

Адрес редакции:

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

E-mail: path.physiol@yandex.ru

Сайт: www.pfiet.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 2021 г.: 0,513

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

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

Сдано в набор 02.03.2023
Подписано к печати 07.03.2023
Опубликовано 17.03.2023

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

ISSN 0031-2991

Пат. физиол. и экспер. тер.
2023. Том 67 № 1. 1–140.

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, 2023.

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 67 № 1 · 2023

Январь–Март

И.о. 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, Хомбург/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 2021 was 0,513

Subscription Index in «Rospechat»: 71456

Subscription Index in «Ural Press»: 71456

Publication format: 205 × 265 mm

Printing: Digital Circulation: 300 copies

The price is not fixed

Sent into set on 02.03.2023

Signed for publication on 07.03.2023

Published on 17.03.2023

Printed: LLC «PKF «SOYUZ-PRESS»

Printing house address:

16 Dobrokhotov passage

150062, Yaroslavl, Russian Federation

ISSN 0031-2991

Pat Fiziol Eksp Ter

2023. Volume 67. No 1. 1-140.

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, 2023.

ISSN 0031-2991



9 770031 299001

Russian Academy of Sciences

Russian Society of Pathophysiology

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. 67 № 1 · 2023****January–March****Acting Editor-in-Chief:**I.S. Gushchin, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., Inst. of Immunology, Moscow, Russia***Executive editor:**N.S. Gourko, *PhD, Inst. of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia***Editorial Board:**Yu.V. Archipenko, *DSc, Prof., Moscow State University, Moscow, Russia*E.I. Astashkin, *DSc, Prof., First Moscow State Medical University, Moscow, Russia*H. Downey, *PhD, Prof., University of North Texas, Fort Worth (TX), USA*S.V. Grachev, *Acad. RAS, DSc, Prof., First Mos. State Med. University, Moscow, Russia*T.A. Guskova, *Corr. Member of RAS, DSc, Prof., Inst. of Immunology, Moscow, Russia*A.V. Efremov, *DSc, Prof., Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia*V.B. Koshelev, *DSc, Prof., Moscow State University, Moscow, Russia*N.A. Krupina, *DSc, Inst. of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*A.A. Kubatiev, *Acad. RAS, DSc, Prof., Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*P.F. Litvitskiy, *Corr. M. of RAS, DSc, Prof., Moscow State Med. Univ., Moscow, Russia*R. Mallet, *PhD, Prof., University of North Texas, Fort Worth (TX), USA*O. Matsuo, *PhD, Prof., Kindai University, Higashiosaka, Japan*G.V. Poryadin, *Corr. M. of RAS, DSc, Prof., National Research Med. Univ., Mos., Russia*R. Sewell, *PhD, Prof., Cardiff University, Cardiff, UK***Advisory Committee:**Yu.Yu. Byalovskiy, *DSc, Prof., Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia*V.T. Dolgikh, *DSc, Prof., Omsk State Medical University, Omsk, Russia*A.M. Dygay, *Acad. RAS, DSc, Prof., Tomsk National Research Medical Center of RAS, Tomsk, Russia*D.A. Enikeev, *DSc, Prof., Bashkir State Medical University, Ufa, Russia*V.P. Kulikov, *DSc, Prof., Altai Medical Inst. of Postgraduate Education, Barnaul, Russia*V.P. Mikhailov, *DSc, Prof., Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia*V.G. Ovsyannikov, *DSc, Prof., Rostov State Med. University, Rostov-na-Donu, Russia*S.N. Orlov, *DSc, Prof., Moscow State University, Moscow, Russia*N.N. Petrishchev, *DSc, Prof., First St.Petersburg State Med. Univ., St.Peterburg, Russia*L.A. Severyanova, *DSc, Prof., Kursk State Medical University, Kursk, Russia*V. Shvarz, *PhD, Prof., Saarland University, Homburg/Saar, Germany*

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Кислухина Е.Н., Лизунова Н.В., Лисина О.Ю., Шарипов Р.Р., Красильникова И.А., Бакаева З.В., Пинелис В.Г., Сурин А.М.** Индуцированные глутаматом и ишемией изменения ионного гомеостаза в нейрональной культуре и коре головного мозга мышей, экспрессирующих Ca²⁺-сенсор GCaMP6f 5
- Галимов К.Ш., Громенко Ю.Ю., Гилязова И.Р., Галимова Э.Ф., Сафиханов Р.Я., Галимова С.Ш., Муратов Э.М., Литвицкий П.Ф., Павлов В.Н.** Мутации гена митохондриального цитохрома В (MT-CYB) в сперматозоидах пациентов из бесплодных семейных пар. . . . 21
- Максимова М.Ю., Галанина А.С.** Клинические, нейрофизиологические и лабораторные особенности дисфункциональных вегетативных расстройств у лиц молодого и среднего возраста 28
- Ерофеева А.-М.В., Антипова О.А., Жаворонок И.П., Рябцева С.Н., Молчанова А.Ю.** Эффективность курсового применения пальмитоилэтаноламида и трансплантации мезенхимальных стволовых клеток при экспериментальной периферической нейропатической боли 39
- Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Корнилов Д.О., Симарзина В.М., Тряпицын М.А., Казанцев Ю.А., Зорников Д.Л., Григорьева Ю.В., Фадеев Ф.А.** Ингибирование опухолевого роста в клеточной культуре остеосаркомы с помощью микроРНК mir162a 48
- Четверяков А.В., Цепелев В.Л.** Концентрация ко-ингибирующих иммунных контрольных точек и их лигандов в крови у пациентов с опухолью толстой кишки. 56
- Данилова Г.А., Александров В.Г., Александрова Н.П.** Влияние внутривенного введения провоспалительного цитокина ИЛ-1β на хеморецепторный контроль дыхания. 63
- Гераськин И.В., Гераськин В.А., Гераськина Н.В.** Влияние гемотрансфузий у новорожденных и детей грудного возраста на состав и сродство к кислороду физиологических гемоглобинов 71
- Терехина Н.А., Селин А.Д., Горячева О.Г., Терехин Г.А.** Прогностическое значение определения активности гамма-глутамилтранспептидазы в плазме крови крыс при действии электромагнитного излучения. 79
- Мелконян К.И., Никифорова Е.Б.** Разработка и изучение влияния дермального гидрогеля с экстрактом кукурузы столбиков с рыльцами на процесс репарации скарифицированных ран в эксперименте. 87

ОБЗОРЫ

- Терехина О.Л., Кирова Ю.И.** Анализ причин и подходов к регуляции цитотоксического состояния микроглии стареющего мозга. 94

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Kislukhina E.N., Lizunova N.V., Lisina O.Yu., Sharipov R.R., Krasilnikova I.A., Bakaeva Z.V., Pinelis V.G., Surin A.M.** Glutamate and ischemia-induced changes in ion homeostasis in the neuronal culture and cerebral cortex of mice expressing Ca²⁺-sensor GCaMP6f 5
- Galimov K.Sh., Gromenko J.Y., Gilyazova I.R., Galimova E.F., Safikhanov R.Y., Galimova S.Sh., Muratov E.M., Litvitskiy P.F., Pavlov V.N.** Mutations in the mitochondrial cytochrome B (MT-CYB) gene in spermatozoa of patients from infertile couples 21
- Maksimova M.Yu., Galanina A.S.** Clinical, neurophysiological and laboratory features of autonomic disorders in young and middle-aged adults 28
- Yerofeyeva A.-M.V., Antipova O.A., Zhavoronok I.P., Rjabceva S.N., Molchanova A.Y.** Effectiveness of a course treatment with palmitoylethanolamide and transplantation of mesenchymal stem cells in experimental peripheral neuropathic pain 39
- Grebnev D.Ju., Maklakova I.Ju., Kornilov D.O., Simarzina V.M., Tryapitsyn M.A., Kazancev Ju.A., Zornikov D.L., Grigoryeva Ju.V., Fadeev F.A.** Inhibition of tumor growth in osteosarcoma cell culture with mir162a miicrRNA 48
- Chetveryakov A.V., Tsepelev V.L.** Concentration of co-inhibiting immune checkpoints and their ligands in blood of patients with colon tumor 56
- Danilova G.A., Aleksandrov V.G., Aleksandrova N.P.** Effect of intravenous administration of the proinflammatory cytokine IL-1β on the chemoreceptor control of respiration 63
- Geraskin I.V., Geraskin V.A., Geraskina N.V.** Effect of hemotransfusions in newborns and infants on the composition and oxygen affinity of physiological hemoglobin 71
- Terekhina N.A., Selin A.D., Goryacheva O.G., Terekhin G.A.** The prognostic value of determining gamma-glutamyl-transpeptidase activity in blood plasma of rats under the action of electromagnetic radiation 79
- Melkonyan K.I., Nikiforova E.B.** Development and study of the effect of a dermal hydrogel with corn silk extract on repair of scarified wounds in the experiment 87

REVIEWS

- Terekhina O.L., Kirova Y.I.** Analysis of the causes and approaches to the regulation of the cytotoxic state of microglia in the aging brain 94

СОДЕРЖАНИЕ

- Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б.** Движение и мышление . . . 110
Евдокимова Н.В., Черненькая Т.В. Умеренные бактериофаги – тайное оружие бактерий или их ахиллесова пята? 117

МЕТОДИКА

- Никитин П.В., Мусина Г.Р., Полозов В.Н., Красновский В.М., Николаев В.Н.** Внутриопухолевая гетерогенность менингиом в плоскости метилиционного профайлинга 124

ВОПРОСЫ ПРЕПОДАВАНИЯ

- Авдеев Д.Б., Барашкова С.А., Сергеева Е.Д., Цускман И.Г., Акулинин В.А., Шоронова А.Ю.** Адаптация «Анатомического атласа «Пирогов» и «Aperio ImageScore» – программного обеспечения для интерактивной сенсорной панели в учебном процессе 133

CONTENTS

- Paltsyn A.A., Sviridkina N.B.** Movement and thinking
Evdokimova N.V., Chernenkaya T.V. Moderate bacteriophages: the secret weapon of bacteria or their Achilles heel?

METHODS

- Nikitin P.V., Musina G.R., Polozov V.N., Krasnovsky V.M., Nikolaev V.N.** Intratumoral heterogeneity of meningioma with respect of the methylation profiling

TEACHING ISSUES

- Avdeev D.B., Barashkova S.A., Sergeeva E.D., Tsuskman I.G., Akulinin V.A., Shoronova A.Yu.** Adaptation of the *Anatomical Atlas "Pirogov"* and *Aperio ImageScope* software for an interactive touch panel in the educational process

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2023

УДК 577.25, 57.085

Кислухина Е.Н.¹, Лизунова Н.В.^{1,2}, Лисина О.Ю.³, Шарипов Р.Р.³, Красильникова И.А.¹, Бакаева З.В.^{1,4}, Пинелис В.Г.¹, Сурин А.М.³

Индукцированные глутаматом и ишемией изменения ионного гомеостаза в нейрональной культуре и коре головного мозга мышей, экспрессирующих Ca^{2+} -сенсор GCaMP6f

¹ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, 119991, Москва, Россия, Ломоносовский просп., д. 2, стр. 1;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119234, Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия, Балтийская ул., д. 8;

⁴ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет им. Б.Б. Городовикова», 358000, Элиста, Республика Калмыкия, Россия, ул. Пушкина, д. 11

Актуальность. При исследованиях внутриклеточного сигналинга и межнейрональной передачи сигнала в мозге в норме и при патологии все большее применение находят трансгенные животные, экспрессирующие в нейронах флуоресцентный Ca^{2+} -сенсор. Вместе с тем, пока недостаточно исследовано, насколько изменения кальциевого гомеостаза в интактном мозге соотносятся с гораздо более подробно изученными изменениями этого важнейшего параметра в нейроглиальных культурах, служащих модельными системами живого мозга.

Целью работы было на модели ишемического инсульта выяснить в какой степени изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) в мозге трансгенной мыши, измеренные с помощью флуоресцентного белкового сенсора GCaMP6f, соотносятся с изменениями $[Ca^{2+}]_i$ в первичных нейроглиальных культурах из кортекса этих животных.

Методы. Методом широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН) измерены изменения концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле нейронов ($[Ca^{2+}]_i$) головного мозга мышей. Измерения проводили перед и после фотоиндуцированного инсульта в сенсомоторной зоне коры. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ отслеживали по флуоресценции GCaMP6f, экспрессируемого в нейронах кортекса. На первичных нейроглиальных культурах из коры головного мозга мышей той же линии проверено влияние эксайтотоксических доз глутамата (Glu) на $[Ca^{2+}]_i$ и на изменения средней концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме ($[Ca^{2+}]_i$). Измерения $[Ca^{2+}]_i$ выполнены методом флуоресцентной микроскопии с использованием синтетических Ca^{2+} -индикаторов Fura-2 и Fura-FF. В культивируемых нейронах дополнительно к измерениям кальциевого гомеостаза выполнены измерения внутриклеточного pH (pH_i), митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) и эндогенной флуоресценции NADH.

Результаты. Фотоиндуцированная ишемия вызывает сильный рост $[Ca^{2+}]_i$ в зоне облучения $\sim 1,1$ мм² ($n=9$). В течение суток область высокой $[Ca^{2+}]_i$ расширяется до ~ 6 мм², но к 7-м сут практически возвращается к размерам необратимого повреждения. В нейроглиальных культурах из коры головного мозга мышей этой же линии кинетика изменений $[Ca^{2+}]_i$, индуцированных Glu, напоминает кинетику $[Ca^{2+}]_i$, однако $[Ca^{2+}]_i$ имеет значительно меньшую амплитуду при развитии отсроченной кальциевой дисрегуляции (ОКД). Сопоставление изменений $[Ca^{2+}]_i$ и pH_i показывает, что различия могут быть обусловлены тушением флуоресценции GCaMP6f при закислении цитозоля в результате эксайтотоксического действия Glu.

Заключение. Сопоставление сигналов экспрессируемого нейронами Ca^{2+} -сенсора GCaMP6f в мозге и синтетических Ca^{2+} -индикаторов в первичных нейроглиальных культурах, полученных из животных той же линии, показывает, что феномен ОКД, впервые обнаруженный в культурах, вероятно, реализуется и в нейронах целого мозга при инсульте. Вместе с тем, необходимо учитывать, что относительные изменения $[Ca^{2+}]_i$ на разных стадиях развития ишемического повреждения и последующего восстановления мозга после фотоиндуцированного инсульта, могут быть искажены за счет влияния pH_i на флуоресценцию белкового сенсора.

Ключевые слова: широкопольная оптическая нейровизуализация; ишемия мозга; глутамат; нейротоксичность; кальций; GCaMP6f; фототромбоз

Для цитирования: Кислухина Е.Н., Лизунова Н.В., Лисина О.Ю., Шарипов Р.Р., Красильникова И.А., Бакаева З.В., Пинелис В.Г., Сурин А.М. Индуцированные глутаматом и ишемией изменения ионного гомеостаза в нейрональной культуре и коре головного мозга мышей, экспрессирующих Ca^{2+} -сенсор GCaMP6f. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(1): 5–20.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.5-20

Участие авторов: концепция дизайна исследования – Сурин А.М., Кислухина Е.Н., Лизунова Н.В., Бакаева З.В.; сбор материала – Лисина О.Ю., Шарипов Р.Р., Кислухина Е.Н., Лизунова Н.В., Красильникова И.А.; анализ и интерпретация данных – Сурин А.М., Лисина О.Ю., Шарипов Р.Р., Кислухина Е.Н., Лизунова Н.В., Бакаева З.В.; подготовка иллюстративного материала – Сурин А.М., Кислухина Е.Н., Лизунова Н.В., Лисина О.Ю., Шарипов Р.Р.; написание текста – Сурин А.М., Кислухина Е.Н., Лизунова Н.В., Шарипов Р.Р.; редактирование текста – Сурин А.М., Бакаева З.В., Пинелис В.Г. Кислухина Е.Н., Лизунова Н.В., Лисина О.Ю. и Шарипов Р.Р. внесли равный вклад в сбор материала и анализ результатов. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Сурин Александр Михайлович, e-mail: surin_am@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена за счет средств Государственного задания № FGFU-2022-0012, а также при финансовой поддержке Минздрава России, проект № ААААА19-119012590191-3. Оборудование для исследования приобретено в рамках гранта в форме субсидии Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по программе обновления приборной базы НИОКР (внутренний номер 08-07-56/2021/82930).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.01.2023

Принята к печати 26.01.2023

Опубликована 17.03.2023

Kislukhina E.N.¹, Lizunova N.V.^{1,2}, Lisina O.Yu.³, Sharipov R.R.³, Krasilnikova I.A.¹, Bakaeva Z.V.^{1,4}, Pinelis V.G.¹, Surin A.M.³

Glutamate and ischemia-induced changes in ion homeostasis in the neuronal culture and cerebral cortex of mice expressing Ca^{2+} -sensor GCaMP6f

¹National Medical Research Center for Children's Health of the Russian Ministry of Health, Lomonosovsky prospect, 2, bldg. 1, Moscow, 119991, Russian Federation;

²Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Leninskie Gory, 1, bldg.12, Moscow, 119234, Russian Federation;

³Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltyskaya st., 8, Moscow, 125315, Russian Federation;

⁴Department of General Biology and Physiology, Kalmyk State University named after B.B. Gorodovikov, Pushkin st., 11, Elista, 358000, Russian Federation

Relevance. In studies of brain intracellular and intercellular signaling in normal and pathological conditions, transgenic animals expressing a fluorescent Ca^{2+} sensor in neurons are increasingly used. Calcium homeostasis was studied in detail in primary neuroglial cultures, which serve as model systems of the living brain. But how change in calcium homeostasis during ischemic conditions in the intact brain correlate with experiments on cell cultures has been poorly studied so far.

The aim of this work was to compare ischemia-driven changes in the intracellular concentration of Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) *in vivo* and *in vitro*: in the brain of transgenic mice, using the GCaMP6f fluorescent protein sensor, and in the neuroglial cell culture, obtained from the cortex of these animals.

Methods. Changes in the cytosolic concentration of free Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) in the neurons was measured by wide-field optical imaging (WFOI). Measurements were taken before and after photothrombotic stroke performed in the sensorimotor cortex. Changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ were monitored by the fluorescence of GCaMP6f expressed in cortical neurons. In primary neuroglial cultures from the cerebral cortex glutamate (Glu) in excitotoxic doses was used to model ischemic injury. Measurements of averaged Ca^{2+} concentration in the cyto- and nucleoplasm ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were carried out by fluorescence microscopy using synthetic Ca^{2+} indicators Fura-2 and Fura-FF. In addition, measurements of intracellular pH (pH_i) and mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) were carried out *in vitro*.

Results. Photothrombotic stroke caused a strong increase in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in the illuminated zone $\sim 1.1 \text{ mm}^2$ ($n=9$). During the 24 hours, the area with high $[\text{Ca}^{2+}]_c$ expands to $\sim 6 \text{ mm}^2$, but by the 7th day it almost returns to the size of the primary damage. In neuroglial cultures from the cerebral cortex of the same mice strain, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kinetics measured by GCaMP6f resembles the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ kinetics, but $[\text{Ca}^{2+}]_c$ has a significantly lower amplitude during the development of delayed calcium deregulation (DCD). Comparison of changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and pH_i shows that the differences may be due to the quenching of GCaMP6f fluorescence due to cytosol acidification as a result of the excitotoxic Glu action.

