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, Bfl-1, BHRF-1. При стрессе при активации сигналов, связанных с JNK1 и ERK 1/2, Bim фосфорилируется по Ser69 и диссоциирует из комплекса с динеином, перемещается к внешней мембране митохондрий и регулирует формирование пор, обуславливающих выход проапоптотных белков в ЕСМ [9].

Особый интерес представляет семейство белков 14-3-3, которые регулируют множество межбелковых взаимодействий в клетке. При активации сигналов апоптоза белок Bad взаимодействует с белком 14-3-3 в зависимости от уровня его фосфорилирования: нефосфорилированный Bad не связывается с 14-3-3 и может перемещаться к митохондриям, где активирует сигналы апоптоза, тогда как фосфорилированная форма Bad связана с белком 14-3-3, образует стабильный комплекс и препятствует сигналам апоптоза [10]. Кроме того, белки семейства 14-3-3 регулируют кальций-зависимые калиевые каналы при стрессе [11].

К сигнальным белкам апоптоза можно отнести и каспазы, но эти протеазы выполняют не только сигнальную роль, но, прежде всего, структурную, так как именно они расщепляют компоненты клетки и способствуют формированию апоптотных телец. Для сигналов апоптоза, связанных с митохондриями, наиболее важны каспаза-2 и каспаза-9, которые активируются при выходе проапоптотных белков в ЕСМ при открытии пор во внешней мембране митохондрий [12, 13].

Цель работы – измерение экспрессии проапоптотных сигнальных белков Bad, Bax, Bak, Bim, Bid, 14-3-3, а также каспазы-2 и каспазы-9, в клетках кожи и подкожно-жировой ткани, выделенных из операционного материала при операции по коррекции контуров лица.

Методика

В работе использован биологический материал 124 женщин (21 – 64 лет), которым в Клинике пластической и эстетической хирургии «Фрау Клиник 1» (Москва) были проведены операции по коррекции контура лица (лифтинг), все операции были выполнены по единому протоколу. Пациентки были разделены на группы по возрасту, все подписывали утвержденную Ученым Советом ФГБНУ «НИИОПП»

и одобренную Дирекцией клиники *форму информированного согласия* на участие в исследовании, а также разрешение на анонимное использование биологического материала пациенток. Протокол исследования одобрен Этическими Комиссиями ФГБНУ «НИ-ИОПП» и клиники. Работа проведена согласно Хельсинской Декларации по соблюдению прав человека. Все исследования выполнялись по международным правилам работы с биоматериалом людей.

Критерии исключения пациенток из исследования: острые бактериальные и вирусные инфекции, сахарный диабет, системные, аллергические, воспалительные или онкологические заболевания, беременность или приём противозачаточных препаратов.

При проведении операции по коррекции лица сразу после фиксации сосудов подкожной клетчатки были выделены фрагменты кожи и подкожной клетчатки используемые в качестве контроля отсутствия ишемии (контрольные образцы). После проведения операции лифтинга лица и снятия зажимов с сосудов также были выделены кусочки кожи и подкожной клетчатки (экспериментальные образцы) для исследования эффекта ишемии/реперфузии. Таким образом, для каждого экспериментального образца существовал свой внутренний контроль. Размер каждого из выделенных фрагментов составлял 2x1x0,5 см. Образцы промывали в стерильном фосфатном буфере (PBS, *Phosphate Buffered Saline*, Sigma) и переносили в стерильную пробирку со средой RPMI-1640 (Flow) с 15% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Flow) и оставляли при температуре +4 °С до окончания операции. Клетки из образцов тканей были выделены по методике [14], клетки получали при воздействии коллагеназы II (Sigma-Aldrich) в конечной концентрации [0,5 мг/мл] при +37 °С и 5% CO₂ в течение 40 мин при непрерывном мягком перемешивании на шейкере. Затем к клеткам добавляли ЭДТА (10 мМ) и лизирующий буфер для эритроцитов (Becton Dickinson, США). Суспензию клеток отмывали дважды в полной среде RPMI-1640 с 10 мМ буфера HEPES (Sigma), 2 мМ L-глутамин (Sigma) и 15% ЭТС (Flow) с центрифугированием 10 мин при 200 g и 25 °С. К осадку добавляли полную среду RPMI-1640 + 15% ЭТС, инкубировали при 37 °С и 5% CO₂ 2 ч для восстановления клеток. Процент живых клеток определяли по окраске трипановым синим при световой микроскопии (обычно >95% всех клеток) [14].

Клетки обрабатывали моноклональными антителами (mAb) к белкам Wax, Bad, Bak, Bid, Bim и их фосфорилированным формам (P) (Cell Signaling Technologies, США), а также антителами к каспазе-2 и каспазе-9, ко-

торые проводят сигналы апоптоза от митохондрий. Клетки отмывали в PBS, доводили до концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток в 50 мкл, добавляли 20 мкл mAb, инкубировали при +4 °С 40 мин. Если антитела не были напрямую мечеными флуоресцеинами, то в качестве вторых антител использовали изотип-специфические F(ab)₂ фрагменты иммуноглобулинов (Ig), меченные флуоресцентными красителями. Клетки трижды отмывали, осадок фиксировали в 4%-м параформальдегиде на PBS.

Окрашенные клетки анализировали на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) по программе SimulSet. Первичный анализ клеток проводили при прямом и боковом просвечивании лазером в системе координат на каналах FSC-A/SSC-A (Forward Scat Cells & Side Scat Cells). В каждом образце анализировалось 10 тысяч событий на гейт одной популяции клеток, который устанавливали автоматически по программе или по экспрессии соответствующего маркера. Интенсивность флуоресценции mAb, меченных FITC, определяли на канале FL1 при длине волны 530 ± 5 нм, флуоресценцию фикоэритрина (PE) измеряли на канале FL2 (585 ± 5 нм). Интенсивность флуоресценции приводили к внутреннему стандарту. В качестве негативного контроля регистрировали флуоресценцию F(ab)₂ фрагментов изотип-специфических Ig, меченных соответствующим красителем без первичных mAb. Далее анализировали гистограмму, соответствующую распределению клеток на канале, по которой определяли процентное содержание антиген-положительных клеток и интенсивность флуоресценции (mean) в условных единицах, отражающую относительную плотность антигена на поверхности клетки или уровень включения флуоресцентной метки в клетку.

Исследование проведено с использованием оборудования ЦКП «Прикладная Генетика» МФТИ. (Соглашение № 075-15-2021-684).

Статистическую обработку результатов проводили по программе БИОСТАТ, Сравнение между двумя группами выполняли по критерию Стьюдента, данные представлены как $M \pm m$. Для анализа групп с малой выборкой использовали метод непараметрического анализа Ньюмена-Кейлса, при котором статистически значимые различия между группами даны как $p < 0,05$.

Результаты исследования

В наших предыдущих работах мы показали, что процент спонтанного апоптоза в клетках кожи, выделенных из операционного материала при лифтинге лица, наиболее выражен в эпителиальных клетках кожи [14, 15]. Однако статистически значимо более высокий уровень апоптоза, индуцированного клеточно-проникающим C2-церамидом, указывает на активацию сигнальных

путей апоптоза во всех типах клеток кожи и подкожно-жировой ткани по завершении операции по коррекции контуров лица [14]. То есть при этих обстоятельствах мы имеем дело с эффектом ишемии/реперфузии (I/R). Известно, что при I/R обязательно задействованы митохондрии, в которых генерируется высокий уровень перекисей и свободных радикалов, что является активатором сигнальных путей апоптоза, сопряженных с митохондриями [3]. В связи с этим в данной работе поставлена задача определения уровня экспрессии сигнальных белков, ассоциированных с митохондриальным типом апоптоза, в клетках кожи, выделенных при операции лифтинга лица. В данном исследовании контролем служили клетки, выделенные от того же пациента, но в самом начале операции, когда не было эффекта ишемии тканей (см. раздел «Методика»).

Данные по экспрессии сигнальных белков, ассоциированных с митохондриальным типом апоптоза, в клетках, выделенных из операционного материала при лифтинге лица, представлены в **табл. 1**.

В нашем исследовании белок Bad не был изменен после операции лифтинга лица по сравнению с контролем (**табл. 1**). Это согласуется с работами, в которых показано, что в нормальных клетках кожи активация белка Bad не сопряжена с развитием апоптоза [7]. В связи с полученными данными мы далее не изучали белок Bad.

Белок Bid, как и Bad, входит в группу “BH3 domain-only” семейства Bcl-2, ему принадлежит важная роль в проведении сигналов от рецепторов апоптоза,

так как при расщеплении каспазой-8 он превращается в укороченный tBid, который при перемещении к митохондриям вызывает изменения белка Вах и открытию пор во внешней мембране митохондрий [8]. В нашей работе экспрессия белка Bid значительно была повышена после завершения операции по изменению контуров лица, что указывает на вовлечение не только митохондрий, но и рецепторов апоптоза в эффекте гибели клеток при I/R (**табл. 1**).

Проапоптотные белки Вах и Вак взаимодействует с белками, образующими поры во внешней мембране митохондрий, что приводит к выходу в ЕСМ цитохрома c и активации каспазы-9 [6]. В нашей работе показано статистически значимое повышение экспрессии белков Вах и Вак (**табл. 1**) в клетках, выделенных после операции лифтинга лица, что указывает на роль этих белков в гибели клеток кожи.

Уровни экспрессии каспазы-2 и каспазы-9 значительно были повышены ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными показателями (**табл. 1**). Что касается белков 14-3-3, то в проведении сигналов апоптоза принимают участие только некоторые формы из этого семейства, но антитела, которые мы использовали, показывают суммарный уровень всех белков 14-3-3 в клетке. Поэтому вычлнить те формы, которые имеют отношение к апоптозу, не представляется возможным. Тем не менее, общий уровень белка 14-3-3 был статистически значимо ($p < 0,05$) повышен в клетках, подвергшихся ишемии / реперфузии, по сравнению с контрольными клетками (**табл. 1**).

Таблица 1/ Table 1

Измерение экспрессии сигнальных белков апоптоза митохондрий в клетках кожи при ишемии / реперфузии при операции лифтинга лица (по данным проточной цитометрии)

Measuring the expression of mitochondrial apoptosis signaling proteins in skin cells during ischemia/reperfusion during facelift surgery (by flow cytometry)

Сигнальные белки Signaling proteins	Контроль (n = 124) Control	Ишемия / реперфузия (n = 124) Ischemia / reperfusion	$p < 0,05$ #
Bad, mean*	59 ± 3	62 ± 4	
Bid, mean	48 ± 4	72 ± 4	+
Bak, mean	121 ± 3	169 ± 5	+
Bax, mean	132 ± 4	176 ± 6	+
Bim, mean	72 ± 5	98 ± 4	+
14-3-3, mean	151 ± 6	196 ± 5	+
Каспаза-2 / Caspasa -2 mean	218 ± 5	278 ± 3	+
Каспаза-9 / Caspasa -9 mean	232 ± 7	294 ± 4	+

Примечание. *mean – интенсивность флуоресценции (в условных единицах),

$p < 0,05$ статистическая значимость по сравнению с контролем.

Note. *mean - fluorescence intensity (in conventional units),

$p < 0.05$ statistical significance compared to control.

Чтобы определить активацию сигнальных путей апоптоза, ассоциированных с митохондриями, мы измерили уровень экспрессии фосфорилированных (P) белков, для этого клетки, выделенные из операционного материала, окрашивали антителами к (P)-Bak, (P)-Bim, (P)-Bax. Вместо фосфорилированной формы (P)-Bid мы исследовали tBid, так как именно эта ук-

роченная форма участвует в передаче сигналов апоптоза (табл. 2). Полученные данные указывают на повышение активности сигналов апоптоза в клетках после ишемии по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Далее мы сравнили показатели экспрессии сигнальных белков в зависимости от возраста пациенток (табл. 3). Во-первых, для всех исследованных белков

Таблица 2/ Table 2

Определение активации сигнальных путей апоптоза митохондрий в клетках кожи при ишемии / реперфузии при операции лифтинга лица (по данным проточной цитометрии)

Determination of mitochondrial apoptosis signaling pathway activation in skin cells during ischemia/reperfusion during facelift surgery (by flow cytometry)

Сигнальные белки Signaling proteins	Контроль (n = 124) Control	Ишемия / реперфузия (n = 124) Ischemia / reperfusion	$p < 0,05$ #
** (P)-Bax, mean*	82 ± 3	112 ± 3	+
(P)-Bak, mean	97 ± 5	134 ± 4	+
(P)-Bim, mean	109 ± 2	141 ± 5	+
(P)-14-3-3, mean	173 ± 5	206 ± 4	+
tBid, mean	62 ± 3	135 ± 6	+

Примечание. *mean – интенсивность флуоресценции (в условных единицах),

** (P) – фосфорилированные белки,

$p < 0,05$ статистическая значимость по сравнению с контролем.

Note. *mean – fluorescence intensity (in conventional units),

** (P) – phosphorylated proteins,

$p < 0.05$ statistical significance compared to control.

Таблица 3/ Table 3

Измерение экспрессии сигнальных белков апоптоза митохондрий в клетках кожи при ишемии / реперфузии (I/R) при операции лифтинга лица в зависимости от возраста пациенток (по данным проточной цитометрии)

Measuring the expression of mitochondrial apoptosis signaling proteins in skin cells during ischemia/reperfusion (I/R) during facelift surgery depending on the age of the patients (according to flow cytometry)

Сигнальные белки Signaling proteins	Группы пациенток / Patient groups					
	I. 32 – 40 лет / years (n = 24)		II. 41 – 50 лет / 41 – 50 years (n = 36)		III. 41 – 64 года / 41 – 64 years n = 64	
	Контроль	I/R	Контроль	I/R	Контроль	I/R
Bax, mean*	112 ± 5	156 ± 4#	119 ± 4	171 ± 5#	128 ± 4	192 ± 4#
Bak, mean	105 ± 3	144 ± 3#	111 ± 5	159 ± 4#	119 ± 7	180 ± 6#
Bid, mean	39 ± 2	64 ± 5#	43 ± 5	76 ± 3#	49 ± 4	82 ± 4#
Bim, mean	66 ± 5	94 ± 6#	70 ± 5	109 ± 5#	75 ± 5	115 ± 7#
14-3-3, mean	143 ± 2	187 ± 4#	149 ± 6	203 ± 5#	155 ± 4	217 ± 6#
Каспаза-2 / Caspasa-2, mean	204 ± 6	267 ± 5#	209 ± 5	279 ± 5#	223 ± 7	294 ± 5#
Каспаза-9 / Caspasa-9, mean	221 ± 4	275 ± 4#	229 ± 4	288 ± 4#	237 ± 5	299 ± 6#

Примечание. *mean – интенсивность флуоресценции (в условных единицах),

$p < 0,05$ статистическая значимость по сравнению с контролем.

Note. *mean – fluorescence intensity (in conventional units),

$p < 0.05$ statistical significance compared to control.

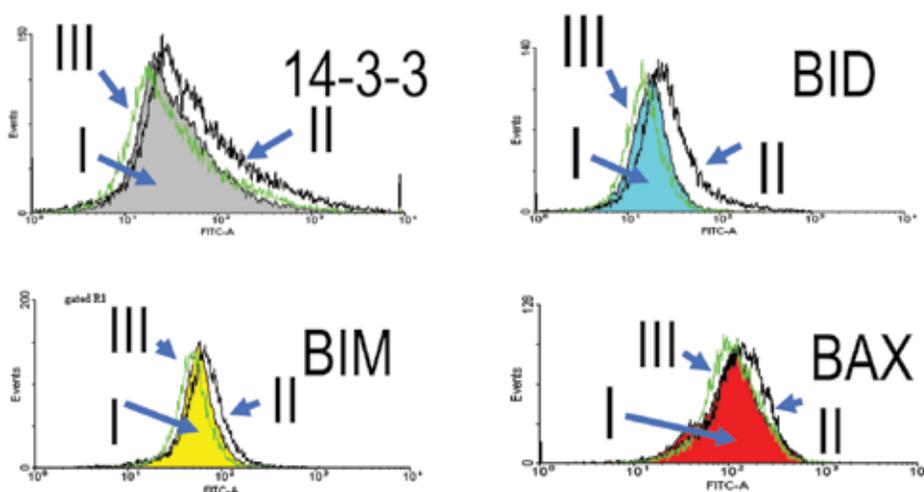
установлено значимое повышение показателей в клетках, подвергшихся ишемии, по сравнению с контролем ($p < 0,05$). При сравнении экспрессии сигнальных белков между группами разного возраста было показано, что для белков Bax и Bak не выявлено различий в контрольных группах разного возраста, но статистически значимо повышена экспрессия в группе старше 50 лет по сравнению с пациентками до 40 лет ($p < 0,05$) для клеток, подвергшихся I/R. Для белка Bim существенных различий не обнаружено, для Bid выявлены статистически значимые различия для клеток после I/R у лиц старше 50 лет по сравнению с пациентками до 40 лет ($p < 0,05$). Для суммарного пула белков 14-3-3 установлены значимые различия ($p < 0,05$) по экспрессии в группе пациенток старше 50 лет по сравнению с группой моложе 40 лет. Экспрессия каспазы-2 и каспазы-9 также статистически значимо ($p < 0,05$) была повышена у лиц старше 50 лет по сравнению с лицами моложе 40 лет в клетках после ишемии/реперфузии.

Некоторые гистограммы, соответствующие экспрессии сигнальных белков в лимфоцитах кожи приведены для примера на рисунке.

Заключение

В данной работе мы проанализировали уровни экспрессии белков Bad, Bak, Bax, Bim, Bid и его ук-

роченную форму tBid, а также суммарный пул белков 14-3-3 и каспазы-2 и -9 в клетках, выделенных из операционного материала при коррекции контуров лица. Контролем служили клетки, которые были изолированы из тканей в самом начале операции при отсутствии ишемии. За исключением белка Bad, все остальные сигнальные белки были существенно повышены в клетках после ишемии, связанной с нарушением кровотока во время операции. Это указывает на наличие эффекта ишемии/реперфузии и сопутствующем апоптозе в клетках, выделенных после завершения операции. Тип апоптоза установлен как митохондриальный, так как исследуемые белки проводят сигналы апоптоза, ассоциированные с митохондриями. При сравнении уровней экспрессии изучаемых белков в клетках, изолированных от пациентов разного возраста, установлено статистически значимое ($p < 0,05$) отличие для возрастной группы старше 50 лет по сравнению с группой пациенток моложе 40 лет. Это говорит о необходимости проведения дополнительных терапевтических вмешательств перед операцией лифтинга лица для коррекции митохондриальных нарушений и связанных с ними негативных последствий для клеток. Для этого можно использовать клеточные энергетика, что является предметом отдельной статьи.



Примеры гистограмм, отражающие экспрессию сигнальных белков апоптоза в гейте лимфоцитов у пациенток разных возрастных групп (данные проточной цитометрии).

Окрашенные пики (I) отражают уровень экспрессии соответствующего белка в клетках пациенток моложе 30 лет. (II) – экспрессия соответствующего белка у лиц в возрасте 30 – 40 лет. (III) – экспрессия соответствующего белка у лиц в возрасте старше 50 лет.

Examples of histograms showing the expression of apoptosis signaling proteins in the lymphocyte gate in patients of different age groups (flow cytometry data).

Stained peaks (I) reflect the expression level of the corresponding protein in the cells of patients younger than 30 years old. (II) – expression of the corresponding protein in individuals aged 30–40 years. (III) – expression of the corresponding protein in individuals aged over 50 years.

Выводы

1. Эффект ишемии/реперфузии и связанная с ним активация апоптоза регистрируется в клетках, выделенных из кожи и подкожно-жировой ткани по завершении операции лифтинга лица. Экспрессия сигнальных белков указывает на активацию митохондриального типа апоптоза в этих клетках.

2. Сравнение клеток, выделенных из операционного материала пациенток разных возрастных групп указывает на статистически значимое ($p < 0,05$) повышение уровней экспрессии сигнальных белков митохондриального типа апоптоза в клетках пациенток в возрасте старше 50 лет по сравнению с пациентками моложе 40 лет, что указывает на более тяжелые последствия ишемии/реперфузии для лиц старшего возраста при операции лифтинга лица.

Литература

(п.п. 1–13 см. References)

14. Абрамян Ш.М., Морозов С.Г. Определение уровня спонтанного и индуцированного апоптоза клеток, полученных из операционного материала при лифтинге лица. *Патогенез*. 2016; 14(4): 63-8.

15. Абрамян Ш.М., Блохин С.Н., Морозов С.Г. Роль лимфоцитов кожи и подкожно-жировой ткани в развитии осложнений после операции лифтинга лица. *Трансляционная медицина*. 2017; 4(S3): 6.

16. Абрамян Ш.М., Морозов С.Г. Изучение состояния сигнальных путей апоптоза в клетках при проведении пластических операций на лице. *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. 2017; 1: 70.

References

1. Li A., Zheng N., Ding X. Mitochondrial abnormalities: a hub in metabolic syndrome-related cardiac dysfunction caused by oxidative stress. *Heart Fail. Rev.* 2022; 27(4): 1387-94.

2. Dominic A., Le N., Takahashi M. Loop between NLRP3 inflammasome and reactive oxygen species. *Antioxid. Redox Signal.* 2022; 36(10-12): 84-796. doi: 10.1089/ars.2020.8257

3. Wang J., Liu H., Wu X., Shi C., Li W., Yuan Y., et al. Induction of apoptosis in SGC-7901 cells by iridium (III) complexes via endoplasmic reticulum stress-mitochondrial dysfunction pathway. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2022; 27(4-5): 455-69. doi: 10.1007/s00775-022-01943-6

4. Rosa N., Speelman-Rooms F., Parys J., Bultynck G. Modulation of Ca²⁺ signaling by antiapoptotic Bcl-2 versus Bcl-xL: From molecular mechanisms to relevance for cancer cell survival. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 2022; 1877(6): 188791. doi: 10.1016/j.bbcan.2022.188791

5. Morris D., Johnson S., Bleck C., Lee D., Tjandra N. Humanin selectively prevents the activation of pro-apoptotic protein BID by sequestering it into fibers. *J. Biol. Chem.* 2020; 295(52): 18226-38. doi: 10.1074/jbc.RA120.013023

6. Deng J., Gutiérrez L., Stoll G., Motiño O., Martins I., Núñez L., et al. Paradoxical implication of BAX/BAK in the persistence of tetraploid cells. *Cell Death Dis.* 2021; 12(11): 1039-45.

7. Emhemmed F., Azouaou S., Hassan S., Lefevbre R., Désaubry L., Muller C., et al. The synthetic flavagline FL3 spares normal human skin cells from its cytotoxic effect via an activation of Bad. *Toxicol In Vitro.* 2019; 60: 27-35. doi: 10.1016/j.tiv.2019.04.025

8. Heilig R., Dilucca M., Boucher D., Chen K., Hancz D., Demarco B., et al. Caspase-1 cleaves Bid to release mitochondrial SMAC and drive secondary necrosis in the absence of GSDMD. *Life Sci. Alliance.* 2020; 3(6): e202000735.

9. Simula L., Corrado M., Accordi B., Di Rita A., Nazio F., Antonucci Y., et al. JNK1 and ERK1/2 modulate lymphocyte homeostasis via BIM and DRP1 upon AICD induction. *Cell Death Differ.* 2020; 27(10): 2749-67.

10. Sluchanko N., Tugaeva K., Gushchin I., Remeeva A., Kovalev K., Cooley R. Crystal structure of human 14-3-3 ζ complexed with the noncanonical phosphopeptide from proapoptotic BAD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021; 583: 100-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.10.053

11. Chen S., Feng X., Chen X., Zhuang Z., Xiao J., Fu H., et al. 14-3-3 γ , a novel regulator of the large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2020; 319(1): F52-F62.

12. Huang R., Liu C., Fu R., Yan Y., Yang J., Wang X., et al. Downregulation of PLK4 expression induces apoptosis and G0/G1-phase cell cycle arrest in keloid fibroblasts. *Cell. Prolif.* 2022; 55(7): e13271.

13. Liu B., Chen L., Li S., Wang Z., Cheng W. Smac/DIABLO regulates the apoptosis of hypertrophic scar fibroblasts. *Int. J. Mol. Med.* 2013; 32(3): 615-22.

14. Abramyan Sh.M., Morozov S.G. Determination of the level of spontaneous and induced apoptosis of cells obtained from surgical material during face lifting. *Patogenez*. 2016; 14(4): 63-8.

15. Abramyan Sh.M., Blokhin S.N., Morozov S.G. The role of skin lymphocytes and subcutaneous adipose tissue in the development of complications after facial lifting surgery. *Translyatsionnaya meditsina*. 2017; (S3): 6.

16. Abramyan Sh.M., Morozov S.G. Study of the state of signaling pathways of apoptosis in cells during plastic surgery on the face. *Annaly plasticheskoy, rekonstruktivnoy i esteticheskoy khirurgii*. 2017; 1: 70.

Сведения об авторах:

Абрамян Шмавон Моисович, мл. науч. сотр. лаб. регуляции репаративных процессов ФГБНУ «НИИОПП»;
Кандалова Ольга Вадимовна, канд. мед. наук, доцент каф. кожных и венерических болезней ФГБУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова»;
Волкова Елена Николаевна, вед. науч. сотр. лаб. регуляции репаративных процессов ФГБНУ «НИИОПП»;
Найденков Николай Петрович, мл. науч. сотр. лаб. регуляции репаративных процессов ФГБНУ «НИИОПП»;
Морозов Сергей Георгиевич, доктор мед. наук, проф., член-корр. РАН, директор ФГБНУ «НИИОПП».

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092.9+616.36-089.87

Леонов С.Д.¹, Родин А.В.², Панченков Д.Н.³

Биоимпедансный анализ селезенки после обширной резекции печени в эксперименте

¹ФГБ «Научно-практический центр лазерной медицины им. О.К. Скобелкина» Федерального медико-биологического агентства, 121165, Москва, Россия, ул. Студенческая, д. 40;

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 214019, Смоленск, ул. Крупской, 28

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава Российской Федерации, 127473, Москва, Россия, ул. Делегатская, д. 20, стр.1

Введение. Пострезекционная печеночная недостаточность является наиболее серьезным осложнением обширных резекций печени. Одним из направлений поиска диагностических и прогностических критериев тяжести печеночной недостаточности может стать исследование влияния обширной резекции печени на морфофункциональное состояние селезенки.

Цель исследования – оценка показателей полного электрического сопротивления селезенки в условиях обширной резекции печени.

Методика. Исследование выполнено на 20 белых крысах Вистар массой 180–230 г. Обширную резекцию печени (ОРП) моделировали путем удаления 70% органа. До операции, непосредственно сразу после ОРП, а также на 3-и и 14-е сут после нее выполняли инвазивную биоимпедансометрию печени и селезенки. Селезенка подвергалась гистологическому исследованию.

Результаты. Сразу после обширной резекции печени показатели электрического импеданса печени и селезенки статистически значимо уменьшались на частоте 2 кГц по сравнению с исходными значениями. На 3-и сут после оперативного вмешательства электрический импеданс паренхимы печени на частоте измерения 2 кГц достигал максимальных за весь период наблюдения значений, при этом импеданс паренхимы селезенки не увеличивался по сравнению с показателем до проведения обширной резекции печени. На 14-е сут наблюдения электрический импеданс паренхимы печени статистически значимо снижался относительно значений, полученных на 3-сут, и соответствовал показателям до обширной резекции печени. Импеданс селезенки был статистически значимо меньше значений до операции. По данным гистологического исследования на 14-е сут после операции наблюдались признаки малокровия красной пульпы и обеднения белой пульпы.

Заключение. В условиях изменения внутриорганного кровотока сразу после проведения обширной резекции печени регистрировалось снижение значений импеданса селезенки. На 14-е сут после операции наблюдалось снижение показателей импеданса селезенки на фоне малокровия красной пульпы и обеднения белой пульпы, по данным гистологического исследования.

Ключевые слова: обширная резекция печени; морфофункциональный анализ селезенки; инвазивная биоимпедансометрия

Для цитирования: Леонов С.Д., Родин А.В., Панченков Д.Н. Биоимпедансный анализ селезенки после обширной резекции печени в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 115-121.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.115-121

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Леонов С.Д., Панченков Д.Н.; сбор и обработка материала – Леонов С.Д., Родин А.В.; подготовка иллюстративного материала – Леонов С.Д., Родин А.В.; статистическая обработка материала – Леонов С.Д., Родин А.В.; написание текста – Леонов С.Д., Родин А.В.; редактирование – Панченков Д.Н., Леонов С.Д. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Леонов Сергей Дмитриевич, e-mail: leonov-serg@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.04.2022

Принята к печати 27.10.2022

Оубликована 15.12.2022

Leonov S.D.¹, Rodin A.V.², Panchenkov D.N.³**Bioimpedance analysis of the spleen after experimental extended liver resection**¹Skobelkin Science and Practice Center for Laser Medicine of the Federal Biomedical Agency, Studencheskaya St. 40, Moscow, 121165, Russian Federation;²Smolensk State Medical University, Krupskoy St. 28, Smolensk, 214019, Russian Federation;³Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Delegatskaya St. 20, Bldg. 1, Moscow, 127473, Russian Federation

Background. Post-resection liver failure is considered the most serious complication of extended liver resections. One of possible directions in the search for diagnostic and prognostic criteria of liver failure severity is studying the effect of extended liver resection on morphology and function of the spleen.

Aim. To evaluate parameters of full electrical resistance of the spleen following extended liver resection.

Materials and methods. The study was performed on 20 Wistar rats weighing 180–230 g. Extended liver resection was modeled by removing 70% of the organ. Prior to the surgery, immediately after the surgery, and on postoperative days 3 and 14, invasive bioimpedancemetry of the liver and spleen was performed.

Results. Following extended liver resection, biophysical parameters of the liver and spleen parenchyma were characterized by a significant decrease in the impedance at a frequency of 2 kHz compared to normal background values obtained immediately after the removal of a part of the liver. On the 3rd day after surgery, the liver parenchyma impedance at a measurement frequency of 2 kHz reached a maximum for the entire observation period while the spleen parenchyma impedance did not increase compared to the respective values before extensive liver resection. On the 14th day of follow-up, the liver parenchyma impedance was significantly decreased compared to the values obtained on the 3rd day and corresponded to the preoperative values. The spleen impedance was significantly lower than the preoperative values. Histological study performed on the 14th postoperative day showed signs of depletion of the red and white pulp.

Conclusions. The decrease in the spleen impedance observed immediately after extended liver resection was associated with intensified parenchymal blood flow. The decrease in the spleen impedance observed on the 14th day was associated with depletion of the red and white pulp as shown by histological examination.

Keywords: extended liver resection; morpho-functional examination of the spleen; invasive bioimpedancemetry

For citation: Leonov S.D., Rodin A.V., Panchenkov D.N. Bioimpedance analysis of the spleen after experimental extended liver resection. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66 (4): 115-121. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.115-121

Author's contribution: concept and design of the study – Leonov S.D., Panchenkov D.N.; collection and processing of material – Leonov S.D., Rodin A.V.; preparation of illustrative material – Leonov S.D., Rodin A.V.; statistics – Leonov S.D., Rodin A.V.; writing the text – Leonov S.D., Rodin A.V.; editing – Panchenkov D.N., Leonov S.D. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Sergey D. Leonov, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher, «Federal State Budgetary Institution «Skobelkin Scientific and Practical Center for Laser Medicine FMBA»; 40 Studencheskaya Str., Moscow 121165, Russian Federation, e-mail: leonov-serg@yandex.ru

Financing. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:

Rodin A.V., <https://orcid.org/0000-0001-9046-7429>

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

Received 11.04.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

Обширная резекция печени (ОРП) является «золотым стандартом» в лечении пациентов с первичными или метастатическими опухолями печени, однако ее выполнение сопровождается риском развития печеночной недостаточности. При этом пострезекционная печеночная недостаточность считается наиболее

серьезным осложнением обширных резекций печени, которое формирует основную долю летальных исходов после операции [1, 2], поэтому в хирургической гепатологии крайне важна клиническая оценка функциональной активности оставшейся после резекции части печени [3, 4].

Изучение патогенетических аспектов развития печеночной недостаточности после ОРП – важнейшая

задача, решение которой позволит разработать новые методы инструментальной диагностики пострезекционных осложнений и расширит критерии для прогноза исхода оперативного вмешательства. Одним из направлений поиска диагностических и прогностических критериев тяжести печеночной недостаточности может стать исследование влияния ОРП на морфофункциональное состояние селезенки. Причем, потенциально перспективным методом морфофункциональной оценки селезенки является измерение полного электрического сопротивления органа, или биоимпедансометрия (БИМ), которая показала высокую диагностическую ценность при различных патологических процессах [5–7].

В исследовании G. Petrovai и соавторы показано, что у пациентов после гепатэктомии через 1 мес после оперативного вмешательства наблюдалась гипертрофия селезенки, степень выраженности которой напрямую зависела от объема резекции. Чем больше объем резекции печени, тем более выражена гипертрофия селезенки [8]. Эти данные подтверждает работа N. Hai Nam и соавторов, которые наблюдали гипертрофию селезенки через 3 года после обширной резекции печени [9].

Показано, что увеличение объема селезенки после 6 мес химиотерапии у пациентов с метастазами колоректального рака является независимым предиктором основных послеоперационных осложнений после обширной резекцией печени [10]. Все эти данные подтверждают влияние обширной резекции печени на состояние селезенки.

Цель исследования – оценка показателя полного электрического сопротивления селезенки в условиях обширной резекции печени.

Методика

Исследование выполнено на 20 крысах Вистар массой 180–230 г. возрастом от 6 до 12 месяцев. Животных содержали в условиях, соответствующих нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ». При выполнении экспериментов выполнялись требования национального руководства и руководства учреждения, где проводилась научно-исследовательская работа, по содержанию и использованию лабораторных животных, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Обширную резекцию печени осуществляли под эфирным наркозом. Производили срединную лапаротомию, извлекали правую долю печени и проводили биоимпедансометрию (БИМ) печени, затем в рану

выводили селезенку и также измеряли электрический импеданс биполярными электродами с ограничителем. Далее выполняли резекцию печени для чего последовательно перевязывали срединную и левую боковую доли печени с последующим отсечением.

После ОРП повторно измеряли импеданс правой доли печени и селезенки. Достигали гемостаза и ушивали послеоперационную рану. На 3-и и 14-е сут после операции производили релапаротомию с последующей БИМ паренхимы печени и селезенки. Селезенку подвергали гистологическому исследованию.

Импедансометрию производили инвазивным методом с помощью оригинального устройства для измерения электрического импеданса биологических тканей ВІМ-II (патент РФ 2366360, патент РФ 2318435). В случае нашего исследования, выбор инвазивной технологии связан с перспективой именно интраоперационного применения данного метода в хирургической гепатологии. Также инвазивную биоимпедансометрию можно проводить параллельно с тонкоигольной биопсией печени и селезенки до и после проведения оперативного вмешательства. Electroды вводили в ткань на всю толщину, так чтобы их активные части находились в паренхиме. Измерения осуществляли в 3 различных зонах на частотах 2 кГц и 20 кГц с последующим расчетом на каждой частоте средних значений импеданса. Также были рассчитаны коэффициенты дисперсии электрического импеданса (D), как отношение величины электрического импеданса, измеренного на низкой частоте (Zнч), к величине электрического импеданса, измеренного на высокой частоте (Zвч).

Для более наглядной иллюстрации изменений электрического импеданса паренхимы печени относительно показателей селезенки производили расчет печеночно-селезеночного индекса (ПСИ), который вычисляли, как отношение электрического импеданса паренхимы печени к электрическому импедансу паренхимы селезенки у одного и того же животного в соответствующий период наблюдения, в пределах одной частот. В настоящее время активно разрабатываются и внедряются в клиническую практику приборы, позволяющие неинвазивно определять, параметры электрического импеданса биологических тканей [11].

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью методов вариационной статистики, используя непараметрические критерии (критерии Манна-Уитни и Колмогорова-Смирнова). Для оценки статистической значимости использовалась общепринятая в медицине величина $p < 0,05$, при которой различия признавались значимыми.

Результаты и обсуждение

Электрический импеданс печени и селезенки представлен в **табл. 1**. Как видно из данных таблицы электрический импеданс селезенки перед ОРП статистически значимо не отличался от показателей интактной печени.

Сразу после обширной резекции печени исследуемый показатель в обоих органах статистически значимо уменьшался ($p < 0,05$) на частоте 2 кГц по сравнению с исходными значениями (**табл. 1**).

На 3-и сут после оперативного вмешательства электрический импеданс паренхимы печени на частоте измерения 2 кГц достигал максимальных значений за весь период наблюдения, при этом импеданс паренхимы селезенки не увеличивался по сравнению с показателем непосредственно после ОРП. Электрический импеданс паренхимы печени при этом был статистически значимо выше импеданса селезенки. Регистрация максимальных показателей электрического импеданса печени, вероятно, связана с развитием жировой дистрофии печени после ОРП [11].

На 14-е сут наблюдения электрический импеданс паренхимы печени статистически значимо снижался относительно значений на 3-и сут, и соответствовал показателям до ОРП. Импеданс селезенки был статистически значимо меньше значений до ОРП. На протяжении всего периода наблюдения показатели БИМ были максимально информативны на частоте 2 кГц (**табл. 1**).

При обширной резекции печени в процессе оперативного вмешательства производилось значительное удаление паренхимы, что возможно приводило к кратковременному изменению гемодинамики в бассейне чревного ствола в направлении усиления интенсивности кровотока. Этим можно объяснить уменьшение показателей электрического импеданса печени и селезенки в первые минуты после ОРП. При сравнении значений электрического импеданса печени и селезенки сразу после ОРП статистически значимых различий выявлено не было, что говорит об однотипных патофизиологических процессах в этих органах. Предположения об изменении гемодинамики косвенно подтверждает работа Mellert F. и соавт., где было экспериментально доказано снижение электрического импеданса при реперфузии ишемизированного органа [12]. А в работе Venugopal D. и соавт. четко показана зависимость электрического импеданса от артериального давления. Чем оно выше, тем ниже импеданс исследуемой ткани [13].

Показатели печеночно-селезеночного индекса в процессе наблюдения у экспериментальных животных на частоте 20 кГц находились в пределах единицы с небольшими статистически незначимыми отклонениями.