Conclusion. Comparison of measurements by the genetically-encoded GCaMP6f Ca^{2+} sensor *in vivo* and by the synthetic Ca^{2+} indicators in primary neuroglial cultures shows that the DCD phenomenon, first discovered in cultures, is probably realized in intact brain neurons in stroke. It should be taken into account that the relative changes in $[\text{Ca}^{2+}]_c$ can be distorted due to the effect of pH_i on the fluorescence of the protein sensor at different stages of ischemia development and subsequent brain recovery after a photothrombotic stroke.

Keywords: wide-field optical imaging; brain ischemia; glutamate; neurotoxicity; calcium; GCaMP6f; photothrombosis

For citation: Kislukhina E.N., Lizunova N.V., Lisina O.Yu., Sharipov R.R., Krasilnikova I.A., Bakaeva Z.V., Pinelis V.G., Surin A.M. Glutamate and ischemia-induced changes in ion homeostasis in the neuronal culture and cerebral cortex of mice expressing Ca^{2+} -sensor GCaMP6f. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(1): 5–20. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.5-20

Author's contribution: the study design – Surin A.M., Kislukhina E.N., Lizunova N.V., Bakaeva Z.V.; data acquisition – Lisina O.Yu., Sharipov R.R., Kislukhina E.N., Lizunova N.V., Krasilnikova I.A.; data analysis and interpretation – Surin A.M., Lisina O.Yu., Sharipov R.R., Kislukhina E.N., Lizunova N.V., Bakaeva Z.V.; preparation of illustrative material – Surin A.M., Kislukhina E.N., Lizunova N.V., Lisina O.Yu., Sharipov R.R.; writing the text – Surin A.M., Kislukhina E.N., Lizunova N.V., Sharipov R.R.; editing the text – Surin A.M., Bakaeva Z.V., Pinelis V.G. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Alexander M. Surin, e-mail: surin_am@mail.ru

Information about the authors:

Lizunova N.V., <https://orcid.org/0000-0002-6644-7716>

Kislukhina E.N., <https://orcid.org/0000-0001-9217-1330>

Lisina O.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-0273-9928>

Sharipov R.R., <https://orcid.org/0000-0001-9280-5954>

Krasilnikova I.A., <https://orcid.org/0000-0001-9453-3040>

Bakaeva Z.V., <https://orcid.org/0000-0002-2797-3270>

Surin A.M., <https://orcid.org/0000-0003-1104-5442>

Financing. This research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, State order No. FGFU-2022-0012, by the Russian Ministry of Health, Project AAAA19-119012590191-3. The equipment for the study was purchased as part of a grant in the form of a subsidy from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under the program for updating the instrument base of leading organizations performing research and development (internal number 08-07-S6/2021/82930).

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

Received 14.01.2023

Accepted 26.01.2023

Published 17.03.2023

Введение

При ишемии мозга и инсульте вокруг зоны необратимого поражения возникает переходная область, пенумбра, в которой отмечена повышенная концентрация основного возбуждающего нейромедиатора центральной нервной системы – глутамата (Glu). Избыточная стимуляция глутаматом рецепторов в пенумбре считается лидирующим фактором гибели нейронов [1]. Исследования первичных культур нейронов из различных отделов мозга показали, что Glu вызывает гиперактивацию ионотропных рецепторов, в результате которой происходит перегрузка нейронов ионами кальция, ведущая к дисфункции митохондрий, энергетическому коллапсу, оксидативному стрессу и ряду других процессов, кульминацией которых является гибель нейронов [2–4]. Другим важнейшим фактором, по мнению некоторых исследователей, является формирование областей избыточной концентрации ионов K^+ и метаболический стресс вследствие распространяющейся кортикальной депрессии [1]. Поэтому актуальным является комплексное исследование нарушений метаболизма и ионного гомеостаза нейронов в моделях *in vivo* и *in vitro* с использованием трансгенных животных (мышей) и первичных нейрональных культур из мозга, в условиях, имитирующих патофизиологические состояния центральной нервной системы.

Трансгенные животные, в клетках которых экспрессируются флуоресцентные белковые сенсоры, по-

зволяющие отслеживать изменения внутриклеточного гомеостаза, становятся все более важной моделью для изучения фундаментальных процессов в живом организме [5, 6]. Чтобы полученные данные были максимально приближены к тому, что происходит в организме людей, используются трансгенные млекопитающие, чаще всего лабораторные линии мышей [7–9]. Наиболее популярный пример такого подхода – это исследования изменений внутриклеточных концентраций свободного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]$), который служит универсальным вторичным мессенджером во всех типах эукариотических клеток. Вместе с тем, изменения $[\text{Ca}^{2+}]$ в интактном организме могут происходить под влиянием нескольких факторов, каждый из которых трудно контролировать. Поэтому культуры клеток, полученные из трансгенного организма и содержащие флуоресцентный белковый сенсор, являются полезной моделью для проверки ответа на контролируемые воздействия.

В настоящей работе были использованы трансгенные мыши, экспрессирующие в нейронах белковый сенсор ионов кальция GCaMP6f. Исследование выполнено с использованием мультимедийной системы широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН) флуоресцентных сигналов коры головного мозга живой мыши. Параллель-

но в первичных нейроглиальных культурах из коры головного мозга этой же линии мышей проведены мультиволновые измерения методом флуоресцентной микроскопии средней концентрации свободного Ca^{2+} в цито- и нуклеоплазме ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), а также митохондриального потенциала и уровня эндогенного NADH. Показано, что в нейроглиальной культуре изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и изменения $[\text{Ca}^{2+}]_c$ в цитозоле ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), индуцированные нейротоксическим действием Glu, согласуются. Вместе с тем, на разных стадиях развития ишемии и последующего восстановления мозга после фотоиндуцированного инсульта, $[\text{Ca}^{2+}]_c$ может быть занижена за счет влияния цитозольного pH на флуоресценцию белкового сенсора.

Методика

Эксперименты с животными. В экспериментах была использована линия трансгенных мышей C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J (JAX stock #025393), экспрессирующих в нейронах флуоресцентный сенсор Ca^{2+} GCaMP6f [10]. Мышей содержали в стандартных условиях (22 °C, 12-часовой цикл день/ночь) с неограниченным доступом к воде и пище. В эксперименте использовали животных обоих полов.

Эксперименты проводились с учетом рекомендаций директивы № 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях. Протокол исследований был одобрен локальными этическими комитетами ФГБНУ «НИИОПП» (№05-06/12 от 14.12.2017) и ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» (протокол заседания №1 от 30.01.2018).

Подготовка животных к ШОН. Мышам в возрасте 4-6 нед была проведена операция по истончению костей черепа и установке краниального окна для дальнейшего наблюдения активности коры больших полушарий методом ШОН. Использовали протокол, как в статье [11] с небольшими изменениями. Вкратце, с дорзальной поверхности головы снимали скальп, удаляли соединительные ткани. Затем, используя скоростную микродрель 78001 (RWD, Китай), алмазную фрезу №803165524040 (HDFREZA, Россия) и силикон-алмазные полиры №803104243524030, №803104243514030, №803104243504030 (Acurata, Германия), удаляли верхние слои черепных костей до достижения прозрачности. Диаметр краниального окна составлял примерно 10 мм. В процессе полировки череп непрерывно орошали холодным физраствором. Подготовленные кости покрывали цианакрилатным клеем LOCTITE 401 (Henkel, Германия) и слоем двух прозрачных полимеров SN BC и SN-TC-01 (Brigitte Bottier, Россия), затвердевающих под

воздействием USB-LED-лампы мощностью 3W (Solomeya, Великобритания) в течение 30 с. К голове мыши при помощи цианакрилатного клея LOCTITE 401 и стоматологической пластмассы Villacryl S V2 (Zhermack, Польша) крепили титановый холдер для фиксации животного в установке для ШОН. Холдер представлял из себя ободок по форме краниального окна с 4 выступающими пластинами для крепления в штативе. В качестве анестезии во время проведения операции была использована интраперитонеальная инъекция смеси Золетила 100 (Virbac Sante Animale, Франция) и Ксилы (Interchemie werken De Adelaar B.V., Эстония) в дозах 100 и 8 мг/кг соответственно. После операции животными подкожно вводили смесь Кетонала (8.5 мг/кг) и антибиотика Марбобел (8 мг/кг) 1 раз в сут в течение 4 дней.

Через неделю после операции животных постепенно приучали к съемкам в установке ШОН в бодрствующем состоянии. Приучение включало 3 этапа в течение 6 дней с интервалом в 2 дня: 1-й этап – 30-минутная адаптация к комнате с установкой ШОН, исследование платформы и приучение к фиксации головы в руках экспериментатора; 2-й этап – трехкратная фиксация мыши в установке не более чем на 1 мин, 3-й этап – 5-минутная фиксация мыши с включением светодиодов.

Установка для широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН). Флуоресценцию GCaMP6f возбуждали, используя светодиод с длиной волны 470 нм (BLS-LCS-0470-14-22, Mightex, США). Излучение светодиода направляли к образцу через светофильтр ET470/24m (Chroma, США) и комбинированный светоделитель (LCS-BC25-0495, Mightex, США), световод (Mightex, США), широкополосный светофильтр ET470/40x, (Chroma, США), светоделитель T495lpxg (Chroma, США) и фокусировали на коре головного мозга с помощью 4x-эпиобъектива (P/N OBJ-MAO-04, Mightex, США). Испускаемый GCaMP6f свет регистрировали в конфигурации прямого микроскопа, используя светофильтр ET525/50m (Chroma, США).

Частота регистрации кадров составила 20 Гц. Сигнал детектировали скоростной высокочувствительной камерой (CXE-V013-U, Mightex, США).

Для получения изображений голову мыши закрепляли под объективом микроскопа, фиксируя холдер в штативе. Свобода передвижения бодрствующему животному обеспечивалась с помощью левитирующей на воздушной подушке платформы (Neurotar, Финляндия).

Моделирование инсульта. Через 2 нед после операции животных случайным образом, но с учетом ра-

венства полов, распределили на 2 группы: «Контроль» и «Фототромбоз». Мышам из группы «Фототромбоз» ($n = 9$) проводили моделирование инсульта методом фотоиндуцированной ишемии (ФИ) [12]. Фотосенсибилизатор Бенгальский розовый (БР, 20 мг/кг) (Sigma-Aldrich®, Германия) вводили в правую или левую яремную вену через катетер, установленный за 2 дня до индукции инсульта. Локальный тромбоз получали при помощи облучения в течение 10 мин лазером ($\lambda = 532$ нм) с диаметром пучка 2 мм и мощностью 10 мВт. Лазер включали через 5 мин после введения БР. Центр лазерного пучка фокусировали относительно брегмы в сенсомоторной области коры левого полушария (AP = -1; ML = -2). С животными из группы «Контроль» ($n = 9$) проводили те же манипуляции, кроме введения БР. С целью минимизации влияния наркоза, фототромбоз индуцировали бодрствующим животным, закрепленным в установке для ШОН. Регистрацию изображений коры мозга проводили за 2 дня до ФИ и через 3 мин (в течение последующих 7,3 мин) после окончания индукции ишемии. Регистрацию изображений повторяли спустя 1 и 7 сут после ФИ.

Гистологическое окрашивание. На 20-е сут после фотоиндуцированного инсульта, животных усыпляли, используя эфир. Далее проводили транскардиальную перфузию 4% параформальдегидом (Sigma-Aldrich®, Германия). Извлекали головной мозг и фиксировали образцы в 10% формалине в фосфатно-солевом буфере (Биовитрум, Россия).

Срезы толщиной 35 мкм нарезали при помощи вибратома Leica vt1200s (Leica, Германия). Срезы наносили на покрытые желатином и квасцами (Sigma-Aldrich®, Германия) покровные стекла и высушивали при комнатной температуре. Через сутки проводили окрашивание по Нисслию, используя краситель крезиловый фиолетовый (Servicebio, Китай). Окрашенные срезы заключали под покровные стекла, используя в качестве среды для заключения Канадский бальзам (Panreac, Испания).

Приготовление нейроглиальных культур. Нейроглиальные культуры получали из коры головного мозга новорожденных мышей (P0-P2) линии C57BL/6J-Tg(Thy1-GCaMP6f)GP5.17Dkim/J (JAX stock #025393) по стандартной методике [13, 14]. Нейрональная специфичность синтеза флуоресцентного белкового сенсора GCaMP6f обеспечивалась нейрон-специфичным промотором Thy-1; один из родителей был гемизиготен, второй дикого типа. Вкратце, мышей анестезировали, декапитировали, кору выделяли и отделяли от мозговых оболочек. Извлеченные ткани промыли раствором Хенкса, не содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+} ,

измельчали скальпелем, инкубировали в растворе папаина (12 мин, 37 °C) и диссоциировали в свежей MEM. Однородную суспензию дважды центрифугировали (200 g, 5 мин, 4 °C). Осадок ресуспендировали до концентрации 10^6 клеток/мл в нейробазальной среде (NBM, Gibco, США) с добавлением саплимента B-27 и пенициллина/стрептомицина. Аликвоты клеточной суспензии (250 мкл) переносили в лунки 35 мм чашек Петри, дном которых служили покровные стекла, прикрепленные к лункам с внешней стороны (MatTeck, США). Клетки хранили в CO_2 -инкубаторе при 37 °C, в атмосфере 95% воздуха, 5% CO_2 и относительной влажности 100%. Через 2-3 дня в среду добавляли цитозинарабинозид (Ara C, 5 мкМ) для предотвращения пролиферации глиальных клеток. Клетки снабжали питательными веществами, заменяя 1/3 среды на свежую, через каждые 3-4 суток. Культуры использовали в экспериментах через 14-16 дней после посева (14-16 days *in vitro*, DIV).

Все использованные реактивы производства Sigma-Aldrich® (Германия), если не указано иное.

Флуоресцентно-микроскопические измерения. Флуоресцентно-микроскопические измерения выполнены, как описано в [15, 16] на 2 установках. Одна система анализа изображений была на основе микроскопа Olympus IX-71 (Япония), оснащенного системой освещения образца Lambda 10-2 (Sutter Instruments Co, США), CCD-камерой CoolSNAP HQ2 (Photometrics, США), управляемой через компьютерную программу MetaFluor (Universal Imaging Corp., США). Другая система состояла из инвертированного микроскопа Nikon Ti2 Eclipse (Япония), оснащенного объективами 20x/NA=0.75 и 40x/NA=1.30 Oil. Возбуждающее излучение создавалось светодиодами устройствами pE-340fura и pE-300ultra (CoolLED, Англия). Излучаемый и проходящий свет шёл через эмиссионные фильтры, встроенные в колесо перед sCMOS камерой Prime BSI Express (Teledyne Photometrics, США). Вся система управлялась через программу Nikon NIS-Elements (Япония).

Генотипирования новорожденных не проводили, объединяя клетки коры мозга 4 мышат. По этой причине количество нейронов, синтезировавших GCaMP6f и имевших зеленую флуоресценцию (возбуждение 485 нм, регистрация 525 нм), было различным в культурах, приготовленных из разных пометов (4 серии по 2 эксперимента в каждой; 20 мышат от 4 самок, 4 независимые посадки). Доля культивируемых нейронов, экспрессировавших GCaMP6f колебалась в поле наблюдения от 2 до 20%.

Эндогенная флуоресценция клеток, обусловленная NADH, а также флуоресценция синтетических флуо-

ресцентных Ca^{2+} индикаторов Fura-2 и Fura-FF, белкового Ca^{2+} сенсора GCaMP6f, pH-чувствительного индикатора BCECF, митохондриального потенциал-чувствительного зонда TMRM имеют хорошо разделенные спектры возбуждения и испускания флуоресценции. Благодаря этому мы смогли выполнить одновременные измерения сразу двух или трех из перечисленных выше параметров в одних и тех же клетках.

TMRM, а также ацетоксиметилловые эфиры Fura-2, Fura-FF и BCECF приобретены у ThermoFisher (США). Нагрузку клеток ацетоксиметилловыми эфирами указанных Ca^{2+} - и pH-индикаторов проводили как описано ранее [15, 16].

Обработка результатов и статистический анализ.

Анализ изображений мозга животных осуществляли с помощью программы с открытым исходным кодом для анализа и обработки изображений ImageJ (National Institutes of Health, США). Статистический анализ данных проводили в программе GraphPad Prizm (GraphPad Software, США).

Результаты

Широкопольная нейровизуализация мозга мыши.

Площадь пораженной поверхности мозга является важным показателем степени тяжести повреждения. Результаты измерения размера области, подвергшейся ишемии, представлены на **рисунке 1**. Преимуществом ШОН является возможность прижизненной оценки повреждения в динамике (в данном эксперименте измерения проводили через 3 мин, 10 мин, 1 день и 7 дней после окончания облучения лазером). Поскольку подобных измерений методом ШОН, насколько нам известно, ранее не проводили, была выполнена валидация данного метода как способа оценки размера зоны некроза. Для этого результаты обсчета снимков ШОН были сопоставлены с классическим методом — окрашиванием гистологических срезов по Нисслию [17].

У здоровых животных интенсивность флуоресценции GCaMP6f довольно равномерна по поверхности коры больших полушарий (**рис. 1, Г**). При анализе видеозаписей ШОН перед фотоиндукцией ишемии видны спонтанные флуктуации флуоресценции, соответствующие увеличению или снижению концентрации свободного кальция в цитоплазме ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) группы нейронов. На первых минутах после фотоиндуцированной ишемии (ФИ) в группе «Фототромбоз» наблюдалось резкое (более, чем на 200%, по сравнению с исходным) увеличение уровня флуоресценции сенсора в центре области, в которой был индуцирован тромбоз сосудов (**рис. 1, А, Г**), что свидетельствует о входе большого количества ионов Ca^{2+} в клетки очага ише-

мии. От 3-й к 10-й мин область высокой флуоресценции расширялась у всех мышей группы ($1,14 \pm 0,34 \text{ мм}^2$ и $1,34 \pm 0,33 \text{ мм}^2$ соответственно, ср. ар. \pm ст. ош. ср., $p = 0.02$, $n = 9$, двухфакторный дисперсионный анализ для связанных выборок с поправкой Тукей). Расширение области высокой флуоресценции обусловлено, вероятно, увеличением количества нейронов со стабильно высокой $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

Значительный рост (в среднем, до $6,03 \pm 0,82 \text{ мм}^2$, $p = 0.0002$) площади высокой флуоресценции GCaMP6f происходил через 1 сут после ФИ. Затем развивался противоположный эффект уменьшения площади и к 7-м сут она снижалась до почти исходной величины ($1,69 \pm 0,19 \text{ мм}^2$, $p = 0.0015$). Можно предположить, что на 1-е сут после ФИ большая часть нейронов (в среднем, 15% площади дорзальной проекции левого полушария) имела стабильно высокую $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Притом большая часть этих клеток восстанавливала низкую $[\text{Ca}^{2+}]_c$ к 7-м сут после ФИ (**рис. 1, Г**), а также функциональный статус, о чем свидетельствует возобновление спонтанных флуктуаций $[\text{Ca}^{2+}]_c$ в данных областях (данные не показаны).