На частоте измерения электрического импеданса равной 2 кГц на 3-сут фиксировалось статистически значимое повышение медианы ПСИ до 1,32 связанное с увеличением абсолютных значений импеданса

Таблица 1/Table 1

Электрический импеданс паренхимы печени и селезенки у экспериментальных животных

Electrical impedance of liver parenchyma and spleen in experimental rats

Срок наблюдения / Observation period	n	Электрический импеданс, кОм, Ме (min; max) / Electrical impedance, kΩ, Me (min; max)			
		Печень / Liver		Селезенка / Spleen	
		2 кГц / 2 kHz	20 кГц / 20 kHz	2 кГц / 2 kHz	20 кГц / 20 kHz
До ОРП / Before ELR	14	2,48 (2,16; 3,30)	1,43 (1,13; 2,0)	2,42 (1,75; 2,82)	1,55 (1,29; 1,88)
Непосредственно после ОРП / Just after ELR	14	2,04* (1,22; 2,67)	1,36 (0,7; 1,78)	2,1* (1,79; 2,51)	1,42 (1,22; 1,78)
3-и сутки после ОРП / 3 days after ELR	12	2,88*^ (1,96; 3,84)	1,32 (1,21; 2,05)	2,12*^ (1,63; 2,61)	1,37 (1,1; 1,78)
14-е сутки после ОРП / 14 days after ELR	7	2,5 (1,81; 2,85)	1,3 (1,11; 1,76)	2,15* (1,94; 2,99)	1,41 (1,18; 1,78)

Примечание / Note. * – $p < 0,05$ по сравнению с показателями до ОРП в пределах одной частоты

* – $p < 0,05$ in comparison with indices before ELR on the same frequency

’ – $p < 0,05$ по сравнению с показателями непосредственно после ОРП в пределах одной частоты

’ – $p < 0,05$ in comparison with indices just after ELR on the same frequency

^ – $p < 0,05$ между показателями печени и селезенки в пределах одного срока наблюдения и частоты измерения

^ – $p < 0,05$ between impedance values of the liver and spleen on the same frequency and observation period

паренхимы печени крыс, относительно показателей полного электрического сопротивления ткани селезенки (табл. 2).

При анализе печеночного коэффициента дисперсии $D_{2\text{кГц}/20\text{кГц}}$ (табл. 3) наблюдалось статистически значимое его увеличение на 3-и сут эксперимента относительно показателей до резекции и непосредственно после резекции.

Величина коэффициента D зависит от строения и функционального состояния биологической ткани. Причем, чем он выше, тем интенсивнее обмен веществ в исследуемом органе [14]. По-видимому, повышение коэффициента дисперсии $D_{2\text{кГц}/20\text{кГц}}$ печени после ОРП на 3-и сут эксперимента связано с актив-

ным процессом ее внутриклеточной регенерации, что сопровождалось интенсивным обменом веществ и повышенной функциональной активностью гепатоцитов.

Коэффициент дисперсии $D_{2\text{кГц}/20\text{кГц}}$ селезенки статистически значимо не изменялся на всем протяжении эксперимента. Коэффициент дисперсии паренхимы печени при сравнении с показателями селезенки находился на более высоком уровне на 3-и сут наблюдения, что подтверждается общеизвестными данными о повышенной функциональной нагрузке печени по сравнению с селезенкой.

Морфологические изменения в селезенке были наиболее выражены на 14-е сут после ОРП. Во многих наблюдениях рисунок органа был стерт за счет обилия

Таблица 2/Table 2

Печеночно-селезеночный индекс электрического импеданса экспериментальных животных
Hepato-splenic electrical impedance index in experimental rats

Срок наблюдения / Observation period	n	Печеночно-селезеночный индекс, Ме (min; max) / Hepato-splenic electrical impedance index, Ме (min; max)	
		2 кГц / 2 kHz	20 кГц / 20 kHz
До ОРП / Before ELR	15	1,02 (0,81; 1,28)	0,95 (0,65; 1,4)
Непосредственно после ОРП / Just after ELR	13	1,01 (0,82; 1,2)	0,92 (0,8; 1,33)
3-и сутки после ОРП / 3 days after ELR	12	1,32* (1,11; 1,58)	1,06 (0,69; 1,45)
14-е сутки после ОРП / 14 days after ELR	7	1,17 (0,73; 1,38)	0,91 (0,77; 1,25)

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с данными до ОРП, непосредственно после ОРП и на 14 сутки в пределах одной частоты.

Note. * – $p < 0,05$ in comparison with indices before ELR, just after ELR and on the 14 day after ELR on the same frequency.

Таблица 3/Table 3

Таблица 3. Коэффициент дисперсии электрического импеданса печени и селезенки экспериментальных животных
Table 3. Dispersion coefficient of the electrical impedance of the liver and spleen of experimental rats

Срок наблюдения / Observation period	n	Коэффициент дисперсии электрического импеданса, Ме (min; max) / Dispersion coefficient of the electrical impedance, Ме (min; max)	
		Печень / Liver	Селезенка / Spleen
До ОРП / Before ELR	15	1,76 (1,42; 2,03)	1,52 (1,27; 1,89)
Непосредственно после ОРП / Just after ELR	13	1,5 (1,39; 1,81)	1,51 (1,13; 1,84)
3-и сутки после ОРП / 3 days after ELR	12	1,96* (1,58; 2,46)	1,54' (1,28; 1,78)
14 -е сутки после ОРП / 14 days after ELR	7	1,77 (1,62; 2,14)	1,54 (1,36; 1,82)

Примечание / Note. * – $p < 0,05$ по сравнению с показателями до и после ОРП в пределах одной частоты.

* – $p < 0,05$ in comparison with indices before and after ELR on the same frequency.

' – $p < 0,05$ между показателями печени и селезенки в пределах одного срока наблюдения.

' – $p < 0,05$ between impedance values of the liver and spleen on the same frequency and observation period.

гемопоэтических клеток, минимизации фракции эритроцитов в красной пульпе и скудности элементов белой пульпы. Синусы красной пульпы в основном были заполнены крупными макрофагами и клетками гранулоцитарного ряда. Эритроцитов, лимфоцитов и плазмочитов наблюдалось относительно мало.

В ряде наблюдений красная пульпа состояла из синусоидных капилляров с небольшим количеством эритроцитов и селезеночных тяжей (тяжей Бильбота) содержащих преимущественно макрофаги, лимфоциты, плазмочиты.

Белая пульпа в большинстве случаев была представлена единичными мелкими лимфоидными узелками, в которых практически отсутствовали светлые центры и были слабо выражены периартериальная, мантийная и маргинальные зоны. Периартериальные лимфатические влагаллища содержали небольшое количество лимфоцитов. В ряде наблюдений белая пульпа была относительно сохранна с часто расположенными лимфатическими узелками. В синусах и пульпарных тяжях красной пульпы преобладали макрофаги. Обращало на себя внимание заметное количество крупных многоядерных клеток типа мегакариоцитов и наличие синусового гистиоцитоза.

Заключение

В условиях моделирования экспериментальной обширной резекции печени показатели электрического импеданса селезенки были максимально информативны на частоте 2 кГц. Величина показателей биоимпедансометрии селезенки зависела от морфологической структуры и функции органа. В условиях изменения внутриорганного кровотока, что происходит сразу после проведения обширной резекции печени, регистрировалось снижение значений импеданса. На 14-е сут после операции сохранялись пониженные показатели импеданса на фоне малокровия красной пульпы и обеднения белой пульпы, по данным гистологического исследования. Инвазивный интраоперационный биоимпедансный анализ может найти свое дальнейшее применение при открытых и лапароскопических вмешательствах на печени, так как при этом можно обеспечить надежный гемостаз. Не стоит исключать и возможность применения инвазивной биоимпедансометрии в ходе тонкоигольной пункционной биопсии печени и селезенки.

Исследование электрического импеданса печени и селезенки в условии обширной резекции печени в перспективе может позволить разработать дополнительные прогностические критерии тяжести постре-

зекционной печеночной недостаточности и оценки функционального резерва печени.

Литература

1. Чжао А.В., Ботиралиев А.Ш., Степанова Ю.А., Вишневецкий В.А. Билиарные осложнения резекций печени (причины, факторы риска, профилактика, вопросы тактики). *Высокотехнологическая медицина*. 2021; 8(3): 14-24.
3. Мирасова Г.Х., Салимгареев И.З., Логинов М.О., Грицаенко А.И., Нартайлаков М.А. Методы профилактики печеночной недостаточности после обширных резекций печени. *Креативная хирургия и онкология*. 2021; 11(1): 10-4.
5. Панченков Д.Н., Леонов С.Д., Родин А.В. Биоимпедансный анализ в медицине. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2014; 58(2): 80-6.
6. Бухниев Ю.Ю., Леонов С.Д., Борсуков А.В., Баженов С.М., Баранов А.В. Оценка импеданса паренхимы почки при почечной недостаточности в эксперименте. *Нефрология*. 2011; 15(1): 54-57.
7. Готье С.В., Луцевич О.Э., Мойсюк Я.Г., Галлямов Э.А., Панченков Д.Н., Ефимкин А.С., Баранов А.В. Лапароскопическая мануально-ассистированная донорская нефрэктомия. Первый российский опыт. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2010; 12(1): 56-60.
11. Панченков Д.Н., Леонов С.Д., Алиханов Р.Б., Забозлаев Ф.Г., Иванов Ю.В., Агибалов Д.Ю. и др. Биоимпедансный анализ паренхимы печени при ее обширной резекции в эксперименте. *Анналы хирургической гепатологии*. 2014; 19(1): 55-9.
13. Тарусов Б.Н., Кольс О.Р. *Биофизика: учебное пособие*. М.; Высшая школа; 1968.

References

1. Chzhao A.V., Botiraliyev A.Sh., Stepanova Yu.A., Vishnevskiy V.A. Biliary complications of liver resections (causes, risk factors, prevention). *Vysokotekhnologicheskaya meditsina*. 2021; 8(3): 14-24. (in Russian)
2. Asahi Y., Kamiyama T., Kakisaka T., Orimo T., Shimada S., Nagatsu A. et al. Outcomes of reduction hepatectomy combined with post-operative multidisciplinary therapy for advanced hepatocellular carcinoma. *World J. Gastrointest. Surg*. 2021; 13(10): 1245-57.
3. Mirasova G.Kh., Salimgareev I.Z., Loginov M.O., Gritsaenko A.I., Nartaylakov M.A. Prevention of Liver Failure in Extended Hepatic Resection. *Kreativnaya khirurgiya i onkologiya*. 2021; 11(1): 10-4. (in Russian)
4. Liu Y., Chen Z.L., Yu X.X., Liang Y.J. Risk factors for hepatic insufficiency after major hepatectomy in non-cirrhotic patients. *Asian J. Surg*. 2021; 44(10): 1324-5.
5. Panchenkov D.N., Leonov S.D., Rodin A.V. Bioimpedance analysis in medicine. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2014; 58(2): 80-6. (in Russian)
6. Bukhniev Yu.Yu., Leonov S.D., Borsukov A.V., Bazhenov S.M., Baranov A.V. Estimation of an impedance of a kidney parenchyma at renal insufficiency in experiment. *Nefrologiya*. 2011; 15(1): 54-57. (in Russian)
7. Gautier S.V.1, Lutsevich O.E.2, Moysyuk Y.G.1, Gallyamov E.A.2, Panchenkov D.N.2, Efimkin A.S.1, Baranov A.V. Hand-assisted laparoscopic donor nephrectomy. The first Russian experience.

- Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov.* 2010; 12(1): 56-60. (in Russian)
8. Petrovai G., Truant S., Langlois C., Bouras A.F., Lemaire S., Buob D. et al. Mechanisms of splenic hypertrophy following hepatic resection. *HPB (Oxford)*. 2013; 15(12): 919-27.
 9. Hai Nam N., Taura K., Kimura Y., Uemoto Y., Yoshino K., Fukumitsu K. et al. Extent of liver resection is associated with incomplete liver restoration and splenomegaly a long period after liver resection. *Surgery*. 2020; 168(1): 40-8.
 10. Simpson A.L., Leal J.N., Pugalenti A., Allen P.J., DeMatteo R.P., Fong Y. et al. Chemotherapy-induced splenic volume increase is independently associated with major complications after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. *J. Am. Coll. Surg.* 2015; 220(3): 271-80.
 11. Panchenkov D.N., Leonov S.D., Alikhanov R.B., Zabozaev F.G., Ivanov Yu.V., Agibalov D.Yu. et al. Bio-Impedance Analysis of Liver Parenchyma after Major Liver Resection in Experimental Setting. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii*. 2014; 19(1): 55-9. (in Russian)
 12. Mellert F., Winkler K., Schneider C., Dudykevych T., Welz A., Osypka M. et al. Detection of (reversible) myocardial ischemic injury by means of electrical bioimpedance. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2011; 58(6): 1511-8.
 13. Venugopal D., Patterson R., Jhanjee R., McKnite S., Lurie K.G., Belalcazar A. et al. Subcutaneous bioimpedance recording: assessment of a method for hemodynamic monitoring by implanted devices. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2009; 20(1): 76-81.
 14. Tarusov B.N., Kols O.R. *Biophysics: textbook*. [Biofizika: uchebnoe posobie]. Moscow; Vysshaya shkola; 1968. (in Russian)

Сведения об авторах:

Леонов Сергей Дмитриевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. ФГБУ «НПЦ лазерной медицины им. О.К. Скобелкина» ФМБА России, e-mail: leonov-serg@yandex.ru;

Родин Антон Викторович, канд. мед. наук, доцент, каф. общей хирургии с курсом хирургии ФДПО, зав. Молодежным научно-исследовательским центром ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России;

Панченко Дмитрий Николаевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. хирургии и хирургических технологий ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России.

© Савилов П.Н., 2022

УДК 6616-005 2

Савилов П.Н.

Особенности кинетики мочевины в организме при хроническом воспалительном поражении печени

ТОГБУЗ «Тамбовская ЦРБ», 392524, Россия,

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

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»,

39400, Воронеж, ул. Студенческая, д. 1

Введение. Участие эндогенного антиоксиданта мочевины в регуляции многих физиологических процессов и биохимических реакций объясняет научный и практический интерес изучения её кинетики в больном организме, особенно при нарушении мочевиносинтетической функции печени. Цель работы – изучение кинетики мочевины в организме при хроническом воспалительном поражении печени.

Методика. Опыты выполнены на 96 белых крысах (самках) массой 180-220 г. Хроническое воспалительное поражение печени вызывали подкожным введением 50% раствора тетрахлорметана (CCl_4) на оливковом масле 0,1 мл/100 г массы тела, через день, 65 сут с двумя двухнедельными перерывами между 6-й и 7-й, 13-й и 14-й инъекциями. Исследования проводили в последние сутки введения гепатотоксина, на 3-и, 7-е и 14-е сут после его отмены. Объектами исследования служили: щитовидная железа, лёгкие, сердце, печень, желудок, двенадцатиперстная кишка, толстая кишка, селезёнка и почки а также биологические жидкости: кровь (аорта, *v. Femoralis*, *v. hepatica*, *v. porta*, *v. renalis*), желчь и моча. Содержание мочевины определяли диацетилмоноксимовым методом. В гомогенате и цитозольной фракции печени исследовали активность аргиназы по скорости образования мочевины.

Результаты. При хроническом CCl_4 -гепатите нарушается образование мочевины гепатоцитами в результате снижения активности в них аргиназы, которая не восстанавливается к 14-м сут после отмены CCl_4 . Это сопровождается снижением концентрации мочевины в поражённой печени, на фоне увеличения её содержания в протекающей через неё крови. Последнее связано с активацией «портальных», «лёгочных», «почечных» и «висцеральных» механизмов, направленных на увеличение концентрации мочевины в артериальной крови, крови *v. porta* и *v. renalis*. В результате содержание мочевины в артериальной крови животных с хроническим CCl_4 -гепатитом, несмотря на нарушение мочевиносинтетической функции гепатоцитов, превышает норму. Одновременно изменяется кинетика мочевины как в самом организме, так и в отдельных его органах.

Заключение. Стремление организма предотвратить снижение концентрации мочевины в крови при нарушении мочевиносинтетической функции печени, вызванной длительным действием CCl_4 , указывает на важную роль мочевины в саногенных реакциях, которые запускаются в организме при хроническом CCl_4 -гепатите.

Ключевые слова: мочевина; висцеральные органы; кругооборот в организме, гепатит; аргиназа гепатоцитов

Для цитирования: Савилов П.Н. Особенности кинетики мочевины в организме при хроническом воспалительном поражении печени. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 122-131.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.122-131

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 05.04.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Savilov P.N.

The kinetics of urea in the body in chronic inflammatory liver disease

Tambov Central Regional Hospital,

Polevaya St. 4, Pokrov-Prigorodnoe Village 392524, Tambov Region, Russian Federation;

Burdenko Voronezh State Medical University,

Studencheskaya St. 1, Voronezh, 39400, Russian Federation

The participation of the endogenous antioxidant, urea, in the regulation of many physiological processes and biochemical reactions explains the scientific and practical interest in studying its kinetics during illness, especially when the urea-producing function of the liver is disturbed. **The aim** of this work was to study the kinetics of urea in chronic inflammatory liver damage.

Methods. Experiments were performed on 96 white female rats weighing 180-220 g. Chronic inflammatory liver disease was induced by subcutaneous administration of a 50% CCl_4 solution in olive oil, 0.1 ml/100 g body weight, every other day, for 65 days with two two-week breaks between the 6th and 7th, 13th and 14th injections to reduce mortality. The material was collected for study on the 65th day (the last day) of CCl_4 administration and on the 3rd, 7th, and 14th days after stopping CCl_4 . The following materials were studied: tissues of visceral organs (thyroid gland, lungs, heart, liver, stomach, duodenum, colon, spleen, kidneys); biological fluids: blood (aorta and femoral, hepatic, portal, and renal veins), bile, and urine. The urea content was determined by the diacetyl monoxime method. The activity of arginase in the homogenate and the cytosolic fraction of the liver were evaluated by the urea formation rate.

Results. In chronic CCl_4 hepatitis, the formation of urea by hepatocytes was disrupted as a result of a decrease in their arginase activity, which did not recover by the 14th day after stopping CCl_4 withdrawal. This was accompanied by a decrease in the concentration of urea in the affected liver and an increase in its content in the blood flowing through the liver. This was due to the activation of portal, pulmonary, renal, and visceral mechanisms aimed at increasing the concentration of urea in arterial blood and in portal and renal venous blood. As a result, the urea content in the arterial blood of rats with chronic CCl_4 hepatitis was elevated, despite the disruption of the urea-synthetic function of hepatocytes. At the same time, the kinetics of urea changed in both the whole body and in individual organs.

Conclusion. The ability of the body to prevent a decrease in the concentration of blood urea during disruption of the urea-producing function of the liver, as caused by the prolonged action of CCl_4 , indicates the important role of urea in sanogenic reactions that are triggered during chronic CCl_4 -hepatitis.

Keywords: urea; education; visceral organs; circulation in the body; hepatitis; hepatocyte arginase

For citation: Savilov P.N. The kinetics of urea in the body in chronic inflammatory liver disease. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66 (4): 122-131. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.122-131

For correspondence: Pavel N. Savilov, Doctor of medical Sciences, Professor, anesthesiologist, Tambov Central District Hospital, 4 ul. Polevaya, v. P-Prigorodnoye, Tambov region, 393524, Russian Federation, e-mail: p_savilov@rambler.ru

Information about the author:

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

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Financing. The study had no sponsorship.

Received 05.04.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

Экспериментальными исследованиями установлено, что нарушение мочевиносинтетической функции гепатоцитов при резекции печени [1], вызывая снижение концентрации мочевины в крови печёночных вен, не приводит к аналогичным изменениям содержания метаболита в артериальной крови [2]. Это достигается, благодаря запуску ряда механизмов, направленных на компенсацию нарушения мочевиносинтетической функции гепатоцитов [3]. Однако возникает вопрос, являются ли выявленные изменения кинетики мочевины в оперированном организме специфическими, или они наблюдаются при других патологических состояниях, затрагивающих образование мочевины в печени. Интерес к этому продиктован полифункциональностью данного эндогенного метаболита, который является не только эндогенным антиоксидантом [4], но может выступать в роли регулятора активности ферментов [5], гепарина [6], а также стабилизато-

ра лизосомальных мембран в условиях патологии [7]. Всё это имеет важное значение при диффузном поражении печени, которое сопровождается истощением антиоксидантной системы гепатоцитов на фоне активации перекисного окисления липидов [8].

Цель исследования – изучение в эксперименте кинетики мочевины в организме при хроническом воспалительном поражении печени, вызванном длительным введением тетрахлорметана.

Методика

Исследования проводились в лаборатории кафедры нормальной физиологии (зав.- проф. В.Н. Яковлев) Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко на 96 беспородных белых крысах (самки) массой 180-220 г. Хронический гепатит воспроизводили по методике Д.С. Саркисова и Л.С. Рубецкого [9] подкожным введением 50% раствора тетрахлорметана (CCl_4) на оливковом масле (0,1 мл/100г массы тела). Инъекции в течение 65 сут

делали через сутки с двумя двухнедельными перерывами (для снижения летальности) между 6-й – 7-й и 13-й – 14-й инъекциями. Работа с экспериментальными животными проводилась в соответствии с регламентом декларации ЕС от 22 сентября 2010 г. об использовании лабораторных животных в научных целях. Исследование одобрено Этической комиссией Воронежского государственного медицинского университета. Выведение животных из опыта осуществляли декапитацией на фоне этиминалового наркоза (40 мг этиминала-натрия/кг массы тела).

Животные были разделены на 5 серий опытов. 1 серия – интактные животные (норма); 2 серия – животные, исследованные на 65-е (последние) сутки введения CCl_4 (конец затравки); 3-я, 4-я и 5-я серии – животные с хроническим CCl_4 -гепатитом, исследованные, соответственно, на 3-и, 7-е и 14-е сут отмены CCl_4 . Объектами исследования служили: щитовидная железа, лёгкие, сердце, левая и средняя доли печени, селезёнка, желудок, двенадцатиперстная кишка (ДПК), толстая кишка, почки, артериальная кровь (аорта), венозная кровь (*v. porta*, *v. hepatica*, *v. renalis*, *v. femoralis*), желчь и моча. Забор крови осуществляли у наркотизированных животных предварительно гепаринизированными инсулиновыми шприцами в следующей последовательности: *v. femoralis*- *v. hepatica*- *v. Porta* – *v. renalis*- *aorta*. Кровь *v. hepatica* получали из междолевого печёночного синуса по разработанной нами методике [10]. В дальнейшем рассчитывали артерио-венозную разницу по мочеvine между артериальной кровью и кровью бедренной вены (fABPm), печёночных вен (hABPm), кровью почечной вены (rABPm). Рассчитывали артерио-портальную разницу (АПРm) – между артериальной кровью и кровью *v. porta* и порто-венозную разницу (ПВРm) – между кровью *v. porta* и *v. hepatica*. После забора крови из сосудов производили перфузию органов охлаждённым 0,145M раствором KCl. Животных декапитировали под этиминаловым наркозом (40 мг этиминала-Na/кг массы). Отмытые от крови органы извлекали, замораживали в жидком азоте и растирали в порошок, который использовали для приготовления 10% гомогената в 60% растворе трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Гомогенат экстрагировали на холоду в течение 30 мин, центрифугировали при 900 g в течение 10 мин. Для получения мочи, животного помещали на 2-4 ч в клетку-пенал, а в пробирки, предназначенные для этой цели, предварительно вносили 0,1 мл 60% раствора ТХУ для подавления уреазной активности мочи. Пробу мочи для определения мочевины разводили в 100 раз, что учитывали при расчёте полученного показателя. Содержание свобод-

ной мочевины в крови, тканях, желчи и моче определяли диацетилмоноксидным методом [11] с использованием набора реактивов фирмы «ЛАХЕМА». В ткани содержание мочевины выражали в ммоль/кг сырой ткани, в биологических жидкостях (кровь, желчь, моча) – в ммоль/л. Для определения активности аргиназы в гепатоцитах (гомогенат и цитозольная фракция), проводилась ретроградная перфузия печени охлаждённым 0,145 M раствором KCl. Цитозольная фракция гепатоцитов выделялась методом дифференциального центрифугирования [12]. Активность аргиназы определяли по количеству отщепляющейся мочевины [13] и выражали в нмоль/мг белка/с. Содержание белка в гомогенате и цитозольной фракции определяли по методу Лоури [14].

Статистический анализ проводился с помощью персонального компьютера с использованием программ «Stastica 5.5» и «Microsoft Exel XP». Результаты обработаны статистически с учётом t-критерия Стьюдента и применением коэффициента Ньюмана–Кейлса для множественных сравнений [15]. Различия в сериях опытов считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Как видно из табл. 1, у здоровых крыс концентрация мочевины в крови *v. hepatica* превышала аналогичный показатель в крови артерии и *v. porta*, соответственно, на 25% и 58%. Поэтому величины hABPm и ПВРm становились отрицательными. Это указывает на инкрецию у здоровых крыс мочевины из печени в кровоток. В желчи холедоха (табл. 1) концентрация мочевины значимо не отличалась от аналогичного показателя в крови *v. porta*, но была значимо ниже, чем в артериальной крови и крови *v. hepatica*, соответственно, на 19% и 35%. Полученные результаты позволяют предположить, что в крови *v. hepatica* здоровых крыс пул мочевины, синтезированный гепатоцитами в цикле Кребса-Хенселяйта преобладает над пулом мочевины, поступившей к печени с артериальной и портальной кровью. При этом основным «поставщиком» мочевины в печень является портальная кровь, на что указывает значимая отрицательная корреляция ($r = -0,84$; $p < 0,05$), выявленная у здоровых крыс, между содержанием мочевины в желчи и стенке двенадцатиперстной кишки (ДПК), где обнаружена активность аргиназы [16]. Между тем, по сравнению с артериальной кровью, содержание мочевины в крови *v. porta* у здоровых крыс было снижено на 21% ($p < 0,05$). В результате АПРm имела положительную величину, указывая на секрецию «артериальной» мочевины в просвет желудочно-кишечного тракта.

Как видно из **табл. 1**, у здоровых животных содержание мочевины в артериальной крови на 23% превышало аналогичный показатель в крови *v. renalis*, делая положительной величину гАВРм. Концентрация мочевины в моче в 10 раз превышала аналогичный показатель в артериальной крови (**табл. 1**). У здоровых крыс выявлена положительная корреляция ($r=0,88$; $p<0,05$) между содержанием мочевины в артериальной крови и почечной ткани и отрицательная корреляция ($r=-0,82$; $p<0,05$) между содержанием мочевины в ткани почек и стенке ДПК. Последнее указывает на определённую связь мочевины выделительной функцией почек и образования мочевины в данном отделе тонкого кишечника. Статистически значимых различий между содержанием мочевины в артериальной крови и крови *v.femoralis* у здоровых животных не обнаружено (**табл. 1**).

Как видно из **табл. 2**, у здоровых крыс отсутствует значимое различие между концентрациями мочевины в ткани лёгких, сердца и исследуемыми долями печени; в стенке толстой кишки её содержание было

значимо ниже аналогичного показателя в стенках желудка и ДПК, соответственно, на 20% и 18%. Содержание мочевины в селезёнке, где обнаружена аргиназа [17], значимо не отличалось от аналогичного показателя исследуемых органов желудочно-кишечного тракта (**табл. 2**), но выявлена положительная корреляция ($r=0,82$; $p<0,05$) между её концентрациями в селезёнке и стенке толстой кишки. Минимальная концентрация мочевины обнаружена в ткани щитовидной железы, максимальная в почечной ткани (**табл. 2**).

Как показали исследования, на 65-е сутки развития хронического CCl_4 -гепатита (конец затравки) активность гАЗ в ЛДП и СДП снижалась, соответственно, на 34% и 37% (**рис. А**), а цАЗ, соответственно, на 37% и 58% (**рис. Б**); концентрация мочевины в ЛДП и СДП снижалась, соответственно, на 41% и 37% (**табл. 2**). Это указывает на торможение образования мочевины в гепатоцитах. Несмотря на это, содержание мочевины в крови *v. hepatica* превышало норму на 50% (**табл. 1**). Как показал анализ полученных результатов, это достигается следующими механизмами

Таблица 1/Table 1

Содержание мочевины (ммоль/л) в биологических жидкостях при хроническом CCl_4 -гепатите ($M \pm m$)
Urea content (mmol/l) in biological fluids in chronic CCl_4 -hepatitis ($M \pm m$)

Объект исследования The object of the study	Норма norm $n=10$	Конец затравки End of seed $n=10$	Сутки после отмены CCl_4 Days after cancellation of CCl_4		
			3-и $n=10$	7-е $n=10$	14-е $n=10$
Arterial blood	3,40 ± 0,12	7,11 ± 0,31*	6,17 ± 0,31*	4,17 ± 0,18**	5,40 ± 0,22**
Blood <i>v. hep.</i>	4,25 ± 0,30	6,38 ± 0,33*	5,63 ± 0,24*	3,81 ± 0,12*	5,31 ± 0,46*
Blood <i>v. porta</i>	2,70 ± 0,11	7,41 ± 0,39*	5,33 ± 0,44**	4,49 ± 0,19**	6,07 ± 0,31**
Blood <i>v. ren.</i>	2,63 ± 0,19	7,86 ± 0,35*	6,42 ± 0,23**	3,94 ± 0,11**	6,05 ± 0,19**
Blood <i>v. fem.</i>	3,51 ± 0,15	6,15 ± 0,21*	7,05 ± 0,19*	4,17 ± 0,18**	5,45 ± 0,22**
Bile	2,78 ± 0,10	5,19 ± 0,29*	4,16 ± 0,26**	3,82 ± 0,25**	3,39 ± 0,51*
Urine	28,6 ± 4,12	48,6 ± 4,38*	56,4 ± 5,4*	46,4 ± 3,18*	40,0 ± 3,15*
fАВРм	нд	0,96 ± 0,33	-0,82 ± 0,31	нд (nr)	нд (nr)
hАВРм	-0,83 ± 0,11	0,82 ± 0,11	нд (nr)	нд (nr)	нд (nr)
ПВРм	-1,22 ± 0,38	1,5 ± 0,25	нд (nr)	0,68 ± 0,09	1,21 ± 0,27
АПРм	0,74 ± 0,14	нд (nr)	нд (nr)	нд (nr)	-0,90 ± 0,09
гАВРм	0,77 ± 0,08	-0,75 ± 0,11	нд (nr)	нд (nr)	-1,32 ± 0,37

Примечание. * $p<0,05$ значимость различий по сравнению с нормой; ** $p<0,05$ – по сравнению с концом затравки. fАВРм, hАВРм и гАВРм – соответственно бедренная, печёночная и почечная артерио-венозные разницы по мочеине, ПВРм – порто-венозная разница по мочеине, АПРм – артерио-портальная разница по мочеине, нд – различия статистически не значимы, n – число животных по сериям опытов. **Note.** *($p<0,05$) significance of differences compared to the norm; **($p<0,05$) the reliability of differences compared to the end of the seed. fAVDm, hAVD and gAVRm- respectively femoral, hepatic and renal arterio-venous differences in urea, PVDm- porto-venous difference in urea, APDm – arterio-portal difference in urea, nr – differences are not statistically significant, the n – number of animals by series of experiments.

ми. Во-первых, за счёт увеличения поступления к печени «портальной» мочевины, на что указывает увеличение её концентрации в крови *v. porta* на 174%. Во-вторых, за счёт увеличения поступления к печени мочевины с артериальной кровью, где она превышала норму на 118% (табл. 2). В пользу этого говорят положительные корреляции между концентрацией мочевины в крови *v. hepatica* и аналогичным показателем в крови *v. porta* ($r=0,72$; $p<0,05$) и артериальной крови ($r=0,94$; $p<0,05$), обнаруженные на 65-е сут развития CCl_4 -гепатита.

В свою очередь, формирование в конце затравки положительных hABPm и ПВPm (табл. 1), указывает на ретенцию в поражённой печени мочевины, поступающей как с артериальной, так и портальной кровью. Однако, этого оказалось недостаточно для нормализации содержания мочевины в исследуемых долях печени на 65-е сут введения CCl_4 . На наш взгляд здесь несколько причин. Во-первых, нарушения печёночного кровотока [18], что создаёт условия для внутрипечёночного шунтирования крови. Во-вторых, переход мочевины из свободного в связанное с белками и липопротеидами состояние. Данный феномен является одним из механизмов адаптации клетки к действию повреждающего фактора [7]. В-тре-

тых, активацией на 65-е сут развития хронического CCl_4 -гепатита печёночно-кишечной циркуляции мочевины, за счёт сброса части «артериальной» мочевины в желчные капилляры. Не случайно, увеличение на 65-е сут введения CCl_4 концентрация мочевины в желчи на 87% по сравнению с нормой, сопровождалось снижением её на 30% по сравнению с кровью *v. porta* (табл. 1).

Увеличение содержания мочевины в артериальной крови на 65-е сут развития хронического CCl_4 -гепатита служило одной из причин увеличения её концентрации в стенках желудка, ДПК и толстой кишки, соответственно, 65%, 47% и 84% по сравнению с нормой (табл. 2). На это указывает, выявленная в конце затравки, положительная корреляция между концентрацией мочевины в артериальной крови и аналогичным показателем в стенках желудка ($r=0,91$; $p<0,05$) и толстой кишки ($r=0,72$; $p<0,05$). А положительная корреляция между содержанием мочевины в стенке ДПК с аналогичным показателем в стенках желудка ($r=0,94$; $p<0,05$) и толстой кишки ($r=0,79$; $p<0,05$), указывает на синхронность накопления мочевины в тканях этих органов в условиях её повышенного поступления к ним с артериальной кровью. С другой стороны, несоответствие прироста содержания мочевины в стенках

Таблица 2/Table 2

Содержание мочевины (ммоль/кг сырой ткани) в висцеральных органах при хроническом тетрахлорметановом гепатите ($M \pm m$)

Urea content (mmol/kg raw tissue) in visceral organs in chronic tetrachloromethane hepatitis ($M \pm m$)

Объект исследования The object of the study	Норма norm <i>n</i> =10	Конец затравки End of seed <i>n</i> =10	Сутки после отмены CCl_4 Days after cancellation CCl_4		
			3-и <i>n</i> =10	7-е <i>n</i> =10	14-е <i>n</i> =10
Thyroid gland	2,79 ± 0,15	4,01 ± 0,22*	4,65 ± 0,39*	5,40 ± 0,19**	5,46 ± 0,28**
Lungs	2,91 ± 0,20	5,72 ± 0,4*	5,47 ± 0,34*	6,34 ± 0,35*	6,07 ± 0,46*
Heart	3,47 ± 0,1	5,30 ± 0,31*	5,79 ± 0,46*	4,87 ± 0,15*	6,20 ± 0,48*
LLL (ЛДП)	4,83 ± 0,14	2,86 ± 0,14*	3,86 ± 0,21**	3,30 ± 0,18*	3,41 ± 0,19*
MLL (СДП)	4,64 ± 0,16	2,94 ± 0,14*	3,46 ± 0,29*	3,31 ± 0,23*	3,56 ± 0,22*
Stomach	3,7 ± 0,26	5,06 ± 0,23*	5,76 ± 0,34*	4,63 ± 0,18*	6,01 ± 0,43*
Duodenum	3,68 ± 0,19	5,42 ± 0,35*	5,94 ± 0,4*	5,13 ± 0,14*	6,58 ± 0,42*
The colon	3,03 ± 0,20	5,57 ± 0,35*	6,28 ± 0,51*	3,90 ± 0,16*	6,32 ± 0,42*
Spleen	3,31 ± 0,16	3,96 ± 0,23	5,19 ± 0,37**	2,95 ± 0,08	5,93 ± 0,51**
Kidney	14,2 ± 1,01	9,79 ± 0,59*	13,4 ± 0,47*	12,0 ± 0,36*	14,0 ± 1,36*

Примечание. ЛДП-левая доля печени, СДП – средняя доля печени, *($p<0,05$) значимость различий по сравнению с нормой; **($p<0,05$) – по сравнению с концом затравки, *n*- число животных по сериям опытов.

Note. LLL-the left lobe of the liver, MLL- the middle lobe of the liver, * $p<0.05$ the reliability of differences compared with the norm; ($p<0.05$) the reliability of differences compared with the end of the seed, *n* – number of animals by series of experiments.

желудка и толстой кишки по сравнению со стенкой ДПК, в конце затравки, позволяет говорить о последней как «главном» поставщике мочевины в портальный кровоток. Не случайно, на 65-е сут введения CCl_4 выявлена положительная ($r=0,79$; $p<0,05$) корреляция

между содержанием мочевины в стенке ДПК и в крови *v. hepatica*.

Повышение содержания мочевины в артериальной крови на 65-е сут развития хронического CCl_4 -гепатита (табл. 1) не вызывало значимого изменения её

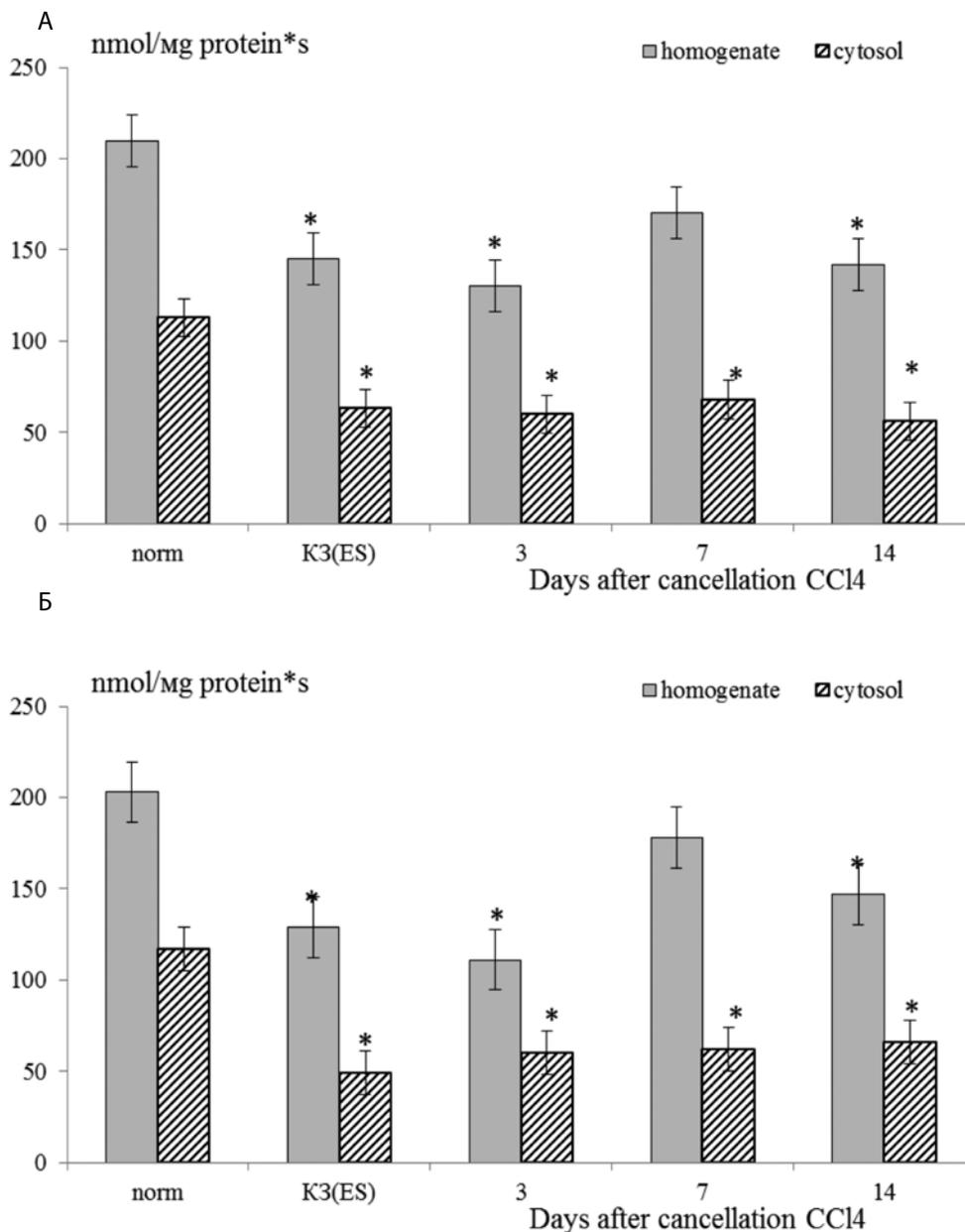


Рисунок. Активность аргиназы в гомогенате (гА3) и цитозольной (цА3) фракции гепатоцитов левой (А) и средней (Б) долей печени крыс при хроническом CCl_4 -гепатите. К3-конец затравки, * $p<0,05$ – значимость различий по сравнению с нормой. В скобках число животных по сериям опытов

Figure. Arginase activity in the homogenate (hAS) and cytosolic (cAS) fractions of hepatocytes of the left (A) and middle (B) lobes of the rat liver in chronic CCl_4 hepatitis. ES-end of seed, * $p<0.05$ – the reliability of differences compared to the norm. Number of animals by series of experiments in parentheses.