В группе «Контроль» средний уровень флуоресценции и амплитуда его флуктуаций (средняя амплитуда $2,2 \pm 1,8\%$, ср.ар. \pm ст.откл., макс. = $9,6\%$, расчет относительно среднего уровня $\Delta F/\text{Fo} \cdot 100\%$, $n = 9$) не изменялись после ложной ФИ.

Описанные динамические измерения площади поверхности поражения (поверхность с высокой интенсивностью флуоресценции) не позволяют однозначно оценить размер зоны некроза, поэтому ее размеры были дополнительно определены гистологически. Диаметр области некроза на дорзальной проекции кортекса и на фронтальном срезе мозга должен совпадать, поэтому именно этот параметр был сопоставлен (**рис. 1, Б**). Зоной некроза считали очаг совместно с глиальным рубцом. Как видно из рисунка, ближе всего к значениям, полученным классическим гистологическим методом, лежат величины, полученные методом ШОН на 3-й мин после ФИ, между этими данными корреляция высокая ($r = 0,70$, $p = 0,035$, корреляция Пирсона).

У 5/9 мышей в период 3–10 мин после окончания облучения лазером (13–20 мин после начала фотоиндукции ишемии) была зарегистрирована распространяющаяся кортикальная деполяризация (РКД). Притом у 1 мыши это была первичная РКД, поскольку до ее начала флуоресценция во всем полушарии была на среднем уровне, а после окончания волны деполяризации сформировался очаг яркой флуоресценции. Как недавно показано Н.Т. Zhao с коллегами [18], количество

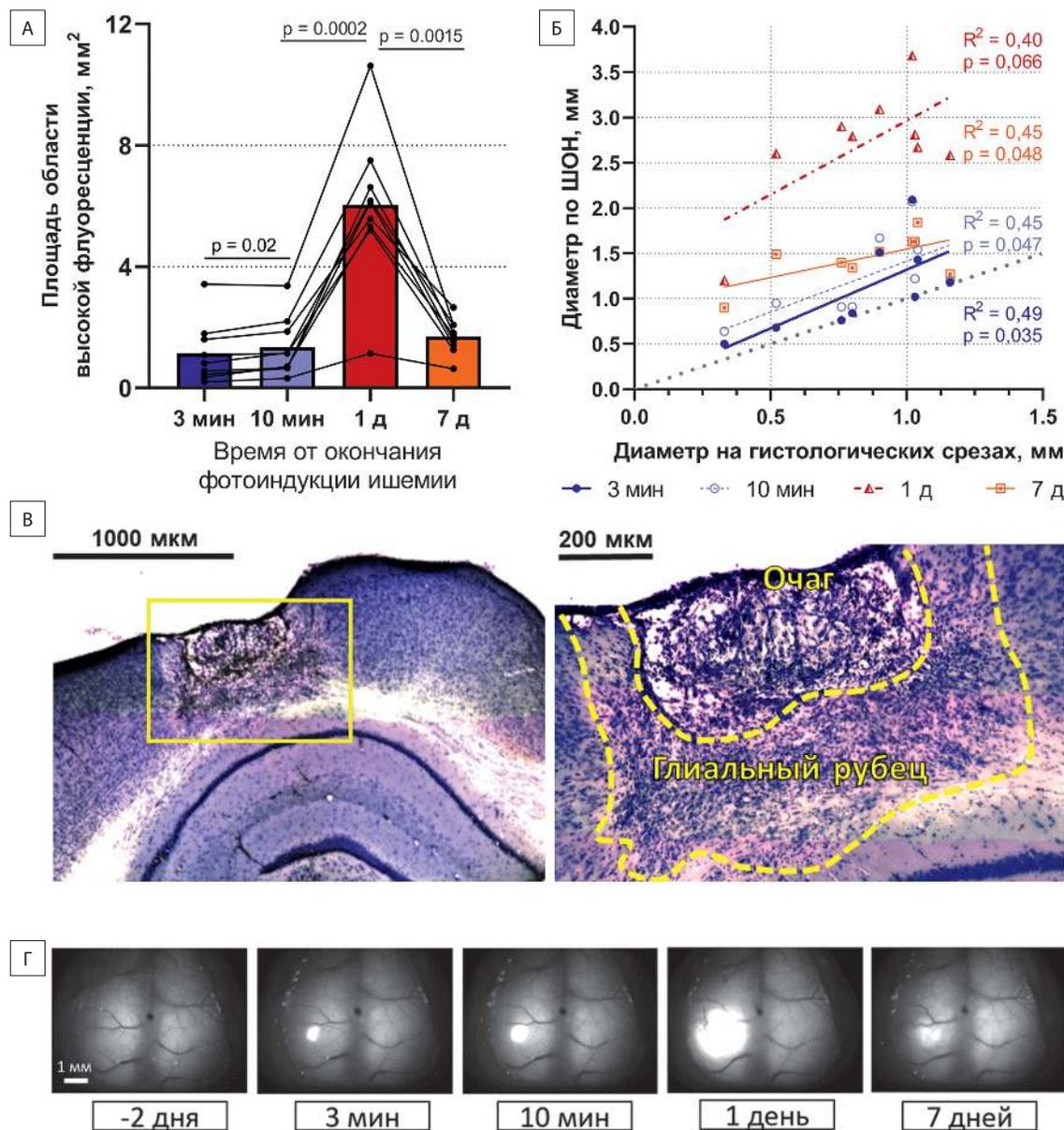


Рис. 1. Определение размера области ишемии в мозге мыши. (А) Площадь области с высокой интенсивностью флуоресценции GCaMP6f на снимках ШОН ($n=9$, ср. арифм., двухфакторный дисперсионный анализ для связанных выборок с поправкой Тукей); (Б) Сопоставление диаметра области инсульта, определенного по ШОН, с диаметром инсульта, определенного по гистологическим срезам (корреляция Пирсона); (В) Репрезентативное изображение среза мозга, окрашенного по Нисслю. (Г) Репрезентативные флуоресцентные изображения поверхности коры больших полушарий, полученные методом ШОН для одной мыши; изображения представлены без обработки. Измерения методом ШОН проводили на бодрствующих подвижных мышах. Увеличение интенсивности флуоресценции GCaMP6f-сенсора соответствует увеличению концентрации кальция в цитозоле нейронов. Съемку ШОН проводили при возбуждении 470 нм, регистрация флуоресценции 525 ± 25 нм. Фотоиндукцию ишемии проводили лазером 532 нм (10 мВт, 10 мин, диаметр светового пучка 2 мм); Бенгальский розовый (20 мг/кг) вводили intravenously.

Fig. 1. Ischemic area size measurements in the mouse brain. (A) The square of the region with high intensity of GCaMP6f fluorescence in the WFOI images ($n=9$, Mean, Two-Way ANOVA with Tukey); (B) Comparison of the stroke diameter, determined by WFOI, with the stroke diameter, determined by histological sections (Pearson's correlation); (B) Representative image of a Nissl-stained brain section. (Г) Representative fluorescent images of the cerebral cortex surface, obtained by WFOI for one mouse; images are presented without processing. Measurements by WFOI were carried out on awake moving mice. An increase in the GCaMP6f fluorescence corresponds to an increase in the cytosolic calcium concentration. WFOI images were obtained at excitation 470 nm, registration of fluorescence 520 ± 20 nm. Photothrombotic stroke modeling was performed with a 532 nm laser (10 mW, 10 min, the light beam diameter 2 mm); Rose Bengal (20 mg/kg) was administered intravenously.

волн РКД индивидуально для каждого животного, поэтому нельзя точно знать, какой по счету была зарегистрированная РКД у других животных. Характеристика волн не отличается от описанных [18] и заключается в том, что массовая деполяризация нейронов, детектируемая по увеличению флуоресценции GCaMP6f, распространяется по ишемизированному полушарию

от очага ишемии, с последующим периодом депрессии – снижением активности нейронов в полушарии относительно исходного уровня [19, 20]. Ширина фронта и временные характеристики могут различаться между различными РКД (рис. 2), что согласуется с данными литературы [18]. Также отмечено, что протекание РКД способствует скачкообразному расширению об-

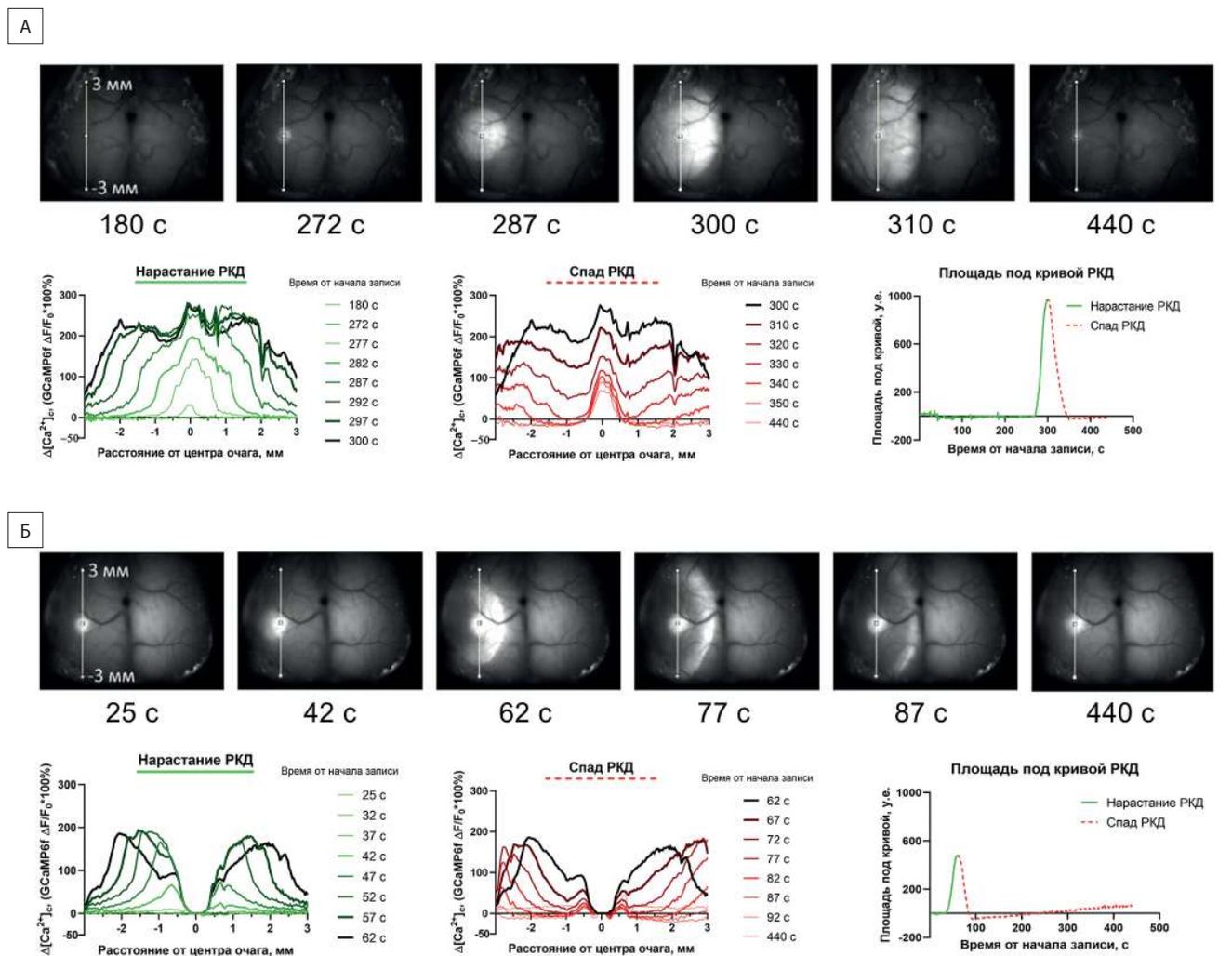


Рис. 2. Распространяющаяся кортикальная деполяризация (РКД) через 3-10 мин после фотоиндукции ишемии. Представлены репрезентативные изображения, полученные от 2 мышей, отображающие 2 различных сценария протекания РКД. (А) Первичная РКД с широким фронтом; (Б) Не первичная РКД с узким фронтом (изменений в очаге ишемии нет, т.к. там исходно высокая флуоресценция). Представлены (последовательно): репрезентативные необработанные изображения на различных временных промежутках записи (длина отрезка 6 мм); $\Delta F/F_0 * 100\%$ на различных этапах нарастания и спада РКД (профиль интенсивности построен вдоль прямой, прерывчатой на изображениях мозга); площадь под кривой $\Delta F/F_0 * 100\%$ в течение всей записи. На графиках представлены изменения флуоресценции GCaMP6f относительно исходного уровня (принят за 0%).

Fig. 2. Cortical spreading depolarization (CSD) recorded 3-10 min after photothrombotic stroke. Representative images from two mice are shown, illustrating two different CSDs scenarios. (A) Wide primary CSD; (B) Narrow non-primary CSD (there are no changes in the ischemic core, since it initially has high fluorescence). Presented (consequently): raw images at various recording time intervals (segment length 6 mm); $\Delta F/F_0 * 100\%$ at various stages of CSD rise and fall (intensity profile plotted along a straight line drawn on brain images); area under the curve $\Delta F/F_0 * 100\%$ during the entire recording. The graphs show the changes in GCaMP6f fluorescence relative to the initial level (taken as 0%).

ласти с повышенной $[Ca^{2+}]_c$, тогда как в другие отрезки времени расширение области повышенной $[Ca^{2+}]_c$ происходит равномерно.

Измерения внутриклеточных концентраций кальция, митохондриального потенциала и pH в нейроглиальных культурах. В использованной линии трансгенных мышей Ca^{2+} -сенсор GCaMP6f не имеет адресной пептидной последовательности для доставки в какой-либо внутриклеточный компартмент и после синтеза на рибосомах должен оставаться в цитозоле. Анализ изображений подтверждает, что флуоресценция GCaMP6f сосредоточена в цитозоле и не обнаруживается в ядре (рис. 3, А). Примерно такое же распределение в клетке демонстрирует митохондриальный зонд TMRM, поскольку митохондрии в ядре отсутствуют. Очевидно, размер молекулы GCaMP6f (Мол. масса около 51 кДа) [21] превышает размер ядерной поры и без адресной метки сенсор не может попасть в ядро, и поэтому изменения сигнала GCaMP6f отражают изменения концентрации Ca^{2+} в цитозоле ($[Ca^{2+}]_c$). Это наблюдение важно в связи с тем, что синтетические Ca^{2+} -индикаторы, в том числе, использованные в данной работе Fura-2 или Fura-FF, имеют малый размер (около 1 кДа), легко проникают в ядро и их сигналы отражают изменения концентрации Ca^{2+} , усредненные по цито- и нуклеоплазме ($[Ca^{2+}]_i$).

Основная часть клеток, экспрессировавших GCaMP6f, имела в невозбужденном состоянии (перед добавлением Glu) стабильно низкую концентрацию

Ca^{2+} , регистрируемую как по флуоресценции белкового сенсора, так и с помощью синтетических кальциевых индикаторов Fura-FF и Fura-2. Добавление глутамата (Glu, 10 мкМ, глицин 10 мкМ, безмагневый буфер) вызывало транзиторный скачок сигнала обоих типов индикаторов Ca^{2+} , вслед за которым следовал вторичный подъем $[Ca^{2+}]_i$ (отсроченная кальциевая дизрегуляция, ОКД), четко регистрируемый с помощью Fura-FF (рис. 4, А) и Fura-2 (не показано). Сигналы GCaMP6f показали только начало вторичного подъема $[Ca^{2+}]_c$ (рис. 4, Б). Амплитуда этого подъема в большинстве клеток не превышала первоначальный скачок $[Ca^{2+}]_c$ в момент добавления Glu.

Митохондриальный потенциал начинает резко падать в тот момент, когда в нейронах развивается ОКД [22]. В данном эксперименте это отчетливо видно из сопоставления графиков на рисунке 4, В (сплошная красная кривая и зеленая пунктирная) и хорошо согласуется с опубликованными ранее данными [22, 23].

Изменения сигналов Fura-FF и TMRM в клетках, не экспрессировавших GCaMP6f, имели такой же характер, как и представленные на рисунке 4 (данные не показаны).

Ранее было показано, что воздействие токсических доз глутамата сопровождается закислением внутриклеточной среды [24]. Все флуоресцентные белки уменьшают свечение при падении pH ниже определенного порога, характерного для каждого сенсора [25]. Экспрессия флуоресцентного белкового pH-сенсора YFP

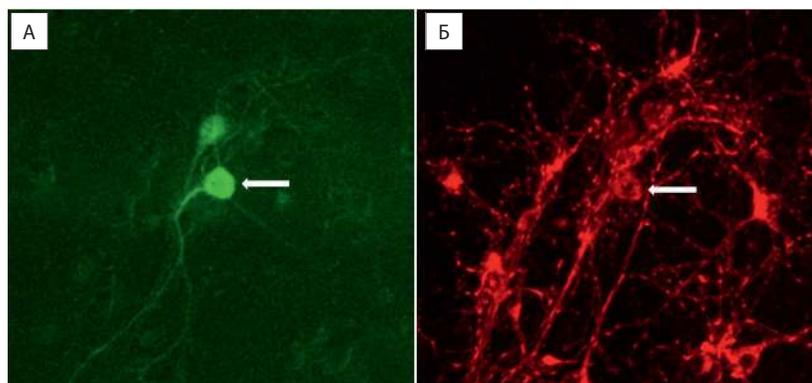


Рис. 3. Изображения первичной нейроглиальной культуры из кортекса мозга трансгенных мышей, экспрессирующих флуоресцентный белковый Ca^{2+} -сенсор GCaMP6f и окрашенных потенциал-чувствительным митохондриальным зондом TMRM. Стрелка указывает на нейрон, а также служит масштабной мерой (длина стрелки соответствует 20 мкм). Флуоресценцию GCaMP6f (А, зеленое изображение) возбуждали при 485 нм и регистрировали при 525 нм; флуоресценцию TMRM (Б, красное изображение); возбуждали при 565 нм регистрировали при ≥ 610 нм). Возраст культуры 14 дней. Объектив 40x/NA=1.35, Oil.

Fig. 3. Images of primary neuroglial culture from the brain cortex of transgenic mice expressing the fluorescent protein Ca^{2+} sensor GCaMP6f and stained with the voltage-sensitive mitochondrial dye TMRM. The arrow points to the neuron and also serves as a scale measure (the length of the arrow is 20 μ m). GCaMP6f fluorescence (A, green image) was excited at 485 nm and recorded at 525 nm; TMRM fluorescence (B, red image); excited at 565 nm recorded at ≥ 610 nm). Culture was 14 days in vitro (DIV). Lens 40x/NA=1.35, Oil.

в цитозоле культивируемых нейронов позволила показать, что при нейротоксическом действии глутамата рН цитозоля (рН_c) опускается ниже 6 [15, 26, 27], причем закисление цитозоля прекращалось после развития ОКД до стадии высокого [Ca²⁺]_i плато. Значение рК для структурных аналогов GCaMP6f находится вблизи рН 7,1 [21] и поэтому следует ожидать тушения его флуоресценции при действии Glu.