концентрации в селезёнке (**табл. 2**). Но при этом обнаружена положительная корреляция содержания мочевины в спленоцитах с аналогичным показателем в крови *v. porta* ($r=0,77$; $p<0,05$) и *v. hepatica* ($r=0,75$; $p<0,05$). Можно предположить, что в конце затравки CCl_4 поглощение спленоцитами мочевины из артериальной крови сопровождается повышенным образованием данного метаболита селезёночными макрофагами с дальнейшей его инкрецией в портальный кровоток. Тем более, установлена стимуляция их аргиназной активности при поражении печени [17]. Нельзя исключить, что данный процесс сопряжён с накоплением мочевины в стенке толстой кишки, на что может указывать положительная корреляция ($r=0,98$; $p<0,05$) между содержанием мочевины в этих органах, выявленная в данный период.

Обнаружение на 65-е сут развития хронического CCl_4 -гепатита положительной корреляции между содержанием мочевины в почечной ткани и аналогичным показателем в крови *v. hepatica* ($r=0,74$; $p<0,05$) и артериальной крови ($r=0,82$; $p<0,05$) сопровождалось снижением на 31% концентрации мочевины в почечной ткани (**табл. 2**) и увеличением на 198% концентрации мочевины в крови *v. renalis* с формированием отрицательной гАПРм (**табл. 1**). Причиной этого следует рассматривать гипоперфузию коркового слоя почек в результате вазоконстрикции приносящих артериол, которое имеет место при хроническом поражении печени. В результате происходит «сброс» части непрофильной артериальной крови через внутривенные артерио-венозные шунты в центральный кровоток [20]. В свою очередь, увеличение концентрации мочевины в протекающей через почки крови будет приводить к уменьшению, характерного для нормы, градиента мочевины между первичной мочой и почечным интерстицием. Как следствие, будет снижаться реабсорбция мочевины в почечных канальцах. Это объясняет, обнаруженное нами на 65-е сут развития хронического CCl_4 -гепатита повышение на 70% концентрации мочевины в моче. А появление в этот период положительной корреляции ($r=0,89$; $p<0,05$) между концентрациями мочевины в почках и в ткани желудка указывает на вовлечение последнего в механизмы регуляции кинетики мочевины в организме.

Как видно из **табл. 2**, на 65-е сут развития хронического CCl_4 -гепатита прирост концентрации мочевины в тканях щитовидной железы и сердца составил, соответственно, 45% и 53%, что было в 2 раза меньше аналогичных изменений в артериальной крови (**табл. 1**). Такое несоответствие может быть объяснено только переходом «артериальной» мочевины в указанных ор-

ганах в связанное (с белками и липопротеидами) состояние. Что касается лёгких, то к концу затравки прирост содержания мочевины в них составил 97% (**табл. 2**), тогда как в крови *v. hepatica* и *v. femoralis*, впадающих, как известно, в нижнюю полую вену, доставляющую кровь к лёгким, соответственно, 50% и 75% (**табл. 1**). Поскольку в лёгких обнаружена аргиназа [16], то можно предположить стимуляцию в этот период исследования образования мочевины лёгочными макрофагами с её дальнейшей инкрецией в кровоток и поступлением «лёгочной» мочевины в том числе и в тироциты. На это указывает положительная корреляция ($r=0,82$; $p<0,05$) между содержанием мочевины в лёгких и щитовидной железе, выявленная на 65-е сут развития CCl_4 -гепатита. В свою очередь, увеличение концентрации мочевины в артериальной крови на 65-е сут детерминировало её увеличение в крови *v. femoralis*, однако появление в этот период наблюдений положительной fABPm (**табл. 1**) указывает на частичную ретенцию «артериальной» мочевины в мышечной ткани.

Прекращение введения гепатотоксина не привело к нормализации как активности гАЗ и цАЗ в исследуемых долях печени (**рисунок**), так и содержания в них мочевины (**табл. 2**) к 14-м сут восстановительного периода. Это свидетельствует о стойком нарушении мочевиносинтетической функции гепатоцитов при хроническом CCl_4 -гепатите. В крови *v. hepatica* содержание мочевины значимо снижалось до нормы по сравнению с концом затравки только на 7-е сут, тогда как на 3-и и 14-е сут после отмены CCl_4 превышали норму, соответственно, на 32% и 25% (**табл. 1**). Между тем, содержание мочевины в артериальной крови на 3-и, 7-е и 14-е сут после отмены CCl_4 превышало норму, соответственно, на 81%, 23% и 59%, но при этом hABPm из положительной в конце затравки, становилась не значимой, оставаясь таковой в течение 14 сут после отмены CCl_4 (**табл. 1**). Сохранение на 3-и сут после отмены CCl_4 положительной корреляции ($r=0,81$; $p<0,05$) между содержанием мочевины в артериальной крови и крови *v. hepatica* указывает на значимую роль «артериальной» мочевины в стабилизации содержания мочевины в крови *v. hepatica* в ранние сроки после отмены гепатотоксина при сохранении нарушения мочевиносинтетической функции гепатоцитов. В крови *v. porta* содержание мочевины в указанные выше сроки превосходило норму, соответственно, на 97%, 66% и 124%, при этом ПВРм, не будучи значимой на 3-и сут, снова становилась положительной на 7-е, увеличиваясь на 14-е сут после отмены CCl_4 (**табл. 1**). Это указывает на усиление к этому сроку ретенции в печени мочевины, поступающей с кровью *v. porta* (**табл. 1**). Однако,

этого было недостаточно для нормализации содержания данного метаболита в исследуемых долях печени после отмены гепатотоксина (табл.2). Отмена CCl_4 приводила к снижению до нормы к 14-м сут восстановительного периода концентрации мочевины в желчи. Нельзя исключить, что снижение к этому сроку поступления желчи в желчные капилляры направлено на сохранение её повышенного содержания в оттекающей от печени крови на фоне сохранения нарушения мочевиносинтетической функции гепатоцитов.

Как видно из табл. 1, отмена гепатотоксина приводила к формированию на 14-е сут после отмены CCl_4 отрицательной АПРм, которая сопровождалась появлением положительной корреляции между концентрацией мочевины в артериальной крови и крови *v. porta* ($r=0,83$; $p<0,05$). По сравнению с нормой, на 3-и, 7-е и 14-е сут после отмены CCl_4 концентрация мочевины оставалась повышенной в желудке, соответственно, на 56%, 25% и 62%; в ДПК – соответственно, на 61%, 39% 79% (табл. 2). На 3-и и 14-е сут после отмены CCl_4 концентрация мочевины превышала норму в стенке толстой кишки, соответственно, на 107% и 109%; в селезёнке, соответственно, на 56% и 79% (табл. 2). При этом на 7-е сут исследования появлялась положительная корреляция между содержанием мочевины в стенке желудка и аналогичным показателем в артериальной крови ($r=0,87$; $p<0,05$) и крови *v. porta* ($r=0,79$; $p<0,05$). Последняя сохранялась к 14-м сут после отмены CCl_4 ($r=0,85$; $p<0,05$), когда появлялась положительная корреляция между содержанием мочевины в стенке ДПК и стенке желудка ($r=0,79$; $p<0,05$). На 7-е сут после отмены CCl_4 выявлена положительная корреляция между содержанием мочевины в стенке толстой кишки и желчи ($r=0,85$; $p<0,05$). На 14-е сут восстанавливалась характерная для нормы положительная корреляция между содержанием мочевины в стенке толстой кишки и селезёнке ($r=0,81$; $p<0,05$) и появлялась положительная корреляция между содержанием мочевины в артериальной крови и ткани селезёнки ($r=0,78$; $p<0,05$).

Анализ полученных, результатов позволяет говорить о том, что после отмены гепатотоксина одним из «поставщиков» мочевины в портальный кровоток является толстый кишечник, вероятно за счёт снижения поступления в его просвет «артериальной» мочевины. При этом сохраняется повышенное образование мочевины в стенке тонкого кишечника, где обнаружен полный набор ферментов орнитинового цикла [19], с инкрецией в портальный кровоток. Неслучайно, после отмены CCl_4 , имеет место несоответствие прироста содержания мочевины в стенке ДПК с ана-

логичными изменения её концентрации в стенках желудка, толстой кишки (табл. 2) и в артериальной крови (табл. 1). Несоответствие прироста содержания мочевины в ткани селезёнки по сравнению с артериальной кровью на 14-е сут после отмены токсина указывает на вовлечение данного органа в насыщение крови воротной вены мочевиной.

Как видно из табл. 2, на 3-и, 7-е и 14-е сут после отмены CCl_4 , содержание мочевины превышало норму в лёгких соответственно, 89%, 119% и 109%; в сердечной мышце, соответственно, на 55%, 40% и 77% (табл. 2). Сопоставление указанных показателей с динамикой прироста содержания мочевины в артериальной крови после отмены токсина (табл. 1) позволяет говорить о сохранении повышенного образования мочевины в лёгких и сердце в течение 14 сут после отмены гепатотоксина. На это, в частности, указывает положительная корреляция ($r=0,85$; $p<0,05$) между содержанием мочевины в лёгочной ткани и артериальной крови, выявленная на 14-е сут восстановительного периода.

Как видно из табл. 2, содержание мочевины в ткани щитовидной железы превышало норму на 3-и, 7-е и 14-е сут после отмены CCl_4 , соответственно, на 67%, 94% и 96%; (табл. 2). При этом сопоставление прироста содержания мочевины в ткани щитовидной железы и артериальной крови, позволяет говорить о накоплении «артериальной» мочевины тироцитами на 7-е и 14-е сут восстановительного периода. В свою очередь, отрицательные корреляции между содержанием мочевины в щитовидной железе с аналогичным показателем в почечной ткани ($r=-0,90$; $p<0,05$) и в крови *v. hepatica* ($r=-0,94$; $p<0,05$), выявленные на 7-е сутки после отмены CCl_4 позволяют говорить о формировании определённой связи накопления мочевины тироцитами в указанный период наблюдений с её поступлением в кровь из печени и почек больных животных.

Прекращение воздействия гепатотоксина на крыс нормализовало концентрацию мочевины в почечной ткани, которая не изменялась к 14-м сут восстановительного периода (табл. 2). Между тем, в крови *v. renalis* она значительно снижалась относительно конца затравки, но оставалась выше нормы на 3-и, 7-е и 14-е сут после отмены CCl_4 , соответственно, на 144%, 50% и 130% (табл. 1). В результате гАВРм на 3-и и 7-е сут была статистически не значимой, а на 14-е сутки после отмены CCl_4 снова становилась отрицательной величиной (табл. 1). При этом на 3-и сут восстанавливалась, характерная для нормы, положительная корреляция между содержанием мочевины в артериальной крови и крови *v. renalis* ($r=0,83$; $p<0,05$), на 7-е сут после отмены

ССI₄ появлялись отрицательная корреляционная зависимость между содержанием мочевины в крови *v.renalis* и в ткани толстой кишки ($r=-0,82$; $p<0,05$), а также положительная корреляция между содержанием мочевины в крови *v. renalis* и *v. hepatica* ($r=0,81$; $p<0,05$), которая сохранялась ($r=0,75$; $p<0,05$) на 14-е сут восстановительного периода. В этот срок выявлена положительная корреляция между содержанием мочевины в почечной ткани и стенке толстой кишки ($r=0,93$; $p<0,05$) и между содержанием мочевины в крови *v.renalis* и желчи ($r=0,90$; $p<0,05$). В моче содержание мочевины, существенно не отличаясь от конца затравки, превышало норму на 3-и, 7-е и 14-е сут после отмены ССI₄ соответственно, на 97%, 62% и 40% (табл. 1). Сопоставление полученных результатов показывает, что прекращение ведения ССI₄, приводит к постепенному снижению повышенной экскреции мочевины с мочой. Однако полной нормализации не происходит. Во-первых, из-за повышенного поступления мочевины с артериальной кровью (табл. 1). Во-вторых, увеличения секреции в почечные каналцы мочевины, образованной в их клетках при участии почечной аргиназы [16]. На это указывает несоответствие динамики прироста содержания мочевины в протекающей через почки крови, её содержанию в почечной ткани и моче. При этом следует признать и сохранение к 14-м сут восстановительного периода внутривисцерального шунтирования артериальной крови, наблюдаемого при хронических гепатитах [20], что создает условия для формирования отрицательной fABP на 14-е сут после отмены ССI₄.

Как видно из табл. 1, на 3-и, 7-е и 14-е сут после отмены ССI₄ концентрация мочевины крови *v.femoralis* превышала норму, соответственно, на 97%, 20% и 55%. При этом на 3-и сут после отмены ССI₄ ретенция «артериальной» мочевины в мышечной ткани, обнаруженная в конце затравки, сменялась повышенной инкрецией мочевины из неё обратно в кровоток, что приводило к формированию отрицательной fABP (табл. 1). К 7-м сут восстановительного периода данный процесс прекращался и fABP становилась недостоверной, как в норме (табл. 1).

Таким образом, стойкое нарушение образования мочевины в гепатоцитах при хроническом воспалительном поражении печени не приводит к развитию дефицита мочевины в крови. Наоборот её концентрация возрастает и сохраняется повышенной на протяжении 14 сут восстановительного периода. В основе данного биологического феномена лежит активация внепечёночных механизмов, направленных на компенсацию нарушения образования мочевины в гепатоцитах. Условно их можно разделить на «портальные»,

«лёгочные», «почечные» и «висцеральные». Портальные механизмы компенсации связаны с увеличением содержания мочевины в крови воротной вены, которое достигается избирательным снижением секреции «артериальной» мочевины в просвет органов желудочно-кишечного тракта, увеличением образования мочевины в стенке тонкого кишечника с дальнейшей инкрецией в порталный кровоток, а также активацией печёочно-кишечного кругооборота мочевины. Лёгочные механизмы компенсации заключаются в активации образования мочевины в лёгочной ткани с дальнейшей её инкрецией в оттекающую от лёгких кровь. Почечные механизмы компенсации характеризуются увеличением содержания мочевины в оттекающей от почек крови, которое может достигаться как увеличением реабсорбции мочевины в почках, так и инкрецией в кровоток мочевины, образованной клетками почечных канальцев. При этом повышенное выделение мочевины с мочой сохраняется. Висцеральные механизмы компенсации обусловлены избирательными изменениями проницаемости для мочевины гистогематического барьера органов и тканей. При этом возможны как ретенционная задержка мочевины в ткани, так и изменение её диффузии в клетки из крови, равно как переход из свободного в связанное состояние и наоборот.

Стремление организма предотвратить снижение концентрации мочевины в крови при нарушении мочевиносинтетической функции печени, вызванной длительным действием ССI₄, указывает на важную роль мочевины в саногенных реакциях, которые запускаются в организме при хроническом ССI₄-гепатите.

Литература

(п.п. 5; 11; 12; 14 см. References)

1. Савилов П.Н. Образование мочевины в оперированной печени *Биомедицинская химия* 2016; 62(1): 79-81.
2. Савилов П.Н., Метаболизм азота при резекции печени и гипербарической оксигенации (экспериментальное исследование). *Общая реаниматология*. 2007; 3(1): 37-41.
3. Савилов П.Н., Молчанов Д.В. Влияние гипербарической оксигенации на кругооборот мочевины в организме при частичной гепатэктомии в эксперименте. *Общая реаниматология*. 2018; 14(4): 52-63.
4. Кричевская А.А., Лукаш А.И., Внуков В.В., Дудкин С.И. Железосодержащие белки плазмы крови и протеолитическая активность в сыворотки крови при гипербарической оксигенации и защитном действии мочевины. *Биологические науки*. 1986; 9: 30-6.
5. Кудряшев Б.А., Ляпин Л.А. Комплекс гепарин-мочевина и его физико-химические свойства. *Вопросы медицинской химии*. 1975; 21(2): 165-8.

7. Гершенович З.С., Кричевская А.А., Лукаш А.И. *Мочевина в живых организмах*. Ростов н/Д; Изд-во РГУ, 1970.
8. Мышкин В.А., Еникеев Д.А. Габдрахманова Г.Д., Срубиллин Д.В., Гимадиева А.Р., Репина Э.Ф. Влияние комплексных соединений метилпроизводных 5-гидроксипуридина с янтарной кислотой на антиоксидантную систему и морфофункциональное состояние печени белых крыс при воздействии тетрахлорметана. *Патогенез*. 2017; 15(2): 52-6.
9. Саркисов Д.С., Рубецкой Л.С. *Пути восстановления цирротически изменённой печени*. М.; Медицина, 1965.
10. Савилов П.Н., Кузьмина Н.И., Дьячкова С.Я. Материалы по изучению антимикробной функции печени здорового организма. *Вестник ВГУ. Проблемы химии, биологии*. 2002; 1: 41-3.
13. Трапезникова С.С., Навасардянк А.Г., Давтян М.А. Множественные формы аргиназы печени крысы. *Биохимия*. 1982; 47(12): 2022 -7.
15. Гланц С.А. *Медико-биологическая статистика* (пер. с англ.). М.; Практика, 1999.
16. Мансурова И.Д., Калетина Л.Г. Энзимогрaмма сыворотки крови и распределение ферментов в структурах гепатоцита. В кн. *Успехи гепатологии*. Ред. Е.М. Тареев, А.Ф. Блюгер. Рига; 1971; 3: 80-90.
17. Чернышёва М.Д., Малыгин А.М., Фель В.Я. Индукция аргиназной активности в спленоцитах мышей СЗНА после частичной гепатэктомии. *Цитология* 1985; 27(2): 209-12.
18. Савилов П.Н. Кровоток и напряжение кислорода в печени при различных способах её повреждения и гипероксии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 2020; 64(2): 54-62.
19. Косенко Е.А., Каминский Ю.Г. Клеточные механизмы токсичности аммиака М.: Издательство ЛКИ, 2008
20. Молчанов Д.В. *Почки при гипероксии*. М.: БИНОМ, 2015.
5. Yancey P.H., Somero G.H. Methylamine osmoregulatory solutes of elas-mofranch fishes counteract urea inhibition of enzymes *J. Experimental Zoology*. 1980; 213(2): 205- 13.
6. Kudryashev B.A., Lyapin L.A. Heparin-urea complex and its physico-chemical properties. *Voprosy meditsinskoj khimii*. 1975; 21(2): 165-8. (in Russian)
7. Gershenovich Z.S., Krichevskaya A.A., Lukash A.I. *Urea in living organisms [Mochevina v zhivyykh organizmakh]*. Rostov-na-Donu; Publishing House RSU, 1970. (in Russian)
8. Myshkin V.A., Enikeev D.A. Gabdrakhmanova G.D., Srubilin D.V., Gimadiev A.R., Repina E.F. The effect of complex compounds of methyl derivatives of 5-hydroxyuracil with succinic acid on the antioxidant system and morphofunctional state of the liver of white rats exposed to tetrachloromethane. *Patogenez*. 2017; 15(2): 52-6. (in Russian)
9. Sarkisov D. S., Rubecokoy L.S. *Ways to restore cirrhotic altered liver [Puti vosstanovleniya tsirroticheski izmenyonnoy pecheni]*. Moscow; Meditsina,1965. (in Russian)
10. Savilov P.N., Kuzmina N.I., Dyachkova S.Ya. Materials on the study of antimicrobial liver function of a healthy organism *Vestnik Voronezskogo gosudarstvennogo universiteta. Problemy khimii, biologii*. 2002; 1: 41-3. (in Russian)
11. Richterrich D. *Clinical. Chemistry*. N.Y.: Academia Press, 1962.
12. Jonson D., Lardy. I. Method in Enzimology N.Y. 1967; 10: 94 -102.
13. Trapeznikova S. S., Navasardiyants A. G., Davtyan M. A. The Multiple forms of arginase of rat liver. *Biokhimiya* 1982; 47(12): 2022–7. (in Russian)
14. Hartree E.F. Determination of protein a modification of the Lowry method that gives a linear photometric responds. *Anal. Biochemistry*. 1972; 43(2): 422-7.
15. Glantz St. A. Primer of Biostatistics N.Y.: McGraw-Hill Inc,1994.
16. Mansurova I. D., Kaletina L. G Anisogramma serum and the distribution of enzymes in the structures of the hepatocytes. *The Success of Hepatology [Uspekhi gepatologi]*. (ed E.M., Tareev, A.F. Blyuger). Riga,1971; 3: 80-90. (in Russian)
17. Chernysheva M.D., Malygin A.M., Fel V.Ya. Induction of arginase activity in splenocytes of c3na mice after partial hepatectomy. *Tsitologiya*. 1985; 27(2): 209-12. (in Russian)
18. Savilov P.N. Blood flow and oxygen tension in the liver with various methods of its damage and hyperoxia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2020; 64(2): 54-62. (in Russian)
19. Kosenko E.A., Kaminsky Yu.G. *Cellular mechanisms of ammonia toxicity [Kletochnye mekhanizmy toksichnosti ammiaka]*. Moscow; LKI Publishing house, 2007. (in Russian)
20. Molchanov D.V. *Kidneys in hyperoxia [Pochki pri giperoksii]*. Moscow; BINOM, 2015. (in Russian)

References

1. Savilov P.N. Urea formation by postoperative Liver. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2016; 62(1): 79-81. (in Russian)
2. Savilov P.N. Nitrogen metabolism in liver resection and hyperbaric oxygenation (experimental study). *Obshchaya reanimatologiya*. 2007; 3(1): 37-41. (in Russian)
3. Savilov P.N., Molchanov D.V. The effect of hyperbaric oxygenation on the urea circulation in the body during partial hepatectomy in the experiment. *Obshchaya reanimatologiya*. 2018; 14(4): 52-63. (in Russian)
4. Krichevskaya. A.A., Lukash. A.I., Vnukov V.V., Dudkin S. And Iron-containing plasma proteins and proteolytic activity in blood serum with hyperbaric oxygenation and the protective effect of urea. *Biologicheskije nauki*. 1986; 9: 30-6. (in Russian)

Сведения об авторе:

Савилов Павел Николаевич, доктор мед. наук, проф., врач анестезиолог-реаниматолог ТОГБУЗ «Тамбовская ЦРБ».

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Посвящается памяти проф. М.И. Титова и Ж.Д. Беспаловой

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616.127-005.8+612.42:543.645.6

Засеева А.М., Хугаева В.К., Ардасенов А.В.

Влияние лимфостимулирующего пептида на динамику летальности при экспериментальном инфаркте миокарда

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

Актуальность проблемы определяется сохранением высокой смертности и инвалидизации населения страны и за рубежом от сердечно-сосудистых заболеваний, среди которых инфаркт миокарда (ИМ) занимает первое место.

Цель – оценка влияния лимфостимулирующего пептида на динамику летальности при экспериментальном инфаркте миокарда.

Методика. Экспериментально изучали роль в патогенезе ИМ активации лимфотока в микрососудах с помощью лимфостимуляторов прямого действия пептидной природы. Эксперименты выполнены на 44 белых беспородных крысах самцах, наркотизированных внутримышечным введением 8% раствора хлоралгидрата (0,6 г/кг массы). Моделировали ИМ методом Селье в модификации Когана. Опиоидный пептид (структурная формула Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Glu) вводили животным внутрибрюшинно за 15 мин до и через 15 мин после моделирования ИМ. Лимфостимулирующую активность пептида изучали на кровеносных и лимфатических микрососудах брыжейки тонкой кишки крысы. В работе использовали фотосъемку, осуществляли морфологическое исследование макро- и микропрепаратов сердца.

Результаты. Использование лимфостимулирующего пептида с лечебной целью снижало летальность животных на 18% по сравнению с контролем.

Заключение. Положительный лечебный эффект пептида Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Glu на выживаемость животных при ИМ позволяет рассматривать лимфатическую систему как резерв нашего организма, направленный на восстановление кровообращения.

Ключевые слова: инфаркт миокарда; лимфостимуляция; опиоидный пептид; летальность; крысы

Для цитирования: Засеева А.М., Хугаева В.К., Ардасенов А.В. Влияние лимфостимулирующего пептида на динамику летальности при экспериментальном инфаркте миокарда. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 132-137.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.132-137

Участие авторов: Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все со-авторы.

Для корреспонденции: Засеева Алана Моисеевна, e-mail: alzasmoy@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Поступила 29.07.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Zaseeva A.M., Khugaeva V.K., Ardasenov A.V.

The effect of lymphostimulating peptide on the dynamics of mortality in experimental myocardial infarction

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

The relevance of this issue is determined by steadily high mortality and disability of the population in Russia and worldwide due to cardiovascular diseases, among which myocardial infarction (MI) is on the first place among the causes of death. **Aim.** To evaluate the effect of direct-action peptide-type lymph-stimulators on the mortality from MI.

Methods. The study was performed on 44 mongrel white male rats anesthetized with 8% chloral hydrate, i.v. MI was modeled by the Selye method in the Kogan modification. The opioid peptide was administered to animals intraperitoneally 15 minutes before and 15 minutes after the simulation. The lymph-stimulating activity of the peptide was studied on mesenteric blood and lymphatic microvessels of the rat small intestine. Morphological examination of macro- and micro-preparations of the heart was performed. **Results.** The therapeutic use of the lymph-stimulating peptide reduced the mortality of animals by 18% compared with the control. **Conclusion.** The beneficial effect of the peptide Tyr-D-Ala-eeeGly-Phe-Leu-Glu on the MI mortality suggests that the lymph system can be considered as a reserve designed for the recovery of circulation.

Keywords: myocardial infarction; lymph-stimulation; opioid peptide; lethality; rats

For citation: Zaseeva A.M., Khugaeva V.K., Ardasenov A.V. The effect of lymphostimulating peptide on the dynamics of mortality in experimental myocardial infarction. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66 (4): 132-137. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.132-137

Author's contribution: Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Alana M. Zaseeva, Junior Researcher, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; 8 Baltiyskaya str., 125315, Moscow, Russian Federation, e-mail: alzasmoy@mail.ru

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 29.07.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

Актуальность проблемы определяется сохранением высокой смертности и инвалидизации населения страны и за рубежом от сердечно-сосудистых заболеваний (1-е место в ряду других причин смертности), среди которых инфаркт миокарда занимает первое место. Несмотря на многочисленные лекарственные препараты, применяемые при ИМ, самой высокой эффективностью остается хирургическое лечение (аортокоронарное шунтирование, транслюминальная баллонная ангиопластика и др. методы).

После открытия в 1975 г первых опиоидных пептидов (энкефалины) в мозге млекопитающих [1, 2] и человека было обнаружено лимфостимулирующее действие лейэнкефалина на лимфатические микрососуды (ЛМ) брыжейки тонкой кишки крысы [3]. В дальнейшем было доказано наличие опиоидергической регуляции лимфатической микроциркуляции [4] и появилась возможность использования регуляции активности ЛМ в эксперименте. Лейэнкефалин и его тирозинсодержащие аналоги, агонисты дельта-опиатных рецепторов (ОР) активировали сократительную активность стенки и клапанов ЛМ, увеличивали скорость лимфотока на 300%, а универсальный блокатор ОР – налоксон блокировал последующий лимфостимулирующий эффект лейэнкефалина. В дальнейшем

была показана высокая эффективность стимуляции лимфотока при различных видах патологии, сопровождающихся ишемией, воспалением¹, при ультрафиолетовом воспалении кожи [5]), острым отеке легких [6], а также при операциях на кишечнике [7]. Во всех случаях активация лимфотока и сократительной активности (СА) стенки и клапанов ЛМ сопровождалась восстановлением микрогемодикуляции, морфо-функционального состояния тканей, увеличением или 100% выживаемостью животных.

Поскольку сердце имеет 3 густые сети лимфатических сосудов: снаружи – под эпикардом, изнутри – под эндокардом и в миокарде представляло интерес использование активации лимфотока с лечебной целью при ИМ. Богатая лимфатическая система сердца с хорошо развитой системой анастомозов подсказывает важность этой структуры в жизнедеятельности миокарда. Однако, после открытия первых опиоидных пептидов в лаборатории синтеза пептидов ВКНЦ АМН СССР, руководимой профессором М.И. Титовым и позже канд. химич. наук Ж.Д. Беспаловой стало возможным исследование этих пептидов в экспериментальной медицине.

Цель работы – экспериментальное изучение роли активации лимфотока с помощью лимфостимулирующих пептидов прямого действия при инфаркте миокарда

¹Хугаева В.К. «Опиоидергическая регуляция микролимфоциркуляции в норме и при ишемии». Автореферат диссертации докт. мед. наук. 1993; М., 48 с.

Методика

Эксперименты выполнены на 44 беспородных крысах—самцах различного возраста, массой 200 – 300 г. Все работы проводились в соответствии с регламентом декларации ЕС от 22 сентября 2010 г. об использовании лабораторных животных в научных целях. Исследование одобрено Этической комиссией института. Животных наркотизировали внутримышечным введением 8% раствора хлоралгидрата (из расчета 0,6 г/кг),



Рис. 1. Ветви левой коронарной артерии после инъекции раствора красителя.

Fig. 1. Branches of the left coronary artery after injection of a dye solution.

разведенного в 0,9 % растворе NaCl. Моделирование ИМ осуществляли методом Селье в модификации Когана [8]. ИМ у животных воспроизводили путем перевязки ветви левой коронарной артерии (**рис. 1**).

В качестве антисептиков перед и после операции обрабатывали кожу 96% спиртом и 5% раствором йода. У наркотизированного животного в грудной клетке (передняя стенка левая сторона в 4-5 межреберье) после освобождения межреберья от мышц и фасций делали разрез, через который выводили наружу сердце. Под левым ушком предсердия перевязывали ветвь левой коронарной артерии и быстро возвращали сердце в грудную полость. Вся манипуляция продолжалась 20 с. Разрез кожи зашивали, перед последним швом в рану вводили антибиотик цефазолин. Тестирование опиоидных пептидов на способность активировать лимфоток и СА ЛМ проводили на брыжейке тонкой кишки крысы по общепринятой методике [9]. Наиболее активный из исследованных пептидов использовали при ИМ. Опиоидный пептид агонист дельта опиатных рецепторов вводился животным в дозе 40.0 мкг/кг внутрибрюшинно в 1.0 мл 0.9% раствора хлорида натрия за 15 мин до моделирования ИМ (режим профилактики) или через 15 мин после моделирования ИМ (режим лечения).

В работе использовали фотосъемку макро- и микропрепаратов и гистологические методы изучения сердца. (**рис. 2**)

Результаты и обсуждение

В условиях биомикроскопии исследовали целую группу пептидов аналогов лейэнкефалина и даларгина агонистов дельта ОР, содержащих тирозин, поскольку, аминокислота тирозин обладает слабым, но длитель-

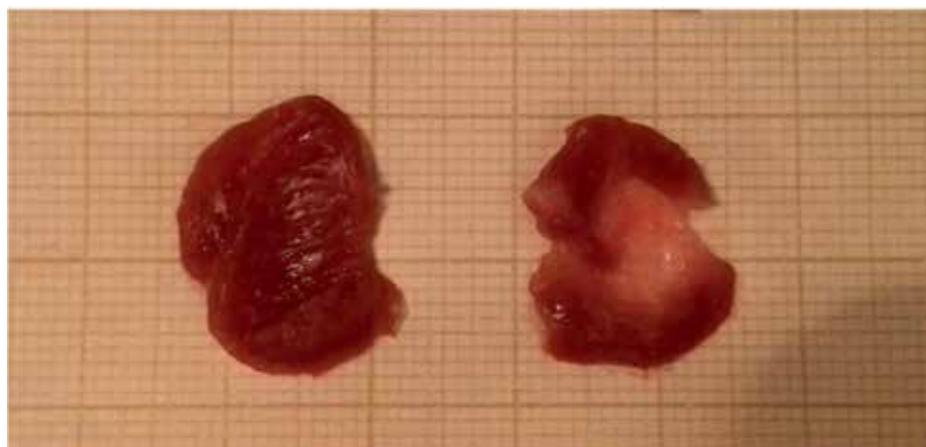


Рис. 2. Левый желудочек сердца крысы. Слева – контроль, справа – светлая зона инфаркта миокарда.

Fig. 2. Left ventricle of the rat heart. Left – control, right – light myocardial infarction zone.

ным лимфостимулирующим действием (30-60 мин). Наиболее активным лимфостимулятором был пептид со структурной формулой Туг-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Glu. В таблице 1 представлены данные по влиянию пептида на моторику стенки и клапанов лимфатических микрососудов, ткани брыжейки тонкой кишки крысы. Скорость лимфотока увеличивалась до максимального значения, которое характеризовалось непрерывностью с кратковременными паузами, не превышающими 1 с. Используемый пептид выделялся среди изученных наиболее интенсивным влиянием на лимфоток, хотя частота сокращения его могла быть меньше по сравнению с другими пептидами.

В таблице 2 представлены данные по летальности и выживаемости животных в динамике ИМ (во время операции, после операции в течение 1 ч, 1 сут, 30 сут). В качестве контроля использовали животных с ИМ, который моделировали без стимуляции лимфотока.

При ИМ во время операции и в течение 1-го ч после операции наблюдалась одинаковая летальность животных. Животные, прожившие 1 сут и 30 сут, как правило, выживали, дальнейшее наблюдение за ними в течение 2-3 мес не сопровождалось их гибелью.

Использование пептида перед операцией (профилактический эффект) способствовало увеличению летальности животных как во время операции, так и в течение 1-го часа после операции. Дальнейшее течение было аналогично контрольному. В этой группе отмечалась минимальная выживаемость животных.

В третьей группе животных пептид использовали после операции (лечебный эффект), при этом отмечалась минимальная летальность во время операции и в течение 1 ч после операции. Общая летальность во все периоды наблюдения также была минимальной, соответственно имела место максимальная выживаемость.

Необходимо отметить, что летальность во время операции и в течение 1-го ч наблюдалась во всех груп-

пах. В последующем ни одно животное не погибло, т.е. все 44 животных подчинялись этой динамике летальности. Анализ подобной реакции позволяет сделать вывод о критическом времени, которым является 1-й ч после операции.

Возникает вопрос о причине отрицательного влияния на выживаемость при профилактическом введении пептида. Необходимо учитывать следующие факторы:

1) Опиоидные пептиды эффективны только при экстремальных состояниях и при однократном применении. Использование опиоидных пептидов в контроле или при средней степени тяжести патологии бывает мало эффективно или, напротив, вызывает повреждение более значительное, по сравнению с контролем. Примером может служить работа, в которой введение пептида при ишемии мозга разной степени тяжести (легкая, средней тяжести или тяжелая по величине снижения артериального давления) давало положительный эффект у животных только при тяжелой степени ишемии мозга. При ишемии легкой формы, из которой животное выходило самостоятельно без лечения, наблюдались случаи летального исхода под влиянием пептида. У животных с патологией средней тяжести животные хотя и погибали, но в меньшей степени [10].

2) В нашем эксперименте пептид вводился после погружения животного в состояние наркоза, который продолжался до 1 ч, а вводился пептид за 15 мин до операции. Эффективность пептидов зависит от сочетания с другими веществами, в данном случае с применяемым снотворным препаратом. Оба средства действуют на одни и те же ОР, что изменяет активность этих препаратов. Проиходится нагрузка на одни и те же ОР: вначале снотворного препарата, потом пептида. В другой нашей работе было показано значительное увеличение (в 10 раз!) продолжительности сна после приема нембутала при предварительном за 1 сут вве-

Таблица 1/ Table 1

Влияние пептида на моторику стенки и клапанов лимфатических микрососудов, расположенных около жировой ткани брыжейки тонкой кишки крысы

The effect of the peptide on the motility of the wall and valves of lymphatic microvessels located near the adipose tissue of the mesentery of the rat small intestine

Объект исследования	Кол-во животных, (ед)	Латентный период, (мин)	Макс. частота сокращения за 1 мин	Длительность периода сокращения, (мин)
Стенка ЛМ	10	0,1±0,01 *	10 ±1,24*	29,0±6,68*
Клапан ЛМ	10	0,13±0,01	9,0±1,12	23,0±0,55

Примечание. * – $p < 0,05$.

Note. * – $p < 0,05$.

Таблица 2/ Table 2

Влияние пептида на динамику летальности крыс при инфаркте миокарда

Effect of the peptide on the lethality dynamics of rats in myocardial infarction

Модель патологии Pathology model	Общее кол-во животных/ Total number of animals		Летальность / Lethality										Выживаемость Survival rate	
	ед units	%	1		2		3		4		5		ед units	%
			ед units	%	ед units	%	ед units	%	ед units	%	ед units	%		
Инфаркт миокарда (ИМ) myocardial infarction	22	100	6	27	6	27	-	-	-	-	12	54	10	46
Пептид+ИМ Peptide +myocardial infarction	11	100	5	46	4	36	-	-	-	-	9	82	2	18
ИМ+Пептид Myocardial infarction +peptide	11	100	1	9	3	27	-	-	-	-	4	36	7	64

Примечание. Летальность во время операции (1); после операции: в течение 1 часа (2); 1 суток (3); 30 суток (4); общее количество погибших животных (5), « - » отсутствие погибших животных.

Note. Lethality during surgery (1); after surgery: within 1 hour (2); 1 day (3); 30 days (4); total number of dead animals (5), « - » no dead animals.

дении опиоидного пептида [11]. Одновременное введение пептида с нембуталом пролонгировало длительность сна с каждым повторным применением пептида.

Успешное использование пептида после экстремальных состояниях, одной из причин которых была операция, свидетельствует о его высокой эффективности, поскольку выживаемость животных по сравнению с контролем увеличивалась на 18%. Такой результат позволяет надеяться на дальнейшее использование лимфостимулирующих пептидов в клинической практике.

Заключение

Положительный лечебный эффект пептида на выживаемость при ИМ позволяет рассматривать лимфатическую систему как резерв нашего организма, направленный на восстановление кровообращения. Лимфатическая система обладает 10 важнейшими функциями, среди которых в данном случае проявила себя дезинтоксикационная функция, связанная со стимуляцией лимфообращения. Стимуляция лимфотока активирует иммунную функцию организма за счет увеличенного выброса лимфоцитов и лимфопептидов из лимфатических узлов, что также оказывает существенное влияние на регенераторные процессы организма, что доказано в работах, посвященных изучению размеров зоны некроза при ИМ при воздействии энкефалинов [12, 13].

Развитие осложнений и летальность больных после первоначального улучшения гемодинамики при ИМ

позволяет предположить нарушение лимфоциркуляции в миокарде, препятствующее нормальному оттоку продуктов распада из зоны некроза, что приводит к увеличению площади инфаркта в миокарде. Таким образом, стимуляция лимфотока могла бы предотвратить развитие осложнений, прогрессирование нарушений микроциркуляции и летальный исход.

Литература

(п.п. 1; 2; 8 см. References)

- Хугаева В.К., Сучков В.В. Влияние энкефалина на микроциркуляторное русло. *Бюлл. ВКНЦ АМН СССР*. 1980; 1: 92-6.
- Хугаева В.К. Влияние даларгина на микрогемо- и микролимфоциркуляцию. *Бюлл. ВКНЦ АМН СССР*. 1988; 3: 300-2.
- Ардасенов А.В., Хугаева В.К., Беспалова Ж.Д. Роль лимфостимулирующих пептидов в восстановлении микрогемоциркуляции кожи и подкожной жировой клетчатки при воспалении. *Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. I съезд лимфологов России. 22-23 мая 2003.*
- Хугаева В.К., Султанов Д.В. Лимфостимулирующая активность препаратов, применяемых при патологии легких. *Бюлл. exper. биол. и мед.* 2012; 153(4): 427-9.
- Коваленко А.А., Хугаева В.К. Экспериментальное обоснование применения синтетического пептида в комплексном хирургическом лечении острой кишечной непроходимости. *Патогенез*. 2018; 16(4): 138-40.
- Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В. *Микроциркуляция*. М.; Медицина, 1984.
- Хугаева В.К., Беспалова Ж.Д. Различное влияние аналога лей-энкефалина на динамику мозгового кровотока при ишемии мозга различной степени тяжести. *Бюлл. exper. биол. и мед.* 1988; 106(11): 516-9.

11. Хугаева В.К., Беспалова Ж.Д., Александров П.Н., Ардасенов А.В. Потенцирующее и отсроченное действие аналогов даларгина на продолжительность нембуталового сна в эксперименте. *Бюлл. экпер. биол. и мед.* 1996; 122(12): 618-22.
12. Афонская Н.И., Ильинский О.Б., Кондаленко В.Ф., Спевак С.Е., Черпаченко Н.М. Влияние опиоидного пептида на заживление экспериментального инфаркта миокарда. *Бюлл. экпер. биол. и мед.* 1986; 12: 754-7.
13. Маслов Л.Н., Барзах Е.И., Лишманов А.Ю., Горбунов А.С., Цибульников С.Ю., Семенов А.С. Агонисты опиоидных рецепторов могут усугублять ишемические и реперфузионные повреждения сердца. *Патол. физиол. и экпер. тер.* 2014; 1: 79-84.
6. Khugaeva V.K., Sultanov D.V. Lymphostimulating activity of drugs used in lung pathology. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny.* 2012; 153(4): 427-9. (in Russian)
7. Kovalenko A.A., Khugaeva V.K. Experimental substantiation of the use of synthetic peptide in the complex surgical treatment of acute intestinal obstruction. *Patogenez.* 2018; 16(4): 138-40. (in Russian)
8. Selye H, Bajusz E, Grasso S, Mendell P. Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiologiya.* 1960; (11): 398-407.
9. Chernukh A.M., Alexandrov P.N., Alekseev O.V. *Microcirculation [Mikrotsirkulyatsiya]*. Moscow; Meditsina; 1984. (in Russian)
10. Khugaeva V.K., Bespalova Zh.D. Various effects of ley-enkephalin analog on the dynamics of cerebral blood flow in cerebral ischemia of varying severity. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny.* 1988; 106(11): 516-19. (in Russian)
11. Khugaeva V.K., Bespalova Zh.D., Alexandrov P.N., Ardasenov A.V. The potentiating and delayed effect of dalargin analogues on the duration of nembutal sleep in the experiment. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny.* 1996; 122(12): 618-22. (in Russian)
12. Afonskaya N.I., Ilyinsky O.B., Kondalenko V.F., Spevak S.E., Cherpachenko N.M. The effect of opioid peptide on the healing of experimental myocardial infarction. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny.* 1986; 102(12): 754-7. (in Russian)
13. Maslov L.N., Barzakh E.I., Lishmanov A.Yu., Gorbunov A.S., Tsybulnikov S.Yu., Semenov A.S. Opioid receptor agonists can aggravate ischemic and reperfusion injuries of the heart. *Patol. fiziol. i ekper. ter.* 2014; 58(1): 79-84. (in Russian)

References

1. Hughes J., Smith T.W., Kosterlits H.W., et al. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature.* 1975; 258: 577-80.
2. Hughes J. *Opioid peptides*. Proc. Eur. Soc. Neurochem: 2nd Meet. ESN. Gottingen. N.Y.: Weinheim, 1978: 452-3.
3. Khugaeva V.K., Suchkov V.V. The effect of enkephalin on the microcirculatory bed. *Byulleten Vsesoyuznogo kardiologicheskogo nauchnogo tsentra AMN SSSR.* 1980; (1): 92-6. (in Russian)
4. Khugaeva V.K. The influence of dalargin on microhemo- and microlymphocirculation. *Byulleten Vsesoyuznogo kardiologicheskogo nauchnogo tsentra AMN SSSR.* 1988; (3): 300-2. (in Russian)
5. Ardasenov A.V., Khugaeva V.K., Bespalova Zh.D. The role of lymphostimulating peptides in restoring microhemocirculation of the skin and subcutaneous fat in inflammation. *Byulleten NCSSKH im. A.N.*

Сведения об авторах:

Засеева Алана Моисеевна, мл. науч. сотр. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ НИИОПП;

Хугаева Валентина Каргоевна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции, e-mail: vhugaeva@mail.ru;

Ардасенов Алан Валерьевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ НИИОПП.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 615.322

Лупанова И.А., Ферубко Е.В., Курманова Е.Н., Шишканов Д.В., Сайбель О.Л.

Изучение гепатопротекторной активности топинамбура травы экстракта сухого на модели токсического гепатита у крыс

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»,
117216, Россия, Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1

Введение. Для выполнения программы по импортозамещению лекарственных препаратов перспективным направлением является создание оригинальных отечественных гепатопротективных средств. Топинамбур (*Helianthus tuberosus* L.) семейства Астровые (*Asteraceae*) - перспективный род растения для детального изучения с целью создания на его основе современных лекарственных средств для лечения заболеваний печени. **Цель работы** - изучение влияния сухого экстракта травы топинамбура на состояние печени крыс в условиях экспериментального токсического гепатита.

Методика. В отделе экспериментальной фармакологии ФГБНУ ВИЛАР проведено фармакологическое изучение топинамбура травы экстракта сухого. Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту в экстракте составляет $5,13 \pm 0,44$ %. Исследовано влияние экстракта на состояние печени крыс в условиях экспериментального токсического гепатита. В работе использовали 50 белых нелинейных крыс самцов массой 200-240 г. Экстракт вводили животным внутривентрикулярно в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг в течение 5 сут, препаратом сравнения был Силимар в дозе 100 мг/кг. Экспериментальный гепатит у крыс вызывали однократным введением подкожно 50% масляного раствора тетрахлорметана в объеме 0,4 мл на 100 г, через 1 ч после последнего введения исследуемых веществ. Через 48 ч после введения тетрахлорметана брали кровь из хвостовой вены крыс, получали сыворотку и проводили её биохимический анализ. Затем крыс подвергали эвтаназии в CO_2 камере, извлекали печень для проведения патогистологического исследования.

Результаты. Введение экстракта травы топинамбура в дозе 500 мг/кг и препарата сравнения Силимар в дозе 100 мг/кг снижало токсическое действие тетрахлорметана на печень лабораторных животных, что подтверждено результатами биохимического исследования сыворотки крови подопытных животных и при гистологическом исследовании их печени. Внутривентрикулярное введение крысам экстракта топинамбура в дозе 100 мг/кг приводило к незначительному снижению активности ферментов-маркеров функционального состояния и не влияло на морфологическую структуру печени опытных животных.

Заключение. Сухой экстракт травы топинамбура в дозе 500 мг/кг обладает гепатопротекторным действием и является перспективным объектом для дальнейшего углубленного фармакологического изучения.

Ключевые слова: гепатопротекторная активность; модель тетрахлорметанового гепатита; трава топинамбура; *Helianthus tuberosus* L

Для цитирования: Лупанова И.А., Ферубко Е.В., Курманова Е.Н., Шишканов Д.В., Сайбель О.Л. Изучение гепатопротекторной активности топинамбура травы экстракта сухого на модели токсического гепатита у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 138-142.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.138-142

Участие авторов. Лупанова И.А., Ферубко Е.В.-- планирование и разработка эксперимента; Сайбель О.Л. – ответственная за изучение химического состава экстракта; Курманова Е.Н., Шишканов Д.В. – проводили эксперимент на модели токсического гепатита и обрабатывали результаты; все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании статьи. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

Для корреспонденции: Лупанова Ирина Александровна, канд. биол. наук, руководитель Центра доклинических исследований, e-mail: lupanova@vilarnii.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.07.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Lupanova I.A., Ferubko E.V., Kurmanova E.N., Shishkanov D.V., Saybel O.L.

Hepatoprotective activity of the *Helianthus tuberosus* L. extract in carbon tetrachloride-induced liver damage in rats

All-Russia Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants,
Grina St. 7, Bldg. 1, Moscow 117216, Russian Federation

Introduction. Some bioactive substances (e.g., flavonoids, phenolic acids, sesquiterpenes, polysaccharides, and amino acids) in *Helianthus tuberosus* L. leaves have antibacterial, anti-inflammatory, and antioxidant activity. These active ingredients may provide effective alternatives to imported hepatoprotective medicines. Aim of the study was to assess the hepatoprotective activity of extracts of the *Helianthus tuberosus* L. dried herb in male rats with carbon tetrachloride intoxication.

Methods. The composition of *Helianthus tuberosus* L. herb dry extract includes hydroxycinnamic acids and flavonoids. The predominant phenolic compound is chlorogenic acid. The hepatoprotective activity of the H. tuberosus extract doses of 100 and 500 mg/kg body weight was compared in carbon tetrachloride-treated rats. The rats were divided into five groups with ten animals in each. The first group consisted of intact animals; the second group received carbon tetrachloride, the third and the fourth groups received the H. tuberosus extract at a dose of 100 or 500 mg/kg plus carbon tetrachloride (TCM). The fifth group received Silymar[®] as a comparator drug. 48 hours after the TCM administration, serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and alkaline phosphatase (ALP) activities and total bilirubin concentration were measured. Pathomorphology of rat liver was studied by histological methods using section staining with hematoxylin and eosin.

Results. Prior H. tuberosus extract administration reduced the toxic TCM effect on liver cells in experimental toxic hepatitis. In animals treated with H. tuberosus at a dose of 500 mg/kg body weight, the ALT activity was decreased by 31 %, the AST activity by 20%, the alkaline phosphatase activity by 19%, and the total bilirubin concentration by 16% as compared with the respective variables in the Silymar[®] group of animals that were not treated with the extract. The histological study showed that the H. tuberosus extract administration to animals at a dose of 500 mg/kg reduced dystrophic changes in hepatocytes.

Conclusion. The H. tuberosus extract at a dose of 500 mg/kg has a pronounced hepatoprotective effect and it is promising for further pharmacological study for developing hepatoprotective drugs.

Keywords: carbon tetrachloride treatment model; *Helianthus tuberosus* L.; hepatoprotective activity

For citation: Lupanova I.A, Ferubko E.V., Kurmanova E.N., Shishkanov D.V., Saybel O.L. Hepatoprotective activity of the *Helianthus tuberosus* L. extract in carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(4): 138-142. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.138-142

Author's contribution: Lupanova I.A., Ferubko E.V. – planning and development of the experiment; Saibel O.L. – responsible for studying the chemical composition of the extract; Kurmanova E.N., Shishkanov D.V. – conducted the experiment on the model of toxic hepatitis and processed the results; all authors participated in discussion of the results and in writing the article. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

For correspondence: Irina A. Lupanova, Ph.D. (Biol.), Head of Preclinical research Center, All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow, Russia), e-mail: lupanova@vilarnii.ru

Financing. The study had no sponsorship.

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

Information about authors:

Lupanova I.A., <https://orcid.org/0000-0001-8183-2877>

Kurmanova O.N., <https://orcid.org/0000-0002-9243-5268>

Ferubko E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1949-2597>

Received 18.07.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

Для выполнения программы по импортозамещению лекарственных препаратов перспективным направлением является создание оригинальных отечественных гепатопротективных средств, которые могли бы конкурировать с зарубежными препаратами, в настоящее время представляющими большую часть Российского фармацевтического рынка [1,2].

Интерес в качестве гепатопротекторов представляют средства растительного происхождения, к достоинствам которых относят сочетание комплекса биологически активных веществ, что определяет широкий спектр фармакологического воздействия, возможность потенцировать эффект на фоне низкой токсичности и длительного применения [3]. В этом плане интерес представляет топинамбур (*Helianthus tuberosum* L.) семейства Астровые (*Asteraceae*) –

перспективное растение для детального изучения с целью создания на его основе современных лекарственных средств. Разнообразный состав БАВ топинамбура обуславливает фармакологическое действие различных средств, получаемых из клубней и надземной части данного растения. Биологически активные вещества, содержащиеся в клубнях и надземной части растения (стебли, листья и цветки) активно используются в животноводстве [4]. Из литературных данных известно, что инулин, содержащийся в клубнях, стимулирует рост *Bifidobacteria* и *Lactobacillus*, за счет чего регулируется микрофлора кишечника и улучшается иммунитет [5, 6]. Кроме того, надземная часть топинамбура содержит ряд биологически активных веществ, таких как флавоноиды, фенольные кислоты, терпеноиды и некоторые аминокислоты, которые проявляют антиоксидантную, противовоспалительную, противоопухолевую и антибактериальную активность [7, 8]. Стоит отметить, что содержание основных биологически активных веществ в траве топинамбура сильно различается и зависит от сорта, фазы роста и времени заготовки [9].

В то же время в источниках литературы нет сведений о гепатопротекторной активности экстрактов надземной части топинамбура обыкновенного. Цель исследования – изучение влияния сухого экстракта травы топинамбура на состояние печени крыс в условиях экспериментального токсического гепатита.

Методика

Сухой экстракт получен из травы топинамбура, заготовленного в фазу конца вегетации растения в Московской и Тверской областях в 2018-2021 гг. Способ получения экстракта включает стадию экстракции сырья 70%-м спиртом, концентрирования полученных извлечений, очистку от липофильных соединений и сушку. Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту в экстракте составляет $5,13 \pm 0,44$ %. В результате проведенных исследований методом ВЭЖХ-УФ-МС/МС было установлено, что фенольный комплекс травы топинамбура представлен вторичными метаболитами, относящимися к гидроксикоричным кислотам и флавоноидам. Доминирующими веществами являются хлорогеновая, изохлорогеновая А и изохлорогеновая С кислоты [10].

При проведении эксперимента использовали белых нелинейных крыс-самцов массой 200-240 г в количестве 50 особей. Исследования выполняли согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации и «Руководству по проведению доклинических

исследований лекарственных средств» (2012 г.). Животных содержали в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе. Исследования одобрены биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР, протокол №62 от 01.12. 2021.

Опытные животные были разделены на 5 групп по 10 особей в каждой: 1-я группа интактные, 2-я – контрольные, получавшие на протяжении 5 сут внутривенно очищенную воду в объеме эквивалентном исследуемым веществам. 3-я и 4-я группы – опытные, которые получали исследуемое вещество (сухой экстракт травы топинамбура внутривенно в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг соответственно) на протяжении 5 сут., 5-я группа животных на протяжении 5 сут получала внутривенно препарат сравнения – субстанцию Силимара в дозе 100 мг/кг, суспендированную в 1% крахмальном геле. Через 1 ч после завершающего введения исследуемых веществ у животных всех опытных групп (за исключением интактной) моделировали токсический тетрахлорметановый гепатит однократным введением подкожно 50%-го масляного раствора тетрахлорметана в объеме 0,4 мл на 100 г.

Через 48 ч после введения тетрахлорметана из хвостовой вены крыс брали для исследования кровь; биохимический анализ сыворотки крови проводили на анализаторе биохимическом «Dirui CS-T240». В сыворотке крови определяли активность ферментов-маркеров функционального состояния гепатоцитов: аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), экскреционного фермента маркера холестаза – щелочной фосфатазы (ЩФ), а также содержание общего билирубина и холестерина

После завершения всех манипуляций крыс подвергали эвтаназии в CO₂ камере и извлекали печень. Для оценки морфологических изменений печень животных фиксировали в 10%-ном забуференном нейтральном формалине с последующей стандартной спиртовой проводкой и заливкой в парафин по общепринятой методике. Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 4-6 мкм, окрашивали их гематоксилином и эозином. Структурные изменения печени оценивали с помощью микроскопа «Axio LAB.A1» с цифровой камерой «AxioCam ERc5s» с программным обеспечением для анализа изображений (Axio Vision SE64 Rel.4.8.3 и ZEN 2012).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета «Statistica 13», значимость различий между группами оценивали по критерию U Манна-Уитни. Различия между анализируемыми показателями считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты изучения влияния сухого экстракта травы топинамбура на активность маркеров морфофункционального состояния гепатоцитов в сыворотке крови крыс представлены в **таблице**.

Введение опытным животным тетрахлорметана вызвало выраженные изменения активности индикаторных ферментов цитолитического синдрома (АЛТ, АСТ), экскреционного фермента маркера холестаза щелочной фосфатазы, уровней общего билирубина и холестерина. Наблюдалось статистически значимое увеличение активности этих ферментов-маркеров функционального состояния печени.

Внутрижелудочное введение крысам экстракта топинамбура в дозе 100 мг/кг приводило к незначительному снижению активности ферментов-маркеров, в то время как введение экстракта в дозе 500 мг/кг существенно снижало: активность АЛТ на 31 %, АСТ на 20 %, щелочной фосфатазы на 19 %, содержание общего билирубина 16%, холестерина на 38 %. Препарат сравнения Силимар в дозе 100 мг/кг также оказывал выраженное гепатопротекторное действие, снижая активность «печеночных» ферментов: АЛТ на 31 %, АСТ на 25 %, ЩФ на 20 %, содержание общего билирубина на 15 %, общего холестерина на 34 %.

Гепатопротекторная активность экстракта была подтверждена и при гистологическом исследовании печени крыс. Оценивая морфологическую структуру печени опытных животных, можно сделать заключе-

ние, что тетрахлорметан проявлял выраженное гепатотоксическое действие, вызывая изменения гепатоцитов по типу вакуольной и жировой дистрофии. Введение топинамбура травы экстракта сухого в дозе 500 мг/кг и препарата сравнения Силимар® в дозе 100 мг/кг существенно снижало токсическое действие тетрахлорметана на печень лабораторных животных.

Установленная в опытах *in vivo* гепатопротекторная активность экстракта может быть обусловлена входящим в ее состав комплексом фенольных соединений. Согласно данным литературы гепатопротекторное действие многих лекарственных средств связано с их антиоксидантной и противовоспалительной активностью [11].

Так, Wang и соавт. (2017) в экспериментах *in vivo* показали, что добавление флавоноидов из травы топинамбура (45 мг/кг сухого вещества) в рацион овец значительно увеличивало антиоксидантный потенциал сыворотки крови и печени. Кроме того, активность ферментов: супероксиддисмутазы в сыворотке крови, печени и селезенке, активность каталазы и глутатионпероксидазы в сыворотке крови и селезенке также повышались, при этом содержание малонового диальдегида в сыворотке крови и печени было снижено [12].

Доминирующими компонентами экстракта травы топинамбура являются гидроксикоричные кислоты, и хлорогеновая кислота, преобладающая в нём, возможно, вносит значительный вклад в его гепатопротекторную активность. Venditti и соавт. (2015) пред-

Таблица/ Table

Влияние сухого экстракта травы топинамбура на активность маркеров морфофункционального состояния гепатоцитов в сыворотке крови крыс при CCl₄ гепатите

Effect of dry extract of topinambur herb on the activity of markers of morphofunctional state of hepatocytes in the blood serum of rats with CCl₄ hepatitis

Группа животных Animal Group n=10	Холестерин, ммоль/л Cholesterol, mmol/l	Билирубин, общ. мкмоль/л Bilirubin, total μmol/l	ЩФ, Е/л Alkaline phosphatase u/l	АЛТ, Е/л ALT, u/l	АСТ, Е/л AST, u/l
Интактные Intact	1,72±0,15	2,12±0,03	400,0±6,97	54,03±0,81	94,14±6,51
Контроль Control	0,99±0,02	2,89±0,57	582,6±19,27	113,51±7,75	173,17±2,10
Топинамбура Topinambur 100 мг/кг (mg/kg)	1,02±0,04*	2,86±0,01*	573,8±3,60*	109,05±1,14*	165,20±2,42*
Топинамбура Topinambur 500 мг/кг (mg/kg)	1,37±0,02*	2,44±0,02*	474,1±5,11*	78,33±2,16*	138,00±0,52*
Силимар Silimar 100 мг/кг (mg/kg)	1,33±0,01*	2,47±0,08*	469,1±6,60*	79,11±2,13*	130,28±1,12*

Примечание. * $p \leq 0,05$ – различия статистически значимы по сравнению с контролем

Note. * $p < 0.05$ – differences are statistically significant compared to the control

положили один из механизмов действия хлорогеновой кислоты, заключающийся в том, что она «поглощает» активные формы кислорода, образующиеся при диете с высоким содержанием жиров, подавляя воспаление, что приводит к снижению резистентности к инсулину, накоплению жира и увеличению массы тела, в то время как ингибирование рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR γ), предотвращает развитие стеатоза печени [13].

Заключение

Таким образом, топинамбура травы экстракт сухой в дозе 500 мг/кг обладает гепатопротекторным действием, ослабляя повреждающее действие тетрахлорметана, что подтверждено биохимическими и гистологическими исследованиями, и является перспективным объектом для дальнейшего углубленного фармакологического изучения.

Данная работа проведена согласно плану научно-исследовательской работы ФГБНУ ВИЛАР по теме: «Направленный скрининг, оценка фармакологической активности и безопасности биологически активных веществ и фармацевтических композиций на их основе» (FGUU-2022-0010).

Литература

(п.п. 4-9; 19; 12-13 см. References)

1. Вельмяйкина Е. И. Анализ ассортимента иммунотропных лекарственных препаратов. *Вестник ПГФА*. 2012; № 9: 19 – 21.
2. Куркин В. А., Петрухина И.К. Актуальные аспекты создания импортозамещающих лекарственных растительных препаратов. *Фундаментальные исследования*. 2014; 11(2): 366-371.
3. Мизина П.Г. Растительное и минерально-биологически активные комплексы для медицинских технологий оздоровления. Москва; Наука; 2021.
10. Сайбель О.Л. Исследование фенольных соединений топинамбура (*Helianthus tuberosus* L.). *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2022; 2(25): 7-13. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-02-02/>
11. Новиков В.Е., Климкина Е.И. Фармакология гепатопротекторов. *Обзоры по клинической и лекарственной терапии*. 2005; 4(1): 2-20.

References

1. Velmyaikina E. I. Analiz assortimenta immunotropnih lekarstvennih preparatov assortimenta immunotropnykh lekarstvennykh preparatov. *Vestnik PGFA*. 2012; № 9: 19 – 21. (in Russian)
2. Kurkin V.A., Petruhina I.K. Aktualnie aspekty sozdaniya importozamestchaayushih lekarstvennih rastitelnykh preparatov. *Fundamentalnie issledovaniya*. 2014; 11(2): 366-371. (in Russian)
3. Mizina P.G. *Rastitelnie i mineralnie biologicheski aktivnie kompleksi dlya meditsinskih tehnologiy zdorov'esberejeniya*. Moscow; Nauka; 2021. (in Russian)
4. Kays SJ, Nottingham SF. Biology and chemistry of Jerusalem artichoke: (*Helianthus tuberosus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 10(4): 352e3. <https://doi.org/10.1080/10496500903245503>.
5. Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC. Effect of Bifidobacterium longum and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*. 1998; 19(2): 281e5. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.2.281>.
6. Kaur N, Gupta AK. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biomechanics*. 2002; 27(7): 703e14. <https://doi.org/10.1007/BF02708379>.
7. Pan L, Sinden MR, Kennedy AH, Chai H, et al. Bioactive constituents of *Helianthus tuberosus* (Jerusalem artichoke). *Phytochemistry Letters*. 2009; 2(1): 15e8. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2008.10.003>.
8. Yuan X, Gao M, Xiao H, Tan C, Du Y. Free radical scavenging activities and bioactive substances of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) leaves. *Food Chemistry*. 2012; 133: P. 10e4.
9. Wang Y, Zhao Y., Xue F., Nan X., et al. Nutritional value, bioactivity, and application potential of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) as a neotype feed resource. *Animal Nutrition*. 2020; 6: 429-437. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.09.001>
10. Saybel O.L. Issledovanie fenolnykh soedineniy travi topinambura (*Helianthus tuberosus* L.). *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2022; 2(25): 7-13. (in Russian) <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-02-02/>
11. Novikov V.E., Klimkina E.I. *Pharmakologiya hepatoprotektorov. Obzori po klinicheskoy i lekarstvennoy terapii*. 2005; 4(1): 2-20. (in Russian)
12. Wang YM, Zhao JQ, Yang JL, Idong PT, Shi YP. Antioxidant and a α -glucosidase inhibitory ingredients identified from Jerusalem artichoke flowers. *Natural Product Research*. 2017; 33(4): 1e5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1399379>.
13. Venditti A, Bianco A., Frezza C., Conti F., et al. Essential oil composition polar compounds, glandular trichomes and biological activity of *Hyssopus officinalis* subsp. *Aristatus* (Godr.) Nyman from central Italy. *Industrial Crops and Products*. 2015; 77: P. 353–363.

Сведения об авторах:

Лупанова Ирина Александровна, канд. биол. наук, руководитель Центра доклинических исследований, ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений», e-mail: lupanova@vilarnii.ru;

Ферубко Екатерина Владимировна, доктор мед. наук, зав. отделом экспериментальной фармакологии, ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений»;

Курманова Елена Николаевна, науч. сотр. отдела экспериментальной фармакологии, ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений»;

Шишканов Дмитрий Васильевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела экспериментальной фармакологии, ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений»;

Сайбель Ольга Леонидовна, канд. фарм. наук, руководитель Центра химии и фармацевтической технологии, ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений».

ОБЗОРЫ

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Лукина С.С.¹, Бурденный А.М.¹, Филиппова Е.А.¹, Пронина И.В.¹, Иванова Н.А.¹,
Казубская Т.П.², Брага Э.А.¹, Логинов В.И.¹

Роль длинных некодирующих РНК и ДНК-метилирования в патогенезе рака яичников

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

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

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,

115552, Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 23

Рак яичников (РЯ) представляет собой группу агрессивных гетерогенных злокачественных опухолей, характеризующихся быстрой прогрессией, низким диагностическим потенциалом, высокой частотой неблагоприятных исходов и высоким потенциалом метастазирования. В обзоре авторы концентрируют внимание на одном из основных регуляторов клеточных процессов, приводящем к образованию опухолей, а именно на длинных некодирующих РНК (днРНК). Известно, что они участвуют в регуляции экспрессии генов на транскрипционном, посттранскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях, оказывая влияние на такие фундаментальные биологические процессы, как дифференцировка, пролиферация, дозовая компенсация генов, ремоделирование хроматина, геномный импринтинг, альтернативный сплайсинг пре-мРНК и другие. Они могут выступать как в роли онкогенов, так и в роли генов-супрессоров опухолей. Многочисленные данные показывают, что днРНК вовлечены в патогенез рака яичников, а их aberrантное метилирование представляет один из эпигенетических механизмов регуляции их собственной экспрессии. **Цель** обзора – изучение вклада днРНК и ДНК-метилирования в процессы онкогенеза рака яичников и их потенциала в качестве биомаркеров. Особое внимание уделено применению экзосомальных днРНК в неинвазивной диагностике рака яичников.

Методика. Проведен анализ литературы по международным базам Scopus, Web of science по ключевым словам: рак яичников, длинные некодирующие РНК, ДНК-метилирование. В соответствии с целью обзора предложены и утверждены части, раскрывающие потенциал нкРНК в патогенезе РЯ.

Заключение. Изучение свойств днРНК и ДНК-метилирования – путь к улучшению прогноза заболевания, общей выживаемости и качества жизни пациенток с РЯ, к появлению принципиально новых биомаркеров для ранней диагностики, разработки таргетной терапии и персонализированному лечению этого социально значимого заболевания.

Ключевые слова: рак яичников; длинные некодирующие РНК; ДНК-метилирование

Для цитирования: Лукина С.С., Бурденный А.М., Филиппова Е.А., Пронина И.В., Иванова Н.А., Казубская Т.П., Брага Э.А., Логинов В.И. Роль длинных некодирующих РНК и ДНК-метилирования в патогенезе рака яичников. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 143-156.
DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.143-156

Участие авторов: Лукина С.С., Бурденный А.М. – концепция, дизайн и структура обзора, написание вводной и заключительной части, финальное редактирование статьи; Филиппова Е.А., Логинов В.И. – написание главы «Аберрантное метилирование. Роль метилирования ДНК в патогенезе РЯ», подготовка иллюстративного материала, финальное редактирование статьи; Пронина И.В., Иванова Н.А. – написание главы «Класс длинных некодирующих РНК. Их классификация и функции»; Казубская Т.П. – написание главы «Длинные нкРНК и их практическое применение»; Брага Э.А. – написание глав «Длинные нкРНК, проявляющие свойства онкогенов при раке яичников» и «Онкосупрессорные днРНК и роль метилирования в их инактивации», финальное редактирование статьи. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

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

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда, грант № 20-15-00368.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.05.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Lukina S.S.¹, Burdennyu A.M.¹, Filippova E.A.¹, Pronina I.V.¹, Ivanova N.A.¹, Kazubskaya T.P.², Braga E.A.¹, Loginov V.I.¹**The role of long non-coding RNA and DNA methylation in the pathogenesis of ovarian cancer**¹Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya St., 8, Moscow, 125315, Russian Federation;²Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Kashirskoe sh., 23, Moscow, 115552, Russian Federation

Background. Ovarian cancer (OC) is a group of aggressive heterogeneous malignant neoplasms characterized by rapid progression, low diagnostic potential, high incidence of adverse outcomes, and high potential for metastasis. The present review focuses on one of the main regulators of cell processes that lead to the formation of tumors, namely, long non-coding RNAs (lncRNAs). It is known that they are involved in the regulation of gene expression at the transcriptional, post-transcriptional, translational, and post-translational levels, thereby influencing fundamental biological processes, such as differentiation, proliferation, dose compensation of genes, chromatin remodeling, genomic imprinting, alternative pre-mRNA splicing, and others. lncRNAs can act both as oncogenes and as tumor suppressor genes. Multiple reports show that lncRNAs are involved in the pathogenesis of OC, and their aberrant methylation is one of the most important epigenetic mechanisms for regulation of their own expression.

The aim of this review is to address the contribution of lncRNAs and DNA methylation to the oncogenesis of OC and the lncRNA potential as biomarkers. Special attention is paid to the use of exosomal lncRNAs in non-invasive diagnostics of OC.

Methods. The search for literature was performed in the Scopus and Web of Science databases using the following keywords: ovarian cancer, long non-coding RNAs, DNA methylation. In accordance with the objectives of the review, the parts that addressed the role of lncRNAs in the pathogenesis of OC were proposed and approved. All articles used in the review were obtained from open sources.

Conclusion. Studying lncRNA properties and DNA methylation will improve the prognosis, overall survival, and quality of life of patients with OC. Such studies will help developing fundamentally new biomarkers, targeted therapy and personalized treatment of this socially significant disease.

Keywords: ovarian cancer; long non-coding RNA; DNA methylation

For citation: Lukina S.S., Burdennyu A.M., Filippova E.A., Pronina I.V., Ivanova N.A., Kazubskaya T.P., Braga E.A., Loginov V.I. The role of long non-coding RNA and DNA methylation in the pathogenesis of ovarian cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(4): 143-156. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.143-156

Author's contribution: Lukina S.S., Burdennyu A.M. – concept, design and structure of the review, writing the introductory and final parts, final editing of the article; Filippova E.A., Loginov V.I. – writing the chapter “Aberrant methylation. The role of DNA methylation in the pathogenesis of RNA”, preparation of illustrative material, final editing of the article; Pronina I.V., Ivanova N.A., – Writing the chapter “Class of long non-coding RNAs. Their classification and functions.”; Kazubskaya T.P., – Writing the chapter “Long ncRNAs and their practical application”; Braga E.A. – writing the chapters “Long ncRNAs exhibiting the properties of oncogenes in ovarian cancer” and “Oncosuppressive lncRNAs and the role of methylation in their inactivation”, final editing of the article. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Alexey M. Burdennyu, Ph.d. I.s.r. of Pathogenomics and Transcriptomics lab. of FSBSI IGPP, e-mail: burdennyu@gmail.com

Information about the authors:

Lukina S.S., <https://orcid.org/0000-0001-6246-2444>

Burdennyu A.M., <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>

Filippova E.A., <https://orcid.org/0000-0001-7172-0433>

Pronina I.V., <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>

Kazubskaya T.P., <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>

Braga E.A., <https://orcid.org/0000-0001-5188-4094>

Loginov V.I., <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>

Financing. This work was funded by the Russian Science Foundation, grant number 20-15-00368.

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

Received 11.05.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Введение

Во всем мире проблема заболеваемости и смертности, связанная с онкологическими заболеваниями, на протяжении многих лет занимает лидирующие по-

зиции. Ежегодно от рака умирают более 9,5 млн человек в мире. Следует отметить, что на заболевания раком яичников (РЯ) приходится более 225 тысяч новых случаев злокачественных новообразований яичников

ежегодно и порядка 140 тысяч из них заканчиваются неблагоприятным исходом [1]. РЯ представляет собой группу крайне агрессивных опухолей, характеризующуюся большой частотой неблагоприятных исходов, поэтому РЯ остаётся наиболее прогностически неблагоприятным раком женских половых органов во всём мире [2]. Также важно подчеркнуть, что хотя в современном обществе прикладываются значительные усилия по улучшению методов диагностики, лечения и увеличению общей выживаемости (ОВ) пациентов, РЯ остаётся угрозой для жизни женщин из-за лекарственной устойчивости, отличительных особенностей каждого подтипа РЯ и отсутствия четких симптомов на ранних стадиях [3]. Таким образом, по-прежнему необходимо осуществлять поиск новых эффективных диагностических и прогностических маркеров для скрининга больных РЯ, а также определение эффективных маркеров ответа на лечение.

Опухоли яичников подразделяются в зависимости от их гистологического типа: герминогенные, опухоли стромы полового тяжа и эпителиальные (собственно рак) [3]. Важными характеристиками рака яичников, определяющими агрессивность заболевания являются повышенная сложность ранней диагностики, быстрый рост, раннее имплантационное метастазирование по серозным оболочкам малого таза и брюшной полости. К этому также можно добавить неудовлетворительные результаты лечения наиболее распространенных форм рака. Следует отметить, что РЯ, также как, и многие другие виды рака, представляет собой заболевание многофакторного генеза, в основе которого лежат нарушения разнообразных молекулярно-генетических механизмов, включая эпигенетические. Эти нарушения оказывают критическое воздействие на работу многих регуляторных и защитных систем клетки [4]. Стоит подчеркнуть, что эпигенетические механизмы регуляции генов не затрагивают нуклеотидную последовательность ДНК и вовлечены в регуляцию экспрессии генов на разных уровнях – от геномно-транскрипционного до посттранскрипционного и пост-трансляционного.

На сегодняшний день, благодаря развитию технологии полногеномного секвенирования удалось понять, что гены, кодирующие белки, составляют лишь около 2% генома человека, а подавляющая часть генома (до 70–90%), которую принимали за т.н. «тёмную материю», активно транскрибируется в виде некодирующих РНК (нкРНК) [5]. Различают несколько классов некодирующих РНК, среди которых наибольший интерес и, возможно, значимость играют 2 больших класса. К первому относят короткие некодирующие

РНК (20–30 пар оснований) – микроРНК (миРНК), участвующие в регуляции экспрессии до половины известных генов на пост-транскрипционном уровне. Другую большую группу некодирующих РНК составляют длинные нкРНК (днРНК), длина которых превышает 200 пар оснований. Показано, что днРНК регулируют экспрессию мРНК белок кодирующих генов как путем конкурентного связывания с миРНК, так и непосредственно взаимодействуя с мРНК [6].

В перспективе исследования закономерностей механизмов экспрессии и метилирования днРНК лежит потенциальная возможность различать нормальную и опухолевую ткань, определять стадию РЯ, оценивать прогноз развития опухоли, а также эффективность лечения. Всё это делает днРНК возможными биомаркерами, применимыми в клинической практике как при диагностике и прогнозе заболевания, так и в качестве терапевтической мишени.

Аберрантное метилирование. Роль метилирования ДНК в патогенезе РЯ. Многофакторная природа рака обусловлена не только изменением структуры генома или факторами внешней среды, но и нарушением процессов, осуществляющих контроль за выполнением алгоритмов клеточной стабильности генома. Выделяют три основных механизма – ремоделирование хроматина, модификация гистонов и метилирование ДНК [7]. В данной главе будут рассмотрены особенности аберрантного метилирования ДНК в целом, а также роль метилирования в патогенезе рака яичников.