Мы проверили, как изменяется рН в культурах нейронов, полученных из коры головного мозга трансгенных мышей с генетически-кодируемым GCaMP6f. На рис. 5 представлены изменения [Ca²⁺]_i и внутриклеточного рН (среднее рН в цито- и нуклеоплазме, рН_i)

в 2 представительных нейронах, которые отличались характером изменений [Ca²⁺]_i в ответ на добавление Glu (10 мкМ, 5 мин). Обращает внимание, что после удаления Glu, восстановление низкой [Ca²⁺]_i происходит быстрее по сравнению с рН_i. Этот эффект объясняется тем, что митохондрии эффективно захватывают Ca²⁺ из цитозоля. На это указывает резкое увеличение [Ca²⁺]_i при добавлении протонифора FCCP (1 мкМ) в бескальциевом буфере (рис. 5). Несмотря на яркое отличие в Ca²⁺ сигналинге, изменения рН_i в обоих нейронах очень похожи. Это, вероятно, связано с тем, что восстановление исходного рН_i сопряжено с трансмембранным градиентом концентрации Na⁺, который (градиент) остается не-

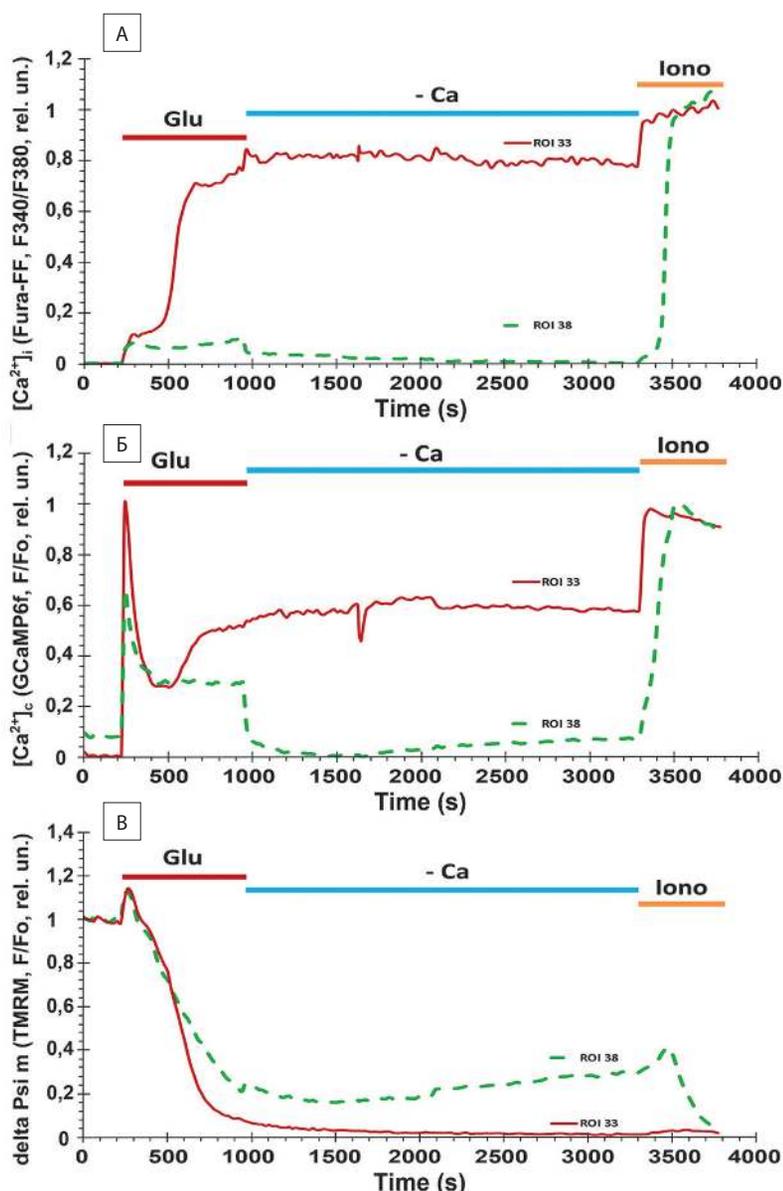


Рис. 4. Изменения средней по клетке внутриклеточной концентрации свободного Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) в цитозоле ([Ca²⁺]_c) и трансмембранного потенциала митохондрий (ΔΨ_m) в нейронах первичной нейроглиальной культуры из кортекса мозга мыши. Возраст культуры 13 сут. Приведены графики для 2 представительных нейронов (ROI 33, ROI 38), экспрессировавших GCaMP6f, в одном из которых (ROI 33) за время действия глутамата (Glu, 10 мкМ) развилась отсроченная кальциевая дисрегуляция (ОКД), а во втором ОКД не состоялась (ROI 38). Относительные измерения [Ca²⁺]_i выполнены с помощью (А) синтетического флуоресцентного индикатора Fura-FF (возбуждение 340 и 380 нм, регистрация 525 нм) и (Б) эндогенного Ca²⁺-сенсора GCaMP6f (возбуждение 485 нм, регистрация 525 нм); (В) измерения ΔΨ_m выполнены с использованием флуоресцентного зонда TMRM (возбуждение 565 нм, регистрация ≥610 нм). Снижение флуоресценции TMRM соответствует падению ΔΨ_m в результате вытекания TMRM из клетки [22]. Значения Ca²⁺ в покоящихся нейронах приняты за 0; максимальные сигналы Fura-FF и GCaMP6f приняты за 1, достигнуты добавлением Ca²⁺-ионофора иономицина (Iono, 1 мкМ, [Ca²⁺]_i в буфере 5 мМ). Изменения ΔΨ_m нормированы относительно исходных значений в покоящихся нейронах.

Fig. 4. Average intracellular concentration of free Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) dynamics, changes in the cytosolic calcium ([Ca²⁺]_c) and transmembrane potential of mitochondria (ΔΨ_m) in neurons of the primary neuroglial culture from the mouse cortex. 13 DIV. Graphs are shown for two representative neurons (ROI 33, ROI 38) expressing GCaMP6f, in one of which (ROI 33) delayed calcium dysregulation (DCD) developed during the action of glutamate (Glu, 10 μM), and in the second one, DCD did not take place (ROI 38). Relative measurements of [Ca²⁺]_i were performed using (A) synthetic fluorescent indicator Fura-FF (excitation 340 and 380 nm, emission 525 nm) and (B) endogenous Ca²⁺ sensor GCaMP6f (excitation 485 nm, emission 525 nm); (B) ΔΨ_m measurements were made using a TMRM fluorescent probe (excitation 565 nm, emission ≥610 nm). A decrease in TMRM fluorescence corresponds to a decrease in ΔΨ_m as a result of TMRM leakage from the cell [22]. Ca²⁺ values in resting neurons are taken as 0; the maximum signals of Fura-FF and GCaMP6f were taken as 1, achieved by adding the Ca²⁺ ionophore ionomycin (Iono, 1 μM, [Ca²⁺]_i = 5 mM, in buffer solution). Changes in ΔΨ_m shown as relative to the initial values in resting neurons.

большим после удаления Glu, даже если восстановление низкой $[Ca^{2+}]_i$ уже произошло [16].

Таким образом, данные измерений pH_i (рис. 5) подтверждают предположение, что пониженное значение $[Ca^{2+}]_c$ в период ОКД может быть вызвано рН-чувствительностью GCaMP6f к закислению цитозоля.

Неожиданной особенностью культуры клеток из коры головного мозга трансгенных мышей оказалось способность нейронов к спонтанным изменениям $\Delta\Psi_m$, синхронным с изменениями $[Ca^{2+}]_c$, зарегистрированными с помощью GCaMP6f. Пример таких синхронных изменений показан на рис. 6, А. Доля таких клеток составляла ~10% (8 клеток из 78, 2 выделения из 8 животных с разницей в 1 нед). Эти изменения относятся именно к цитозолу поскольку GCaMP6f, как уже отмечалось, не имеет адресной пептидной последовательности и не может попадать во внутриклеточные органеллы. Кроме того, в покое нейронах GCaMP6f не мо-

жет пассивно диффундировать в ядро, вероятно, потому что этого не позволяют размеры ядерных пор (рис. 3).

Сопоставление сигналов зонда TMRM и кальциевого сенсора GCaMP6f показало, что быстрые транзиторные флуктуации флуоресценции TMRM совпадают по продолжительности с падениями концентрации Ca^{2+} в цитозоле (рис. 6, верхние графики). Учитывая высокую аффинность GCaMP6f по отношению к Ca^{2+} (K_d в диапазоне 100-300 нМ; [21]), а также то, что в покое нейронах $[Ca^{2+}]_i$ не превышает 100 нМ [28], транзиторные изменения $[Ca^{2+}]_c$ составляют не более нескольких десятков наномолей/литр. Очевидно, этого количества Ca^{2+} достаточно для активации дыхательной цепи, но недостаточно для сильной деполяризации внутренней митохондриальной мембраны. Вторым вариантом реализуется при поступлении большого количества Ca^{2+} в матрикс митохондрий, которое происходит при нейротоксическом действии Glu (рис. 4).

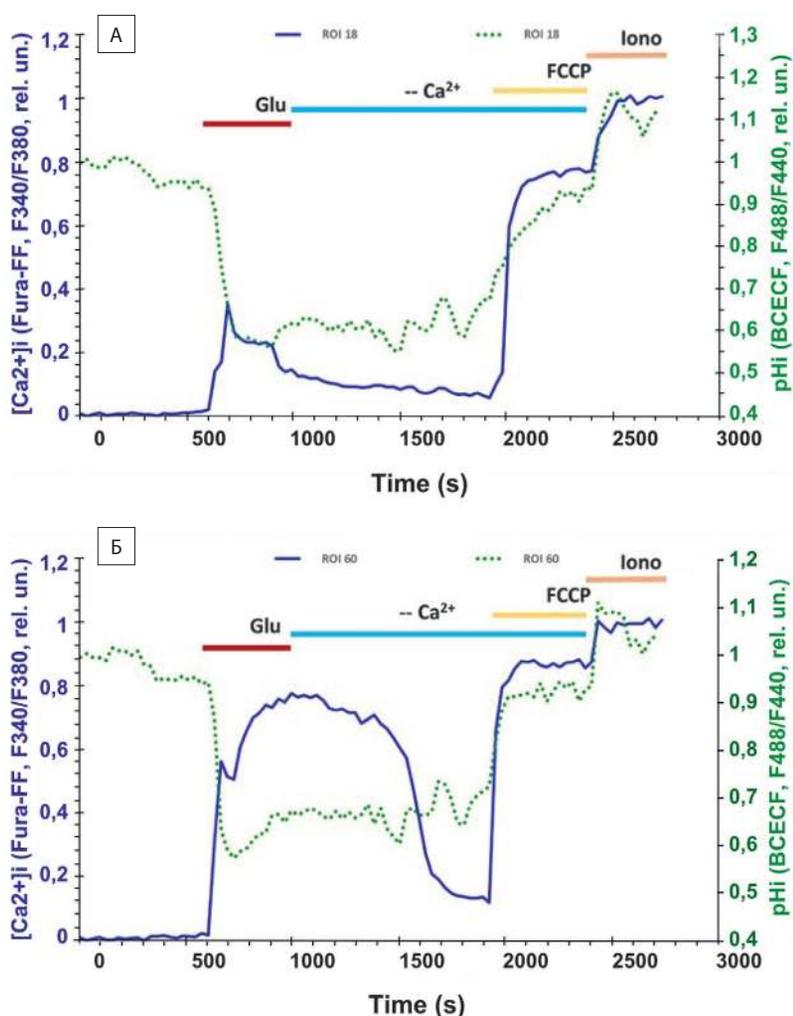


Рис. 5. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ и внутриклеточного рН (pH_i) в первичной нейроглиальной культуре из мозга мыши. Показаны $[Ca^{2+}]_i$ и pH_i сигналы 2 представительных клеток, в одной из которых Glu не вызвал развития отсроченной кальциевой дисрегуляции (А), во второй ОКД развилась через 2 мин после добавления Glu (Б). Изменения $[Ca^{2+}]_i$ (синяя сплошная линия) представлены левой шкалой ординат, изменения pH_i (зеленая точечная линия) – правой шкалой. Концентрация Glu 10 мкМ (10 мкМ глицина, безмагниевого буфера); удаление Glu и добавление протонифора FCCP (1 мкМ) проводили в бескальциевом буфере (2 мМ Mg^{2+}). Внутриклеточные сигналы низкоаффинного Ca^{2+} -индикатора Fura-FF регистрировали как указано на рисунке 2. Для записи сигналов флуоресцентного рН-индикатора BCECF использовали возбуждение на 440 и 485 нм, регистрация на 525 нм. Калибровку максимального сигнала Fura-FF осуществляли, добавляя иономицин (см. рис. 2). Калибровку сигналов рН-индикатора BCECF не проводили, однако см. [15]. Возраст культуры 14 сут.

Fig. 5. Changes in $[Ca^{2+}]_i$ and intracellular pH (pH_i) in primary neuroglial culture from mouse brain (14 DIV). Changes in $[Ca^{2+}]_i$ (solid blue line) are represented by the left ordinate axis, pH_i changes (green dotted line) are represented by the right ordinate axis. Adding of Glu 10 μ M (10 μ M glycine, magnesium-free buffer), removal of Glu, and adding of protonophore FCCP (1 μ M) were performed in calcium-free buffer (2 mM Mg^{2+}). Intracellular signals of the low-affinity Ca^{2+} indicator Fura-FF were recorded as indicated for Fura-2 in Fig. 2. To record the signals of the fluorescent pH indicator BCECF, the conditions indicated in Fig. 1 for GCaMP6f were used. Calibration of the maximum Fura-FF signal was performed by adding ionomycin (see Fig. 2). Calibration of the signals of the pH indicator BCECF was not performed, however, see [15].

Для увеличения $\Delta\Psi_m$ требуется ускорение работы ферментов дыхательной цепи и, соответственно, усиленного потребления их субстратов, в первую очередь NADH, субстрата комплекса I [29]. Поэтому одновременно с измерениями $[Ca^{2+}]_c$ и $\Delta\Psi_m$ были выполнены измерения уровня внутриклеточного NADH, около 70% которого заключено в митохондриях [30]. Сопоставление сигналов зонда TMRM с изменениями эндогенной флуоресценции, обусловленной NADH показало, что скачки гиперполяризации (кратковременного роста $\Delta\Psi_m$) совпадают с падениями флуоресценции NADH (рис. 6, нижняя панель). Такие изменения NADH согласуются с каноническими представлениями о том, что для увеличения $\Delta\Psi_m$ необходимо ускорение работы ферментов дыхательной цепи митохондрий и, соответственно, увеличение потребления NADH комплексом I. Если бы скачкообразные увеличения $\Delta\Psi_m$ были связаны с быстрыми временными уменьшениями ионной проницаемости внутренней мембраны митохондрий, то в этом случае следовало

ожидать сокращения потребления NADH комплексом I и, соответственно, роста флуоресценции NADH. Однако имеет место противоположный феномен и, следовательно, более вероятной причиной скачкообразных транзиторных увеличений $\Delta\Psi_m$ является кратковременный рост скорости дыхания.

Чтобы уточнить изменениями какого из параметров, $[Ca^{2+}]_c$ или pH обусловлены спонтанные флуктуации флуоресценции GCaMP6f, первичную нейроглиальную культуру из мозга мышей, экспрессирующую этот кальциевый сенсор, окрасили синтетическим кальциевым индикатором Fura-2. Fura-2 является высокоаффинным индикатором и имеет константу диссоциации комплекса с Ca^{2+} $K_d=224$ нМ [31], что соответствует аффинности комплексов GCaMP-белков с Ca^{2+} ($K_d = 100-400$ нМ) [32, 33]. Сопоставление сигналов GCaMP6f и Fura-2 показало, что ни в одной клетке, продемонстрировавшей изменения флуоресценции GCaMP6f, не происходило изменений рэйшио-метрического сигнала Fura-2 (данные не показаны).

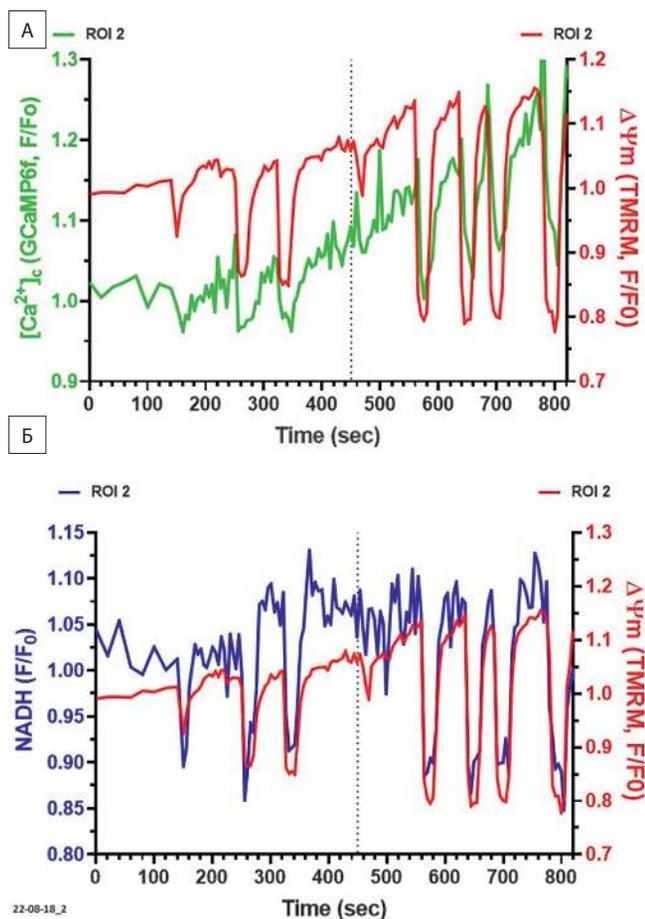


Рис. 6. Изменения трансмембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий ($\Delta\Psi_m$), концентрации Ca^{2+} в цитозоле ($[Ca^{2+}]_c$) и уровня эндогенного NADH в первичной нейроглиальной культуре из мозга трансгенной мыши. Изменения $[Ca^{2+}]_c$ (А, зеленая кривая, левая шкала ординат) регистрировали, как сказано в подписи к рисунку 4. Изменения $\Delta\Psi_m$ регистрировали с помощью TMRM (правые шкалы ординат), как описано на рисунке 4. Снижение флуоресценции TMRM в данном протоколе соответствует увеличению $\Delta\Psi_m$ (см. в тексте). Изменения уровня NADH (Б, синяя кривая, левая шкала ординат) измеряли по интенсивности эндогенной флуоресценции, возбуждаемой при 360 нм и регистрируемой при 450 нм. Концентрацию TMRM (20 нМ) во всех буферных растворах подбирали таким образом, чтобы при увеличении $\Delta\Psi_m$ и захвате зонда митохондриями происходило концентрационно-зависимое самотушение флуоресценции TMRM в матриксе митохондрий [22].