Следует отметить, что профиль метилирования ДНК в достаточной мере пластичен и зависит от множества факторов и процессов, таких как старение, образ жизни, а также разнообразных патологических процессов [8, 9]. Изменение статуса и уровня метилирования генов системных процессов организма может существенно изменить клеточный гомеостаз, что, в конечном итоге, может стать причиной развития новообразований. В частности, седативные процессы, вызванные старением организма, усиливают механизм глобального деметилирования, процесса, при котором контроль за экспрессией многих протоонкогенов сильно ослабевает. С другой стороны, усиливается и процесс метилирования генов супрессоров опухолевого роста в конкретных тканях. Эти два разнонаправленных процесса вносят существенный вклад в разбалансировку системных процессов клеточной стабильности, что сказывается на нарушении взаимодействия генов в генных сетях. Подобные глобальные изменения являются основой образования опухолей разных локализаций, в том числе и РЯ [8]. На **рис. 1** приведены примеры влияния метилирования ДНК на уро-

вень экспрессии генов миРНК и генов, кодирующих белки, причем как онкогенных, так и опухоль-супрессорных при РЯ.

В нормальной ткани механизм метилирования ДНК это процесс эпигенетической регуляции экспрессии генов, не приводящий к изменению самой структуры гена, но блокирующий его транскрипцию. Следует отметить, что данный механизм не однороден и включает несколько вариантов. В данном обзоре мы рассматриваем вариант CpG-метилирования, который характеризуется присоединением метильной группы к остаткам цитозина в паре цитозин-гуанин (CG), с образованием 5-метилцитозина. В межгенных областях и в участках tandemных повторов генома человека CpG-области встречаются редко и, в основном, подвергаются метилированию. В случае гипометилирования таких участков может развиваться геномная нестабильность и потеря генного импринтинга, что в конечном итоге приводит к возникновению неопластических клеток [10]. С другой стороны, наиболее CpG-богатые участки генома – это промоторные области генов, которые часто плотно упакованы и образуют так называемые CpG-островки. В нормальной клетке эти участки, по большей части, не подвергаются метилированию, чтобы обеспечить транскрипцию генов. Аберрантное гиперметилирование этих CpG-островков может подавлять экспрессию генов, которые имеют решающее значение для гомеостаза клеток, целостности ДНК или стабильности генома, что приводит к развитию и прогрессии рака [11].

В нормальной клетке процесс метилирования ДНК осуществляется с участием генов семейства ДНК-метилтрансфераз (DNMTs), а именно *DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3a*, *DNMT3b* и *DNMTL*. Фермент DNMT1, ко-

дируемый одноимённым геном, обеспечивает сохранность метилирования геномной ДНК во время репликации клеток, с помощью повторения на вновь синтезированной цепи паттерна метилирования CpG-динуклеотидов матричной цепи. В то же время остальные члены семейства DNMT, в основном DNMT3a и DNMT3b, отвечают за запуск метилирования ДНК *de novo*, то есть прежде неметилированных последовательностей ДНК [12].

Следует отметить, что по вопросу взаимодействия генов семейства DNMT с другими генами и их взаимного влияния на изменение экспрессии и/или метилирования, приводящего к развитию РЯ за последние 10 лет в базе NCBI на 26 апреля 2022 г., найдена всего 31 печатная работа (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; поисковый запрос: ovarian AND cancer AND (methylation OR expression) AND dnmt). Среди данных работ нет результатов прямого влияния взаимодействующих генов на нарушение экспрессии генов семейства DNMT, гиперметилирование которых, в свою очередь, необратимо приводило бы к развитию РЯ. Однако, в случае сочетанной делеции в генах DNMT1 и DNMT3b, приводящей к их инактивации, значительно снижался уровень метилирования ДНК в сравнении с ситуацией, когда был «выключен» лишь один из этих двух генов [12].

С другой стороны, в ряде исследований отмечено, что аберрантное метилирование является важным фактором развития РЯ. В частности, в крупном исследовании при анализе генома с помощью секвенирования нового поколения, выявлено 2 взаимодействующих набора генов, для одного из которых показано снижение экспрессии при их гиперметилировании, а для другого набора картина была обратная [13]. Следует отме-

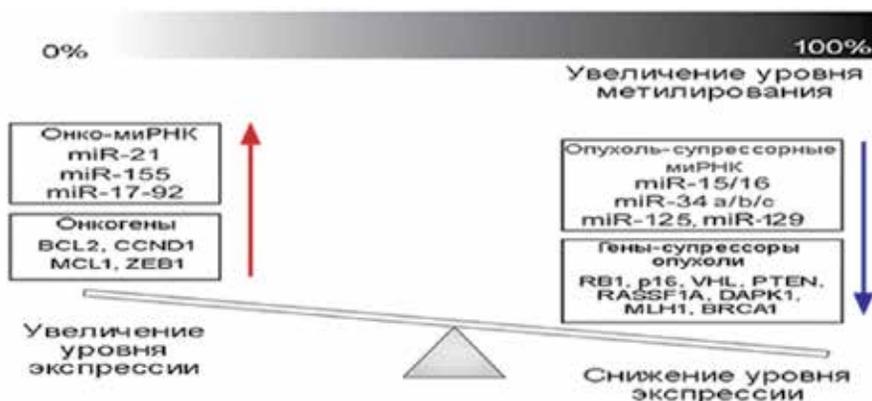


Рис. 1. Роль метилирования в регуляции экспрессии генов и миРНК при РЯ.

Fig. 1. The role of methylation in the regulation of gene and miRNA expression in OC.(ovarian cancer).

тить, что несмотря на общие закономерности в патогенезе многих опухолей, в том числе и РЯ, определяющая роль отводится метилированию как механизму инактивации генов супрессоров и/или активации протоонкогенов. В клинической практике без молекулярно-генетического анализа в современном мире практически невозможно определить триггеры инициации рака. Поэтому определение метилирования может помочь в точности постановки диагноза, включая определение не только типа опухоли и её гистологического подтипа, но также показатели прогрессии опухоли согласно современной классификации, что будет определять и тактику, и стратегию лечения конкретного пациента.

Большинство исследований посвящено изучению роли метилирования в регуляции экспрессии отдельных групп генов, участвующих в патогенезе разных видов рака, в том числе и РЯ. К ним относятся белок-кодирующие гены, гены миРНК и гены длинных некодирующих РНК. В частности, в одном из исследований отмечается прямая корреляция гиперметилирования днРНК *MEG3* с её пониженной экспрессией в опухолях РЯ. В то же время в гистологически нормальной парной ткани от тех же пациентов наблюдалась обратная картина [14]. В этой работе также отмечается вклад некоторых других днРНК в патогенез РЯ. Так показано, что уровень экспрессии днРНК *GAS5* в опухоли яичника был значительно снижен в сравнении с таковым в гистологически неизменённой парной ткани яичника. Кроме того, для данного гена выявлена корреляция с метастазированием. Дополнительно отмечалось, что при трансфекции нормально работающего *GAS5* в клетки РЯ запускался каскад процессов, приводящих к митохондриальному пути апоптоза за счёт усиления экспрессии генов белков Вах, Вак и каспаз 9/3.

Практический интерес представляет работа исследовательской группы из Китая. Учёным удалось подтвердить, что гиперметилирование генов *NCALD* и *LAM3* оказалось связано не только с неблагоприятным прогнозом у пациентов с серозным подтипом РЯ, но и с устойчивостью к химиотерапии [15].

Таким образом, на сегодняшний день результаты о роли aberrантного метилирования в патогенезе РЯ остаются противоречивыми и требуются дополнительные исследования, которые могли бы прояснить закономерности механизма aberrантного метилирования в патогенезе РЯ.

Класс длинных некодирующих РНК. Их классификация и функции. Все метаболические процессы в нормальной клетке контролируются сложной и многосту-

пенчатой системой генных взаимодействий, где каждый элемент отвечает за свой процесс. В этой сложной системе взаимодействий выделяют 2 группы элементов. К одной относят гены, кодирующие белки, к другой – гены, не дающие белкового продукта. Таким образом, можно выделить производственные гены и регуляторные. Класс регуляторных генов насчитывает значительное количество подклассов, из которых наибольший интерес представляют два: миРНК и днРНК [16, 17]. Основным критерием различия миРНК от днРНК условно считается их длина: длинные (примерно от 200 до десятков тысяч нуклеотидов) и короткие (20-35 нуклеотидов) [18]. Следует отметить, что для миРНК установлена ключевая роль в пост-транскрипционной регуляции экспрессии генов. Несмотря на незначительное регуляторное воздействие (одна миРНК изменяет экспрессию гена-мишени не более, чем в 2-2.5 раза), ученые возложили на них роль “главных регуляторов” сигнальных каскадов в клетке. Считается, что миРНК контролируют экспрессию около 50% белок-кодирующих генов (БКГ) и вовлечены в регуляцию многих жизненно важных процессов клеточной активности: пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, адгезию, эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и метастазирование, что подтверждается исследованиями опухолей различного происхождения, включая РЯ [19]. В последние годы актуальными стали процессы регуляции самих миРНК, в частности влияние метилирования их промоторов на экспрессию генов миРНК, а также роль недавно открытых длинных нкРНК (lncRNA, днРНК) и циркулирующих нкРНК [20, 21]. С применением технологии секвенирования нового поколения (NGS) выяснилось, что большая часть генома представлена днРНК, а их количество превышает 100 тысяч. Это больше, чем сумма всех известных БКГ и миРНК [22]. Известно, что молекулы днРНК не кодируют белки, так как они не имеют открытой рамки считывания достаточной длины. Как правило, эволюционная сохранность всей последовательности днРНК значительно меньше, чем у генов, кодирующих белки, но выше, чем у не транскрибируемых областей генома. Более того, структура промоторных областей генов днРНК такая же, как и в генах кодирующих белки, и направленная ими экспрессия днРНК является высокоспецифичной для тканей [23].

Молекулы днРНК имеют длину более 200 оснований, подвергаются транскрипции РНК-полимеразой II и полиаденилированию на 5' и 3' концах, соответственно [23]. Последовательности, кодирующие днРНК, могут быть расположены в межгенных областях,

в интронах или частично перекрывающихся экзонах как на прямой, так и на обратной цепях ДНК. На основании этого принципа их можно разделить на 5 подклассов: смысловые, антисмысловые, двунаправленные, межгенные и интронные (рис. 2).

днРНК участвуют в самых разных процессах: от модификации гистонов и ремоделирования хроматина до регуляции транскрипционных и посттранскрипционных процессов (рис. 3). Они могут быть энхансерами, «губками», которые связывают несколько миРНК, или даже предшественниками некоторых миРНК [20]. Аномальная экспрессия днРНК, в частности онкогенных днРНК, приводит к нарушениям в клеточных сигнальных каскадах, которые могут стимулировать пролиферацию клеток и способствовать прогрессии опухоли и метастазированию. Таким образом, днРНК по праву можно считать эпигенетическими модификаторами и регуляторами. В частности, интересными представляются данные о функциональном значении днРНК HOTAIR. Наиболее изученная днРНК HOTAIR была первой днРНК, для которой показано её взаимодействие с белками, регулируемыми динамические обратимые изменения в активации хроматина. Для данной днРНК показано большое число взаимодействий с генами различных путей при онкологии [14].

Следует отметить, что для всех генов днРНК так же как, и для генов миРНК, а также мРНК справедливо разделение всех генов на гены, провоцирующие развитие опухоли (протоонкогены) и гены, подавляющие такое развитие (гены-супрессоры опухолевого роста). Следующие главы посвящены анализу днРНК с точки зрения именно такого принципа разделения.

Длинные нкРНК, проявляющие свойства онкогенов при раке яичников. Анализ многих исследований выявил увеличение экспрессии ряда днРНК в клеточных линиях и опухолевых тканях РЯ – онкогенные днРНК, задействованные в процессах миграции, инвазии, ЭМП и метастазирования [14]. Наибольший интерес представляют исследования, в которых ряд днРНК был изучен в составе так называемой оси днРНК/миРНК/мРНК, где описаны днРНК как регуляторы этих осей и это взаимодействие при нарушении даже одного элемента оси стало критическим фактором развития РЯ [24, 25]. В частности, ниже рассмотрены примеры днРНК, проявляющих онкогенные свойства, а также их участие в инициации и прогрессии РЯ.

В ряде исследований отмечается онкогенная роль днРНК CCAT1 (Colon Cancer-Associated Transcript-1). Показано, что, эта днРНК, как типичный протоонкоген, гиперэкспрессируется в тканях и клеточных линиях

РЯ. Результат показал, что уровень гиперэкспрессии CCAT1 коррелировал со стадией опухолевого процесса, гистологическим статусом опухоли, метастазированием в лимфатические узлы и более короткой выживаемостью и определялся как независимый прогностический фактор [26]. Повышенная экспрессия CCAT1 способствовала миграции и инвазии клеток, стимулировала ЭМП, а также снижала экспрессию E-кадгерина (эпителиальный маркер) и повышала экспрессию виментина и N-кадгерина (мезенхимальные маркеры) [27]. С помощью ряда методов, в частности, трансфекции, вестерн-блоттинга и люциферазного метода, было показано, что в качестве мишеней днРНК CCAT1 выступают миРНК miR-152 и miR-130b [26]. Кроме того, таким же образом было показано, что мишенями miR-152 являются мРНК генов *ADAM17* и *WNT1*, а miR-130b – транскрипционные факторы *STAT1* и *ZEB1*. Участки связывания миРНК miR-152 и miR-130b были идентифицированы в 3'-UTR вышеперечисленных генов, а также в днРНК CCAT1 [26]. Таким образом, в данной работе были идентифицированы 4 пути: CCAT1/miR-152/ADAM17 (WNT1) и CCAT1/miR-130b/STAT3 (ZEB1). Последующие исследования подтвердили участие днРНК CCAT1 в эпителиально-мезенхимальном переходе (ЭМП), миграции, инвазии, метастазировании, и ее связь с тяжелыми стадиями опухолевого процесса и плохой выживаемостью [27, 28]. Было подтверждено прямое взаимодействие CCAT1 и/или TG-

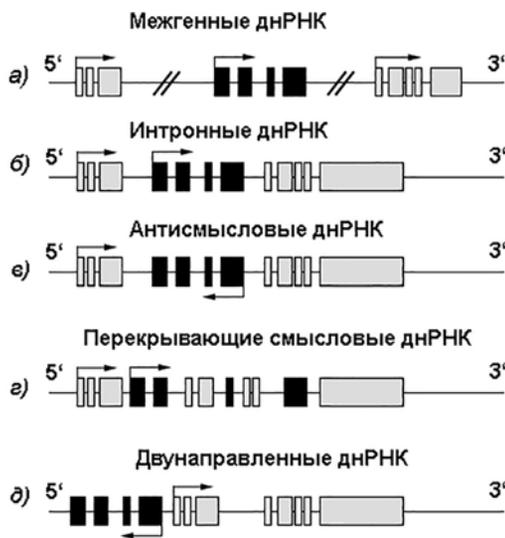


Рис. 2. Классификация днРНК. Светло-серым обозначены белок-кодирующие гены, черным – гены днРНК.

Fig. 2. Classification of dnRNAs. Protein-coding genes are shown in light gray, and lncRNA genes are shown in black.

FB1 с миРНК miR-490-3p [29], а также между CCAT1, miR-454 и BIRC5 [28]. В этих работах показано также, что днРНК CCAT1 оказывает подавляющее действие на химиорезистентность к цисплатину *in vitro* и *in vivo* [28].

Другой интересной днРНК является HOTAIR (HOX transcript antisense intergenic RNA), которая кодируется геном, расположенным в кластере генов homeobox C на хромосоме 12 и имеет длину 2,2 тысяч пар нуклеотидов. Было показано, что экспрессия HOTAIR повышается в клеточных линиях РЯ, а ее подавление ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию в клеточной линии SKOV3 [30]. В этом же исследовании с помощью биоинформатического анализа бы-

ла предсказана связь между днРНК HOTAIR и мРНК гена MAPK1, через конкурентное связывание с miR-1, miR-214-3p и miR-330-5p, и эта связь была выявлена с применением различных методов, включая qRT-PCR и вестерн-блоттинг и подтверждена с применением прямого люциферазного метода. Было показано, что подавление экспрессии HOTAIR увеличивает экспрессию miR-1, miR-214-3p или miR-330-5p, а также ингибирует пролиферацию, миграцию и инвазию в клетках SKOV3 [30]. В дальнейшем были получены убедительные данные, доказывающие онкогенный характер днРНК HOTAIR, и были выявлены новые пути, через которые эта днРНК способствует пролиферации,

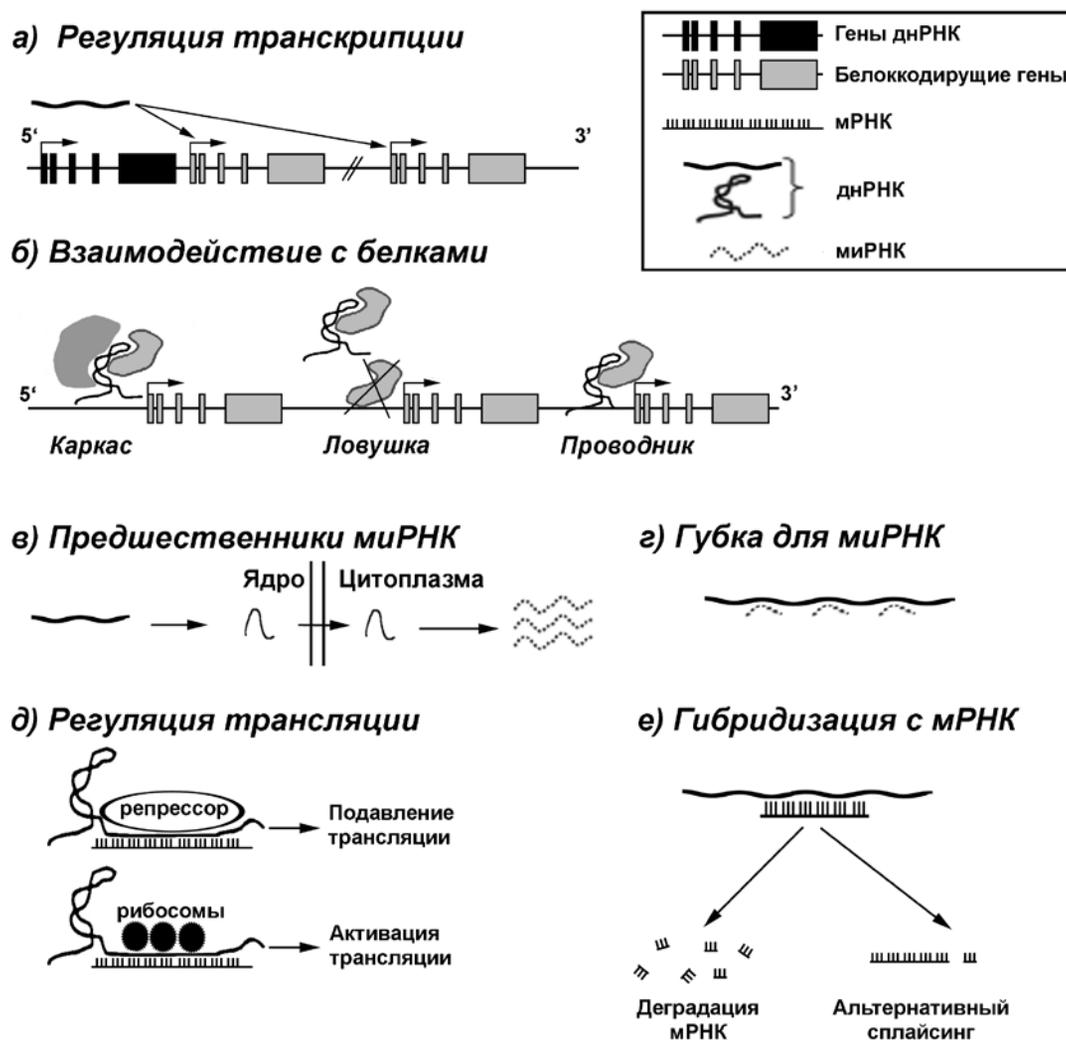


Рис. 3. Механизмы и функции днРНК.

Fig. 3. Mechanisms and functions of lncRNA.

миграции и инвазии клеток РЯ. Новая ось HOTAIR/miR-214(miR-217)/PIK3R3 также была валидирована с использованием комплекса методов, включая двойную люциферазную тест-систему [31]. Ещё в одном исследовании было изучено влияние HOTAIR на прогрессию и метастазирование клеток РЯ с использованием анализа экспрессии и двойной люциферазной тест-системы и найдена новая ось HOTAIR/miR-373/RAB22A [32]. При анализе прогрессии и метастазирования РЯ была выявлена ещё одна ось, HOTAIR/miR-206/CCND1 (CCND2), которая доказывает важную регуляторную роль днРНК HOTAIR при РЯ [33]. Многочисленные примеры влияния днРНК HOTAIR на уровень экспрессии ряда онкогенных белков при посредничестве миРНК приведены на **рис. 4**.

При исследовании закономерностей в процессе пластичной реверсии ЭМП-МЭП была обнаружена ось HOTAIR/miR-200c/SNAI1, участвующая, как выяснилось, в инвазии РЯ. Данная ось была продемонстрирована с использованием генной конструкции на основе лентивируса и миРНК miR-200c с применением не только уже частично упоминавшихся ранее методов, но и ряда других [34]. Интересными представляются результаты исследования, в котором выявлена корреляция между супрессорной miR-138-5p, которая экспрессируется только в яичниках, и днРНК HOTAIR, которая подавляет экспрессию данной миРНК. Отме-

тим, что днРНК HOTAIR действует как губка для miR-138-5p и конкурирует за связывание с 3'-нетранслируемыми областями (3'-untranslated region, 3'-UTR) генов *EZH2* и *SIRT1*, что было подтверждено с использованием двойной люциферазной тест-системы [35]. Кроме того, с использованием цисплатин-резистентных клеточных линий РЯ было показано, что гиперэкспрессия HOTAIR снижает химиочувствительность клеток РЯ к цисплатину через оси HOTAIR/miR-138-5p/*EZH2* и HOTAIR/miR-138-5p/*SIRT1* [35].

Крайне перспективными представляются результаты исследования механизма образования сферических кластеров стволовыми клетками опухоли. Данный механизм является адаптивным и позволяет клеткам опухоли избегать апоптоза. По результатам исследования выяснилось участие днРНК HOTAIR в этом процессе. Было обнаружено увеличение экспрессии HOTAIR в клетках РЯ. На клеточных линиях, соответствующих стволовым клеткам опухоли, с помощью подавления экспрессии данной днРНК удалось снизить злокачественный потенциал опухолевых клеток, нарушить механизм образования сферических кластеров, а также уменьшить устойчивость к цисплатину. Была выявлена и соответствующая ось HOTAIR/miR-206/*TBX3*, которая была подтверждена с помощью современных методов исследования. Данная находка может стать важным шагом к повышению эффективности лечения РЯ

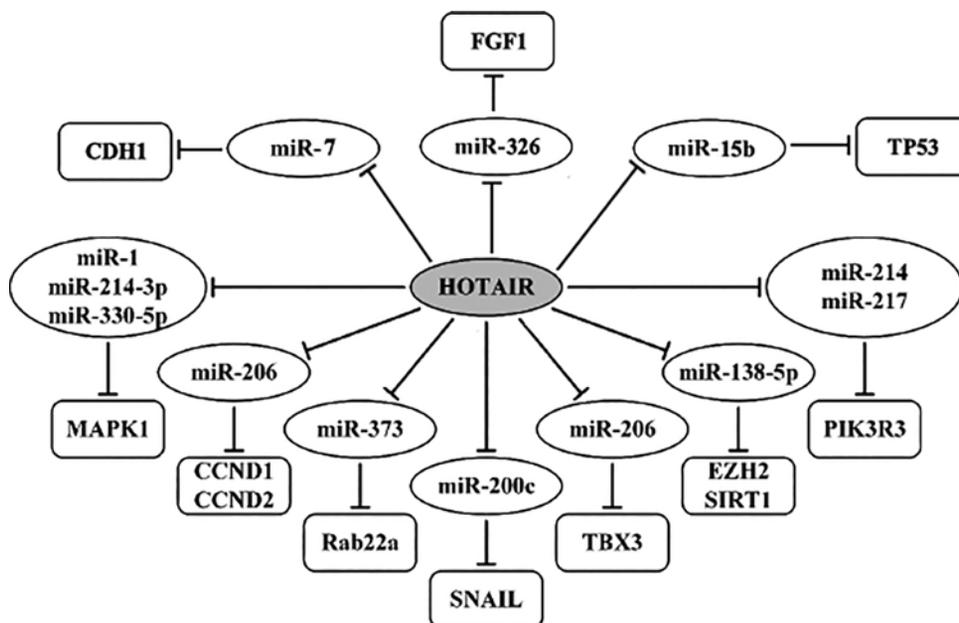


Рис. 4. Примеры путей регулируемых днРНК HOTAIR. Тупые стрелки указывают на ингибирование экспрессии миРНК или гена (белка).

Fig. 4. Examples of HOTAIR regulated lncRNA pathways. Blunt arrows indicate inhibition of miRNA or gene (protein) expression.

при условии дополнительных данных о других осях подобного рода и пониманию всего механизма развития опухоли яичников [36].

Ещё одной днРНК, которую мы рассмотрим в данном разделе, будет днРНК MALAT1 (*Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*). Во многих исследованиях отмечается участие этой днРНК в патогенезе различных видов рака, в том числе РЯ [37]. Было проведено исследование механизма ухода от апоптоза клетками РЯ. В результате исследования была обнаружена и подтверждена с помощью современных методов ось MALAT1/miR-506/PPP1R13L(iASPP) [38]. С помощью двойного люциферазного теста удалось установить множественные сайты связывания миРНК miR-506 с днРНК MALAT1 и с 3'-нетранслируемой областью гена iASPP/PPP1R13L. Благодаря этому удалось установить, что после повреждения ДНК ген iASPP позволил клеткам уйти от апоптоза, а также выявилось, что MALAT1 усиливал этот процесс и позволил стимулировать синтез ДНК в клетках РЯ через ось MALAT1/miR-506/iASPP [38]. Таким образом, можно говорить о конвергентном действии двух генов, что позволяет более ясно представлять механизм ухода от апоптоза клетками опухоли.

При исследовании адаптивных возможностей клеточных линий РЯ, было показано, что гиперэкспрессия днРНК MALAT1 усиливала жизнеспособность, миграцию и инвазию клеточных линий РЯ и была связана с метастазированием и низкой общей выживаемостью [39]. Исследование показало, что MALAT1 осуществляет свою негативную регуляцию через прямое связывание с miR-200c, что было подтверждено с помощью люциферазного анализа [39].

Еще одна ось, которая также участвует в стимуляции пролиферации, миграции и росте ксенотрансплантата РЯ, показана в работе Тао F. и соавт. [40]. Это ось MALAT1/miR-211/PHF19, которая была валидирована с помощью двойной люциферазной тест-системы и вестерн-блоттинга. Показано прямое связывание миРНК miR-211 с MALAT1 и с мРНК гена *PHF19*. При этом подтверждено, что MALAT1 может связывать и ингибировать miR-211, тем самым повышать экспрессию *PHF19*, что усиливает прогрессию РЯ [40].

Следует также отметить отрицательную корреляцию между уровнем экспрессии MALAT1 и miR-503-5p в клетках РЯ, прямое связывание которых было подтверждено с помощью двойной люциферазной тест-системы и РНК-pull-down анализа [41]. Показано, что гиперэкспрессия MALAT1 связана с активацией белков p-JAK и p-STAT3 через оси MALAT1/miR-503-5p/JAK и MALAT1/miR-503-5p/STAT3, что приводит к пода-

влению апоптоза и высокой пролиферативной активности клеток РЯ [41].

Онкосупрессорные днРНК и роль метилирования в их инактивации. ДнРНК, подобно миРНК и генам, кодирующим белки, могут проявлять как опухоль стимулирующий, так и опухоль ингибирующий эффект в клетках РЯ. Большинство супрессорных днРНК участвуют в сдерживании и подавлении прогрессии РЯ, миграции, инвазии, ЭМП и метастазирования. Супрессорные днРНК подавляют экспрессию и функциональную активность онкогенных миРНК, с которыми они непосредственно связываются, что в дальнейшем приводит к повышению уровня мРНК-мишени гена-супрессора и кодируемого им белка.

Противоречивым механизмом действия обладает днРНК MEG3. По данным различных работ это может быть связано с двойственным поведением этой днРНК или с различием экспериментальных подходов. Так, было показано, что днРНК MEG3 гиперэкспрессируется в клетках РЯ [42]. В этой работе путь MEG3/miR-421/PDGFR α был валидирован с помощью метода анализа люциферазных репортеров. Предполагается, что высокая экспрессия MEG3 индуцирует пролиферацию опухолевых клеток, инвазию, метастазирование и ангиогенез через этот путь. Предложен антибиотик анизомицин в качестве ингибитора влияния MEG3 и PDGFR α на ангиогенез и прогрессию РЯ [42]. Напротив, недавно показано снижение экспрессии MEG3 в клеточных линиях и тканях РЯ, и способность MEG3 уменьшать миграцию и инвазию опухоли [43]. Супрессорная функция MEG3, реализуемая взаимодействием с онкогенной miR-205-5p, была подтверждена с помощью анализа люциферазного репортера [43]. На основании данных об ингибировании экспрессии мРНК гена PTEN, являющегося мишенью miR-205-5p, [44] и последних данных из работы Тао P. и соавт. [43], мы можем предположить, что MEG3 участвует в ингибировании роста, миграции и инвазии клеток опухоли, а также в развитии апоптоза в клетках РЯ через путь MEG3/miR-205-5p/PTEN.

Эпигенетическое подавление генов-супрессоров опухолей путем метилирования в настоящее время вызывает все больший интерес применительно к исследованиям рака. Как было описано выше, в опухолевых клетках РЯ наблюдается снижение или полное отсутствие экспрессии днРНК MEG3. Причем, снижение экспрессии коррелирует со стадией заболевания. Было показано, что промоторная область гена *MEG3* была гиперметилована в более чем 60% клинических образцов и в 100% клеточных линий РЯ. Использование деметилирующего агента 5-аза-2'-дезоксиди-

тидина приводило к деметилированию этой области в клеточных линиях, причем с увеличением дозы эффективность реакции увеличивалась. Это может говорить о том, что гиперметилирование промоторной области MEG3 отрицательно коррелирует с экспрессией днРНК MEG3 при РЯ. Исследования на других видах онкологии доказывают, что пониженная регуляция или потеря экспрессии днРНК MEG3 согласуется с аномальным метилированием промотора MEG3 при различных типах рака, в частности менингиомах и нейробластомах. Напротив, MEG3 экспрессируется во многих нормальных тканях человека, промоторные области CpG-островков которых не подвергаются гиперметилированию. Эти исследования показывают, что инактивация гена MEG3 и снижение экспрессии днРНК MEG3 в этих опухолях частично являются результатом подавления промоторной области гена MEG3 путем гиперметилирования [45].

Особое внимание обращает на себя днРНК ZNF667-AS1, ген которой расположен в области хромосомы 19q13.43. Молекулярная функция ZNF667-AS1 остается мало изученной, однако ZNF667-AS1 преимущественно экспрессируется в цитоплазме клетки и может участвовать в регуляции трансляции белка посредством взаимодействия с РНК-связывающими белками. Показано [46], что инактивация ZNF667-AS1 происходит еще до злокачественной трансформации клетки, на этапе ее иммортализации, в результате метилирования ее промотора (рис. 5). Это было подкреплено способностью ингибитора ДНК-метилтрансферазы, 5-аза-2-дезоксцитидина, реактивировать экспрессию ZNF667-AS1 [46]. ZNF667-AS1 была исследована в образцах

пациентов с РЯ с использованием нескольких молекулярных методов [47]. В работе Chen X. и соавт. было показано, что экспрессия днРНК ZNF667-AS1 снижена, а miR-21 повышена в опухолевых тканях по сравнению с соседними здоровыми тканями пациентов с РЯ [48]. Похожие изменения в уровне экспрессии ZNF667-AS1 наблюдались у пациентов с раком молочной железы, толстой кишки, раком желудка и увеальной меланомы [49-52]. Эти исследования показывают, что гиперметилирование промотора может быть одним из механизмов, приводящих к подавлению ZNF667-AS1 при раке и может рассматриваться в качестве потенциального диагностического маркера.

Длинные нкРНК и их практическое применение.

На сегодняшний день стандартное лечение прогрессирующего РЯ включает циторедуктивную хирургию и химиотерапию препаратами платины (цисплатин или карбоплатин) и таксанами (паклитакселом). Однако лечение ограничено в основном формированием резистентности к химиотерапии [53]. Кроме того, почти 30% пациентов с РЯ проявляют внутреннюю химиорезистентность и имеют плохой прогноз [54]. Поэтому для преодоления этой проблемы требуется более подробное изучение основных механизмов химиорезистентности.

Экспериментальные результаты показали, что такие факторы, как снижение внутриклеточной концентрации препарата, активация или инактивация цисплатина антиоксидантными системами, повышение способности к репарации ДНК и дефекты в сигнальных путях способствуют резистентности к цисплатину при РЯ [55, 56]. Исследования показали, что днРНК

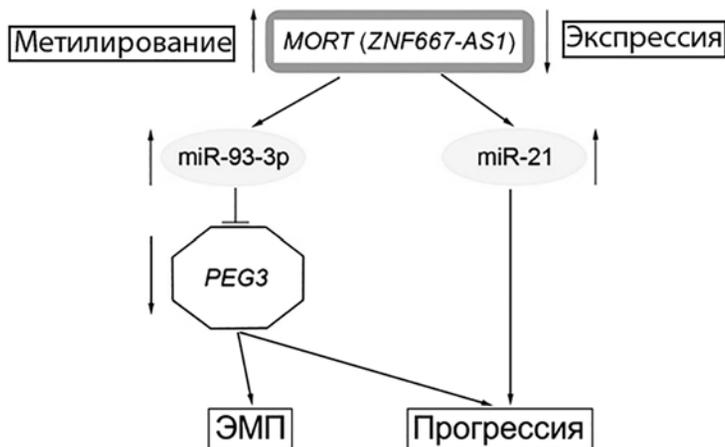


Рис. 5. Роль онко-супрессорной гиперметилированной днРНК MORT (ZNF667-AS1) при раке яичников.

Fig. 5. Role of onco-suppressor hypermethylated lncRNA MORT (ZNF667-AS1) in ovarian cancer.

могут регулировать клеточный ответ на повреждение ДНК, включая реакцию на введение препаратов платины, на посттранскрипционном уровне [57]. Таким образом, днРНК могут играть важную роль в устойчивости к цисплатину.

Новым интересным открытием для неинвазивной диагностики рака стали экзосомальные днРНК, которые могут действовать как мессенджеры при межклеточных взаимодействиях [58]. Экзосомы представляют собой внеклеточные везикулы диаметром 40-100 нм с двухслойной липидной структурой. Процесс образования экзосом в основном зависит от эндоцитоза клеточной мембраны для образования эндосом. Экзосомы содержат большое количество нуклеиновых кислот (ДНК и РНК, включая мРНК, миРНК и днРНК), белков и липидов, и тем самым воздействуют на клетки-реципиенты, перенося эти вещества [59]. Эти внеклеточные пузырьки встречаются в различных жидкостях организма, включая кровь, слезу, мочу, слюну, молоко кормящей женщины, асцит и т.д. [60]. Раковые клетки выделяют больше экзосом, чем нормальные клетки, и биологическая информация о раке может быть получена непосредственно путем анализа экзосом, полученных из опухоли [61]. Экзосомы участвуют в критических процессах развития рака, включая рост опухоли, метастазирование, лекарственную устойчивость и микроокружение опухоли [61]. Экзосомальные днРНК по-разному экспрессируются при многих видах рака, в том числе и при раке яичников, что позволяет предположить, что они могут таким образом показывать физиологический и патологический статус их родительских клеток [62]. Более того, в нескольких исследованиях сообщалось о существенных различиях в профиле экспрессии экзосомальных днРНК у здоровых людей и онкологических больных [62], а также среди онкологических больных на разных стадиях заболевания [63].

Обнаружить экзосомальные днРНК можно с помощью «жидкой» биопсии. По сравнению с традиционной биопсией она широко используется в качестве неинвазивной диагностики и технологии молекулярного фенотипирования для выявления ранних стадий рака. Жидкая биопсия также была предложена для определения динамики опухоли и может предоставить диагностическую и прогностическую информацию до лечения, во время лечения и во время прогрессирования [64, 65]. Как известно, идеальный биомаркер рака должен соответствовать следующим критериям: идентифицировать подтип рака, стадию заболевания, наиболее эффективную терапию и прогнозировать/обнаруживать рецидивы опухоли. Кроме

того, он должен быть обнаружен неинвазивным методом, применимым в клинической практике. Благодаря своей специфичности днРНК, обнаруживаемые в жидкостях организма, потенциально могут соответствовать этим ожиданиям.

Взаимосвязь между экзосомальной днРНК и прогрессированием раковых заболеваний, а также выделение экзосом из жидких биопсий делают полученные из экзосом днРНК отличными кандидатами в качестве потенциальных диагностических и прогностических биомаркеров различных видов рака, в том числе и РЯ [63, 65, 66].

Заключение

Рак яичников развивается бессимптомно вплоть до поздних стадий и характеризуется обширным метастазированием, химиорезистентностью и плохим прогнозом. Метастазирование при РЯ преимущественно перитонеальное, с образованием асцита, и его главной особенностью является отсутствие барьера между первичной опухолью и брюшной полостью. Важную роль в метастазировании РЯ играет ЭМП-переход от неподвижной поляризованной эпителиальной клетки, связанной с окружающей средой, к подвижной клетке с мезенхимальной морфологией.

Роль миРНК как «главного регулятора» сигнальных каскадов в клетке широко известна, в том числе и при РЯ. Однако недавнее открытие около 100 тысяч молекул днРНК, обладающих различными, но, в первую очередь, регуляторными функциями, привлекло внимание исследователей, и число соответствующих публикаций резко возросло.

Механизм действия днРНК как эндогенных РНК, конкурирующих с мРНК белок-кодирующих генов за связывание с миРНК, получил широкое признание как один из ключевых в опухолях с различной локализацией, включая РЯ.

Помимо механизма конкурентного связывания миРНК, широко распространены альтернативные механизмы прямого воздействия днРНК на мРНК или белок. Более того, некоторые днРНК (MALAT1 и др.), действуют в обоих режимах: с и без посредничества миРНК, но при этом регулируют различные мишени.

Неоднозначность действия миРНК хорошо известна — в зависимости от клеточного контекста они могут проявлять как онкогенные, так и супрессорные свойства. Двойственность поведения обнаруживается и для некоторых днРНК.

Значительная часть днРНК влияет на ключевые пути метастазирования РЯ и эпителиально-мезенхимальный переход. Более того, как онкосупрессорные,

так и онкогенные днРНК влияют почти на весь набор ключевых путей, имеющих в клетке. Кроме того, белки, на экспрессию которых прямо или косвенно влияют днРНК, также связаны сразу со многими сигнальными путями. При этом днРНК могут быть предикторами прогноза выживаемости и/или факторами ответа на терапию у пациентов с РЯ.

Имеется множество примеров участия ДНК-метилирования в регуляции генов кодирующих и некодирующих белки, включая мРНК и днРНК, что отражается на протекании процессов в развитии и прогрессии РЯ. Более того, ДНК-метилирование представляется перспективным биомаркером для диагностики и прогноза ответа на терапию РЯ.

Пересечения взаимодействий днРНК и миРНК с мРНК БКГ и с процессами эпигенетической регуляции их генов посредством ДНК-метилирования составляют многослойные регуляторные сети, выяснение которых критичная задача современной биологии.

Изучение свойств днРНК и ДНК-метилирования – источник улучшения прогноза, общей выживаемости и качества жизни пациенток с РЯ, источник принципиально новых биомаркеров, а также путь к таргетной терапии и персонализированному лечению этого социально значимого заболевания. Отмечена перспективность экзосомальных днРНК, выделенных из жидких биопсий.

Литература/References

- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3): 209-49. doi: 10.3322/caac.21660. PMID: 33538338
- Vogell A., Evans M.L. Cancer Screening in Women. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2019; 46(3): 485-99. doi: 10.1016/j.ogc.2019.04.007. PMID: 31378290
- Gaona-Luviano P., Medina-Gaona L.A., Magaña-Pérez K. Epidemiology of ovarian cancer. *Chin Clin Oncol.* 2020; 9(4): 47. doi: 10.21037/cco-20-34. PMID: 32648448
- Klymenko Y., Nephew K.P. Epigenetic Crosstalk between the Tumor Microenvironment and Ovarian Cancer Cells: A Therapeutic Road Less Traveled. *Cancers (Basel).* 2018; 10(9): 295. doi: 10.3390/cancers10090295. PMID: 30200265; PMCID: PMC6162502
- Beer mann J., Piccoli M.T., Viereck J., Thum T. Non-coding RNAs in Development and Disease: Background, Mechanisms, and Therapeutic Approaches. *Physiol Rev.* 2016; 96(4): 1297-325. doi: 10.1152/physrev.00041.2015. PMID: 27535639
- Wang J.Y., Lu A.Q., Chen L.J. LncRNAs in ovarian cancer. *Clin Chim Acta.* 2019; 490: 17-27. doi: 10.1016/j.cca.2018.12.013. PMID: 30553863
- Biswas S., Rao C.M. Epigenetics in cancer: Fundamentals and Beyond. *Pharmacol Ther.* 2017; 173: 118-34. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.011. PMID: 28188812
- Jung M., Pfeifer G.P. Aging and DNA methylation. *BMC Biol.* 2015; 13: 7. doi: 10.1186/s12915-015-0118-4. PMID: 25637097; PMCID: PMC4311512
- Lillicrop K.A., Burdge G.C. Epigenetic mechanisms linking early nutrition to long term health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012; 26(5): 667-76. doi: 10.1016/j.beem.2012.03.009. PMID: 22980048
- Bakshi A., Bretz C.L., Cain T.L., Kim J. Intergenic and intronic DNA hypomethylated regions as putative regulators of imprinted domains. *Epigenomics.* 2018; 10(4): 445-61. doi: 10.2217/epi-2017-0125. PMID: 29569934; PMCID: PMC5925440
- Pfeifer G.P. Defining Driver DNA Methylation Changes in Human Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(4): 1166. doi: 10.3390/ijms19041166. PMID: 29649096; PMCID: PMC5979276
- Lyko F. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet.* 2018; 19(2): 81-92. doi: 10.1038/nrg.2017.80. PMID: 29033456
- Gong G., Lin T., Yuan Y. Integrated analysis of gene expression and DNA methylation profiles in ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 2020; 13(1): 30. doi: 10.1186/s13048-020-00632-9. PMID: 32192517; PMCID: PMC7082962
- Oncul S., Amero P., Rodriguez-Aguayo C., Calin G.A., Sood A.K., Lopez-Berestein G. Long non-coding RNAs in ovarian cancer: expression profile and functional spectrum. *RNA Biol.* 2020; 17(11): 1523-34. doi: 10.1080/15476286.2019.1702283. PMID: 31847695; PMCID: PMC7567512
- Feng L.Y., Yan B.B., Huang Y.Z., Li L. Abnormal methylation characteristics predict chemoresistance and poor prognosis in advanced high-grade serous ovarian cancer. *Clin Epigenetics.* 2021; 13(1): 141. doi: 10.1186/s13148-021-01133-2. PMID: 34289901; PMCID: PMC8296752
- Yang D., Sun L., Li Z., Gao P. Noncoding RNAs in Regulation of Cancer Metabolic Reprogramming. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 927: 191-215. doi: 10.1007/978-981-10-1498-7_7. PMID: 27376736
- Wei J.W., Huang K., Yang C., Kang C.S. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncol Rep.* 2017; 37(1):3-9. doi: 10.3892/or.2016.5236. PMID: 27841002
- Hombach S., Kretz M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 937: 3-17. doi: 10.1007/978-3-319-42059-2_1. PMID: 27573892
- Deb B., Uddin A., Chakraborty S. miRNAs and ovarian cancer: An overview. *J Cell. Physiol.* 2018; (233): 3846-54. doi: 10.1002/jcp.26095. PMID: 28703277
- Sanchez Calle A., Kawamura Y., Yamamoto Y., Takeshita F., Ochiya T. Emerging roles of long non-coding RNA in cancer. *Cancer Sci.* 2018; 109(7): 2093-100. doi: 10.1111/cas.13642. PMID: 29774630; PMCID: PMC6029823
- Zhao X., Cai Y., Xu J. Circular RNAs: Biogenesis, Mechanism, and Function in Human Cancers. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(16): 3926. doi: 10.3390/ijms20163926. PMID: 31412535; PMCID: PMC6720291
- Zhang X., Wang W., Zhu W., Dong J., Cheng Y., Yin Z., Shen F. Mechanisms and Functions of Long Non-Coding RNAs at Multiple Regulatory Levels. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(22): 5573. doi: 10.3390/ijms20225573. PMID: 31717266; PMCID: PMC6888083
- Quinn J.J., Chang H.Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet.* 2016; 17(1): 47-62. doi: 10.1038/nrg.2015.10. PMID: 26666209

24. Wasson M.D., Brown J.M., Venkatesh J., Fernando W., Marcato P. Datasets exploring putative lncRNA-miRNA-mRNA axes in breast cancer cell lines. *Data Brief*. 2021; 37: 107241. doi: 10.1016/j.dib.2021.107241. PMID: 34235238; PMCID: PMC8250161
25. Shetty A., Venkatesh T., Kabbekodu S.P., Tsutsumi R., Suresh P.S. LncRNA-miRNA-mRNA regulatory axes in endometrial cancer: a comprehensive overview. *Arch Gynecol Obstet*. 2022. doi: 10.1007/s00404-022-06423-5. PMID: 35182183
26. Cao Y., Shi H., Ren F., Jia Y., Zhang R. Long non-coding RNA CCAT1 promotes metastasis and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Exp Cell Res*. 2017; 359(1): 185-94. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.07.030. PMID: 28754469
27. Seborova K., Vaclavikova R., Rob L., Soucek P., Vodicka P. Non-Coding RNAs as Biomarkers of Tumor Progression and Metastatic Spread in Epithelial Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021; 13(8): 1839. doi: 10.3390/cancers13081839. PMID: 33921525; PMCID: PMC8069230
28. Wang D.Y., Li N., Cui Y.L. Long Non-coding RNA CCAT1 Sponges miR-454 to Promote Chemoresistance of Ovarian Cancer Cells to Cisplatin by Regulation of Surviving. *Cancer Res Treat*. 2020; 52(3): 798-814. doi: 10.4143/crt.2019.498. PMID: 32124583; PMCID: PMC7373880
29. Mu Y., Li N., Cui Y.L. The lncRNA CCAT1 upregulates TGFβ1 via sponging miR-490-3p to promote TGFβ1-induced EMT of ovarian cancer cells. *Cancer Cell Int*. 2018; 18: 145. doi: 10.1186/s12935-018-0604-1. PMID: 30250403; PMCID: PMC6148998
30. Yiwei T., Hua H., Hui G., Mao M., Xiang L. HOTAIR Interacting with MAPK1 Regulates Ovarian Cancer Cell Proliferation, Migration, and Invasion. *Med Sci Monit*. 2015; 21: 1856-63. doi: 10.12659/MSM.893528. PMID: 26117268; PMCID: PMC4489685.
31. López-Camarillo C., Ruiz-García E., Salinas-Vera Y.M., Silva-Cázares M.B., Hernández-de la Cruz O.N., Marchat L.A., et al. Deciphering the Long Non-Coding RNAs and MicroRNAs Coregulation Networks in Ovarian Cancer Development: An Overview. *Cells*. 2021; 10(6): 1407. doi: 10.3390/cells10061407. PMID: 34204094; PMCID: PMC8227049
32. Xin X., Li Q., Fang J., Zhao T. LncRNA HOTAIR: A Potential Prognostic Factor and Therapeutic Target in Human Cancers. *Front Oncol*. 2021; 11: 679244. doi: 10.3389/fonc.2021.679244. PMID: 34367966; PMCID: PMC8340021
33. Chang L., Guo R., Yuan Z., Shi H., Zhang D. LncRNA HOTAIR Regulates CCND1 and CCND2 Expression by Sponging miR-206 in Ovarian Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2018; 49(4): 1289-303. doi: 10.1159/000493408. PMID: 30205383
34. Yang C., Li H., Zhang T., Chu Y., Chen D., Zuo J. miR-200c overexpression inhibits the invasion and tumorigenicity of epithelial ovarian cancer cells by suppressing lncRNA HOTAIR in mice. *J Cell Biochem*. 2020; 121(2): 1514-23. doi: 10.1002/jcb.29387. PMID: 31535411
35. Zhang Y., Ai H., Fan X., Chen S., Wang Y., Liu L. Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR reverses cisplatin resistance of ovarian cancer cells through inhibiting miR-138-5p-regulated EZH2 and SIRT1. *Biol Res*. 2020; 53(1): 18. doi: 10.1186/s40659-020-00286-3. PMID: 32349783; PMCID: PMC7191713
36. Zhang Y., Guo J., Cai E., Cai J., Wen Y., Lu S., et al. HOTAIR maintains the stemness of ovarian cancer stem cells via the miR-206/TBX3 axis. *Exp Cell Res*. 2020; 395(2): 112218. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112218. PMID: 32771526
37. Jin Y., Feng S.J., Qiu S., Shao N., Zheng J.H. LncRNA MALAT1 promotes proliferation and metastasis in epithelial ovarian cancer via the PI3K-AKT pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017; 21(14): 3176-84. PMID: 28770968
38. Lei R., Xue M., Zhang L., Lin Z. Long noncoding RNA MALAT1-regulated microRNA 506 modulates ovarian cancer growth by targeting iASPP. *Onco Targets Ther*. 2016; 10: 35-46. doi: 10.2147/OTT.S112686. PMID: 28031721; PMCID: PMC5182047
39. Pa M., Naizaer G., Seyiti A., Kuerbang G. Long Noncoding RNA MALAT1 Functions as a Sponge of MiR-200c in Ovarian Cancer. *Oncol Res*. 2017. doi: 10.3727/096504017X15049198963076. PMID: 28899458
40. Tao F., Tian X., Ruan S., Shen M., Zhang Z. miR-211 sponges lncRNA MALAT1 to suppress tumor growth and progression through inhibiting PHF19 in ovarian carcinoma. *FASEB J*. 2018, fj201800495RR. doi: 10.1096/fj.201800495RR. PMID: 29874124
41. Sun Q., Li Q., Xie F. LncRNA-MALAT1 regulates proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells by targeting miR-503-5p. *Onco Targets Ther*. 2019; 12: 6297-307. doi: 10.2147/OTT.S214689. PMID: 31496733; PMCID: PMC6691960
42. Ye W., Ni Z., Yicheng S., Pan H., Huang Y., Xiong Y., et al. Anisomycin inhibits angiogenesis in ovarian cancer by attenuating the molecular sponge effect of the lncRNA-Meg3/miR-421/PDGFRα axis. *Int J Oncol*. 2019; 55(6): 1296-312. doi: 10.3892/ijo.2019.4887. PMID: 31638182; PMCID: PMC6831202
43. Tao P., Yang B., Zhang H., Sun L., Wang Y., Zheng W. The overexpression of lncRNA MEG3 inhibits cell viability and invasion and promotes apoptosis in ovarian cancer by sponging miR-205-5p. *Int J Clin Exp Pathol*. 2020; 13(5): 869-79. PMID: 32509057; PMCID: PMC7270692
44. Shi X., Xiao L., Mao X., He J., Ding Y., Huang J., et al. miR-205-5p Mediated Downregulation of PTEN Contributes to Cisplatin Resistance in C13K Human Ovarian Cancer Cells. *Front Genet*. 2018; 9: 555. doi: 10.3389/fgene.2018.00555. PMID: 30510566; PMCID: PMC6253938
45. Sheng X., Li J., Yang L., Chen Z., Zhao Q., Tan L., et al. Promoter hypermethylation influences the suppressive role of maternally expressed 3, a long non-coding RNA, in the development of epithelial ovarian cancer. *Oncol Rep*. 2014; 32(1): 277-85. doi: 10.3892/or.2014.3208. PMID: 24859196
46. Vrba L., Garbe J.C., Stampfer M.R., Futscher B.W. A lincRNA connected to cell mortality and epigenetically-silenced in most common human cancers. *Epigenetics*. 2015; 10(11): 1074-83. doi: 10.1080/15592294.2015.1106673. PMID: 26646903; PMCID: PMC4844203
47. Salamini-Montemurri M., Lamas-Maceiras M., Barreiro-Alonso A., Vizoso-Vázquez Á., Rodríguez-Belmonte E., Quindós-Varela M., et al. The Challenges and Opportunities of LncRNAs in Ovarian Cancer Research and Clinical Use. *Cancers (Basel)*. 2020; 12(4): 1020. doi: 10.3390/cancers12041020. PMID: 32326249; PMCID: PMC7225988
48. Chen X., Wu W., Cao X., Zhao X., Li W., Deng C., et al. lncRNA mortal obligate RNA transcript was downregulated in ovarian carcinoma and inhibits cancer cell proliferation by downregulating miRNA-21. *J Cell Biochem*. 2019. doi: 10.1002/jcb.28478. PMID: 30916806
49. Vrba L., Futscher B/W. Epigenetic Silencing of MORT Is an Early Event in Cancer and Is Associated with Luminal, Receptor Positive Breast Tumor Subtypes. *J Breast Cancer*. 2017; 20(2): 198-202. doi: 10.4048/jbc.2017.20.2.198. PMID: 28690657; PMCID: PMC5500404

50. Zhuang L., Ding W., Ding W., Zhang Q., Xu X., Xi D. lncRNA ZNF667-AS1 (NR_036521.1) inhibits the progression of colorectal cancer via regulating ANK2/JAK2 expression. *J Cell Physiol.* 2021; 236(3): 2178-93. doi: 10.1002/jcp.30004. PMID: 32853419
51. Peng S., Yin X., Zhang Y., Mi W., Li T., Yu Y., et al. Competing endogenous RNA network analysis reveals potential long non-coding RNAs as predictive biomarkers of gastric cancer. *Oncol Lett.* 2020; 19(3): 2185-96. doi: 10.3892/ol.2020.11351. PMID: 32194716; PMCID: PMC7039062
52. Yang H., Cai M.Y., Rong H., Ma L.R., Xu Y.L. ZNF667-AS1, a positively regulating MEGF10, inhibits the progression of uveal melanoma by modulating cellular aggressiveness. *J Biochem Mol Toxicol.* 2021; 35(5):e22732. doi: 10.1002/jbt.22732. PMID: 33512044
53. Markman M. Pharmaceutical Management of Ovarian Cancer: Current Status. *Drugs.* 2019; 79(11): 1231-9. doi: 10.1007/s40265-019-01158-1. PMID: 31267481
54. Cornelison R., Llana DC, Landen CN. Emerging Therapeutics to Overcome Chemoresistance in Epithelial Ovarian Cancer: A Mini-Review. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(10): 2171. doi: 10.3390/ijms18102171. PMID: 29057791; PMCID: PMC5666852
55. Huang D., Savage S.R., Calinawan A.P., Lin C., Zhang B., Wang P., et al. A highly annotated database of genes associated with platinum resistance in cancer. *Oncogene.* 2021; 40(46): 6395-405. doi: 10.1038/s41388-021-02055-2. PMID: 34645978; PMCID: PMC8602037
56. Loret N., Denys H., Tummers P., Bex G. The Role of Epithelial-to-Mesenchymal Plasticity in Ovarian Cancer Progression and Therapy Resistance. *Cancers (Basel).* 2019; 11(6): 838. doi: 10.3390/cancers11060838. PMID: 31213009; PMCID: PMC6628067
57. Wang H., Fang L., Jiang J., Kuang Y., Wang B., Shang X., et al. The cisplatin-induced lncRNA PANDAR dictates the chemoresistance of ovarian cancer via regulating SFRS2-mediated p53 phosphorylation. *Cell Death Dis.* 2018; 9(11): 1103. doi: 10.1038/s41419-018-1148-y. PMID: 30375398; PMCID: PMC6207559
58. Dragomir M., Chen B., Calin G.A. Exosomal lncRNAs as new players in cell-to-cell communication. *Transl Cancer Res.* 2018; 7 (Suppl 2):S243-S252. doi: 10.21037/tcr.2017.10.46. PMID: 30148073; PMCID: PMC6107076
59. Da M., Jiang H., Xie Y., Jin W., Han S. The Biological Roles of Exosomal Long Non-Coding RNAs in Cancers. *Onco Targets Ther.* 2021; 14: 271-87. doi: 10.2147/OTT.S281175. PMID: 33488093; PMCID: PMC7814250
60. Barile L., Vassalli G. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. *Pharmacol Ther.* 2017; 174: 63-78. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.020. PMID: 28202367
61. Thakur A., Parra D.C., Motallebnejad P., Brocchi M., Chen H.J. Exosomes: Small vesicles with big roles in cancer, vaccine development, and therapeutics. *Bioact Mater.* 2021; 10: 281-94. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.08.029. PMID: 34901546; PMCID: PMC8636666
62. Zhang W., Wang Q., Yang Y., Zhou S., Zhang P., Feng T. The role of exosomal lncRNAs in cancer biology and clinical management. *Exp Mol Med.* 2021; 53(11): 1669-73. doi: 10.1038/s12276-021-00699-4. PMID: 34819615; PMCID: PMC8639705
63. Yang C., Kim H.S., Song G., Lim W. The potential role of exosomes derived from ovarian cancer cells for diagnostic and therapeutic approaches. *J Cell Physiol.* 2019; 234(12): 21493-503. doi: 10.1002/jcp.28905. PMID: 31144314
64. Guo X.M., Miller H., Matsuo K., Roman L.D., Salhia B. Circulating Cell-Free DNA Methylation Profiles in the Early Detection of Ovarian Cancer: A Scoping Review of the Literature. *Cancers (Basel).* 2021; 13(4): 838. doi: 10.3390/cancers13040838. PMID: 33671298; PMCID: PMC7923044
65. Paracchini L., D'Incalci M., Marchini S. Liquid Biopsy in the Clinical Management of High-Grade Serous Epithelial Ovarian Cancer-Current Use and Future Opportunities. *Cancers (Basel).* 2021; 13(10): 2386. doi: 10.3390/cancers13102386. PMID: 34069200; PMCID: PMC8156052
66. Beylerli O., Gareev I., Sufianov A., Ilyasova T., Guang Y. Long noncoding RNAs as promising biomarkers in cancer. *Noncoding RNA Res.* 2022; 7(2): 66-70. doi: 10.1016/j.ncrna.2022.02.004. PMID: 35310927; PMCID: PMC8891810

Сведения об авторах:

Лукина С.С., науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Бурденный А.М., канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Филиппова Е.А., канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Пронина И.В., канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Иванова Н.А., мл. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Казубская Т.П., доктор мед. наук, врач-онкогенетик, ст. науч. сотр. лаб. клинической онкогенетики ФГБНУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

Брага Э.А., доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., зав. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Логинов В.И., канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП.

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Гребнев Д.Ю.^{1,2}, Маклакова И.Ю.^{1,2}, Султанова Д.А.¹

Роль белка сиртуина-3 в лечении фиброза печени

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 620028, Екатеринбург, Россия, ул. Репина, д. 3;²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», 620026, Екатеринбург, Россия, ул. Карла Маркса, д. 22а

Представлен обзор по НАД⁺-зависимой деацетилазе сиртуин-3 (SIRT3) – белке, обладающем антиоксидантной способностью, высокой метаболической активностью и потенциальной возможностью его использовании при лечении фиброза печени. Приводятся сведения о структуре, локализации и молекулярных мишенях SIRT3, обсуждаются механизмы воздействия SIRT3 на фиброз печени. В частности SIRT3 рассматривается как потенциальная терапевтическая мишень при лечении фиброза печени, однако данный аспект требует более детального изучения. В обзоре рассмотрены также механизмы нарушений в органах при подавлении активности SIRT3. Показана возможность приостановления развития фиброза и в других органах, таких как почки, легкие, сердце путем снижения уровня АФК и увеличения активности антиоксидантных ферментов через SIRT3-зависимые молекулярные пути.

Ключевые слова: сиртуины; SIRT3; фиброз печени; супероксиддисмутаза; TGF-β; АФК**Для цитирования:** Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Султанова Д.А. Роль белка сиртуина-3 при лечении фиброза печени.*Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 157-165.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.157-165

Для корреспонденции: Маклакова Ирина Юрьевна, e-mail: makliu@mail.ru**Участие авторов.** Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Султанова Д.А. – все авторы внесли равный вклад в подготовку и написание данной статьи. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.04.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Grebnev D.Yu.^{1,2}, Maklakova I.Yu.^{1,2}, Sultanova D.A.¹

The role of the Sirtuin 3 protein in the treatment of liver fibrosis

¹Ural State Medical University, ul. Repina 3, Ekaterinburg, 620028, Russian Federation;²Institute of Medical Cell Technologies, ul. K. Marksa 22a, Ekaterinburg, 620026, Russian Federation

Abstract. The article presents a review of reports on NAD⁺-dependent deacetylase, Sirtuin-3 (SIRT3), as a protein with antioxidant capability, high metabolic activity, and a potential use in the treatment of liver fibrosis. Information about the SIRT3 structure, localization, molecular targets, and mechanisms of the action on liver fibrosis is provided. In the absence of effective treatment, continuous progression of liver fibrosis disturbs the normal structure and function of the liver, which can eventually lead to the development of cirrhosis. The mortality from cirrhosis as the terminal liver fibrosis ranks the 9th worldwide among all causes of death and the 6th among people of the most active working age. It has been demonstrated that oxidative stress caused by imbalanced formation and elimination of reactive oxygen species (ROS) is a trigger mechanism for hepatic fibrogenesis. Increased activity of certain antioxidant enzymes can suppress oxidative stress and, thus, delay the development of liver fibrosis. Studies have shown that the SIRT3 deficiency increases ROS and aggravates liver damage, while the SIRT3 activation contributes to attenuation of liver fibrosis. It was reported that SIRT3 may be a potential therapeutic target in the treatment of liver fibrosis, although this requires more detailed study. This review addresses the mechanisms of disorders in organs associated with the impaired SIRT3 activity. A possibility is shown to stop the development of fibrosis also in other organs, such as the kidneys, lungs, and heart, by limiting ROS and activating the antioxidant enzymes through SIRT3-dependent molecular pathways.

Keywords: Sirtuins; SIRT 3; liver fibrosis; superoxide dismutase; TGF-β; ROS

For citation: Grebnev D.Yu., Maklakova I.Yu., Sultanova D.A. The role of sirtuin 3 protein in the treatment of liver fibrosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2022; 66(4): 157-165. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.157-165

Author's contribution: all of the authors contributed equally to the preparation and writing of this article. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors

For correspondence: *Maklakova Irina Yurievna*, doctor of Medical Sciences, Head of the Department of Normal Physiology Ural State Medical University, e-mail: makliu@mail.ru

Information about the authors:

Grebnev D.Y., <https://orcid.org/0000-0002-5698-8404>

Maklakova I.Y., <https://orcid.org/0000-0002-6895-7947>

Sultanova D.A., <https://orcid.org/0000-0002-2832-2525>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 18.04.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

Список сокращений:

НАД+ – Никотинамидадениндинуклеотид
 SIRT3 – Сиртуин 3
 АФК – активные формы кислорода
 САТ – каталаза
 MnSOD2 – супероксиддисмутаза 2
 GPx – глутатионпероксидаза
 PGC-1α – γ-коактиватор-1α, активируемый пролифератором пероксисом
 АДФ – Аденозиндифосфат
 АТФ – Аденозинтрифосфат
 AceCS2 – Ацетил-КоА-синтаза 2
 IDH2 – изоцитратдегидрогеназа

НАДФН – Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
 GSH – Глутатион восстановленный
 GSSG – Глутатион окисленный
 GSK3β – киназу-3β гликогенсинтазы
 МРТР – митохондриальная Ca2+-зависимая пора
 MDA – малонового диальдегида
 VEGF – фактор роста эндотелия сосудов
 TGF-β1 – трансформирующий фактор роста β1
 GR – Глутатионредуктаза
 GPx – Глутатионпреоксидаза
 CCl4 – четыреххлористый углерод
 NMN – никотинамидмононуклеотид
 A-SMA – α-гладкомышечный актин

Введение

Сиртуины (silencer information regulator) – семейство белков, которые стали в последние десятилетия объектом изучения многих ученых в связи с их важной ролью в контроле клеточного цикла, метаболических процессах, митохондриальном гомеостазе, старении. Эти белки вырабатываются повсеместно, но больше всего в органах и тканях с высокой метаболической активностью. Белки сиртуины имеют различную внутриклеточную локализацию. SIRT 1,6,7 млекопитающих находятся в ядре, SIRT 2 – преимущественно в цитоплазме, SIRT 3,4,5 – в митохондриях. Сиртуины могут действовать как АДФ-рибозилтрансферазы или белковые деацетилазы, ферментативная активность которых зависит от никотинамидадениндинуклеотида (НАД+), что определяет их роль в клеточных метаболических процессах [1-3]. Их активация происходит при низкоэнергетических состояниях либо при определенных стрессах, когда в клетке увеличивается соотношение НАД+/НАДН и снижается уровень никотинамида,

а также при воздействии эндогенных белков, участвующих в трансдукции и транскрипции сигналов, и ряда микроРНК [1]. Что касается данной статьи, то она направлена на изучение структуры, функции, молекулярных мишеней SIRT3, его роли при патологии печени. Изменения ацетилирования, которые регулирует SIRT3, нужны для поддержания функции митохондрий в различных тканях. Митохондрии играют важнейшую роль в синтезе энергии, метаболизме, апоптозе и внутриклеточной передаче сигналов [3,4]. Из всех 7 видов сиртуинов только SIRT3 регулирует синтез клеткой ферментов, обладающих антиоксидантным действием: каталазы (САТ), супероксиддисмутазы 2 (MnSOD2), глутатионпероксидазы (Gpx) [3,5]. В ряде работ были использованы нокаутные по SIRT3 мыши для оценки метаболических функции [1, 2, 5, 6]. При этом было выявлено, что в клетках этих мышей был повышен уровень АФК и нарушено клеточное дыхание. Нокаутированные мыши были склонны к развитию ожирения, резистентны к инсулину, склонны к прогрессированию хронических повреждений печени. Учитывая

увеличение количества заболеваний печени, в последнее десятилетие появляется все больше работ, посвященных фармакологической активации SIRT3 при фиброзе и других хронических повреждениях печени [7]. В данной работе обобщены данные, демонстрирующие антиоксидантные свойства SIRT3 при фиброзе печени с акцентом на молекулярные механизмы. В статье рассмотрены общие вопросы строения, локализации, молекулярные мишени SIRT3, а также процессы, возникающие в организме, при ингибировании этого белка.

Локализация SIRT3 в тканях и клетках млекопитающих. У млекопитающих белок SIRT3 экспрессируется во многих тканях. В исследованиях, проведенных на мышах, выявили, что больше всего SIRT3 содержится в печени, головном мозге, бурой жировой ткани, сердце, мышцах и почках, в меньшей степени в легких, яичниках и селезенке [3].

Считается, что SIRT3 локализован внутри клетки в митохондриальном матриксе и активируется после расщепления его сигнальной последовательности [1, 3, 8]. Однако другие исследования [1, 9] ставят под сомнение исключительно митохондриальную локализацию SIRT3. Эти различия возникают из-за того, что SIRT3 как у мышей, так и у людей имеет две изоформы – короткую и полную. Ряд исследователей сообщают, что полная форма SIRT3 находится только в митохондриях [10], другие – что в сердце данная изоформа может быть расположена в ядре, митохондриях и цитоплазме [9]. Короткая форма, которая теряет 142 концевых остатка NH_2 , присутствует как в митохондриях, так и в ядре, цитоплазме [9]. Однако в исследовании Соорет Н.М. и др. проводили клонирование различных экспрессионных конструкций SIRT3, при определении субклеточной локализации SIRT3 методами иммунофлуоресценции, вестерн-блоттинга и внутриклеточного фракционирования SIRT3 не был обнаружен в ядре, поэтому можно утверждать, что SIRT3 локализован в митохондриях [11].

Роль SIRT3 в митохондриальном биогенезе. SIRT3 расположен во внутренней мембране митохондрий вместе с цепью переноса электронов [12] и играет важную роль в регуляции функции митохондрий [13]. Митохондрии являются высокодинамичными органеллами и проходят постоянные циклы деления и слияния, которые зависят от наличия питательных веществ в клетке [14]. При недостатке питания происходит слияние митохондрий, которое опосредуется динамин-1-подобный белком, и увеличивается выработка АТФ, при избытке же, наоборот, митохондрии делятся, что ведет к снижению потребления кислорода и продукции АТФ. Таким образом, эти 2 процесса поддерживают го-

меостаз в митохондриях. При индукции SIRT3 при голодании или стрессе, активируется процесс слияния, и подавляется деление митохондрий [10]. Эндогенный регулятор SIRT3 – рецептор γ -коактиватор-1 α , активируемый пролифератором пероксисом (PGC-1 α), участвует в адаптивном термогенезе в скелетных мышцах и буром жире, глюконеогенезе в печени, митохондриальном биогенезе, а также является мощным регулятором метаболизма АФК [12]. Сверхэкспрессия PGC-1 α в клетках скелетных мышц приводит к увеличению расхода энергии и биогенеза митохондрий. В исследовании X. Kong и др. [12] была оценена роль PGC-1 α в отношении влияния SIRT3 на биогенез митохондрий. Сверхэкспрессия SIRT3 приводила к увеличению содержания митохондриальной ДНК в клетке в 1,7 раза, в то время как нокаут эндогенного SIRT3 не изменял содержание базальной митохондриальной ДНК. Кроме того, нокаут эндогенного mSIRT3 снижал индуцированную PGC-1 α митохондриальный биогенеза. Это демонстрирует важную роль SIRT3 в биогенезе митохондрий. У SIRT3-нокаутных мышей происходит гиперацетилирование митохондриального белка и снижение базальных уровней АТФ в различных тканях [15].

Молекулярные мишени SIRT3. Осуществляя метаболические процессы, SIRT3 регулирует выработку многих митохондриальных белков путем обратимого деацетилирования. Первой идентифицированной мишенью белка SIRT3 является Ацетил-КоА-синтаза 2 (AceCS2) – фермент, который является катализатором процесса образования Ацетил-КоА из ацетата [16]. Ацетил-КоА в свою очередь является одним из главных регуляторов биосинтеза жирных кислот и холестерина. Также SIRT3 активирует MnSOD2, снижая, таким образом, митохондриальный супероксид. MnSOD2 – это первичный митохондриальный антиоксидантный фермент, который преобразует $2 \text{O} \cdot^{-2}$ в H_2O_2 , далее превращающуюся в воду под действием фермента каталазы. SIRT3 непосредственно деацетирует MnSOD2 в митохондриях, значительно увеличивая его способность улавливать АФК [17]. SIRT3 также деацетирует изоцитратдегидрогеназу (IDH2), повышая ее активность. Увеличение активности IDH2 за счет SIRT3-опосредованного деацетилирования повышает уровень НАДФН, что, в свою очередь, может увеличивать активность глутатионредуктазы для восстановления GSH из GSSG [10]. В печени, как и в других органах, SIRT3 может увеличивать клиренс АФК для защиты от окислительного повреждения путем влияния на MnSOD2 и CAT за счет деацетилирования и активации FOXO3a [18]. Кроме деацетилирования, SIRT3 также регулирует фосфорилирование CDK1, по-

вышая тем самым активность MnSOD2 через CDK1-опосредованное фосфорилирование [19]. SIRT3 регулирует передачу сигналов ERK-CREB для активации BNIP3, тем самым увеличивая митотическую устойчивость к неалкогольной жировой болезни печени, регулируемую BNIP3 [20]. Также SIRT3, ингибируя повреждение митохондрий и апоптоз за счет деацетилирования и снижения активности Ku70, восстанавливает гепатоциты и снижает выраженность фиброза [21]. Получены данные, свидетельствующие, что SIRT3 деацетилюя киназу-3β гликогенсинтазы (GSK3β), увеличивает ферментативную активность данной киназы и, таким образом, блокирует способность таких факторов, как Smad3, c-Jun и β-катенин стимулировать фиброз [22]. На клеточной линии EJ-p53 было показано, что SIRT3 ингибирует активность p53, тем самым приводя к замедлению роста и старения [23].

Появляется все больше данных о том, что митохондриальная Ca²⁺-зависимая пора (mPTP) способствует митохондриальной дисфункции с возрастом. Резкий запуск mPTP приводит к апоптозу, а медленное открытие способствует набуханию митохондрий, деполаризации мембраны и разрушению дефектных мито-

хондрий путем аутофагии. SIRT3 деацетилюет регуляторный компонент mPTP, циклофилин D (CypD), способствуя предотвращению нарушений функций митохондрий [24]. Также SIRT3 деацетилюет такие ключевые метаболические ферменты, как сукцинатдегидрогеназа [25], пируватдегидрогеназа и глутаматдегидрогеназа [3]. Интересно, что SIRT3 способен деацетилировать свою субъединицу E1α, увеличивая собственную ферментативную активность [26] (рис.1).

Подавление активности SIRT3 в органах и его последствия. Дефицит SIRT3 вызывает повышение уровня АФК и геномную нестабильность, что приводит к митохондриальной дисфункции, которая в свою очередь способствует нарушению работы различных органов [5, 27, 28]. В исследовании Tuagi A. и др. были изучены эффекты гиперацетилирования митохондриального белка головного мозга у мышей с нокаутом SIRT3, содержащихся на западной диете. Было выявлено, что дефицит SIRT3 у мышей приводит к митохондриальной дисфункции, вызывает снижение регуляции нескольких метаболических путей, включая окисление жирных кислот, окислительное фосфорилирование и цикл трикарбоновых кислот.

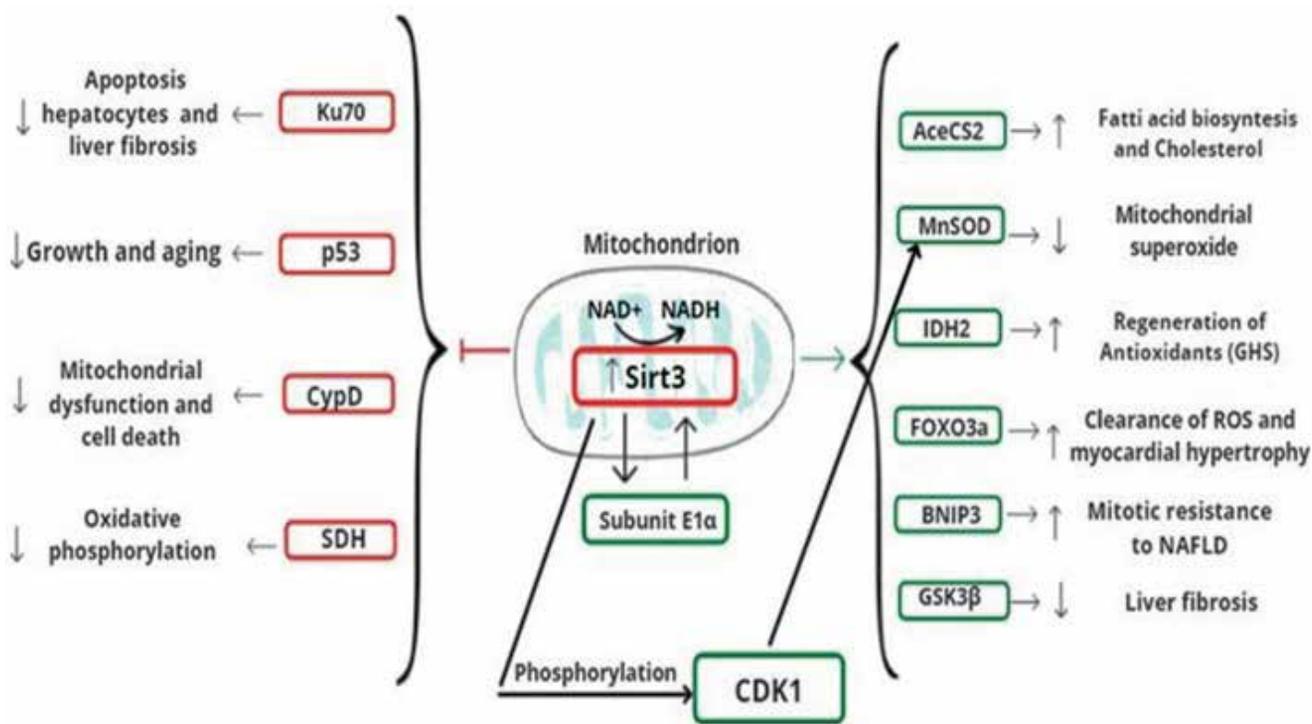


Рис. 1. Молекулярные мишени SIRT3.

Fig. 1. Molecular targets of SIRT3.

В головном мозге наблюдались гипертрофия микроваскуляры и повышение уровня IL-1 β , которые являются маркерами нейроинфекции [29]. S. Yang и др. изучали возможное участие SIRT3 в заживлении диабетических ран. Мышам дикого типа и SIRT3-нокаутным мышам вводили стрептозоцин, в исследованиях *in vitro* фибробласты кожи мыши подвергали воздействию глюкозы [30]. По полученным данным дефицит SIRT3 снижал скорость заживления, ухудшал кровоснабжение и экспрессию VEGF. Также был повышен уровень супероксида, малонового диальдегида (MDA), снижена общая антиоксидантная способность, активность MnSOD2 [30]. У SIRT3-нокаутных мышей была обнаружена сверхэкспрессия протеинкиназы 3 и каспазы 3 как *in vitro*, так и *in vivo*. В целом, недостаток SIRT3 замедляет заживление кожных ран при диабете, это может быть связано с митохондриальной дисфункцией, усилением окислительного стресса и некроптоза.