Fig. 6. Changes in the transmembrane potential of the mitochondrial inner membrane ($\Delta\Psi_m$), Ca^{2+} concentration in the cytosol ($[Ca^{2+}]_c$) and endogenous NADH level in the primary neuroglial culture from the brain of a transgenic mouse. Changes in $[Ca^{2+}]_c$ (upper panel, green curve, left ordinate scale) were recorded as indicated in the caption to Fig.4. Changes in $\Delta\Psi_m$ were recorded using TMRM (right ordinate scales) as described in Fig. 4. The decrease in TMRM fluorescence in this protocol corresponds to an increase in $\Delta\Psi_m$ (see text). Changes in the level of NADH (lower panel, blue curve, left ordinate) were measured by the intensity of endogenous fluorescence excited at 360 nm and recorded at 450 nm. The concentration of TMRM (20 nM) in all buffer solution was chosen so that with an increase in $\Delta\Psi_m$ and capture of the probe by mitochondria, concentration-dependent self-quenching of TMRM fluorescence in the mitochondrial matrix occurred [22].

Из этого следует, что синхронные осцилляции $\Delta\Psi_m$ и $[Ca^{2+}]_c$ вызваны, по крайней мере отчасти, колебаниями рН цитозоля.

Обсуждение

При ишемии и инсульте мозга ключевая роль Glu, длительное действие которого приводит к чрезмерной активации глутаматных рецепторов ионотропного типа и последующему дисбалансу ионного гомеостаза, прежде всего Ca^{2+} , нарушению функций митохондрий, энергетическому коллапсу, окислительному стрессу и, в итоге, к гибели нейронов, не вызывая сомнения [2, 4, 34, 35]. Вместе с тем, появились данные, полученные на нейрональных культурах [36], и при исследованиях живого мозга, что в развитии глутаматной нейротоксичности критичны нарушения гомеостаза не только Ca^{2+} , но и одновалентных ионов Na^+ и K^+ [1, 33]). В этой связи представляются важными исследования Ca^{2+} гомеостаза на живом мозге трансгенных животных, экспрессирующих флуоресцентный сенсор ионов кальция GCaMP6f параллельно с исследованиями нейроглиальных культурах, полученных из животных той же линии.

В данной работе методом широкопольной оптической нейровизуализации (ШОН) выполнены измерения изменений $[Ca^{2+}]_c$ дорзальной поверхности коры больших полушарий у мышей, экспрессирующих GCaMP6f и подвергнутых фотоиндуцированной ишемии (ФИ) в участке сенсомоторной коры. Скачкообразное расширение области с повышенной $[Ca^{2+}]_c$ после завершения распространяющейся кортикальной деполяризации (РКД) подтверждает участие РКД в эскалации ишемического повреждения (рис. 2). Вклад глутамата, K^+ , Na^+ , воспалительных процессов и других причин в формирование области устойчивого повышения $[Ca^{2+}]_c$ через 1 сут после ФИ не может быть определен в данном дизайне исследования.

Динамика флуоресценции GCaMP6f показала, что сенсор сохраняется даже в очаге поражения в течение не менее недели. Хотя GCaMP6f синтезируется под нейрон-специфичным Thy-1 промотором, нельзя исключить того, что в какой-то степени сенсор экспрессируется или поглощается после гибели нейронов другими клетками, выжившими в очаге поражения или хотя бы сохранившими целостность клеточной мембраны. Поэтому даже при полной гибели нейронов в очаге некроза сохраняется флуоресценция GCaMP6f. Было обнаружено, что максимальный рост $[Ca^{2+}]_c$ приходится на 1-е сут после ФИ и, спустя 1 нед, восстанавливается в пенумбре (но не в очаге некроза) до уровня, предшествующего ФИ (рис. 1, А, Г). Диаметр очага

поражения, вычисленный на основании изображений ШОН статистически значимо коррелировал с диаметром зоны некроза, определенным классическим окрашиванием срезов мозга. Притом на 3 мин записи ШОН корреляция была высокой, а у 6/9 мышей значения, вычисленные двумя различными методами, практически совпали (рис. 1, Б, В). Это позволяет считать, что ШОН можно адекватно применять для определения размеров некротического очага при ФИ.

Конструктивные особенности оптической системы ШОН, позволяют наблюдать изменения в большом поле зрения, но с малым пространственным разрешением [9, 37]. Поэтому изменения интенсивности флуоресценции в каждом пикселе изображения представляют собой суммарные изменения $[Ca^{2+}]_c$ в группе нейронов, чьи индивидуальные ответы объединены общими сигналами в каждом пикселе. Поэтому нельзя утверждать, что на 1 д. ФИ высокую $[Ca^{2+}]_c$ имели все нейроны в области яркой флуоресценции. Это может объяснить, почему в большей части данной области к 7 д. ФИ произошел возврат $[Ca^{2+}]_c$ к уровню, предшествующему ФИ (рис. 1, 2). Стоит отметить, что размер области поражения по ШОН на 7 д превышал размеры некротического очага, определенного гистологически. Это может быть обусловлено тем, что часть нейронов пенумбры, дающих вклад в общий сигнал пикселя, восстановила $[Ca^{2+}]_c$ до исходного уровня, а другая часть нейронов сохранила высокую $[Ca^{2+}]_c$, соответствующую максимальному подъему на 1-е сут после ФИ. Степень возврата к исходному уровню и динамика этого процесса, определяется, в этом случае, соотношением нейронов, которые смогли удержать или восстановить низкую $[Ca^{2+}]_c$.

Основанием для такой интерпретации данных ШОН служат результаты, полученные методом эпифлуоресцентной микроскопии на нейроглиальных культурах, приготовленных из той же линии трансгенных мышей. В популяции клеток в поле наблюдения микроскопа, доля экспрессировавших GCaMP6f составляла ~20% (см. раздел «Методика»). Примерно в половине этих клеток развивался вторичный подъем $[Ca^{2+}]_c$, тогда как в остальных клетках, экспрессировавших GCaMP6f, ОКД не возникала (рис. 4).

При анализе изменений $[Ca^{2+}]_c$ следует учесть рН-чувствительность флуоресценции белковых сенсоров [25], включая белки, аналогичные GCaMP6f [21]. На рис. 5 видно, что одна из клеток смогла удерживать относительно низкий уровень $[Ca^{2+}]_i$ в течение действия Glu (рис. 5, А), тогда как в другой произошло развитие ОКД через 2 мин после добавления Glu (рис. 5, Б). Обращает внимание то, что изменения

pH_i во время действия Glu в обоих нейронах очень похожи. Это объясняется тем, что восстановление pH_i осуществляет Na^+/H^+ -обменник плазматической мембраны [38, 39], для работы которого требуется восстановление градиента концентрации Na^+ через плазматическую мембрану и электрического трансмембранного потенциала плазмалеммы. Оба эти параметра зависят от эффективности переноса ионов натрия и калия Na/K -АТФазой плазмалеммы, на работу которой затрачивается почти половина синтезируемого нейронами АТФ [15, 16]. Восстановление трансмембранного градиента концентрации Na^+ и потенциала плазмалеммы происходит значительно медленнее, чем восстановление $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 5) из-за гораздо больших затрат АТФ Na/K -АТФазой, чем Ca^{2+} -АТФазой, которая способна функционировать при $[АТФ] = 0,01-0,1$ мМ [40]. Поэтому, вероятно, pH_i сохраняется на низком уровне (концентрация протонов в цитоплазме остается высокой) дольше, чем высокая $[Ca^{2+}]_i$.

Заслуживает упоминания то, что на 7-е сут после ФИ происходит не только восстановление физиологической $[Ca^{2+}]_c$ в большей части нейронов в пенумбре, но и восстановление функционального статуса клеток, о чем свидетельствует возобновление спонтанных флуктуаций $[Ca^{2+}]_c$. Спонтанные флуктуации $[Ca^{2+}]_c$ были обнаружены также примерно в 10% культивируемых нейронов, имевших $GCaMP6f$ (рис. 6). Примечательно, что эти осцилляции прекращались после добавления экзогенного Glu (10 мкМ). Необходимо подчеркнуть, что осцилляции $[Ca^{2+}]_c$ происходили синхронно с изменениями митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$). В отсутствие Glu и, соответственно, низкой ионной проводимости плазмалеммы, потенциал плазматической мембраны постоянен (около -60 мВ) и вытекания TMRM не происходит [22, 23]. В этих условиях снижение флуоресценции TMRM соответствуют увеличению $\Delta\Psi_m$ (рис. 6, А).

Природа флуктуаций $[Ca^{2+}]_c$ в коре головного мозга, обнаруженных методом ШОН и спонтанных флуктуаций $[Ca^{2+}]_i$ в нейроглиальной культуре, едва ли одинаковая, однако позволяет предположить, что флуктуации $[Ca^{2+}]_c$ в коре мозга могут зависеть от функциональной активности митохондрий [4].

Поскольку поддержание $\Delta\Psi_m$ определяется эффективностью работы цикла трикарбоновых кислот, прежде всего, количеством производимого NADH в матриксе митохондрий, мы проверили изменения уровня этого динуклеотида, регистрируя его флуоресценцию (рис. 6, Б). Оказалось, что флуоресцен-

ция NADH колеблется синхронно, но в противофазе с изменениями $\Delta\Psi_m$ (падение флуоресценции TMRM на рис. 6 соответствует росту $\Delta\Psi_m$). Такие изменения NADH согласуются с каноническими представлениями о том, что для увеличения $\Delta\Psi_m$ необходимо ускорение работы ферментов дыхательной цепи митохондрий рост скорости дыхания и, соответственно, увеличение потребления NADH комплексом I дыхательной цепи.

Эти данные показывают, что для поддержания колебаний $[Ca^{2+}]_c$ важна не только концентрация Glu, но и локализация действия этого нейротрансмиттера [20, 33]. Участие митохондрий также необходимо для поддержания осцилляций $[Ca^{2+}]_c$ [4].

Заключение

Регистрация активности коры головного мозга методом ШОН позволила количественно охарактеризовать динамику развития распространяющейся кортикальной деполяризации после фотоиндуцированного инсульта, детектировать *in vivo* некротическое ядро и зону пенумбры, а также наблюдать процесс восстановления $[Ca^{2+}]_c$ в части коры больших полушарий у трансгенных мышей, экспрессирующих в нейронах $GCaMP6f$. Сочетание ШОН с использованием первичных нейроглиальных культур из коры головного мозга мышей той же линии позволило более корректно интерпретировать данные, полученные для живого мозга, в частности, учитывать pH -зависимость сигналов $GCaMP6f$. Обнаружено, что ~10% популяции культивируемых нейронов имеют спонтанные флуктуации $[Ca^{2+}]_c$, $\Delta\Psi_m$ и $[NADH]$, которые прекращаются при добавлении Glu.

Благодарность. Авторы приносят благодарность А.Е. Згодовой и А.А. Некрасовой за помощь при приготовлении клеточных культур, а также И.Ю. Поповой за помощь в проведении гистологического окрашивания.

Литература

(п.п. 1-8; 10-14; 17-26; 28-40 см. References)

- Лизунова Н.В., Кислухина Е.Н., Сурин А.М. Перинатальный инсульт: модели и возможности нейровизуализации. *Российский педиатрический журнал*. 2022; 25(2): 128–38. <https://doi.org/10.46563/1560-9561-2022-25-2-128-138>
- Сурин А.М., Горбачева Л.Р., Савинкова И.Г., Шарипов Р.Р., Ходоров Б.И., Пинелис В.Г. Исследование изменений $[АТФ]$ в цитозоле индивидуальных нейронов при развитии глутамат-индуцированной дисрегуляции кальциевого гомеостаза. *Биохимия*. 2014; 79(2): 196–208.
- Шарипов Р.Р., Красильникова И.А., Пинелис В.Г., Горбачева Л.Р., Сурин А.М. Исследование механизма сенситизации нейронов к повторному действию глутамата. *Биологические*

- Мембраны*. 2018; 35(5): 384–97. <https://doi.org/10.1134/S0233475518040138>
27. Сурин А.М., Горбачева Л.Р., Савинкова И.Г., Шарипов Р.Р., Пинелис В.Г. Изменения pH в матриксе митохондрий и цитозоле при индуцированной глутаматом дисрегуляции Ca²⁺-гомеостаза в культивируемых нейронах гиппокампа крысы. *Биологические Мембраны*. 2022; 39(4): 307–18. <https://doi.org/10.31857/S0233475522040089>
 1. Andrew R.D., Farkas E., Hartings J.A., Brennan K.C., Herrerias O., Müller M., et al. Questioning Glutamate Excitotoxicity in Acute Brain Damage: The Importance of Spreading Depolarization. *Neurocritical Care*. 2022; 37(Suppl 1): 11–30. <https://doi.org/10.1007/s12028-021-01429-4>
 2. Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2004; 86(2): 279–351. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.10.002>
 3. Campbell B.C. V., Silva D.A. De, Macleod M.R., Coutts S.B., Schwamm L.H., Davis S.M., et al. Ischaemic stroke. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019; 5(1): 1–22. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0118-8>
 4. Plotegher N., Filadi R., Pizzo P., Duchen M.R. Excitotoxicity revisited: mitochondria on the verge of a nervous breakdown. *Trends in Neurosciences*. 2021; 44(5): 342–51. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2021.01.001>
 5. Broussard G.J., Liang R., Tian L. Monitoring activity in neural circuits with genetically encoded indicators. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2014; 7: 97. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00097>
 6. Bregestovski P., Waseem T., Mukhtarov M. Genetically encoded optical sensors for monitoring of intracellular chloride and chloride-selective channels activity. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2009; 2: 15. <https://doi.org/10.3389/neuro.02.015.2009>
 7. Vanni M.P., Murphy T.H. Mesoscale Transcranial Spontaneous Activity Mapping in GCaMP3 Transgenic Mice Reveals Extensive Reciprocal Connections between Areas of Somatomotor Cortex. *Journal of Neuroscience*. 2014; 34(48): 15931–46. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1818-14.2014>
 8. West S.L., Aronson J.D., Popa L.S., Feller K.D., Carter R.E., Chiesl W.M., et al. Wide-Field Calcium Imaging of Dynamic Cortical Networks during Locomotion. *Cerebral Cortex*. 2022; 32(12): 2668–87. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab373>
 9. Lizunova N.V., Kislukhina E.N., Surin A.M. Perinatal stroke: modelling and the potential of neurovisualization. *Rossiyskiy Pediatricheskii Zhurnal (Russian Pediatric Journal)*. 2022; 25(2): 128–38. (In Russian). <https://doi.org/10.46563/1560-9561-2022-25-2-128-138>
 10. Dana H., Chen T.W., Hu A., Shields B.C., Guo C., Looger L.L., et al. Thyl-GCaMP6 transgenic mice for neuronal population imaging in vivo. *PLoS ONE*. 2014; 9(9): e108697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108697>
 11. Ma Y., Shaik M.A., Kim S.H., Kozberg M.G., Thibodeaux D.N., Zhao H.T., et al. Wide-field optical mapping of neural activity and brain haemodynamics: considerations and novel approaches. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2016; 371(1705): 20150360. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0360>
 12. Galkov M., Gulyaev M., Kiseleva E., Andreev-Andrievskiy A., Gorbacheva L. Methods for detection of brain injury after photothrombosis-induced ischemia in mice: Characteristics and new aspects of their application. *Journal of Neuroscience Methods*. 2020; 329: 108457. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2019.108457>
 13. Krasil'nikova I., Surin A., Sorokina E., Fisenko A., Boyarkin D., Balyasin M., et al. Insulin Protects Cortical Neurons Against Glutamate Excitotoxicity. *Frontiers in Neuroscience*. 2019; 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01027>
 14. Bakaeva Z., Lizunova N., Tarzhanov I., Boyarkin D., Petrichuk S., Pinelis V., et al. Lipopolysaccharide From *E. coli* Increases Glutamate-Induced Disturbances of Calcium Homeostasis, the Functional State of Mitochondria, and the Death of Cultured Cortical Neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2022; 14: 347. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.811171>
 15. Surin A.M., Gorbacheva L.R., Savinkova I.G., Sharipov R.R., Khodorov B.I., Pinelis V.G. Study on ATP concentration changes in cytosol of individual cultured neurons during glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis. *Biochemistry (Moscow)* 2014; 79: 146–57. <https://doi.org/10.1134/S0006297914020084>
 16. Sharipov R.R., Krasilnikova I.A., Pinelis V.G., Gorbacheva L.R., Surin, A.M. Study of the Mechanism of the Neuron Sensitization to the Repeated Glutamate Challenge. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. 2018; 12: 369-81. <https://doi.org/10.1134/S1990747818050057>
 17. Ding S., Wang T., Cui W., Haydon P.G. Photothrombosis ischemia stimulates as sustained astrocytic Ca²⁺ signaling in vivo. *GLIA*. 2009; 57(7): 767–76. <https://doi.org/10.1002/glia.20804>
 18. Zhao H.T., Tuohy M.C., Chow D., Kozberg M.G., Kim S.H., Shaik M.A., et al. Neurovascular dynamics of repeated cortical spreading depolarizations after acute brain injury. *Cell Reports*. 2021; 37(1): 109794. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109794>
 19. Pietrobon D., Moskowitz M.A. Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nature Reviews Neuroscience*. 2014; 15(6): 379–393. <https://doi.org/10.1038/nrn3770>
 20. Andrew R.D., Hartings J.A., Ayata C., Brennan K.C., Dawson-Scully K.D., Farkas E., et al. The Critical Role of Spreading Depolarizations in Early Brain Injury: Consensus and Contention. *Neurocritical Care*. 2022; 37(Suppl 1): 83–101. <https://doi.org/10.1007/s12028-021-01431-w>
 21. Akerboom J., Rivera J.D.V., Rodríguez Guilbe M.M., Malavé E.C.A., Hernandez H.H., et al. Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284(10): 6455–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807657200>
 22. Duchen M.R., Surin A., Jacobson J. Imaging mitochondrial function in intact cells. *Methods in Enzymology*. 2003; 361: 353–89. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)61019-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)61019-0)
 23. Ward M.W., Rego A.C., Frenguelli B.G., Nicholls D.G. Mitochondrial membrane potential and glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience*. 2000; 20(19): 7208–19. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-19-07208.2000>
 24. Guang Jian Wang, Randall R.D., Thayer S.A. Glutamate-induced intracellular acidification of cultured hippocampal neurons demonstrates altered energy metabolism resulting from Ca²⁺ loads. *Journal of Neurophysiology*. 1994; 72(6): 2563–9. <https://doi.org/10.1152/jn.1994.72.6.2563>
 25. Chudakov D.M., Matz M. V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological Reviews*. 2010; 90(3): 1103–63. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>

26. Bolshakov A.P., Mikhailova M.M., Szabadkai G., Pinelis V.G., Brustovetsky N., Rizzuto R., et al. Measurements of mitochondrial pH in cultured cortical neurons clarify contribution of mitochondrial pore to the mechanism of glutamate-induced delayed Ca²⁺ deregulation. *Cell Calcium*. 2008; 43(6): 602–14. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.10.005>
27. Surin, A.M., Gorbacheva, L.R., Savinkova, I.G., Sharipov R.R., Pinelis V.G. pH Changes in the Mitochondrial Matrix and Cytosol under Glutamate Deregulation of Ca²⁺ Homeostasis in Cultured Rat Hippocampal Neurons. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A*. 2022; 16(3): 236–45. <https://doi.org/10.1134/S1990747822040079>
28. Kiedrowski L. N-methyl-D-aspartate excitotoxicity: Relationships among plasma membrane potential, Na⁺/Ca²⁺ exchange, mitochondrial Ca²⁺ overload, and cytoplasmic concentrations of Ca²⁺ H⁺ and K⁺. *Molecular Pharmacology*. 1999; 56(3): 619–632. <https://doi.org/10.1124/mol.56.3.619>
29. Denton R.M. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 2009; 1787(11): 1309–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.005>
30. Li D., Zheng W., Qu J.Y. Time-resolved spectroscopic imaging reveals the fundamentals of cellular NADH fluorescence. *Optics Letters*. 2008; 33(20): 2365. <https://doi.org/10.1364/ol.33.002365>
31. Grynkiwicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*. 1985; 260(6): 3440–50. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)83641-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)83641-4)
32. Chen T.W., Wardill T.J., Sun Y., Pulver S.R., Renninger S.L., Baohan A., et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*. 2013; 499(7458): 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>
33. Hinzman J.M., DiNapoli V.A., Mahoney E.J., Gerhardt G.A., Hartings J.A. Spreading depolarizations mediate excitotoxicity in the development of acute cortical lesions. *Experimental Neurology*. 2015; 267: 243–53. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.014>
34. Duchen M.R. Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2012; 464(1): 111–21. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1112-0>
35. Lai T.W., Zhang S., Wang Y.T. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*. 2014; 115(C): 157–88. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.006>
36. Brittain M.K., Brustovetsky T., Sheets P.L., Brittain J.M., Khanna R., Cummins T.R., et al. Delayed calcium dysregulation in neurons requires both the NMDA receptor and the reverse Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Neurobiology of Disease*. 2012; 46(1): 109–17. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.12.051>
37. Nietz A.K., Popa L.S., Streng M.L., Carter R.E., Kodandaramaiah S.B., Ebner T.J. Wide-Field calcium imaging of neuronal network dynamics *in vivo*. *biology*. 2022; 11(11): 1601. <https://doi.org/10.3390/biology11111601>
38. Blaustein M.P., Lederer W.J. Sodium/calcium exchange: Its physiological implications. *Physiological Reviews*. 1999; 79(3): 763–854. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.3.763>
39. Raley-Susman K.M., Cragoe E.J., Sapolsky R.M., Kopito R.R. Regulation of intracellular pH in cultured hippocampal neurons by an amiloride-insensitive Na⁺/H⁺ exchanger. *Journal of Biological Chemistry*. 1991; 266(5): 2739–45. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)49907-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)49907-3)
40. Saris N.E.L., Carafoli E. A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biokhimiya*. 2005; 70(2): 231–9.