В следующем исследовании было показано, что дефицит SIRT3 способствует прогрессированию индуцированного ангиотензином II почечного фиброза, что сопровождается усиленным синтезом коллагена I [31]. У SIRT3-нокаутных мышей увеличивалось количество почечных перитонов, в которых обнаружилось повышение продукции TGF- β 1, с дальнейшей их дифференцировкой в фибробласты. Нехватка SIRT3 способствовала увеличению образования АФК, производных НАДФН-оксидазы после введения ангиотензина II [31].

В работе, посвященной лечению фиброза печени, вызванного окислительным стрессом, было выявлено, что истощение SIRT3 ослабляло стимулирующий эффект Витаферина А на активность CAT, глутатионредуктазы (GR), GPx и MnSOD2 как в активированных звездчатых клетках печени Ито (*in vitro*), так и при фиброзе печени [5]. У SIRT3-нокаутных мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров, происходит накопление триглицеридов в печени, что подтверждается увеличением экспрессии интегрального мембранного белка CD36 и рецепторов липопротеинов низкой плотности (VLDLR) в печеночных клетках посредством Nrf2-зависимого механизма [32].

Роль SIRT3 при ионизирующем излучении была изучена LoBianco F.V. и др. [33]. В данном исследовании десятидневные самцы мышей SIRT3 $^{-/-}$ и SIRT3 $^{+/+}$ подвергались облучению печени в дозе 24 Гр. Было обнаружено значительное увеличение экспрессии мРНК TGF- β , IL-1 β и IL-6, а также маркеров фиброза - проколлагена 1, α -SMA у мышей SIRT3 $^{-/-}$, что свидетельствует о стойкой воспалительной реакции и непрерывном прогрессировании повреждения печени через 6 мес в отсутствие SIRT3.

Недостаток SIRT3 приводит к ацетилованию и инактивации многих митохондриальных белков, которые имеют решающее значение для целостности митохондрий [6]. У SIRT3-нокаутных мышей может развиваться спонтанный фиброз и в легких в результате повышенного ацетилования GSK3 β , что приводит к усилению синтеза TGF- β 1 [22]. Cheng Y. и др. было обнаружено, что OGG1 -8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза 1, фермент репарации ДНК, является мишенью деацетилования SIRT3, что играет важную роль в восстановлении повреждения митохондриальной ДНК (мтДНК) [34]. Таким образом, истощение SIRT3 в альвеолярных эпителиальных клетках увеличивает ацетилование остатков OGG1 – K338 и K341, тем самым снижая активность ферментов эксцизионной репарации мтДНК, способствуя повреждению и апоптозу альвеолярных эпителиоцитов [27].

Представляет интерес двойственное влияние SIRT3 на развитие рака. SIRT3 может выступать как в роли промотора, так и в роли супрессора опухоли в зависимости от типа клетки и опухоли, а также наличия различных стимулов стресса или гибели клеток [1].

Механизмы SIRT3-зависимого влияния на фиброз печени. Несмотря на то, что восприимчивость тканей к фиброзу различна, можно отметить общие характеристики в развитии этого процесса на клеточном и молекулярном уровнях, которые включают дегенерацию клеток, лейкоцитарную инфильтрацию, пролиферацию клеток с фибробластоподобным действием. Одним из основных факторов, способствующих фиброзу тканей, является активация передачи сигналов трансформирующего фактора роста (TGF). TGF-семейство состоит из 3 лигандов: TGF-1, -2 и -3, которые синтезируются в качестве неактивных предшественников. Активированный TGF связывается с мембранными рецепторами и запускает серию зависимых от фосфорилирования сигнальных каскадов, которые завершаются активацией семейства транскрипционных факторов Smad (рис. 2) [35]. Эти факторы регулируют экспрессию генов, которые приводят к трансформации перисинусоидальных клеток печени Ито в миофибробласты и индукции фиброза [5, 35]. Одной из сигнальных киназ, которая препятствует передаче сигналов TGF, является GSK3 β . GSK3 β – это серин/треонинкиназа, которая регулирует широкий спектр клеточных функций [6]. Деацетилование и активация GSK3 β с помощью SIRT3 снижает экспрессию генов фиброза в печени [6, 22]. Эта модификация увеличивает ферментативную активность киназы и, таким образом, блокирует способность таких факторов как Smad3 и c-Jun β -катенин стимулировать экспрессию фиброзных генов [22].

Окислительный стресс, вызванный дисбалансом между образованием и удалением АФК, которые усиливают выработку лейкоцитами провоспалительных цитокинов, является триггером фиброгенеза печени. АФК индуцируют фиброз печени через AKT-mTOR и ERK1/2 сигнальные пути, в то время как SIRT3 уменьшает фиброз печени путем удаления АФК, воздействуя прямым путем через MnSOD2, а также косвенным путем через IDH2 [36]. Деацетилирование FOXO3 также снижает уровень клеточных АФК за счет усиления активности антиоксидантных ферментов MnSOD2 и CAT, что также способствует уменьшению фиброза печени [37]. При фиброзе печени снижается выработка AMPK и карнитинпальмитоилтрансферазы 1A (CPT-1A), способствуя активации липогенеза и снижения окисления жирных кислот. SIRT3 увеличивает экспрессию AMPK, которая ингибирует синтез жирных кислот, стимулируя окисление жирных кислот путем повышения экспрессии CPT-1A [38]. SIRT3 может связываться и деацетилировать преобразователь сигнала и активатор транскрипции 3 (STAT3) для ингибирования регулируемого STAT3-NFATc2 фиброза печени [39].

SIRT3 как терапевтическая мишень при фиброзе печени. Дисфункция SIRT3, являющегося основным регулятором митохондриального метаболизма и энергетики, тесно связана с возникновением и развитием различных заболеваний. Активация SIRT3 является эффективным способом лечения многих заболеваний [33]. Один из наиболее важных терапевтических подходов нацелен на увеличение митохондриального уровня

НАД+ или других активаторов SIRT3. Рацион, состоящий из таких продуктов питания, как мясо, молочные продукты, яйца, орехи и другие, обеспечивает достаточное поступление триптофана и ниацина, которые стимулируют биосинтез НАД+ de novo, стимулируя тем самым активацию сиртуинов [40].

Другим способом усиления синтеза НАД+ является «Путь спасения НАД+»: никотинамидфосфорилтрансфераза (NAMPT) превращает никотинамид (NAM) в никотинамидмононуклеотид (NMN) для биосинтеза НАД+ в клетках млекопитающих. Таким образом, добавление NMN или увеличение экспрессии повышают уровень НАД+ [41].

Никотинамид рибозид, являющийся предшественником НАД+ можно применять в качестве пищевой добавки для поддержания высокого соотношения НАД+/НАДН [42]. Экзогенный НАД+ также используется для ослабления фиброза печени. В настоящее время еще нет данных об агонисте SIRT3, но есть ряд положительных модуляторов, продемонстрировавших благоприятные терапевтические эффекты [4]. К тому же большинство этих соединений получают из натуральных веществ. Хонокиол (2-(4-гидрокси-3-проп-2-2-енилфенил)-4-проп-2-енилфенол) является одним из наиболее изученных активаторов SIRT3 и представляет собой натуральный лигнан, полученный из коры магнолии [43]. В предыдущих исследованиях было показано, что Хонокиол оказывает противовоспалительное, антиоксидантное, антибактериальное, противоопухолевое и нейропротекторное действие [43, 44]. Имеются данные о том, что антифибротические эф-

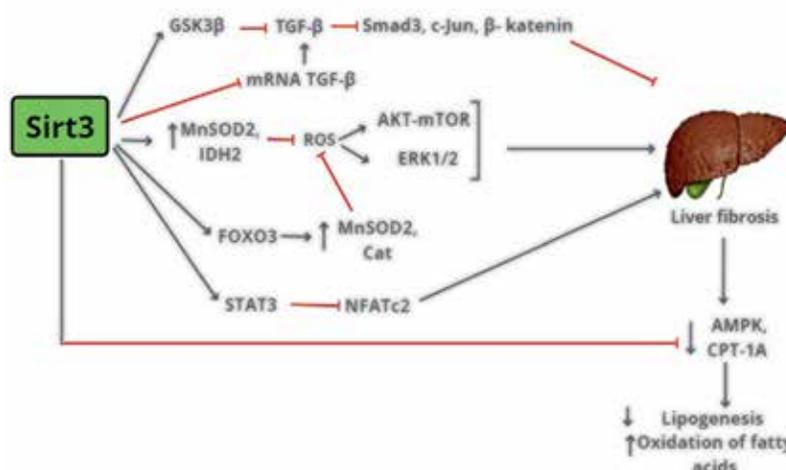


Рис. 2. Основные механизмы влияния SIRT3 при фиброзе печени.

Fig. 2. The main mechanisms of the effect of SIRT3 in liver fibrosis.

фекты Хонокиола у крыс с фиброзом печени связаны с подавлением путей передачи сигналов TGF- β /Smad и MAPK [23]. Таким же образом Хонокиол тормозит развитие фиброза почек [44].

Силибин – еще один активатор SIRT3, обладает гепатопротекторным, антиоксидантным, иммуномодулирующим действием [45]. Более того, известно, что силибин препятствует превращению перисинусоидальных клеток печени Ито в миофибробласты, предотвращая отложение коллагена и развитие фиброза печени [46]. Применение куркумина при фиброзе печени, вызванном перевязкой желчного протока у крыс, снижало повреждение печени [2]. В ряде исследований подтвердили, что он обладает антиоксидантным, противовоспалительным и противораковым действиями [45, 47]. Исходя из данных работ, можно заключить, что куркумин может увеличивать активность SIRT3, индуцируя AMPK и повышая уровень НАД+. Также было показано, что лечение куркумином повышало экспрессию MnSOD и IDH2 в фиброзной печени [2, 45].

Совсем недавно было проведено исследование, в котором было выявлено, что Витаферин А – стероидный лактон, полученный из травяного растения *Withania somnifera*, оказывает мощное антифибротическое действие SIRT3-зависимым путем [5]. У SIRT3-нокаутных мышей стимулирующий эффект Витаферина А на активность CAT, GR, GPx, HO-1 и MnSOD был существенно ниже как в активированных клетках печени Ито, так и в фиброзной печени, что дает возможность предположить, что SIRT3 опосредует окислительный стресс в основном за счет повышения активности митохондриальных антиоксидантных ферментов.

Есть сведения, что кофеин увеличивал превращение АДФ в АТФ и активировал путь α AMF/CREB/SIRT3/AMPK/ACC в печени, снижая фиброзирование печени [48]. Целастрол – пентациклический тритерпен, получаемый из *Tripterygium Wilfordi* и обладающий мощным противовоспалительным действием, подавлял воспаление в печени крыс и секрецию воспалительных факторов *in vitro*, тормозя прогрессирование фиброза печени [49]. Данный эффект Целастрола обусловлен снижением активности воспаления путем передачи сигналов AMPK-SIRT3 как в перисинусоидальных клетках печени Ито, так и в фиброзной печени [49].

В исследовании Y. Wang и др. [50] было обнаружено, что γ -мангостин – один из основных ксантонов мангостина, снижает трансформацию перисинусоидальных клеток печени Ито (LX-2) человека в миофибробласты, а также препятствует у мышей, прогрессированию фиброза печени вызванного четыреххлористым углеродом (CCl₄). γ -Мангостин уменьшал экспрессию колла-

гена I и α -гладкомышечного актина (α -SMA) в клетках LX-2 дозозависимым путем. Кроме того, γ -ман ингибировал активность NAD(P)H-оксидазы путем активации SIRT3, что приводило к снижению внутриклеточного окислительного стресса в клетках LX-2. У мышей с фиброзом печени γ -ман усиливал экспрессию SIRT3 и снижал экспрессию белка 1-й группы высокой подвижности хроматина (HMGB1), что приводило к уменьшению накопления коллагена I и α -SMA в печени [50].

Важным аспектом в регулировании экспрессии SIRT3 являются физическая активность и ограничение калорийности пищи [51]. Уровень НАД+ значительно увеличивался при голодании, что способствовало активации SIRT3. Экспрессия мРНК SIRT3 увеличивалась в печени, скелетных мышцах и жировой ткани мышей содержащихся на диете с 30% ограничением калорийности. Известно, что при старении экспрессия SIRT3 снижается [25]. Метаболический стресс, вызванный физическими упражнениями, способствует увеличению соотношения НАД+/НАДН, которое обеспечивает повышенный уровень субстрата для SIRT3 [51].

Заключение

Накопление научных данных постепенно раскрывает биологические функции SIRT3, что создает предпосылки его использования в медицине. Исследования, проведенные в последние десятилетия, показали, что роль SIRT3 при многих заболеваниях связана с эффектом снижения уровня АФК. SIRT3 активирует свои субстраты, такие как супероксиддисмутаза, изоцитратдегидрогеназа, пируватдегидрогеназа путем деацетилирования, инактивируя тем самым избыток АФК. Ингибирование окислительного стресса помогает контролировать также и прогрессирование фиброза печени. SIRT3 регулируя цикл трикарбоновых кислот, окислительное фосфорилирование, метаболизм жирных кислот и аминокислот обеспечивает поддержание гомеостаза митохондрий, что в итоге способствует повышению жизнеспособности клеток. Таким образом, SIRT3 был предложен как многообещающая мишень при многих заболеваниях человека, а ряд низкомолекулярных соединений, нацеленных на SIRT3, продемонстрировал терапевтические эффекты при фиброзе печени.

Литература

(п.п. 1–39; 41–51 см. References)

40. Фефелова Ю.А., Сергеева Е.Ю., Новикова Л.В., Климина Г.М. Влияние характера питания на SIRTUIN1-опосредованное изменение метаболических процессов. *Вопросы питания*. 2016; 85(4): 5-13.

References

- Chen Y., Fu L.L., Wen X., Wang X.Y., Liu J., Cheng Y., et al. Sirtuin-3 (SIRT3), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive function in cancer. *Cell Death and Disease*. 2014; 5(1047): 2048-57. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.14>
- Chenari S., Safari F., Moradi A. Curcumin enhances liver SIRT3 expression in the rat model of cirrhosis. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2017; 20(12): 1306-11. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2017.9609>
- Nogueiras R., Habegger K.M., Chaudhary N., Finan B., Banks A.S., Dietrich M.O., et al. Sirtuin 1 and Sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiological Reviews*. 2012; 92: 1479–514. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2011>
- Giblin W., Lombard D.B. Sirtuins, Healthspan, and Longevity in Mammals. *Handbook of the Biology of Aging*. 2016; 83-132. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411696-5.00003-4>
- Gu J., Chen C., Wang J., Chen T., Yao W., Yan T., et al. Withaferin A Exerts Preventive Effect on Liver Fibrosis through Oxidative Stress Inhibition in a Sirtuin 3-Dependent Manner. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020; <https://doi.org/10.1155/2020/2452848>
- Liu D., Gu Y., Pang Q., Han Q., Li A., Wu W., et al. Vitamin C inhibits lipid deposition through GSK-3 β /mTOR signaling in the liver of zebrafish. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2019; 46(1): 383-94. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00727-1>
- Asrani S.K., Devarbhavi H., Eaton J., Kamath P.S. Burden of liver diseases in the world. *Journal of Hepatology*. 2019; 70(1): 151-71. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014>
- Marcus J.M., Andrabi S.A. SIRT3 Regulation Under Cellular Stress: Making Sense of the Ups and Downs. *Frontiers in Neuroscience*. 2018; 12(799). <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00799>
- He W., Newman J.C., Wang M.Z., Ho L., Verdin E. Mitochondrial sirtuins: regulators of protein acylation and metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2012; 23(9): 467–76. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.07.004>
- Parodi-Rullán R.M., Chapa-Dubocq X.R., Javadov S. Acetylation of Mitochondrial Proteins in the Heart: The Role of SIRT3. *Frontiers in Physiology*. 2018; 9(1094). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01094>
- Cooper H.M., Spelbrink J.N. The human SIRT3 protein deacetylase is exclusively mitochondrial. *Biochemical Journal*. 2008; 411(2): 279-85. <https://doi.org/10.1042/BJ20071624>
- Kong X., Wang R., Xue Y., Liu X., Zhang H., Chen Y., et al. Sirtuin 3, a new target of PGC-1 α , plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PLoS One*. 2010; 5(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011707>
- Hao M., Wan-Yu Y., Yu-Hong L., Zheng W., Ye-Ye H., Lian-Kun S., Jue-Pu Z. SIRT3 Regulation of Mitochondrial Quality Control in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2019; 11. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00313>
- Kincaid B., Bossy-Wetze E. Forever young: SIRT3 a shield against mitochondrial meltdown, aging, and neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2013; 13(48). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2013.00048>
- Treviño-Saldaña N., García-Rivas G. Regulation of Sirtuin-Mediated Protein Deacetylation by Cardioprotective Phytochemicals. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017; 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1750306>
- Martinez-Pastor B., Mostoslavsky R. Sirtuins, metabolism, and cancer. *Frontiers in pharmacology*. 2012; 3(22). <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00022>
- Boyle K., Newsom S., Janssen R., Lappas M., Friedman J. Skeletal Muscle MnSOD, Mitochondrial Complex II, and SIRT3 Enzyme Activities Are Decreased in Maternal Obesity During Human Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013; 98(10): 1601-1609. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1943>
- Silaghi C.N., Farcaș M., Crăciun A.M. Sirtuin 3 (SIRT3) Pathways in Age-Related Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Biomedicine*. 2021;9(11):1574. <https://doi.org/10.3390/biomedicine9111574>
- Liu R., Fan M., Candas D., Qin L., Zhang X., Eldridge A., et al. CDK1-Mediated SIRT3 Activation Enhances Mitochondrial Function and Tumor Radioresistance. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2015; 14(9):2090-2102. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0017>
- Li R., Xin T., Li D., Wang C., Zhu H., Zhou H. Therapeutic effect of Sirtuin 3 on ameliorating nonalcoholic fatty liver disease: The role of the ERK-CREB pathway and Bnip3-mediated mitophagy. *Redox Biology*. 2018; 18: 229-43. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.07.011>
- Liu J., Li D., Zhang T., Tong Q., Ye R.D., Lin L. SIRT3 protects hepatocytes from oxidative injury by enhancing ROS scavenging and mitochondrial integrity. *Cell Death Disease*. 2017; 8(10): 3158. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.564>
- Sundaresan N.R., Bindu S., Pillai V.B., Samant S., Pan Y., Huang J.Y., et al. SIRT3 Blocks Aging-Associated Tissue Fibrosis in Mice by Deacetylating and Activating Glycogen Synthase Kinase 3 β . *Molecular and Cellular Biology*. 2015; <https://doi.org/10.1128/MCB.00586-15>
- Li S., Banck M., Mujtaba S., Zhou M.M., Sugrue M.M., Walsh M.J. p53-Induced Growth Arrest Is Regulated by the Mitochondrial SIRT3 Deacetylase. *PLOS One*. 2010;5(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010486>
- Sun F., Si Y., Bao H., Xu Y., Pan X., Zeng L., Jing L. Regulation of Sirtuin 3-Mediated Deacetylation of Cyclophilin D Attenuated Cognitive Dysfunction Induced by Sepsis-Associated Encephalopathy in Mice. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2017; 37(8): 1457-64. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0476-2>
- Zhang J., Xiang H., Liu J., Chen Y., He R.R., Liu B. Mitochondrial Sirtuin 3: New emerging biological function and therapeutic target. *Theranostics*. 2020; 10(18): 8315-42. <https://doi.org/10.7150/thno.45922>
- Ozden O., Park S.H., Wagner B.A., Song H.Y., Zhu Y., Vassilopoulos A., et al. SIRT3 deacetylates and increases pyruvate dehydrogenase activity in cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014; 76: 63-172. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.001>
- Jablonski R. P., Kim S.J., Cheres P., Williams D.B., Morales-Nebreda L., Cheng Y., et al. SIRT3 deficiency promotes lung fibrosis by augmenting alveolar epithelial cell mitochondrial DNA damage and apoptosis. *FASEB Journal*. 2017; 31(6): 2520-32. <https://doi.org/10.1096/fj.201601077R>
- Pham Tho X., Bae M., Kim Mi-Bo, Lee Yo, Hu S. Nicotinamide riboside, an NAD⁺ precursor, attenuates the development of liver fibrosis in a diet-induced mouse model of liver fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease*. 2019; 1865(9): 2451–63. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis>

29. Tyagi A., Nguyen C.U., Chong T., Michel C.R., Fritz K.S., Reisdorph N., et al. SIRT3 deficiency-induced mitochondrial dysfunction and inflammasome formation in the brain. *Scientific Reports*. 2018; 8(1): 17547. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35890-7>
30. Yang S., Xu M., Meng G., Lu Y. SIRT3 deficiency delays diabetic skin wound healing via oxidative stress and necroptosis enhancement. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020; 24: 4415–27. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15100>
31. Feng X., Su H., He X., Chen J., Zeng H. SIRT3 Deficiency Sensitizes Angiotensin-II-Induced Renal Fibrosis. *Cells*. 2020; 9(11):2510. <https://doi.org/10.3390/cells9112510>
32. Barroso E., Rodríguez-Rodríguez R., Zarei M., Pizarro-Degado J., Planavila A., Palomer X., et al. SIRT3 deficiency exacerbates fatty liver by attenuating the HIF1 α -LIPIN 1 pathway and increasing CD36 through Nrf2. *Cell Communication and Signaling*. 2020; 18(147): 383–96. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00640-8>
33. LoBianco F.V., Krager Kimberly J., Carter Gwendolyn S., Alam S., Yuan Yo., Lavoie E.G., et al. The Role of Sirtuin 3 in Radiation-Induced Long-Term Persistent Liver Injury. *Antioxidants*. 2020; 9(5): 409. <https://doi.org/10.3390/antiox9050409>
34. Cheng Y., Ren X., Gowda A.S., Shan Y., Zhang L., Yuan Y.S., et al. Interaction of SIRT3 with OGG1 contributes to repair of mitochondrial DNA and protects from apoptotic cell death under oxidative stress. *Cell Death and Disease*. 2013; 4(7). <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.254>
35. Chaikwad A., Bullock A.N. Structural Basis of Intracellular TGF- β Signaling: Receptors and Smads. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2016; 8(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022111>
36. Maiti G.P., Sinha S., Mahmud H., Boysen J., Mendez M.T., Vesely S.K., Holter-Chakrabarty J., Kay N.E., Ghosh A.K. SIRT3 overexpression and epigenetic silencing of catalase regulate ROS accumulation in CLL cells activating AXL signaling axis. *Blood Cancer Journal*. 2021; 11(93). <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00484-6>
37. Tseng Anne H.H., Shieh Shy., Wang Danny L. SIRT3 deacetylates FOXO3 to protect mitochondria against oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013; 63: 222–34 <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.002>
38. Chenari S., Safari F., Moradi A. Curcumin enhances liver SIRT3 expression in the rat model of cirrhosis. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2017; 20: 1306–11. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2017.9609>
39. Guo X., Yan F., Li J., Zhang C., Bu P. SIRT3 attenuates AngII-induced cardiac fibrosis by inhibiting myofibroblasts transdifferentiation via STAT3-NFATc2 pathway. *American Journal of Translational Research*. 2017; 9(7): 3258–69.
40. Fefelova Yu.A., Sergeeva E.Yu., Novikova L.V., Klimina G.M. Influence of the nature of nutrition on SIRTUIN 1-mediated change in metabolic processes. *Voprosy pitaniya*. 2016; 85(4): 5–13. (In Russian.). <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2016-00045>
41. Hong W., Mo F., Zhang Z., Huang M., Wei X. Nicotinamide Mononucleotide: A Promising Molecule for Therapy of Diverse Diseases by Targeting NAD⁺ Metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020; 8(246). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00246>
42. Cantó C., Houtkooper R.H., Pirinen E., Youn D.Y., Oosterveer M.H., Cen Y., et al The NAD⁺ precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metabolism*. 2012; 15(6): 838–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.022>
43. Xu D., Zeng W., Han X., Qian T., Sun J., Qi F., Liu C., Wang Q., Jin H. Honokiol protects against epidural fibrosis by inhibiting fibroblast proliferation and extracellular matrix overproduction in rats post laminectomy. *International Journal of Molecular Medicine*. 2020; 46: 2057–68. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4765>
44. Maha G. E., Mantawy E. M., Gad A. M., Fawzy H. M., El-Demerdash E. Mechanistic aspects of antifibrotic effects of honokiol in con A-induced liver fibrosis in rats: Emphasis on TGF- β /SMAD/MAPK signaling pathways. *Journal Pre-proof*. 2019; 1(240): 651–89. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117096>
45. Ali S.O., Darwish H.A., Ismail N.A. Modulatory effects of curcumin, silybin-phytosome and alpha-R-lipoic acid against thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. *Chemico-Biological Interactions*. 2014; 216: 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.03.009>
46. Hellerbrand C., Schattnerberg J., Peterburs P., Lechner A., Brignoli R. (2016). The potential of silymarin for the treatment of hepatic disorders. *Clinical Phytoscience*. 2016; 2. <https://doi.org/10.1186/s40816-016-0019-2>
47. Wang R., Zhang J.Y., Zhang M., Zhai M.G., Di S.Y., Han Q.H., et al. Curcumin attenuates IR-induced myocardial injury by activating SIRT3. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2018; 22(4): 1150–60. https://doi.org/10.26355/eurrev_201802_14404
48. Zhang S.J., Li Y.F., Wang G.E., Tan R.R., Tsoi B., Mao G.W., et al. Caffeine ameliorates high energy diet-induced hepatic steatosis: Sirtuin 3 acts as a bridge in the lipid metabolism pathway. *Food function*. 2015; 6(8): 2578–87. <https://doi.org/10.1039/c5fo00247h>
49. Wang Y., Li C., Gu J., Chen C., Duanmu J., Miao J., et al. Celastrol exerts anti-inflammatory effect in liver fibrosis via activation of AMPK-SIRT3 signalling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020; 24(1): 941–53. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14805>
50. Wang A., Zhou F., Li D., Lu J., Wang Y., Li, L γ -Mangostin alleviates liver fibrosis through Sirtuin 3-superoxide-high mobility group box 1 signaling axis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2019; 363: 142–53. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.11.011>
51. Vargas-Ortiz K., Pérez-Vázquez V., Macías-Cervantes M. H. Exercise and Sirtuins: A Way to Mitochondrial Health in Skeletal Muscle. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(11): 2717–28. <https://doi.org/10.3390/ijms20112717>

Сведения об авторах:

Гребнев Дмитрий Юрьевич, доктор мед. наук, доцент, зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, ст. науч. сотр. ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий» Россия, e-mail: dr-grebnev77@mail.ru;

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» Россия, e-mail: makliu@mail.ru;

Султанова Диана Асламовна, студент 5-го курса педиатрического факультета ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: dina.s01@mail.ru

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092

Пальцын А.А.^{1,2}, Свиридкина Н.Б.¹

Инсульт и пробиота

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,
125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8;²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России,
123993, Москва, Россия, Баррикадная ул., д. 2/1, стр. 1

Пробиота (микрофлора кишечника) – важный фактор возникновения, развития, лечения, реабилитации, формирования близких и отдаленных последствий инсульта. Поэтому можно и нужно использовать эти знания для профилактики и лечения этой распространенной и тяжелой, часто смертельной болезни. Важной медицинской характеристикой пробиоты является способность создавать короткоцепочечные жирные кислоты (short-chain fatty acids –SCFA) – энергетический субстрат для мозга и мышц, а также для «второго мозга» – колоноцитов. Для них они не только энергетический субстрат, но и стимулятор пролиферации. Флора, потребляющая SCFA препятствует колонизации кишечника патогенами, например, шигеллами и сальмонеллами, блокирует их адгезию к эпителию, стимулирует рост некоторых полезных анаэробных бактерий. Главный фактор пользы вегетарианской и веганской диеты – благоприятная пробиота.

Ключевые слова: инсульт; пробиота; пребиота; бутират; микрофлора; кишечник

Для цитирования: Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б. Инсульт и пробиота. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2022; 66(4): 166-171.

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.166-171

Участие авторов: концепция и дизайн обзора, написание текста, сбор и обработка материала, редактирование и обсуждение окончательной версии обзора – Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

Для корреспонденции: Пальцын Александр Александрович, email: lrrp@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.08.2022

Принята к печати 27.10.2022

Опубликована 15.12.2022

Paltsyn A.A.^{1,2}, Sviridkina N.B.¹

Stroke and probiotics

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Moscow, 125315, Russian Federation;²Russian Medical Academy of Postgraduate Education,
Moscow, 123995, Russian Federation

Probiotics (intestinal microflora) are an important factor in the occurrence, development, treatment, rehabilitation, and formation of immediate and long-term consequences of stroke. Therefore, this knowledge can and should be used to prevent and treat this common and severe, often fatal, disease. An important medical characteristic of probiotics is the ability to create short-chain fatty acids (SCFAs), an energy substrate for the brain and muscles, as well as for the “second brain”, colonocytes. For them, SCFAs are not only an energy substrate, but also a proliferation inducer. The SCFA-consuming flora prevents colonization of the intestine by pathogens, such as shigella and salmonella, blocks the pathogen adhesion to the epithelium, and stimulates the growth of some beneficial anaerobic bacteria. A major benefit of vegetarian and vegan diets is favorable probiotics.

Keywords: stroke; probiotics; prebiotics; butyrate; microflora; intestines

For citation: Paltsyn A.A., Sviridkina N.B. Stroke and probiota. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2022; 66(4): 166-171. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.166-171

For correspondens: Aleksandr A. Paltsyn, Doctor of biol. Sciences, Prof., Laureate of the State Prize of the USSR, Ch. scientific collaborator Institute of General Pathology and Pathophysiology, prof. cafe general pathology and pathophysiology Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, e-mail: lrrp@mail.ru

Author's contribution: Paltsyn A.A., Sviridkina review concept and design, text writing, material collection and processing, editing, discussion of the review, final version – Paltsyn A.A., Sviridkina N.B. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 02.08.2022

Accepted 27.10.2022

Published 15.12.2022

*«Все болезни начинаются в кишках»
(Древняя догадка, приписываемая Гиппократу)*

Пробиота (микрофлора кишечника) – важный фактор возникновения, развития, лечения, реабилитации, формирования близких и отдаленных последствий инсульта [1]. Проинсультные и противинсультные эффекты пробиоты – это частные случаи всеобъемлющей связи человека со средой обитания, природой и взаимозависимости: человек – природа. Среда не только нас окружает, но и находится внутри, в частности в виде пробиоты и более частной частности – бактерий, образующих короткоцепочечные (не более 5 атомов углерода) жирные кислоты (short-chain fattyacids –SCFA) – питательные вещества для колонизаторов. Всего SCFA 3 с двумя, тремя, и четырьмя углеродными атомами, соответственно: ацетат, пропионат и бутират. Однако в литературе термин *бутират* часто используется как синоним всего комплекса SCFA.

Анаэробная ферментация непереваримых или плохо переваримых полисахаридов (крахмалов, пищевых волокон) – главный по своему биологическому значению процесс в толстом кишечнике. Пропионат производят исключительно анаэробы семейства Clostridiales, а ацетат и бутират имеют более широкий перечень своих продуцентов. SCFA влияют на барьерные и иммунные функции слизистой и на великое множество известных и пока не известных процессов в организме. Все SCFA постоянно присутствуют в крови, стимулируют кровоток в толстой кишке, перистальтику тонкой кишки, влияют на поглощение воды и соли, на чувство насыщения. Вполне современное понимание медицинского значения пробиоты И.И. Мечников изложил более 100 лет назад: «Цель, преследуемая нами, есть превращение нашей кишечной флоры в флору благодетельную для нашего здоровья»[2]. Образование SCFA – главный по своему биологическому значению результат ферментативных процессов в толстом кишечнике. Внутривенное или интраперитонеальное введение бутирата улучшает исходы травматических повреждений мозга [3]. Пробиота способна синтезировать большинство встречающихся в мозге нейротрансмиттеров, в том числе: ГАМК, серотонин, дофамин, норадреналин [4].

Потенциал пробиоты обозначается уже таким формальным по сути, но впечатляющим по цифрам фактом. В кишечнике обитает несколько тысяч только известных видов бактерий, регулируемых тремя миллионами генов, что в 150 раз превышает человеческий геном.

Пероральное потребление пробиотиков, таких как *Bifidobacterium spp.*, *Akkermansia munichipilla* и *Faecalis praunitzii*, снижает содержание провоспалительных маркеров у пожилых людей и старых мышей. Эффект достигается ферментацией этими пробиотиками резистентного крахмала и белков в толстой кишке, проявляется повышением содержания бутирата и улучшением состава пробиоты кишечника. В совокупности пробиотики, резистентный крахмал и резистентные белки способствуют здоровому старению [5]. В китайско–американском исследовании 427 пациентов с болезнью Альцгеймера (контроль – 378 здоровых людей) у больных обнаружили уменьшение общего разнообразия пробиоты, увеличенное содержание *Proteobacteria*, *Bifidobacterium* и *Phascolar* [6]. В качестве причины инвалидности и смерти инсульту принадлежит второе место в нисходящем по «убивающей» способности списке болезней современного человечества, – первое место за ишемической болезнью сердца. Во многих случаях за не смертельным в первые сутки инсультом, следует длящийся месяцы и годы, дорогостоящий, трудно-переживаемый в физическом, моральном, эмоциональном и материальном отношениях процесс реабилитации. Умозрительно существенно улучшить ситуацию могли бы эндоваскулярные тромболитизис и тромбэктомия, рекомендуемые для выполнения в ближайшие 8 ч после инсульта. Однако, практика показывает, что для 30-40% больных реканализация в такие сроки оказывается запоздалой, неэффективной, не восстанавливающей циркуляцию, а порой усугубляющей неблагоприятные изменения в пenumбре [7].

Важным патогенетическим фактором инсульта является активация процесса свертывания крови, агрегация кровяных пластинок и образование атероскле-

ротической бляшки, способствующей как тромбированию, так и разрыву сосуда.

Патологические изменения в зоне инсульта не ограничиваются недостаточностью кислорода, глюкозы, других нормальных компонентов обмена, но осложняются появлением и увеличением содержания damage associated molecular patterns (DAMPs) – искаженных «уродливых» молекул-результатов патологической циркуляции, гипоксии, гипервоспаления. DAMPs вызывают повреждения и гибель нейронов и глиоцитов, повреждают ГЭБ, эндокринную регуляцию, стимулируют воспаление [8]. Цитокины, хемокины, высвобождающиеся при повреждении, активируют резидентную микроглию пенумбры [9].

В последние годы появилось большое количество сведений, благодаря которым сложилось убеждение о важной роли кишечной флоры в патогенезе инсульта [10]. При инсульте, как и без него, для питания организма, обеспечения его энерготрат, иммунитета и функции мозга микрофлора кишечника имеет жизненно-важное значение. Нарушение циркуляции в мозге активирует иммунную систему кишечника, повышает проницаемость кишечной стенки. Это, в свою очередь, приводит к эктопии провоспалительных клеток, бактерий, попадающих в кровоток и в ткани головного мозга вместе с DAMPs через нарушенный гематоэнцефалический барьер. Существенной составляющей патогенеза ишемического инсульта – является активация, агрегация тромбоцитов и формирование атеросклеротической бляшки. Возможность образования/необразования бляшки в свою очередь зависит от микрофлоры кишечника – пробиоты. Пробиота играет также важную роль в двухсторонней связи между центральной и кишечной нервными системами.

По-видимому, лучший способ бактериологической терапии инсульта, а также профилактики его возникновения и развития осложнений – создание питанием и образом жизни благоприятной микрофлоры пищеварительного тракта – пробиоты. Это 15.000 ~ 36.000 видов бактерий, преимущественно (70-75%) Firmicutes и Bacteroides, а также археев, эукариотов, вирусов, бактериофагов. На состав пробиоты существенно влияют среда обитания, пищевой, трудовой, бытовой режимы, генетика хозяина. В качестве полезных для метаболизма и барьерной функции пробиотиков обычно указывают *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*. Нежелательны и вредны *Salmonella* и патогенные штаммы *Escherichia coli*. Неблагоприятное соотношение между полезными и вредными считается причиной многих болезней.

Расстройства микроэкосистемы кишечника, нарушающие в нём метаболизм и абсорбцию, могут быть

риск-фактором инсульта. Энтеральная нервная система «второй мозг» взаимодействует с центральной и вегетативной нервными системами. «Второй мозг» осуществляет двунаправленную регуляцию (перистальтики, секреции, иммунологической защиты) комплекса: мозг-кишечник-флора “flora-gut-brain axis” в автономных отношениях с ЦНС. Кишечная флора способна, ферментируя компоненты пищи создавать множество разнообразных метаболитов, – в том числе регуляторов развития, пластичности, функций мозга, BDNF, синаптофизина и др. Интернейроны кишечника (их сотни миллионов «второй мозг») контролируют его динамику, секрецию, иммунологическую защиту и, конечно, связь с большим мозгом. Во взаимодействие вовлекаются энтероэндокринные клетки эпителия, секретирующие пептидные гормоны, с влиянием на перистальтику и воспаление. Общепринятая точка зрения состоит в том, что нервная, иммунная и эндокринная системы используют блуждающий нерв в качестве основного средства связи, тем самым комплексно с большим мозгом участвуют в регуляции оси мозг-кишечник-микробиота. Использование трансплантаций пробиотика (фекальную трансплантацию от здорового донора через зонд в желудок или двенадцатиперстную кишку, другие пути – через колоноскоп, капсулу или клизму) предлагается авторами для лечения многих болезней: фибромиалгии, синдрома хронической усталости, дистопии, болезни Паркинсона, множественного склероза, ожирения, инсулин-резистентности, метаболического синдрома, аутизма [11]. «Вмешательство» инсульта в нервную регуляцию многих и разнообразных функций кишечного микробиома, называемое дисбиозом кишечника, нарушает нормальную двустороннюю передачу сигналов кишечник-мозг, а следовательно, и все управляемые этими сигналами процессы. Следствия: эндотоксемия, системное воспаление, инфекция, неблагоприятное влияние на течение и исход инсульта. Сигналы от кишечника к мозгу опосредуются метаболитами микробного происхождения, такими как N-оксид триметиламин (ТМАО), SCFA, липополисахаридами (LPS) и, наконец, «бактериальными компонентами» в виде живых бактерий. Последнее обстоятельство подсказывает, что восстановление здоровой микробной экологии кишечника жизненноважно и за рамками проблемы успешной реабилитации после ишемического инсульта. Прекращение транслокации бактерий и токсинов в системный кровоток препятствует развитию расстройств обмена и многих сердечно-сосудистых и неврологических болезней.

Все 3 SCFA в физиологических концентрациях увеличивают скорость роста и число митозов в культуре нейральных прогениторных клеток человека [12]. Ки-

шечная микробиота синтезирует несколько незаменимых витаминов, группы В: В₁₂, фолиевую кислоту, биотин, тиамин, рибофлавин, никотиновую кислоту, пиридоксин, пантотеновую кислоту, витамин К. Микробиотой синтезируются важнейшие медиаторы ЦНС – γ -аминомасляная кислота, серотонин.