Сведения об авторах:

Кислухина Евгения Николаевна, лаборант-исследователь, лаб. нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России;

Лизунова Наталья Владимировна, аспирант биологического факультета, ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», мл. науч. сотр. лаб. нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России;

Лисина Оксана Юрьевна, науч. сотр., лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП;

Шарипов Ринат Рашидович, канд. биол. наук, науч. сотр., лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП;

Красильникова Ирина Александровна, науч. сотр., лаб. нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России;

Бакаева Занда Валериевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, доцент каф. медицины, общей биологии и физиологии ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет им. Б.Б. Городовикова»;

Пинелис Всеволод Григорьевич, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр. лаб. нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России;

Сурин Александр Михайлович, доктор биол. наук, гл. науч. сотр. лаб. фундаментальных и прикладных проблем боли ФГБНУ НИИОПП, e-mail: surin_am@mail.ru

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092.6-616.69

Галимов К.Ш.¹, Громенко Ю.Ю.², Гилязова И.Р.^{3,4}, Галимова Э.Ф.³, Сафиханов Р.Я.⁶, Галимова С.Ш.³, Муратов Э.М.⁵, Литвицкий П.Ф.¹, Павлов В.Н.³

Мутации гена митохондриального цитохрома В (MT-CYB) в сперматозоидах пациентов из бесплодных семейных пар

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

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

²Медицинский центр «Семья»,

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

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

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

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

450054, Уфа, Россия, просп. Октября, д. 71;

⁵Научно-образовательное отделение: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России,

125284, Москва, Россия, 2-й Боткинский пр., д. 3;

⁶Уфимский университет науки и технологий,

452450, Республика Башкортостан, г. Бирск, Россия, ул. Интернациональная, д. 10

Введение. Актуальной проблемой современной андрологии является выявление этиологических факторов мужского бесплодия. Одной из его причин являются мутации митохондриальной ДНК (мтДНК) сперматозоидов, приводящие к нарушению их энергообеспечения и подвижности. Митохондриальный геном подвержен частым мутациям и высокому полиморфизму в связи с особенностями его строения, расположения, а также из-за отсутствия рекомбинативной изменчивости, поскольку наследуется строго по материнской линии. Указанные особенности сопровождаются накоплением в сперматозоидах однонуклеотидных полиморфизмов в мтДНК (mtSNP). **Цель исследования** – выявление мутаций в гене митохондриального цитохрома В (MT-CYB) у бесплодных мужчин с астенотератозооспермией (89 пациентов) и олигоастенотератозооспермией (65 пациентов).

Методика. Группа сравнения состояла из 164 фертильных мужчин. Для выделения тотальной геномной ДНК, включающей мтДНК, использовали мини-набор ДНК QIAamp Micro Kit. Определение и анализ генотипов полиморфных локусов в гене MT-CYB проводили методом дискриминации аллелей TaqMan. Для верификации мутаций в гене MT-CYB, фрагмент гена секвенировали методом Сэнгера на автоматическом ДНК-анализаторе Applied Biosystems Sanger Sequencing 3500 Genetic Analyzer.

Результаты. В гене MT-CYB не выявлено однонуклеотидных полиморфизмов rs28357373 (замена тимина на цитозин в позиции 15629), следовательно, эта мутация не характерна для данной популяции пациентов и не влияет на развитие мужского бесплодия в регионе их проживания. Замена аденина на гуанин в позиции 15218, приводящая к миссенс-мутации p.Thr158Ala, также не проявила себя в качестве причины мужского бесплодия. Статистически значимые результаты были получены при анализе полиморфного варианта rs527236194 (замена триплета ССТ на ССС в позиции 15784). У пациентов с астенотератозооспермией указанная мутация встречалась значительно чаще (наиболее вероятно, что такой эффект обусловлен изменением экспрессии генов при смещении кодонов).

Заключение. Таким образом, требуется проведение специального исследования по выявлению роли локуса rs527236194 гена MT-CYB в возникновении мужского бесплодия, а также возможности его использования в качестве биомаркера заболевания.

Ключевые слова: мужское идиопатическое бесплодие; астенотератозооспермия; олигоастенотератозооспермия; митохондриальная ДНК; цитохром В; мутации

Для цитирования: Галимов К.Ш., Громенко Ю.Ю., Гилязова И.Р., Галимова Э.Ф., Сафиханов Р.Я., Галимова С.Ш., Муратов Э.М., Литвицкий П.Ф., Павлов В.Н. Мутации гена митохондриального цитохрома В (MT-CYB) в сперматозоидах пациентов из бесплодных семейных пар. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(1): 21-27.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.21-27

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

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

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.11.2022

Принята в печать 26.01.2023

Опубликована 17.02.2023

Galimov K.Sh.¹, Gromenko J.Y.², Gilyazova I.R.^{3,4}, Galimova E.F.³, Safikhanov R.Y.⁶, Galimova S.Sh.³, Muratov E.M.⁵, Litvitskiy P.F.¹, Pavlov V.N.³

Mutations in the mitochondrial cytochrome B (*MT-CYB*) gene in spermatozoa of patients from infertile couples

¹Sechenov First Moscow State Medical University,

Trubetskaya St. 8, Bldg. 2, Moscow, 119991, Russian Federation;

²Medical Center "Family"

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

³Bashkir State Medical University, Lenina St. 3, Ufa, 450008, Russian Federation;

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

Prospekt Oktyabrya. 71, Ufa, 450054, Russian Federation;

⁵Scientific and Educational Department, Hetsen Moscow Oncology Research Institute, Branch of the National Medical Research Center of Radiology,

2nd Botkinsky Proezd 3, Moscow, 125284, Russian Federation;

⁶Ufa University of Science and Technology,

Internatsionalnaya St. 10, Birsik, 452450, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

Introduction. A relevant issue of modern andrology is the identification of etiological factors of male infertility. One cause of male infertility is mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in spermatozoa that impair their energy supply and motility. The mitochondrial genome is subject to frequent mutations and high polymorphism due to peculiarities of its structure and location, as well as its lack of recombination variability due to its mode of inheritance being strictly through the maternal line. These features are accompanied by the accumulation in spermatozoa of single-nucleotide polymorphisms in mtDNA.

The aim was to identify mutations in the mitochondrial cytochrome B (*MT-CYB*) gene in infertile men with asthenoteratozoospermia or oligoasthenoteratozoospermia.

Methods. The study included 89 male patients with asthenoteratozoospermia and 65 patients with oligoasthenoteratozoospermia. The comparison group consisted of 164 fertile men. The total genomic DNA, including mtDNA, was isolated with a DNA NAQIAamp Micro Kit. The genotypes of polymorphic loci in the *MT-CYB* gene were determined and analyzed by the TaqMan allele discrimination method. To verify mutations of the *MT-CYB* gene, the gene fragment was sequenced by the Sanger method on an automatic DNA analyzer, the Applied Biosystems® Sanger Sequencing 3500 Series Genetic Analyzer.

Results. No single nucleotide polymorphisms rs28357373 (replacement of thymine with cytosine at position 15629) were detected in the *MT-CYB* gene. Therefore, this mutation is not characteristic of this patient population, and it does not contribute to the development of male infertility. Replacement of adenine with guanine at position 15218, leading to the missense mutation of p.Thr158Ala, also did not manifest itself as a cause of male infertility. Significant results were obtained by analyzing the polymorphic variant rs527236194, i.e., replacement of the CST triplet with CCC in position 15784. In patients with asthenoteratozoospermia, this mutation was much more common. Most likely, this was due to a change in gene expression with codon displacement.

Conclusion. A special study is required to identify the role of the locus rs527236194 of the *MT-CYB* gene in the occurrence of male infertility, as well as a possibility of using it as a biomarker of the disease.

Keywords: male idiopathic infertility; asthenoteratozoospermia; oligoasthenoteratozoospermia; mitochondrial DNA; cytochrome B; mutations

For citation: Galimov K.Sh., Gromenko J.Y., Gilyazova I.R., Galimova E.F., Safikhanov R.Yu., Galimova S.Sh., Muratov E.M., Litvitskiy P.F., Pavlov V.N. Mutations in the mitochondrial cytochrome B (*MT-CYB*) gene in the spermatozoa of patients from infertile couples. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(1): 21-27.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.21-27

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

For correspondence: *Elmira F. Galimova*, Doctor of medical sciences, associate professor; FSBEI HE "Bashkir State Medical University", 3 Lenina str., 450008, Ufa, Russian Federation, e-mail: efgalimova@mail.ru

Information about the authors:Galimov K.Sh., <https://orcid.org/0000-0002-0148-4380>Gromenko J.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-3373-0873>Muratov E.M., <https://orcid.org/0000-0002-5450-1199>Gilyazova I.R., <https://orcid.org/0000-0001-9499-5632>Galimova S.Sh., <https://orcid.org/0000-0002-7865-8326>Galimova E.F., <https://orcid.org/0000-0002-3351-7669>Safikhhanov R.Yu. <https://orcid.org/0000-0002-8119-0699>Litvitskiy P.F., <https://orcid.org/0000-0003-0151-9114>Pavlov V.N., <https://orcid.org/0000-0003-2125-4897>**Financing.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 17.11.2022

Accepted 26.01.2023

Published 17.03.2023

Введение

Бесплодие — это форма патологии, которая характеризуется отсутствием беременности после 12 месяцев незащищенных половых актов. До 15% супружеских пар в мире бесплодны. Половина этих случаев обусловлена мужским фактором, включая дефекты морфологии и подвижности сперматозоидов [1, 2]. Двигательная активность сперматозоидов играет важнейшую роль в мужской фертильности. Движение к месту оплодотворения и естественное оплодотворение обеспечивается макроэргическими соединениями, которые синтезируются главным образом митохондриями сперматозоидов [3, 4]. В гаметях митохондрии располагаются по периферии их жгутика, поскольку аппарат микротрубочек, из которых состоит жгутик сперматозоида, наиболее энергозатратен. Митохондрия представляет собой органеллу, которая имеет собственный геном, кодирующий 13 белков, с различными внехромосомными кольцевыми и двухцепочечными молекулами ДНК. Митохондриальная ДНК (мтДНК) наследуется по материнской линии и обладает уникальным механизмом субклеточной транскрипции и репликации [5].

Характерной чертой митохондриального генома является большая скорость накопления мутаций и высокий полиморфизм. Эти особенности мтДНК объясняются отсутствием в органелле защитных гистонов и механизмов репарации ДНК, что увеличивает ошибки ее репликации, а также, учитывая близость мтДНК к комплексам дыхательной цепи, патогенным воздействием активных форм кислорода (АФК) [6, 7]. Многие митохондриальные однонуклеотидные полиморфизмы (mtSNP) закрепились в различных популяциях в ходе эволюции человека [8]. Из-за исключительно материнского наследования мтДНК и того факта, что геном митохондрий не рекомбинирует, их SNP накапливаются и совместно передаются потомкам по материнской линии [9].

Мутации мтДНК, как свидетельствуют результаты более ранних работ, связаны с нарушением энергообеспечения сперматозоидов, что может приводить к различным формам их патологии, в том числе к астенозооспермии, олигозооспермии и тератозооспермии. Функциональная активность митохондрий тесно сопряжена с активацией акрозина, способностью к акросомальной реакции и целостностью хроматина. В настоящее время опубликовано большое количество работ, посвященных роли мтДНК в развитии мужского бесплодия, но данные о роли мутаций в гене митохондриального цитохрома В (*MT-CYB*) при мужском бесплодии единичны [10–13]. Мутации гена сопровождаются различными нарушениями, особенно в комплексе III, что может прерывать процесс продукции АТФ.

Цель исследования — выявление мутаций в гене *MT-CYB* у бесплодных мужчин с астенотератозооспермией и олигоастенотератозооспермией.

Методика

В группу обследуемых вошли мужчины в возрасте 24–45 лет. Все пациенты были осмотрены и проконсультированы урологами и андрологами клиники «Семья» (г. Уфа). Сбор анамнестических данных включал возраст обследованных, клинические данные, наличие варикоцеле, генетической патологии и хронических заболеваний в анамнезе. Образцы спермы были собраны в соответствии с требованиями Руководства ВОЗ (2010). Фертильные мужчины, принимавшие участие в исследовании, были здоровыми донорами спермы репродуктивного возраста (25–46 лет).

В группе фертильных мужчин ($n=164$) индивиды имели нормальные показатели спермограммы (концентрация сперматозоидов не менее 15×10^6 /мл, общая подвижность $\geq 40\%$, прогрессивная подвижность: $\geq 32\%$, нормальная морфология: $\geq 4\%$). Группа субфертильных мужчин была представлена 154 пациентами

с астенотератозооспермией ($N=89$) и олигоастенотератозооспермией ($n=65$). Критериями аномалии спермы служили: концентрация сперматозоидов менее 15×10^6 /мл или менее 39×10^6 во всем объеме, прогрессивная подвижность (сумма категории А+В) <32%, <4% нормальных форм по KSNPрюгеру.

Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и одобрено локальным этическим комитетом университета. Все участники подписали форму информированного согласия. Исследования выполнялись по международным правилам работы с биоматериалом людей.

Тотальную геномную ДНК, содержащую и митохондриальную ДНК, выделяли из спермы с помощью набора реагентов для выделения малых количеств ДНК QIAamp DNA Micro Kit. Концентрация и чистота выделенной ДНК оценивалась путем измерения оптической плотности с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Определение генотипов полиморфных локусов в гене митохондриального цитохрома В осуществлялось с помощью метода дискриминации аллелей TaqMan. Анализ аллельной дискриминации проводили с использованием прибора CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad). Результаты каждой аллельной дискриминации были проанализированы с использованием программного обеспечения CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием программного обеспечения MS Excel (Microsoft). При попарном сравнении частот мутаций в группах больных и здоровых лиц использовался критерий χ^2 (Р) для таблиц сопряженности 2×2 с поправкой Йейтса на непрерывность. Силу ассоциаций оценивали в значениях показателя соотношения шансов odds ratio (OR).

Для подтверждения мутаций в гене митохондриального цитохрома В проводили секвенирование гена методом Сэнгера на автоматическом ДНК-анализаторе (Life Technologies) в Институте биохимии и генетики УФИЦ РАН. Реакцию секвенирования проводили с набором флюоресцентно меченых ddNTP (Big Dye Terminators v.3.1 RR kit) по протоколу производителя (Life Technologies). После этого выполнялось сравнение последовательностей ДНК обследованных индивидов с референтной последовательностью митохондриального генома человека.

Результаты

Нами проведен анализ 3 обнаруженных мутаций в гене митохондриального цитохрома В у пациентов

с бесплодием и у здоровых мужчин с нормальными показателями спермы. Результаты приведены в **таблице**.

Замена тимина на цитозин в позиции 15629, приводящая к синонимичной мутации Leu295=, не обнаружена ни в группе пациентов с мужским бесплодием, ни в группе фертильных мужчин. Исходя из полученных нами результатов, можно заключить, что указанная мутация является очень редкой и не вносит значимого вклада в развитие мужского бесплодия в регионе Башкортостана.

Замена аденина на гуанин в позиции 15218, приводящая к миссенс-мутации p.Thr158Ala, обнаружена с низкой частотой как у пациентов с мужским бесплодием (3% у пациентов с олигоастенотератозооспермией и 3,3% – с астенотератозооспермией), так и в группе сравнения (2,6%). Статистический анализ не выявил значимых различий в частоте мутаций между пациентами и здоровыми индивидами ($p>0,05$).

Полиморфный вариант rs527236194 показал статистически значимую разницу между пациентами с астенотератозооспермией и фертильной группой индивидов ($p=0,04$). Вариант rs527236194 обуславливает замену триплета [CCT] на [CCC] в позиции 15784 и приводит к синонимичной замене пролина в позиции 346 белка. Несмотря на то, что такой вариант не изменяет структуру белка, он может играть регуляторную роль и, по мнению отдельных авторов, смещение кодонов может быть механизмом, контролирующим уровень экспрессии генов [13].

Полиморфный вариант T15784C мтДНК является определяющей нуклеотидной заменой для целого ряда гаплогрупп, таких как L1c2a, Z, N1b2, W3a, V13, H65, T2c1d2, F3b1, B2b3a, U2e1b1 [8]. Благодаря этому возможна идентификация указанного варианта у народов, которые изучались ранее в рамках популяционно-генетических исследований. Гаплогруппа Z является одной из наиболее распространенных мтДНК в Сибири, с максимальными частотами выше 10% встречается в популяциях юкагир (27,3%), алтайцев (15,4%), эвенов (15,2%), удмуртов (15,2%), хакасов (13%), ительменов (12,8%), ногайцев (12%) и коряков (11,6%) [14, 15]. В Волго-Уральском регионе вариант T15784C мтДНК встречается как минимум в составе гаплогрупп Z, V13, N1b2 и составляет не менее 8,6% в популяции чувашей, 7,1% – казанских татар, 6,4% – марийцев, 5,5% – коми, 3% – бесермян и 2% в популяции пермских башкир. Среди бурзянских башкир, архангельских башкир и мордвы эти гаплогруппы, а с ними и вариант T15784C мтДНК, ранее не был выявлен [16].

Изменения в митохондриальной ДНК могут вызывать заболевания через различные механизмы,

включая нарушения процессов окислительного фосфорилирования (OXPHOS). Такие мутации могут вызывать различные формы патологии: от незначительных клинических проявлений до угрожающих жизни нарушений митохондриальных функций [17]. Молекулы мтДНК спермы человека особенно чувствительны к окислительному стрессу и склонны к мутациям, которые, как было показано другими авторами, играют важную роль в возникновении мужского бесплодия [18, 19]. Хорошо известно, что одной из основных функций мтДНК является инициация синтеза АТФ в сперматозоидах в процессе OXPHOS посредством кодирования белковых субъединиц дыхательной цепи. Процесс OXPHOS обеспечивает также генерацию АФК и индуцированные ими повреждения структуры ДНК. Образующиеся во время сперматогенеза аномалии митохондриальной ДНК могут увеличить вероятность гиперпродукции свободных радикалов, которые нарушают дифференцировку и функции сперматозоидов. Кроме того, подвижность сперматозоидов в большой мере зависит от уровня АТФ. Следовательно, вариации мтДНК сперматозоидов приводят к синтезу дефектных белков [20].

В настоящем исследовании выполнен анализ 3 полиморфных вариантов в гене митохондриального цитохрома В и выявлена ассоциация вариан-

та rs527236194 с риском развития мужского бесплодия. Ранее E. Talebi и соавт. [21] идентифицировали несколько сложных перестроек (делетий) в мтДНК дефектных сперматозоидов. Эти данные позволили установить ассоциации между распространенной делецией 4977 п.н. и патоспермией. При этом стратифицированный анализ по фенотипу бесплодия показал значительную связь между этой аномалией и повышенным риском астенозооспермии, олигоастенотератозооспермии и астенотератозооспермии. Напротив, Y. Zhang и соавт. указывают на то, что некоторые замены, например, С3398Т мтДНК, ассоциированы с низким риском развития астенозооспермии [22].

В более ранних исследованиях было показано, что мутация мтДНК А3243G и крупномасштабные делеции мтДНК связаны с астенозооспермией [23]. Кроме того, у субфертильных мужчин различные мутации мтДНК могут происходить в течение жизни. Такие мутации достигают высоких частот в отдельных клетках-предшественниках сперматозоидов, что приводит к нарушению подвижности сперматозоидов и бесплодию.

I. Mughal и соавт., проанализировав фрагмент гена длиной 8,7 т.п.н. с помощью ПЦР, выявили в нем множество делеций [24], частота которых была намного выше у пациентов с бесплодием, чем у фер-

Частота распределения изученных вариантов мтДНК фертильных и бесплодных мужчин

Frequency of distribution of the studied mtDNA variants of fertile and infertile men

SNP	Изменения последовательности мтДНК (изменения в белке)/ Changes in mtDNA sequence (changes in protein)	Генотипы/ Genotypes	Пациенты с олигоастенотератозооспермией/Patients with oligoasthenoteratozoospermia		Пациенты с астенотератозооспермией/ Patients with asthenoteratozoospermia		Фертильные мужчины/ Fertile Men		P-value (OR, 95%CI)
			N	%	N	%	N	%	
rs28357373	T15629C (Leu295=)	CC	0	0	0	0	0	0	$p>0,05$
		CT	0	0	0	0	0	0	
		TT	65	100	89	100	164	100	
rs527236194	T15784C (p.Pro346=)	CC	6	9	12	13,5	10	6,1	$p=0,04^*$ (OR=2,4; 95%CI=0,99-5,8)
		CT	0	0	0	0	0	0	
		TT	59	91	77	86,5	154	93,9	
rs2853506	A15218G (p.Thr158Ala)	GG	2	3	3	3,3	4	2,4	$p>0,05$
		AG	0	0	0	0	0	0	
		AA	63	97	86	96,7	160	97,6	

Примечание. * – сравнение фертильных и бесплодных мужчин с астенотератозооспермией.

SNP – Single Nucleotide Polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм). Leu – лейцин, Pro – пролин, Thr – треонин, Ala – аланин. C – цитозин, T – тимин, G – гуанин, A – аденин.

Note.* – Comparison of fertile and infertile men with asthenoteratozoospermia.

SNP – Single Nucleotide Polymorphism. Leu – leucine, Pro – proline, Thr – threonine, Ala – alanine. C – cytosine, T – thymine, G – guanine, A – adenine.

тильных мужчин. При сравнении различных подтипов бесплодия было продемонстрировано, что наибольшая частота делеций мтДНК наблюдалась при олигоастенотератозооспермии. Статистический анализ группы случаев и контролей показал значительную связь делеции 8,7 т.п.н. с бесплодием ($p=0,031$), наиболее выраженную при олигоастенотератозооспермии ($p=0,019$). Две другие делеции мтДНК – 4977 и 7599 п.н. также ассоциированы с патоспермией и могут быть генетическими факторами риска мужского бесплодия [21].

Заключение

В заключение можно констатировать, что к митохондриальным маркерам мужского бесплодия относятся 3 типа генетических нарушений: 1) увеличение количества копий мтДНК в сперматозоидах; 2) протяженные делеции мтДНК (в несколько тысяч п.н.); 3) синонимичные и несинонимичные mtSNP по типу обнаруженного нами варианта rs527236194 при астенотератозооспермии. Первые два типа аномалий мтДНК сравнительно хорошо изучены и характеризуются тесной связью со снижением оплодотворяющей способности гамет и вероятности успешной беременности у пар в общей популяции [25, 26]. Вместе с тем, в последнее время появились работы с альтернативной точкой зрения, т.е. единого мнения по этому вопросу пока достичь не удалось [27].

Таким образом, многочисленные данные указывают на существенную роль мтДНК в развитии патоспермии. Сложная природа мужского бесплодия и противоречивые результаты научных изысканий требуют более масштабных проспективных исследований для подтверждения роли мутаций мтДНК в развитии этой формы патологии. Учитывая, что частоты генотипов/аллелей полиморфных вариантов и мутаций генов различаются в различных этнических группах, необходимы дополнительные поиски доказательств ассоциации полиморфного варианта rs527236194 с риском развития мужского бесплодия. Подтверждение полученных данных на больших выборках пациентов позволит решить вопрос о целесообразности применения указанного локуса в качестве биомаркера риска развития этой формы патологии. Перспективным направлением применения массива омиксных данных является также их использование для коррекции нарушений гаметогенеза и процесса оплодотворения, ассоциированных с мтДНК, благодаря появлению и быстрому развитию технологии редактирования митохондриального генома [28].

Литература

(п.п. 1–6; 8–15; 17; 19–23 см. References)

7. Павлов В.Н., Галимова Э.Ф., Терегулов Б.Ф., Кайбышев В.Т., Галимов Ш.Н. Молекулярные и метаболические аспекты мужского бесплодия. *Вестник урологии*. 2016; 4(2): 40-59.
16. Трофимова Н.В. Изменчивость митохондриальной ДНК и Y-хромосомы в популяциях Волго-Уральского региона: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.07. Уфа, 2015.
18. Литвицкий П.Ф., Галимов К.Ш., Громенко Ю.Ю. и др. Роль митохондрий сперматозоидов в возникновении и развитии мужского бесплодия. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(2): 72-9. DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.72-79

References

1. Agarwal A., Baskaran S., Parekh N., Cho C., Henkel R., Vij S., et al. Male infertility. *Lancet*. 2021; 397(10271): 319-33. Doi: 10.1016/S0140-6736(20)32667-2
2. Minhas S., Bettocchi C., Boeri L., Capogrosso P., Carvalho J., Cile-siz N., et al. EAU Working Group on Male Sexual and Reproductive Health. EAU Guidelines on Male Sexual and Reproductive Health: 2021 Update on Male Infertility. *Eur. Urol*. 2021; 80(5): 603-20. Doi: 10.1016/j.eururo.2021.08.014
3. Park Y.-J.; Pang M.-G. Mitochondrial Functionality in Male Fertility: From Spermatogenesis to Fertilization. *Antioxidants*. 2021; 10(1); 98. Doi:10.3390/antiox10010098
4. Vertika S., Singh K., Rajender S. Mitochondria, spermatogenesis, and male infertility – An update. *Mitochondrion*. 2020; 54: 26-40. doi: 10.1016/j.mito.2020.06.003
5. Gonçalves V. Mitochondrial Genetics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1158: 247-55. doi: 10.1007/978-981-13-8367-0_13
6. Li GQ, He Y. Sperm mitochondrial DNA and male infertility: An update. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2017; 23(9): 848-51.
7. Pavlov V.N., Galimova E.F., Teregulov B.F., Kajbyshev V.T., Galimov S.H. Molekulyarnye i metabolicheskie aspekty muzhskogo besplodiya. *Vestnik urologii*. 2016; 4(2): 40-59.
8. Van Oven M., Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Human mutation*. 2009; 30(2): E386-E394.
9. Andersen M., Balding D. How many individuals share a mitochondrial genome? *PLoS Genet*. 2018; 14(11):e1007774. doi: 10.1371/journal.pgen.1007774
10. Mao G., Wang Y., Xu M., Wang W., Tan L., Tao S. Polymorphisms in the MT-ATP6 and MT-CYB genes in in vitro fertilization failure. *Mitochondrial DNA*. 2015;26(1):20-24. doi: 10.3109/19401736.2013.840612
11. Karimian M., Babaei F. Large-scale mtDNA deletions as genetic biomarkers for susceptibility to male infertility: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Biol. Macromol*. 2020; 158: 85-93. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.216
12. Popova D., Bhide P., D'Antonio F., Basnet P., Acharya G. Sperm mitochondrial DNA copy numbers in normal and abnormal semen analysis: A systematic review and meta-analysis. *BJOG*. 2021. doi: 10.1111/1471-0528.17078
13. Saleh Jaweesh M., Hammadeh M., Dahadhah F., Al Zoubi M., Amor H. Association between the single nucleotide variants of the mitochondrial cytochrome B gene (MT-CYB) and the male infertility.

- ty. *Mol. Biol. Rep.* 2022; 49(5): 3609-16. doi: 10.1007/s11033-022-07200-y
14. Fedorova S., Reidla M., Metspalu E., Metspalu M., Rootsi S., Tambets K., et al. Autosomal and uniparental portraits of the native populations of Sakha (Yakutia): implications for the peopling of North-east Eurasia. *BMC Evol. Biol.* 2013; 13: 127. doi: 10.1186/1471-2148-13-127
 15. Schurr T., Sukernik R., Starikovskaya Y., Wallace D. Mitochondrial DNA variation in Koryaks and Itel'men: population replacement in the Okhotsk Sea-Bering Sea region during the Neolithic. *Am. J. Phys. Anthropol.* 1999; 108(1): 1-39. doi: 10.1002/(SICI)1096-8644(199901)108:1<1::AID-AJPA1>3.0.CO;2-1
 16. Trofimova N.V. *Izmenchivost' mitochondrial'noj DNK i Y-hromosomy v populyaciyah Volgo-Ural'skogo regiona: dis. ... kand. biol. nauk: 03.02.07. Ufa, 2015.*
 17. Krausz C., Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat. Rev. Urol.* 2018; 15(6): 369-84. doi: 10.1038/s41585-018-0003-3
 18. Litvickij P.F., Galimov K.Sh., Gromenko Yu.Yu., Galimova S.Sh., Gilyazova I.R., Galimova E.F., et al. The role of sperm mitochondria in the occurrence and development of male infertility. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2022; 66(2): 72-9. DOI: 10.25557/0031-2991.2022.02.72-79
 19. Ritchie C., Ko E. Oxidative stress in the pathophysiology of male infertility. *Review Andrologia.* 2021; 53(1):e13581. doi: 10.1111/and.13581
 20. Wang J., Wang S., Tehmina, Feng Y., Zhang R., Li X., Sun Q., et al. Age-Related Decline of Male Fertility: Mitochondrial Dysfunction and the Antioxidant Interventions. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022; 15(5): 519. doi: 10.3390/ph15050519
 21. Talebi E., Karimian M., Nikzad H. Association of sperm mitochondrial DNA deletions with male infertility in an Iranian population. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp. Seq. Anal.* 2018; 29(4): 615-23. doi: 10.1080/24701394.2017.1331347
 22. Zhang Y., Zhao Y., Wen S., Yan R., Yang Q., Chen H. Associations of mitochondrial haplogroups and mitochondrial DNA copy numbers with end-stage renal disease in a Han population. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.* 2017; 28(5): 725-31. doi: 10.1080/24701394.2016.1177038
 23. Lestienne P., Reynier P., Chrétien M., Penisson-Besnier I., Malhière Y., Rohmer V. Oligoasthenospermia associated with multiple mitochondrial DNA rearrangements. *Mol. Hum. Reprod.* 1997; 3(9): 811-4. doi: 10.1093/molehr/3.9.811. PMID: 9358008.
 24. Mughal I., Irfan A., Jahan S., Hameed A. Male infertility is significantly associated with multiple deletions in an 8.7-kb segment of sperm mtDNA in Pakistan. *Turk. J. Med. Sci.* 2017; 47(3): 928-33. doi: 10.3906/sag-1606-52
 25. Rosati A., Whitcomb B., Brandon N., Buck Louis G., Mumford S., Schisterman E., et al. Sperm mitochondrial DNA biomarkers and couple fecundity, Human Reproduction, 2020; 35(11): 2619-25. doi: 10.1093/humrep/deaa191
 26. Vozdova M., Kubickova S., Kopecka V., et al. Association between sperm mitochondrial DNA copy number and deletion rate and industrial air pollution dynamics. *Sci. Rep.* 2022; 12: 8324. doi: 10.1038/s41598-022-12328-9
 27. Darehbagh R., Khalafi B., Allahveisi A., Habiby M. Effects of The Mitochondrial Genome on Germ Cell Fertility: A Review of The Literature. *Int. J. Fertil. Steril.* 2022; 16(2): 70-5. doi: 10.22074/IJFS.2021.527076.1098
 28. Fu L., Luo Y., Liu Y., Liu H., Li H., Yu Y. Potential of Mitochondrial Genome Editing for Human Fertility Health. *Front Genet.* 2021; 12: 673951. doi: 10.3389/fgene.2021.673951

Сведения об авторах:

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

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

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

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

Сафиханов Ришат Яхьяевич, канд. биол. наук, доцент каф. биологии, экологии и химии ФГБОУ ВО Уфимского университета науки и технологий (Бирский филиал), г. Бирск, Россия, e-mail: safikhhanov_rishat@rambler.ru;

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

Муратов Эмиль Марселевич, ординатор, Научно-образовательное отделение: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России;

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

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

© Максимова М.Ю., Галанина А.С., 2023

УДК 616-092

Максимова М.Ю., Галанина А.С.

Клинические, нейрофизиологические и лабораторные особенности дисфункциональных вегетативных расстройств у лиц молодого и среднего возраста

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

Введение. Проблема дисфункциональных вегетативных расстройств (ДВР), этиология и патогенез которых во многом не ясен, имеет большое клиническое значение и привлекает к себе внимание как клиницистов-неврологов, так и патофизиологов работающих в области нейропатологии. **Цель исследования** – изучение клинических, нейрофизиологических и патогенетических особенностей ДВР у лиц молодого и среднего возраста.

Методика. В исследование включено 46 пациентов в возрасте от 18 до 59 лет с ДВР и редкими паническими атаками. Контрольную группу составили 20 здоровых лиц. Анализировали клинические проявления тревоги и депрессии, выраженность вегетативных нарушений, оценивали степень когнитивных расстройств. Для оценки показателей вегетативной устойчивости пациентов использовали метод кожно-симпатических вызванных потенциалов (КСВП). На анализаторе Immulite 2000 (США) методом иммунохемилюминисценции определяли уровень инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1), активность тиреотропного гормона (ТТГ) и пролактина в венозной крови.

Результаты. У всех пациентов с ДВР выявлены астенический синдром, нарушения сна и эмоциональная неустойчивость. Вегетативные нарушения у пациентов с ДВР были представлены повышенной потливостью, метеозависимостью, плохой переносимостью высоких и низких температур. По данным КСВП у пациентов с ДВР в 57,8% случаев выявлено преобладание симпатического компонента, в 31,1% – парасимпатического типа реакций, в 11,1% случаев отмечался смешанный тип вегетативных реакций. В возрастной группе 18-35 лет отмечено усиление симпатического ответа, тогда как среди пациентов 36-59 лет распространенность симпатического и парасимпатического компонентов была одинаковой (42,1%). У пациентов с ДВР отмечено повышение уровней ИФР-1 и пролактина.

Заключение. Проведенное исследование показало большую распространенность и вариабельность клинических симптомов у пациентов с ДВР. Полученные результаты подтверждают актуальность дальнейшего изучения ДВР у пациентов разных возрастных групп и с различными типами вегетативных реакций.

Ключевые слова: дисфункциональные вегетативные расстройства; кожно-симпатические вызванные потенциалы; гормональный статус

Для цитирования: Максимова М.Ю., Галанина А.С. Клинические, нейрофизиологические и лабораторные особенности дисфункциональных вегетативных расстройств у лиц молодого и среднего возраста. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(1): 28-38 .

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.28-38

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Максимова М.Ю.; сбор и статистическая обработка материала – Галанина А.С.; написание текста – Максимова М.Ю., Галанина А.С.; редактирование – Максимова М.Ю. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Максимова М.Ю., e-mail: ncnmaximova@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.09.2022

Принята к печати 26.01.2023

Опубликована 17.03.2023

Maksimova M.Yu., Galanina A.S.

Clinical, neurophysiological and laboratory features of autonomic disorders in young and middle-aged adults

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

Introduction. The problem of dysfunctional vegetative disorders (DVD), the etiology and pathogenesis of which are largely unclear, is of great clinical importance and attracts the attention of both neurological clinicians and pathophysiologicals working in the field of neuropathology.

Aim. To study clinical, neurophysiological, neuropsychological, and laboratory features of AD in young and middle-aged individuals.

Methods. The study included 46 AD patients aged 18 to 59 years with rare anxiety attacks. The control group included 20 healthy individuals. Clinical symptoms, autonomic disorders, cognitive disorders, anxiety, and depression were evaluated. The method of dermal-sympathetic evoked potentials (DSEP) was used for evaluation of the autonomic resistance. Laboratory tests included measurements of blood insulin-like growth factor 1 (IGF-1), thyroid-stimulating hormone (TSH), and prolactin by chemiluminescence immunoassay with an Immulite 2000 Immunoassay System (USA).

Results. All AD patients had headache, asthenic syndrome, sleep disorders, and emotional lability. Autonomic disorders included hyperhidrosis, meteosensitivity, and low tolerance of high and low temperatures. According to the DSEP study, 57.8% of AD patients showed a predominance of sympathetic reactions, 31.1% showed a predominance of parasympathetic reactions, and 11.1% showed a mixed type of autonomic reactions. Increased sympathetic responses were observed in patients aged 18-35 years whereas in patients aged 36-59 years, the prevalence of sympathetic and parasympathetic responses was similar (42.1%). AD patients had increased levels of IGF-1 and prolactin.