Наши, далеко не исчерпывающие, упоминания о нейрорегуляциях кишечника оправдывают интерес к энтеральным аспектам риск-факторов и механизмам патогенного и саногенного развития ишемического инсульта. Обращение к литературе показало, что состав микробиоты, а конкретно, малое содержание бутират-продуцирующих видов увеличивает риск развития ишемического инсульта [13] и снижает успешность последующей реабилитации [14]. Вызванные инсультом желудочно-кишечные нарушения неблагоприятно влияют на неврологические результаты лечения пациентов, могут тормозить и даже блокировать процессы реабилитации, устранения неврологического дефицита, увеличить вероятность коморбидности и смертности. Клинические и доклинические исследования, проведенные за последнее десятилетие, продемонстрировали убедительную корреляционную связь между дисбактериозом кишечника и развитием хорошо известных факторов риска инсульта, таких как дислипидемия; резистентность к инсулину; избыточный вес – ожирение; гипертоническая болезнь; диабет 2-го типа; сердечно-сосудистые, цереброваскулярные и неврологические расстройства.

Типичным различием микробиоты молодых и старых мышей является снижение продукции короткоцепочечных жирных кислот – SCFA-главного источника энергии для колоноцитов у старых животных. Когда старые мыши после окклюзии средней мозговой артерии получали фекальную трансплантацию от молодых мышей они восстанавливались быстрее, сравнительно с получавшими трансплантат от старых мышей [15]. Исследование доказало значительное влияние пробиоты на постинсультную реабилитацию.

Ещё большую ценность для медицины имеют результаты аналогичного по схеме американо-китайского *клинического* исследования [16]. В нём участвовали 141 пациент в возрасте ≥ 60 лет, без инсульта в прошлом, разделенные на группы высокого, среднего и низкого риска инсульта по набору известных риск-факторов инсульта и перенесенных заболеваний. Группа высокого риска отличалась от других двух групп повышенным содержанием оппортунистической флоры, скудным присутствием бутират-продуцентов. Содержание бутирата в фекалиях пациентов из группы высокого риска было снижено. Предыдущая работа касается важного в проблеме обстоятельства.

Желудочно-кишечный тракт – самый большой (больше 70% по массе) орган иммунной системы. Изучение иммунологической составляющей проблемы затруднено неизбежным отсутствием результатов бактериологического и иммунологического обследования пациента перед инсультом. Не умаляя значения данных от людей с высоким риском, следует признать, что риск, даже высокий – всё-таки не инсульт. Для надежной профилактики и лечения нужна большая точность. Возникший инсульт стабилизирует и усиливает местные и общие патологические изменения: нарушает проницаемость эпителиального барьера кишечника (межклеточные контакты), перистальтическую подвижность, секрецию муцина бокаловидными клетками, снижает число этих клеток, усиливает воспаление. Развиваются энтерит, эндотоксемия, повышенная проницаемость ГЭБ, нейровоспаление, возрастает продукция ROS и реактивных форм азота – RNS. Повышается вероятность обострения или развития гипертонической болезни, диабета 2 типа, сердечно-сосудистых и неврологических расстройств [17]. Недавние исследования подтвердили положительную корреляцию между дисбиозом кишечника и тяжелым течением инсульта. Патофизиологические механизмы, лежащие в основе дисбактериоза кишечника, вызванного инсультом, включают недостаточность эпителиального барьера кишечника, нарушение моторики кишечника, изменение секреции слизи, потерю бокаловидных клеток, изменения местного иммунного гомеостаза, повышенный уровень ЛПС и воспаление кишечника, перемещение кишечных бактерий в кровотоки и внекишечные органы. Развивается эндотоксемия, и это событие приводит к обострению воспаления, разрушению ГЭБ, усилению нейротоксичности, характеризующейся повышенной продукцией ROS, RNS (reactive nitrogen species), ЛПС, С-реактивного белка, проинфламаторных цитокинов, развитием нейровоспаления. За активацией микроглии следует инфильтрация периферических тканей иммунными клетками, особенно моноцитами, а также Т и В-лимфоцитами. Дисбактериоз кишечника, как уже говорилось, часто сочетается с несколькими проинсультными факторами: гипертоническая болезнь, ожирение, дислипидемия, метаболический синдром, СД2, атеросклероз. Следствием этого становится увеличение зоны инфаркта, числа погибших нейронов, синапсов, глиальных клеток, нарастание дисфункции – тяжелое течение болезни с вероятностью осложнений и повышенной смертности. В сравнении 140 случаев инсульта с 92 контролями обнаружили у больных дисбиоз пропорциональный тяжести инсульта, выразившийся сниженным присутстви-

ем SCFA продуцирующих бактерий и концентрации SCFA в кишечнике. Корректировка этих показателей не избавляла больных от последующего тяжелого течения инсульта. Видимо лечение оказывалось запоздалым. Связь концентрации SCFA с состоянием больного настолько отчетливая, что авторы предлагают использовать этот показатель для определения прогноза.

Есть описания клинических приемов, рекомендуемых для коррекции дисбиоза, путем разрыва порочного проморбидного круга. Для нашей темы наибольший интерес представляет трансплантация пробиоты, о которой уже упоминалось выше.

Полноценная микробиота защищает кишечник от колонизации экзогенными патогенами и препятствует избыточному размножению эндогенных потенциально патогенных микробов — феномен, называемый колонизационной резистентностью [18]. Такое действие обеспечивается конкуренцией за нутриенты и пространство, прямым ингибированием патогенов антимикробными веществами «оседлых штаммов», не благоприятным для патогенов изменением среды. Снижение численности бутират-продуцирующих комменсалов увеличивает содержание кислорода в кишке и благоприятствует экспансии вирулентных сальмонелл. Достаточность бутирата, напротив, стимулирует секрецию муцина бокаловидными клетками и поставляет энергию для создания плотных контактов эпителиоцитами. Введенный орально или в портальную вену бутират существенно (на 50–70%) увеличивает продолжительность сна у мышей и снижает температуру тела. Подкожные или в/б инъекции не оказывают такого действия. Видимо, сенсорный механизм основан на рецепторах расположенных в печени или стенке воротной вены [19]. Sun с соавторами [20] кормили мышей в течение 2 недель бактериями *Clostridium butyricum*. Затем вызывали 20-минутную ишемию мозга окклюзией общей сонной артерии. После реперфузии выяснилось, что кормление животных *C. Butyricum* увеличивало содержание бутирата в мозге, существенно уменьшало, вызванные временной ишемией, неврологический дефицит и деструктивные изменения в гиппокампе, увеличивало активность супероксиддисмутазы.

При стрептококковом менингите у крыс через 10 дней после заражения в контроле (введения физраствора) обнаружили нарушения памяти и снижение содержания BDNF и GDNF в гиппокампе. В опыте (введение бутирата) сохранялась память и уровень экспрессии BDNF и GDNF в гиппокампе [21].

Для здоровья человека вегетарианство и веганство (строже исключая продукты животных) предпочтительнее всеядности. Аргументов в пользу вегетари-

анства много. В нашей теме это развитие более разнообразной и стабильной кишечной микрофлоры. В частности многочисленное присутствие представителей рода *Bacteroides*, способных разлагать сложные растительные полисахариды, такие как крахмал, целлюлоза, пектины. Обильные в растительной пище полифенолы способствуют размножению *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, обладающих противовоспалительным и кардиопротективным действием. Среди них есть виды — производители SCFA. Они (SCFA) нормализуют воспалительную реакцию, восстанавливают ГЭБ, и, конечно, обеспечивают энергией все совершающиеся процессы [22].

Старость (старше 65 лет) неблагоприятно сказывается на составе и функциях микробиоты. Ухудшается пережевывание, качество и количество слюны. Замедляется перистальтика, а следовательно, переваривание и абсорбция. Снижаются аппетит, концентрация пищеварительных соков, соляной кислоты. Следствие: мальабсорбция и избыточная активность бактерий в тонкой кишке. Не способствует пищеварению и частый для такого возраста прием лекарств. Для старческой микробиоты характерно снижение общего разнообразия флоры и, что особенно плохо — производителей SCFA и бутирата в особенности [23].

Преคลินิกские и клинические исследования последних лет показали прочную связь между кишечным дисбиозом и развитием риск-факторов инсульта: дислипидемии, инсулин-резистентности, ожирения, гипертонической болезни, диабета 2-го типа, сердечно-сосудистых и неврологических болезней, эндотоксемии, нейротоксичности, повышенного содержания ЛПС, увеличения продукции ROS, RNS. Эти риск-факторы могут быть и осложнениями инсульта.

Патогенные проявления кишечного дисбиоза могут быть предотвращены фармакологическими и нефармакологическими воздействиями, диетой [24] антибиотиками, пробиотиками, пребиотиками и их комплексами — синбиотиками, трансплантациями фекалий [17]. Исследования последних лет доказывают, что динамика микробиома поддается благоприятному для здоровья регулированию. Указанными воздействиями удастся восстановить микрофлору кишечника, с высоким уровнем SCFA и бутирата в особенности. При ишемическом инсульте обогащение пробиоты SCFA существенно снижает проницаемость кишечной стенки и воспаление; уменьшает содержание патогенных бактерий (например: *Bacteroides*, *Klebsiella* и *Haemophilus*) и увеличивает популяцию благоприятных для пищеварения таксонов, например: *Lactobacillus*, *Butyricoccus* и *Meganonas*. Пробиота толстого кишечника синтезирует или сти-

мулирует синтез нескольких нейротрансмиттеров, таких как ацетилхолин, гамма-аминомасляная кислота, серотонин, мелатонин, N-ацетил серотонин, глутамат, допамин, норадреналин. Пробиота модулирует активацию иммунной системы. Снижает содержание провоспалительных цитокинов, что благоприятно сказывается на течении инсульта [25]. Такие изменения микробиома подавляют апоптоз нейронов и глиоцитов, препятствуют развитию оксидативного стресса, снижают вероятность развития и объем инфаркта, масштаб неврологических нарушений. Эти данные свидетельствуют о первостепенном значении, медицинской перспективности в поддержании здоровья человека и в проблеме профилактики и лечения инсульта, а именно связи: кишечник — микробиота — мозг.

Литература

(п.п. 1; 2–23 см. References)

2. Мечников И.И. *Молочные микробы и польза, приносимая ими здоровью*. СПб.; 1911.
24. Коваленко Л.В., Белова Е.А., Гуляев А.Е., Кавушевская Н.С., Синукова Т.А., Кривых Е.А. Патологические процессы при метаболическом синдроме как вероятные мишени терапевтического воздействия. *Патогенез*. 2022; 20(1): 4-13.
25. Кабаева Е.Н., Ершов А.В., Литвицкий П.Ф., Тушова К.А., Ноздрюхина Н.В. Особенности механизма развития и течения острого инсульта у пациентов с Covid-19. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(2): 10-7. DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02

References

1. Yunpeng Liu, Jing Dong, Ziqing Zhang, Yiqi Liu, Yang Wang. How brain infarction links with the Microbiota-Gut-Brain Axis: Hints from studies focusing on the risk factors for ischemic stroke. *Front Neurosci*. 2022; May 24; 16: 877937.
2. Mechnikov I.I. *Milk microbes and the benefits they bring to health [Molochnye mikroby i pol'za, prinosimaya imi zdorov'yu]*. Sankt-Peterburg; 1911.
3. Li H., Sun J., Du J., Wang F., Fang R., Yu C., et al. Clostridium butyricum exerts a neuroprotective effect in a mouse model of traumatic brain injury via the gut-brain axis. *Neurogastroenterol Motil*. 2018; 30:e13260.
4. Dinan T.G., Cryan J.F. The microbiome-gut-brain axis in health and disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017; 46: 77–89.
5. Dwina J.W., Huijuan J., Hisanori K. The Potential roles of probiotics, resistant starch, and resistant proteins in ameliorating inflammation during Aging (Inflammaging). *Nutrients*. 2022 Feb; 14(4): 747.
6. Chun-Che H., Chiung-Chih C., Chi-Wei H., Rui N., Chia-Hsiung C. Gut microbiota in patients with Alzheimer's disease spectrum: a systematic review and meta-analysis. *Aging (Albany NY)*. 2022 Jan 15; 14(1): 477–96. doi:10.18632/aging.203826
7. Balodis A., Radzina M., Miglane E., Rudd A., Millers A., Savlovskis J., et al. Endovascular thrombectomy in anterior circulation stroke and clinical value of bridging with intravenous thrombolysis. *Acta Radiol*. 2019; 60: 308–14.

Сведения об авторах:

Пальцын Александр Александрович, доктор биол. наук, проф., лауреат Государственной премии СССР, гл. науч. сотр. НИИОПП, проф. каф. общей патологии и патофизиологии РМАНПО;
Свиридкина Надежда Борисовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. НИИОПП.

8. Bustamante A., Simats A., Vilar-Bergua A., Garcia-Berrocoto T., Montaner J. Blood/brain biomarkers of inflammation after stroke and their association with outcome: from C-reactive protein to damage-associated molecular patterns. *Neurotherapeutics*. 2016; 13: 671–84.
9. Gauberti M., De Lizarrondo S.M., Vivien D. The “inflammatory penumbra” in ischemic stroke: from clinical data to experimental evidence. *Eur. Stroke J*. 2016; 1: 20–7.
10. Wenjie H., Xiangyi K., Hui W., Yunqing L., Yimin L. Ischemic stroke and intestinal flora: an insight into brain-gut axis. *Eur J Med Res*. 2022; May 25; 27(1): 73.
11. Choi H.H., Cho Y.-S. Fecal microbiota transplantation: current applications, effectiveness, and future perspectives. *Clinical Endoscopy*. 2016; 49(3): 257–65.
12. Yang L.L., Millischer V., Rodin S., MacFabe D.F., Villaescusa J.C., Lavebratt C. Enteric short-chain fatty acids promote proliferation of human neural progenitor cells. *J Neurochem*. 2019; e14928.
13. Zeng X., Gao X., Peng Y., Wu Q., Zhu J., Tan C., et al. Higher Risk of Stroke Is Correlated with Increased Opportunistic Pathogen Load and Reduced Levels of Butyrate-Producing Bacteria in the Gut. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2019; 9: 4.
14. Tan C., Wu Q., Wang H., Gao X., Xu R., Cui Z. et al. Dysbiosis of Gut Microbiota and Short-Chain Fatty Acids in Acute Ischemic Stroke and the Subsequent Risk for Poor Functional Outcomes. *JPEN J. Parenter. Enter. Nutr*. 2021; 45: 518–29.
15. Lee J., D'Aigle J., Atadja L., Quaicoe V., Honarpisheh P., Ganesh B.P., et al. Gut Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Promote Poststroke Recovery in Aged Mice. *Circ. Res*. 2020; 127: 453–65.
16. Xiuli Zeng, Xuxuan Gao, Yu Peng, Qiheng Wu, Jiajia Zhu, Chuhong Tan, et al. Higher risk of stroke is correlated with increased opportunistic pathogen load and reduced levels of butyrate-producing bacteria in the gut. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019; 9: 4.
17. Chidambaram S.B., Rathipriya A.G., Mahalakshmi, A.M., Sharma S., Hediyal T.A., Ray B., et al. The Influence of Gut Dysbiosis in the Pathogenesis and Management of Ischemic Stroke. *Cells*. 2022; 11(7): 1239.
18. Lawley T.D., Walker A.W. Intestinal colonisation resistance. *Immunology*. 2012; 138:1–11.
19. Szentirmai É., Millican N.S., Massie A.R., Kapás L. Butyrate, a metabolite of intestinal bacteria, enhances sleep. *Sci Rep*. 2019; 9: 7035.
20. Sun J., Ling Z., Wang F., Chen W., Li H., Jin J., et al. Clostridium butyricum pretreatment attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in mice via anti-oxidation and anti-apoptosis. *Neurosci Lett*. 2016; 613: 30.
21. Barichello T., Generoso J.S., Simões L.R., Faller C.J., Ceretta R.A., Petronillo F., et al. Sodium butyrate prevents memory impairment by re-establishing BDNF and GDNF expression in experimental pneumococcal meningitis. *Mol Neurobiol*. 2015; 52: 734–40.
22. Tomova A., Bukovsky I., Rembert E., Yonas W., Alwarith J., Barnard N.D., et al. The Effects of Vegetarian and Vegan Diets on Gut Microbiota. *Front Nutr*. 2019; 6: 47.
23. Biagi E., Rampelli S., Turroni S., Quercia S., Candela M., Brigidi P. The gut microbiota of centenarians: Signatures of longevity in the gut microbiota profile. *Mech. Ageing Dev*. 2017; 165: 180–4.
24. Kovalenko L.V., Belova E.A., Gulyaev A.E., Kavunovskaya N.S., Sinyukova T.A., Krivikh E.A. Pathological processes in metabolic syndrome as probable targets of therapeutic effects. *Patogenez*. 2022; 20(1): 4-13
25. Кабаева Е.Н., Ершов А.В., Литвицкий П.Ф., Тausheva K.A., Ноздрюхина Н.В. Features of the mechanism of development and course of acute stroke in patients with Covid-19. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2022; 66(2): 10-7. DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02

Информация

DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.172-174

Итоги работы IX Российской конференции по нейроиммунопатологии, посвященной 100-летию со дня рождения академика РАМН Г.Н. Крыжановского

10-11 ноября 2022 г. в Москве в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (ФГБНУ «НИИОПП») состоялась Девятая Российская конференция по нейроиммунопатологии с международным участием, посвященная 100-летию со дня рождения академика АМН СССР и РАМН Г.Н. Крыжановского. Конференция была организована Министерством науки и образования РФ, ФГБНУ «НИИОПП», Российской академией наук, отделением медицинских наук Российской академии наук и Российским научным обществом патофизиологов.

Председатели конференции – академики РАН А.А. Кубатиев, Е.А., Корнева и член-корреспондент РАН С.Г. Морозов. В состав оргкомитета вошли академики РАН А.М. Дыгай, В.А. Черешнев, В.П. Чехонин, член-корреспондент РАН С.С. Перцов, профессор д.б.н. Г.В. Идова, профессор д.м.н. Т.П. Ключник, профессор д.м.н. И.Д. Столяров, д.б.н. Н.Б. Панкова, к.м.н. Е.Н. Кожевникова. Ответственный секретарь конференции д.м.н. Т.В. Давыдова.

Конференция была посвящена обсуждению последних исследований молекулярно-клеточных и системных механизмов взаимодействия нервной и иммунной системы в норме и патологии, а также новых подходов к нейроиммунотерапии. В работе конференции приняли участие более 200 ученых из Москвы, Санкт-Петербурга, Новосибирска, Томска, Екатеринбурга, Петрозаводска и др., а также ученые из Азербайджана, Великобритании и Германии. На конференции были представлены результаты исследований из 20 научных, лечебных и учебных учреждений России и 3 учреждений из зарубежных стран. Активно участвовали в работе конференции исследователи из следующих учреждений России: ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (Москва), ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К.Анохина» (Москва), ФГБНУ «Институт эксперименталь-

ной медицины» (Санкт-Петербург), ФГБНУ «Научный центр психического здоровья» (Москва), ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (Новосибирск), ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины» (Новосибирск), НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (Томск), ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава РФ (Санкт-Петербург), Санкт-Петербургский государственный университет (Санкт-Петербург), АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» (Санкт-Петербург), ФГБНУ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (Санкт-Петербург). Из зарубежных институтов участвовал Институт физиологии им. академика Абдуллы Гараева, НАН Азербайджана (Баку).

В работе конференции приняли участие 4 академика РАН, 2 члена-корреспондента РАН, 15 профессоров, 25 докторов наук и 56 кандидатов наук и свыше 35 молодых ученых. На конференции были заслушаны 7 пленарных докладов, 18 секционных и 17 стендовых докладов, подготовленных 150 авторами.

С докладом о жизни и деятельности академика АМН СССР, РАМН Г.Н. Крыжановского – выдающегося советского и российского патофизиолога – выступила доктор биологических наук Н.А. Крупина, которая является его ученицей и проработала с ним более 35 лет. Г.Н. Крыжановский руководил лабораторией общей патологии нервной системы до конца своей жизни. С 2013 г. по 2019 г. лабораторию возглавлял член-корреспондент РАН В.К. Решетняк, а в настоящее время лабораторией заведует Н.А. Крупина.

Новое направление в биомедицинской науке – нейроиммунопатология – было создано Г.Н. Крыжановским, который стал директором института в 1983 г. По его инициативе в институте была организована

первая в стране лаборатория нейроиммунопатологии, а в структуре Научно-методического Совета по общей патологии РАМН была создана Проблемная комиссия по нейроиммунопатологии, в обязанности которой входила координация работы в направлении этой междико-биологической науки в масштабе страны.

Пленарные доклады были посвящены узловым проблемам нейроиммунопатологии: С.Г. Морозов «Перинатальная нейроиммунопатология: от эксперимента к клинике» (ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва), И.М. Кветной, Е.С. Миронова «Нейроиммуноэндокринология: интеграция знаний о сигнальных механизмах регуляции гомеостаза (ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава РФ, Санкт-Петербург), И.Н. Абдурасулова «Микробиота кишечника как ключевой участник нейроиммунных взаимодействий» (ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург), М.А. Грудень, R.D.E. Sewell «Аутоантитела к белку α -синуклеину, его амилоидогенным агрегатам в гуморальных механизмах иммунитета при болезни Паркинсона и экспериментальном моделировании» (ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина» Москва), Г.В. Идова и соавт. «Периферические иммунновоспалительные механизмы болезни Паркинсона» (ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины», Новосибирск), Т.В. Давыдова и соавт. «Антитела к глутамату как регуляторы мнестических функций ЦНС при нейродегенеративных повреждениях и старении головного мозга» (ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва), С.А. Зозуля и соавт. «Предикция уровня постприступного социального функционирования детей на основе определения иммунологических показателей» (ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва).

В докладе члена-корреспондента РАН С.Г. Морозова, посвященном новому направлению в нейроиммунопатологии – перинатальной нейроиммунопатологии, были представлены данные о новых методах диагностики и терапии перинатальных нарушений ЦНС. Показана взаимосвязь между отклонением содержания уровней материнских аутоантител во время беременности с выраженностью патологии нервной системы у новорожденных. Технологию «Нейро-тест», разработанную в совместных исследованиях с ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва (руководитель – д.м.н., проф. Т.П. Ключник) применяли для мониторинга терапии детей с тяжёлыми органически-

ми поражениями нервной системы. Эта технология позволяет выявить степень активности нейроиммунного конфликта по целому ряду иммунологических показателей. В клинических исследованиях с применением этой технологии были получены данные, позволившие сформулировать гипотезу о том, что повреждение гемато-энцефалического барьера создает окно для проникновения в мозг крупных молекул.

В докладе доктора медицинских наук, профессора И.М. Кветного и кандидата биологических наук Е.С. Мироновой была подчеркнута необходимость интеграции знаний о сигнальных механизмах регуляции гомеостаза в нейроиммуноэндокринологии – еще одном направлении биомедицинских исследований, которое получило широкое признание в последнее время.

Доктор медицинских наук Т.В. Давыдова и соавт. в своем докладе подчеркнули нейроиммунорегуляторную роль антител к глутамату в процессах памяти при нейродегенеративной патологии головного мозга и возрастных изменениях. Антитела к глутамату являются значимым компонентом иммунных механизмов ауторегуляции.

В докладе кандидата биологических наук И.Н. Абдурасуловой была показана ключевая роль микробиоты кишечника как участника нейроиммунных взаимодействий. Высказано предположение о том, что микробное сообщество в кишечнике координирует коммуникацию между иммунной, нервной и эндокринной системами, что необходимо для развития и поддержания гомеостаза организма хозяина.

Доклад кандидата химических наук М.А. Грудень был посвящён исследованиям роли аутоантител к белку α -синуклеину и его амилоидогенным агрегатам в гуморальных механизмах иммунитета при болезни Паркинсона (БП) и экспериментальном моделировании этого расстройства. Показано, что иммуно-воспалительно-амилоидный каскад, меняет конфигурацию функциональных систем здорового организма. Биомаркером БП может служить нарушение конформации белка α -синуклеина с последующим депонированием в тканях белковых агрегатов. Эти изменения лежат в основе развития нейродегенеративного процесса при БП. Промежуточные формы белковых агрегатов (олигомеры) индуцируют гибель нервных и глиальных клеток по типу апоптоза, что определяет актуальность направления изучения механизмов иммунологической защиты мозга от токсических олигомерных белковых форм.

Профессор Г.В. Идова и соавт. в своем докладе представили результаты изучения нейроиммунологических механизмов БП. Приведен анализ экспрессии

TLR2 и TLR4 рецепторов на циркулирующих моноцитах, Т- и В-клетках, а также продукции цитокинов – IL-6, IL-10, IL-17, IL-4 у мышей линий A53T. Эти данные являются свидетельством того, что иммуновоспалительные нарушения лежат в основе БП на доклинических стадиях её развития.

В секционном докладе, представленном доктором медицинских наук В.Г. Кучеряну и соавт., также было подчеркнуто, что важную роль в гибели nigrostriатных дофаминергических нейронов и, возможно, прогрессировании БП, наряду с олигомерной формой α -синуклеина, играет нейровоспаление, вызванное активацией микроглии.

Поиск нейроиммунных маркеров социально значимых нейродегенеративных заболеваний является ключевой проблемой нейроиммунопатологии. Эти вопросы были рассмотрены в ряде докладов.

Профессор Н.В. Скрипченко (ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА России», Санкт-Петербург) показала, что современные технологии определения антител к нейрональным рецепторам и синаптическим белкам, антинейрональных аутоантител к внутриклеточным мембранным антигенам, а также aquarogin-4 и MOG позволяют установить дифференциальный диагноз и выбрать оптимальную терапевтическую тактику в случае заболеваний инфекционными, аутоиммунными и паранеопластическими энцефалитами.

Кандидат биологических наук С.А. Зозуля и соавт. (ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва) выявили связь между уровнем активации

иммунной системы в приступе с психотической симптоматикой эндогенного генеза и уровнем пост-приступного социального функционирования у детей.

Новые технологии нейроиммунотерапии были представлены в докладах доктора медицинских наук Е.В. Марковой и М.А. Княжевой, а также аспиранта Е.В. Серенко (ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск). Эти технологии основаны на модуляции *in vitro* иммунокомпетентных клеток – спленоцитов мышей-доноров кофеином в случае экспериментального депрессивно-подобного поведения или аминазином – в случае экспериментально-индуцированной агрессии и дальнейшем введении модулированных клеток мышам-реципиентам с соответствующей патологией. Установлено, что такая обработка иммунокомпетентных клеток обладает положительным психонейроиммуномодулирующим эффектом, что открывает перспективы нейроиммунотерапии расстройств психической сферы аутологичными иммунными клетками с модулированной *in vitro* функциональной активностью.

В заключение следует отметить, что многие из представленных на конференции работ, выполнялись при активной поддержке фондов РФФ и РФФИ.

Материалы конференции опубликованы в специальном номере журнала «Патогенез», 2022; 20(3): 1-148.

Доктор мед. наук Т.В. Давыдова,
доктор мед. наук Н.А. Крупина

Новые рубежи изучения воспаления: от трансляционных исследований к клинике. (Информация о XV Всемирном конгрессе (WCI2022))

С 5 по 8 июня 2022 г. в Риме (Италия) прошел XV Всемирный конгресс «Новые рубежи изучения воспаления: от трансляционных исследований к клинике» (WCI2022). Конгресс, собрал исследователей занимающихся проблемами воспаления со всего мира. Были представлены самые последние достижения в области воспаления в фундаментальной науке и клинической практике. Конгресс должен был состояться осенью 2021 года, но из-за пандемии COVID-19 сроки были перенесены почти на год. Следует отметить, что после двух лет преимущественно онлайн общения возможность принять участие в конгрессе привлекла очень много исследователей из разных стран. Конгресс в очном формате собрал представителей более чем 40 стран. Непосредственное участие в работе конгресса приняло более 500 исследователей, занимающихся проблемами воспаления. Было проведено 30 симпозиумов и прочитано ведущими специалистами 6 лекций, в рамках которых были освещены и обсуждались наиболее актуальные научные направления по изучению фундаментальных основ воспаления и возможности их трансляции в клиническую практику. Ключевой целью WCI2022 было способствовать развитию научного взаимодействия между учеными и клиницистами, для чего вся программа конгресса была построена так, чтобы не только обсудить последние инновационные достижения в области изучения генетических, молекулярных и клеточных механизмов воспаления, но и сосредоточиться на клинических исследованиях по применению новых противовоспалительных препаратов.

Конгресс открыла лекция Alberto Mantovani (Италия) «Воспаление, метанарратив от рака до COVID-19». В лекции были проведены параллели между развитием воспаления, сопровождающего канцерогенез, и характеристиками воспаления при COVID-19. Большое внимание уделялось изменениям иммунных реакций с особым акцентом на врожденный иммунный ответ, нейтрофильные внеклеточные ловушки, особенности гуморального и клеточного иммунитета. В лекции представлена информация о роли пластичности нейтрофилов и макрофагов в прогрессировании опухоли,

сравнение с изменениями при COVID-19. Затронуты вопросы предоставления инструментов для адаптации текущих стратегий иммунотерапии и формирования новых терапевтических стратегий, ориентированных на регуляцию миелоидных клеток.

Следует отметить интересную пленарную лекцию проф. Daniela Salvemini (США) «Ориентация на нейровоспаление: новые терапевтические подходы при невропатической боли». В лекции представлены новые данные о возможных мишенях для блокирования невропатической боли. В частности, представлена информация об идентификации клеточных и молекулярных механизмов, задействованных осью S1PR1 при невропатической боли, и использования S1PR1 в качестве мишени для терапевтического вмешательства с помощью антагонистов S1PR1 как класса ненаркотических анальгетиков. Критическую роль, кроме того, в дезадаптивной нейропластичности боли играют сигнальные молекулы, действующие на P2X3, P2X4, P2X7 и P2Y12R, а их антагонисты уменьшают силу хронической или воспалительной боли и, следовательно, модуляция пуриновых рецепторов является многообещающим подходом для будущей терапии боли.

Отдельные лекции были посвящены обсуждению роли интерлейкина 23 «Интерлейкин 23: ключевой цитокин при воспалительных заболеваниях» (A. Chiricozzi, M. Fantini, Италия) и возможности блокирования ряда патогенетических путей при ревматоидном артрите «JAK_STAT как мишень при ревматоидном артрите: биологическая и клиническая значимость» (G. Guggino, Италия).

На проведенных симпозиумах обсуждался широкий спектр научных исследований и проблем в разных областях изучения воспаления. Проблемам нейровоспаления были посвящены симпозиумы «Вовлечение микроглии в физиопатологию головного мозга: механизмы и стратегии инновационного терапевтического вмешательства» и «Ось микробиота-кишка-инфламмосома-мозг при нейродегенеративных заболеваниях». Кроме того, проблемы нейровоспаления обсуждались на устной сессии «Нейровоспаление». На этих симпозиумах обсуждались роль иммунной системы

(G. Cantarella, Италия), mTOR/S6K1 пути (S. Oddo, США), MED1/BDNF/TrkB пути (L. Luongo, Италия), PER1/TEM пути (S. Hopkin, Великобритания) в развитии различных заболеваний ЦНС. Были предложены некоторые целевые вещества, такие как синтетический агонист FPR2 (C. Cristiano, Италия), пентаборат пентагидрат натрия (D. Guden, Турция), ингибитор активности киназы Irfk-2 (A. Filippone, Италия) для экспериментального лечения нейровоспаления.

Ряд симпозиумов и устных сессий был посвящен изучению механизмов развития боли – одного из наиболее ярких маркеров воспаления. В частности, на симпозиуме «Механизмы и лечение воспалительной боли» обсуждались возможности блокады PAR-4 для облегчения боли в суставах при посттравматическом остеоартрозе (J. McDougall, Канада) и роль протеолитических путей как мишеней для лечения воспалительной боли (N. Vergnolle, Франция).

Отдельные симпозиумы были посвящены изучению новых механизмов и поиску мишеней для лечения воспаления. Симпозиум «Генная и клеточная терапия воспаления» был посвящен роли генетических и клеточных механизмов в развитии воспаления и возможности применения генетической и клеточной терапии. Особый интерес вызвал критический доклад «Генная терапия для лечения воспалительных заболеваний: реальность или мираж?» (A. Mortellaro, Италия), в которой обобщаются возможности и проблемы разработки генной терапии для лечения воспаления. Симпозиум «Ядерные рецепторы в контроле воспаления» был посвящен изучению роли глюкокортикоидного рецептора в контроле воспаления и метаболизма (C. Libert, Бельгия) и Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper (GILZ) как новой противовоспалительной молекулы (S. Ronchetti, Италия).

На симпозиуме «Новые идеи и новые терапевтические стратегии при воспалении» были представлены доклады «Целевые мишени воспаления для снижения риска сердечно-сосудистых заболеваний: реальна ли клиническая перспектива?» (P. Maffia, Великобритания) и «Природные соединения как регуляторы метаболизма макрофагов» (A. Kiemer, Германия). Отдельный симпозиум был посвящен вопросам исходов воспаления, на котором обсуждалась роль аденозина при сепсисе в качестве критического регулятора разрешения воспаления (H. Nasko, США), медиаторов пролиферации в контексте вирусной и бактериальной инфекции легких (M. Teixeira, Бразилия), фармакология исходов воспаления как эффективный подход к лечению воспаления (M. Perretti, Великобритания).

Большое внимание уделялось взаимосвязи между микробиотой и воспалением. В ходе симпозиума «Микробиота и воспаление: механизмы и возможные методы лечения» были рассмотрены вопросы роли биопленок в норме и при хроническом воспалении кишечника (Jean-Paul Motta, Франция) и возможности использования микробиоты в качестве вакцины против хронических воспалительных заболеваний (V. Chassaing, Франция). Симпозиум «Роль воспаления в канцерогенезе» вызвал особый интерес, что во многом связано с важной ролью воспаления, связанного с формированием опухоли. Доклады были посвящены повышению продукции H_2S в опухолевых клетках (C. Szabo, Швейцария), транскрипционному контролю ассоциированных с опухолью макрофагов (R. Ostuni, Италия). На данном симпозиуме с докладом выступил представитель российского общества воспаления проф. А. Кубышкин, доклад которого был посвящен критическому обсуждению роли воспаления в прогрессировании рака и перспективам использования таргетной терапии воспаления при онкопатологии (A. Kubyshekin, Россия). Кроме того, на двух симпозиумах «Иммунометаболизм и воспаление» (организованный Австралийским обществом воспаления) и «Новый способ регуляции врожденного иммунитета» (организованный Обществом воспаления Японии) обсуждались роль и новые результаты изучения изменений в иммунной системе при воспалении.

На отдельных симпозиумах были проанализированы новые механизмы развития воспалительных заболеваний сосудов, системного воспаления при острых и хронических заболеваниях, гендерных особенностей воспаления, а также воспаления кишечника. Внимание к клеточным механизмам воспаления было привлечено на симпозиуме «Достижения в биологии нейтрофилов», где большое внимание было уделено изучению противовоспалительных функций нейтрофилов, основанных на образовании иммунных комплексов и их клиренса (S. Vermeren, Великобритания), и механизмам функционирования внеклеточных ловушек (NETs) при воспалении (P. McDonald, Канада).

Разумеется, Конгресс не обошел стороной проблему новой коронавирусной инфекции, которая обсуждалась на симпозиуме «Тромбовоспаление как формирующийся ключевой фактор заболеваний, связанных с COVID-19». Доклады были посвящены роли тромбоцитов (B. Payrastre, Франция) и эндотелиальных клеток (D. Smadja, Франция) в развитии тромбовоспаления.

И конечно, всеобщее внимание привлекли сообщения о новых терапевтических подходах и разработке новых противовоспалительных препаратов. В рамках этих

докладов представлены материалы о разработке и применении иммунокорректоров, ингибиторов киназ, различных стимуляторов и ингибиторов воспалительных путей, газотрансмиттеров, глюкокортикоидов, а также о возможностях трансляционной медицины во внедрении новых методов лечения воспалительных реакций. Организаторы не обошли вниманием роль воспаления в регенеративной медицине и при использовании стволовых клеток. Кроме симпозиумов и устных докладов, более 150 докладов было представлено в виде постеров.

Конгресс завершился пленарной лекцией президента Итальянского общества фармакологии Carlo Riccardi (Италия) «Глюкокортикоиды и воспаление», в которой он обобщил данные о молекулярных мишенях и медиаторах глюкокортикоидной функции в регуляции воспаления.

В рамках конгресса было присуждено несколько премий и наград за лучшие устные доклады и постеры.

На полях съезда состоялась встреча лидеров национальных обществ воспаления, в которой приняли

участие представители национальных обществ Италии, Франции, Канады, Японии, Бразилии и России. Были обсуждены актуальные вопросы дальнейшего развития общества, привлечения спонсоров, приема новых членов и ряд других организационных вопросов. Проведение следующего конгресса намечено на 21-24 июля 2024 года в Квебеке (Канада).

Наиболее интересные материалы, представленные на конгрессе, были опубликованы в журнале *PharmAdvances: New frontiers in inflammation: from translational research to clinic* (PharmAdvances. 2022. Vol. 4 (special issue), June.- doi: 10.36118/pharmadvances.2022.38).

Следует отметить, что многочисленные встречи и обсуждения в рамках конгресса позволили установить новые контакты, которые будут способствовать развитию научных исследований в области воспаления.

*Доктор мед. наук, проф., А.В. Кубышкин,
канд. мед. наук Е.П. Коваленко*

Юбилей

УДК 616

К 85-летию ученого – патофизиолога Н.Н. Петрищева



17 декабря 2022 г. исполняется 85 лет ученому с мировой известностью в области лазерной медицины патофизиологу профессору Петрищеву Николаю Николаевичу. Его работы в области «Фототераностики» и биофотоники широко известны в России и за рубежом. Вся жизнь Николая Николаевича связана с родным городом Ленинградом – Санкт-Петербургом. Здесь он родился, прошли его детские блокадные годы, здесь он окончил школу и 1-й Ленинградский медицинский институт им. акад. И.П. Павлова. Вся его научная и педагогическая деятельность прошла в стенах 1 ЛМИ и ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Здесь он стал профессором, заведующим кафедрой патофизиологии, деканом лечебного факультета. Родина высоко оценила заслуги Н.Н.Петрищева. Он награжден медалью «За трудовую доблесть» и другими наградами.

Глубокоуважаемый, дорогой Николай Николаевич!

Российское научное общество патофизиологов, Санкт-Петербургское общество патофизиологов, журнал «Патологическая физиология и экспериментальная терапия», коллектив кафедры патофизиологии ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, Ваши коллеги и ученики от всего сердца поздравляют Вас с славным юбилеем, искренне желают крепкого здоровья, неиссякаемой энергии, профессионального и жизненного долголетия, новых творческих свершений и семейного благополучия.