Conclusion. The study shows a high prevalence and variability of clinical symptoms in AD patients. These results confirmed the relevance of further studying AD in different age groups of patients with various types of autonomic reactions.

Keywords: autonomic disorders; evoked skin sympathetic potentials; hormonal status

For citation: Maksimova M.Yu., Galanina A.S. Clinical, neurophysiological and laboratory features of autonomic disorders in young and middle-aged adults. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological physiology and experimental therapy. Russian Journal)*. 2023; 67(1): 28-38. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.28-38

Author's contribution: study concept and design – Maksimova M. Yu.; material collection and statistical analysis – Galanina A.S.; text writing – Maksimova M.Yu, Galanina A.S.; editing – Maksimova M.Yu. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

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

Information about authors:

Maksimova M.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-7682-6>

Galanina A.S., <https://orcid.org/0000-0002-5470-1211>.

Funding. The study was performed as a part of the public assignment of the Research Center of Neurology. The study had no sponsorship.

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

Received 21.09.2022

Accepted 26.01.2023

Published 17.02.2023

Введение

Проблема дисфункциональных вегетативных расстройств (ДВР) имеет большое клиническое значение и привлекает к себе внимание как неврологов, так и врачей других специальностей. Распространенность ДВР среди лиц молодого и среднего возраста составляет от 9 до 38%, при этом обращаемость к неврологам (до 30%) значительно выше, чем к специалистам общей медицинской практики (до 12%) [1].

Жалобы, которые являются причиной обращения к неврологу, не всегда могут быть объяснены органической патологией. Такие случаи обычно классифици-

руют как функциональные расстройства, что нередко ведет к прекращению диагностического поиска и пассивной терапевтической тактике. Вместе с тем высокая распространенность ДВР и их влияние на мотивацию к работе, профессиональную деятельность, качество жизни в целом и повышенную подверженность соматическим заболеваниям делают актуальным изучение этой проблемы. Клиническая картина ДВР зависит от преморбидных особенностей изменения личности, продолжительности заболевания, возраста и пола пациента. ДВР характеризуются полиморфностью кли-

нических проявлений, которые могут включать в себя головокружение, болевой синдром разных локализаций, тахикардию, избыточную потливость, ухудшение памяти и концентрации внимания, снижение толерантности к физическим нагрузкам, общую слабость, понижение фона настроения, нарушение сна, чувство тревоги, панические атаки [2]. Преморбидные особенности личности на высоте заболевания приобретают то выраженные психастенические черты, то обостренные свойства сенситивности, то тревожной мнительности. Психогенные нарушения могут долгое время оставаться как бы в тени в связи с включением нейрогуморальных компенсаторных механизмов и декомпенсируются при воздействии дополнительных психических и физических факторов. В связи с этим обследование и лечение пациентов с симптомами ДВР является длительным и трудоемким, что приводит к существенным затратам системы здравоохранения [3].

С учетом многообразия симптомов полагают, что патофизиологические процессы, лежащие в основе ДВР сложны и отражают вклад в формирование заболевания целого ряда как соматических, так и психологических факторов, среди которых особого внимания требует изучение особенностей вегетативной и нейроэндокринной регуляции функций [4]. При исследовании ДВР важно определить функциональное состояние вегетативной нервной системы. Принципы исследования должны быть основаны на клинко-экспериментальном подходе, сущность которого составляют функционально-динамические исследования тонуса, вегетативной реактивности, вегетативного обеспечения деятельности. Вегетативный тонус и реактивность дают представления о гомеостатических возможностях организма, вегетативное обеспечение деятельности — об адаптивных механизмах [1]. Как показали клинко-нейрофизиологические исследования, деятельность симпатической и парасимпатической систем организована синергически и соответствует принципу «качающегося равновесия», т.е. повышение тонуса в одной системе индуцирует возрастание в другой. При этом исходно повышенный тонус в одной системе влечет за собой значительное отклонение в другой, что выводит постоянно существующие колебания вегетативного гомеостаза в область повышенной лабильности [2].

Результаты нейрофизиологических исследований при ДВР весьма противоречивы: выявляются как повышенные, так и сниженные показатели вегетативного тонуса. Тем не менее эти данные указывают на измененную вегетативную возбудимость или реактивность. Полагают, что в некоторых случаях при ДВР существенную роль играет не столько симпатикото-

ния, сколько недостаточность парасимпатической системы [1,2,4]. В работах BS. McEwen (2000 г.), В. Vandelow с соавт. (2003 г.) было показано, что повышенный уровень кортизола и пролактина является одним из возможных нейроэндокринных механизмов развития панических атак и отражением напряженной работы вегетативной нервной системы [5,6]. Также получены данные, что избыточный уровень пролактина может свидетельствовать, в частности, о несостоятельности дофаминергической системы и дисфункции нейроэндокринной системы регуляции в целом [7]. В исследовании М. Kikuchi с соавт. (2005 г.) изучалась взаимосвязь между паническими атаками и функцией щитовидной железы. Было выявлено, что у пациентов с высоким уровнем тревоги отмечался повышенный уровень тиреотропного гормона [8].

Несмотря на более чем вековой период изучения ДВР, остаются дискуссионными вопросы диагностических методов, позволяющих объективно подходить к оценке функций вегетативной нервной системы, нет единого взгляда на патогенез ДВР.

Цель исследования — изучение клинических, нейрофизиологических и лабораторных особенностей ДВР у лиц молодого и среднего возраста.

Методика

Работа выполнена по международным правилам работы с биоматериалом людей. Все проводимые мероприятия соответствовали этическим стандартам, разработанным на основе Хельсинкской декларации всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2008 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации». Исследование одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии — протокол № 11/4-19 от 20.11.19.

В исследование включено 46 пациентов в возрасте от 18 до 59 лет, которые наблюдались в ФГБНУ НЦН и имели проявления вегетативной дисфункции с редкими паническими атаками. Из исследования исключались пациенты с соматическими и психическими заболеваниями. В качестве контрольной группы в исследование включили 20 здоровых лиц, возраст которых находился в том же диапазоне.

После подписания информированного согласия пациенты были осмотрены неврологом. Оценивали наличие и характеристики головной боли, расстройств сна и настроения, астении и дезадаптации, тремора, чувствительных, вестибулярных, атактических, пирамидных, когнитивных и вегетососудистых симптомов, пароксизмальных состояний. Пациенты также запол-

няли международные стандартизованные опросники. Для оценки вегетативной дисфункции использовали Анкету вегетативных изменений А.М. Вейна (диапазон от 0 до 15 баллов, оценка <15 баллов – изменения отсутствуют). Скрининг когнитивных нарушений проводили с помощью Монреальской шкалы (MoCA; диапазон от 0 до 30 баллов, оценка ≥ 26 баллов – нарушения отсутствуют). Для выявления тревоги и депрессии применяли Госпитальную шкалу тревоги и депрессии (HADS, в каждой из субшкал тревоги (Т) и депрессии (D) диапазон от 0 до 21 баллов, оценка ≤ 7 баллов – нарушения отсутствуют).

Для оценки показателей вегетативной устойчивости пациентов обследовали методом кожно-симпатических вызванных потенциалов (КСВП). Оценивали следующие параметры: порог реакции, латентный период (начало ответа), амплитуду ответов, связанных с парасимпатической и симпатической системой (A1 и A2, соответственно), соотношение амплитуд отрицательных и положительных компонентов ответа (преобладание симпатической или парасимпатической вегетативной регуляции), габитуацию (привыкание).

Лабораторные исследования включали определение инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1), тиреотропного гормона (ТТГ) и пролактина в венозной крови методом иммунохемилюминисценции на анализаторе Immulite 2000 (США).

Статистическую обработку проводили с применением программного пакета SPSS Statistics версии 23.0 (IBM, США). Нулевую гипотезу отвергали при уровне значимости $p < 0,05$. Нормальность распределения количественных переменных проверяли методом построения частотных гистограмм. Поскольку в большинстве случаев распределение не соответствовало нормальному, при описании количественных переменных использовали медиану и квартили [Q1, Q3]. Описание качественных переменных проводили с использованием частоты и доли (в процентах). В рамках исследования данные пациентов с ДВР сравнили со здоровыми лицами. Также проводили анализ внутри группы с ДВР, сопоставляя показатели пациентов разных возрастных категорий и с различными типами вегетативных реакций по данным КВСП. Количественные переменные сравнивали с помощью U-критерия Манна-Уитни или критерия Краскела-Уоллиса. Качественные переменные сравнивали с помощью критерия χ^2 Пирсона или точного критерия Фишера.

Результаты

Социально-демографические характеристики. Возраст пациентов с ДВР составил 34 [28;50] лет. Этот

показатель имел бимодальное распределение. Соотношение полов в группе с ДВР оказалось равным (м:ж = 1:1,1). Контрольная группа была сопоставима по возрасту и полу с основной (возраст 34 [28; 42] лет, м:ж = 1: 1).

Клинические характеристики. Распространенность вегетативных нарушений и типичных симптомов представлена в **таблице 1**.

У всех пациентов с ДВР отмечалась головная боль. Чаще всего пациенты описывали давящий характер головной боли (39,1%). В большинстве случаев боль была двусторонней (84,8%), локализовалась в теменно-затылочной или лобно-височной областях (34,8% и 32,6% соответственно) и сопровождалась болезненностью перикраниальных мышц (69,6%). Приступы головной боли возникали от 2 раз в месяц до 7 раз в неделю. Наиболее часто их провоцировали стресс и физическое перенапряжение. Среди здоровых лиц контрольной группы головная боль отмечалась значительно реже (20,0%). Частота приступов головной боли у них составила 0,8 [0,5; 1,0] в неделю против 2,0 [1,0; 3,0] в группе пациентов с ДВР ($p=0,009$).

У всех пациентов с ДВР выявлены астенические состояния, нарушения сна и настроения. Астенический синдром характеризовался слабостью, утомляемостью и снижением толерантности к физическим нагрузкам. Нарушения сна проявлялись трудностями засыпания, ранними пробуждениями в сочетании с поверхностным сном, кошмарными сновидениями, большая часть пациентов из этой группы также сообщали о позднем засыпании. Просыпаясь, пациенты испытывали чувство разбитости, вялости, снижение трудоспособности, ухудшалось запоминание и внимание. Все пациенты с ДВР жаловались на чувство тревоги, у большинства из них также отмечались эмоциональная неустойчивость, снижение настроения и его колебания в течение суток. Нередко это сопровождалось проявлениями дезадаптации: ощущением неспособности справиться с проблемами и строить планы, затруднением выполнения повседневных обязанностей. В контрольной группе некоторые участники также отмечали тревожность, утомляемость и нарушения сна. Тем не менее, эти симптомы наблюдались значительно реже, чем у пациентов с ДВР. Также здоровые лица имели большую продолжительность сна и реже просыпались по ночам (**табл. 1**).

У подавляющего большинства пациентов с ДВР выявлены когнитивные нарушения: замедленность мышления и снижение памяти. Почти у половины из них обнаружены атактические симптомы: неустойчивость в позе Ромберга и трудности выполнения ко-

Таблица 1. Распространенность вегетативных и неврологических нарушений у пациентов с дисфункциональными вегетативными расстройствами

Table 1. Prevalence of autonomic and neurological symptoms in patients with autonomic dysfunction

Тип нарушений Type of violations	Основная группа/ Main group (11 ппг = 46)	Контрольная группа/ Control group (n = 20)	p
Пароксизмальные состояния/Paroxysmal states	46 (100,0%)	0	<0,001
• панические атаки/panic attacks	46 (100,0%)	0	<0,001
• симпатoadреналовые кризы/sympathoadrenal crises	14(30,4%)	0	0,006
• вагоинсулярные кризы/vagoinsular crises	9 (19,6%)	0	0,048
Частота панических атак в месяц/Frequency of panic attacks per month	3,0 [2,0; 3,0]	0	>0,05
Синдром вегетосудистой дистонии/Vegeto-vascular dystonia syndrome	45 (97,8%)	0	<0,001
• непереносимость духоты/жары/stuffy hot intolerance	37 (80,4%)	0	<0,001
• потливость /sweating	37 (80,4%)	0	<0,001
• метеозависимость/meteorological dependence	34 (73,9%)	0	<0,001
• непереносимость холода/cold intolerance	16 (34,8%)	0	0,001
Цефалгический синдром/Cephalgic syndrome	46 (100,0%)	4 (20,0%)	<0,001
• частота приступов боли в неделю/ frequency of pain attacks per week	2,0 [1,0; 3,0]	0,8 [0,5; 1,0]	0,009
• интенсивность боли по ВАШ/ pain intensity according to the VAS	6,0 [5,0; 7,0]	4,5 [4,0; 5,0]	>0,05
Инсомнический синдром/insomnia syndrome,	46 (100,0%)	5 (25,0%)	<0,001
• пробуждения в течение ночи/awakening during the night,	46 (100,0%)	5 (25,0%)	<0,001
• засыпание в полночь и позже/falling asleep at midnight or later,	31 (67,4%)	5 (25,0%)	0,003
Число пробуждений за ночь/ number of awakenings per night	2,0 [2,0; 2,0]	0,0 [0,0; 0,5]	<0,001
Продолжительность сна (часов)/ sleep duration (hours)	6,0 [6,0; 7,0]	8,0 [7,0; 8,0]	<0,001
Астенический синдром/ Asthenic syndrome	46 (100,0%)	5 (25,0%)	<0,001
• общая слабость/ general weakness	46 (100,0%)	0	<0,001
• утомляемость/ fatigue	45 (97,8%)	5 (25,0%)	<0,001
• снижение толерантности к физическим нагрузкам/decreased tolerance to physical exertion	45 (97,8%)	0	<0,001
Тревожно-депрессивный синдром/Anxiety-depression syndrome	46 (100,0%)	4 (20,0%)	<0,001
• чувство тревоги/anxiety	46 (100,0%)	4 (20,0%)	<0,001
• эмоциональная неустойчивость/ emotional instability	43 (93,5%)	0	<0,001
• колебания настроения в течение суток/ Mood swings during the day	40 (87,0%)	0	<0,001
• снижение настроения/ decreased mood	31 (67,4%)	0	<0,001
Дезадаптационный синдром/Disapnotation syndrome	33 (71,7%)	0	<0,001
• ощущение неспособности справиться с проблемами/ feeling of inability to cope with problems	27 (58,7%)	0	<0,001
• ощущение неспособности строить планы/feeling of inability to make plans	24 (52,2%)	0	<0,001
• затруднения исполнения рутинных обязанностей/difficulty in performing routine duties	15 (32,6%)	0	0,003
Когнитивные нарушения/Cognitive disorders,	42 (91,3%)	0	<0,001
• замедленность мышления/ slowed thinking	42 (91,3%)	0	<0,001
• снижение памяти/ decreased memory	31 (67,4%)	0	<0,001

Продолжение табл. 1 см. на стр. 33.

Тип нарушений Type of violations	Основная группа/ Main group (11 ппн = 46)	Контрольная группа/ Control group (n = 20)	p
Атактический синдром/Atactic syndrome	21 (45,7%)	0	<0,001
• неустойчивость в пробе Ромберга/ ¹ , Romberg's pose failure	19 (41,3%)	0	0,001
• дискоординация при выполнении координаторных проб/ discoordination during coordination tests	17 (37,0%)	0	0,001
Пирамидный синдром/ Pyramid syndrome,	31 (67,4%)	0	<0,001
• повышение сухожильных и периостальных рефлексов/increased tendon and periosteal reflexes	28 (60,9%)	0	<0,001
• анизорефлексия/anisoreflexia	7 (15,2%)	0	>0,05
Вестибулярный синдром/Vestibular syndrome	33 (71,7%)	0	<0,001
• шум в голове /noise in the head,	30 (65,2%)	0	<0,001
• головокружение / dizziness	28 (60,9%)	0	<0,001
Тремор пальцев рук/век/Tremory of the fingers, eyelids	40 (87,0%)	0	<0,001
Нарушения чувствительности (онемение, парестезии)/ sensitivity disorder (numbness,paresthesia)	34 (73,9%)	0	<0,001
Симптом беспокойных ног/ restless legs symptom	17 (37,0%)	0	0,001
Кардиалгии/ Cardialgia	33 (71,7%)	0	<0,001

Примечание. Для качественных показателей: частота (доля); для количественных: медиана [Q1; Q3]. ВАШ – визуально-аналоговая шкала.
Note. For qualitative indicators: frequency (proportion); for quantitative: median [Q1; Q3]. VAS is a visual analogue scale.

ординаторных проб. У пациентов с ДВР наблюдалось повышение сухожильных и периостальных рефлексов, отмечалась анизорефлексия и у 4,3% – асимметрия носогубных складок. Почти две трети пациентов с ДВР жаловались на вестибулярные расстройства: головокружение и ощущение шума в голове. Среди других нарушений в этой группе отмечались тремор век и пальцев рук, парестезии, синдром беспокойных ног. У пациентов с ДВР выявлены жалобы на колющую боль в области сердца (кардиалгии) и плохую переносимость душных помещений. В контрольной группе когнитивных, атактических, пирамидных, вестибулярных, сенсомоторных нарушений выявлено не было.

Вегетососудистые нарушения у пациентов с ДВР были представлены повышенной потливостью, метеозависимостью, плохой переносимостью высоких и низких температур. У всех пациентов из этой группы отмечались пароксизмальные состояния: панические атаки, симпатоадреналовые и вагоинсулярные кризы. Панические эпизоды возникали от 1 раза в 2 мес до 5 раз в месяц. Здоровые лица не сообщали о вегетососудистых симптомах и пароксизмальных состояниях (табл. 1).

Длительность симптомов у пациентов с ДВР не превышала 5 лет (у 87% случаев составляла менее 2 лет). Подавляющее большинство пациентов из этой группы (87%) сообщали о нарастании симпто-

матики, при этом 58,7% отмечали смену ведущего симптома. Три четверти пациентов (73,9%) характеризовали тяжесть симптоматики как умеренную, 26,1% – как выраженную. В 76,1% случаев пациенты с ДВР сообщали о применении различных лекарственных препаратов для облегчения симптомов, однако устойчивый эффект не достигался.

Кожно-симпатические вызванные потенциалы. Показатели КСВП приведены в таблице 2.

В группе пациентов с ДВР отмечено значимое повышение порога реакции по сравнению со здоровыми лицами. Также у пациентов с ДВР выявлены патологические изменения габитуации.

Начало ответа и амплитуда вегетативных компонентов (как парасимпатического, так и симпатического) значимо не различались между группами (табл. 2).

В группе с ДВР у одного пациента определение типа реакции вегетативной нервной системы (ВНС) оказалось невозможным в связи с низкими амплитудами ответов. У 57,8% пациентов выявлен симпатический тип реакции ВНС или смешанный с преобладанием симпатического. В 31,1% случаев обнаружен парасимпатический тип реакции или смешанный с преобладанием парасимпатического. У 11,1% пациентов отмечался смешанный тип реакции без преобладания какого-либо компонента.

Международные стандартизованные опросники. У всех пациентов с ДВР общий балл Анкеты вегетативных изменений превышал пороговые значения – 23,0 [19,0; 27,0] баллов, тогда как в контрольной группе этот показатель находился в пределах нормальных значений 12,0 [10,5; 13,0]; $p < 0,001$. Общий балл по шкале MoCA у пациентов с ДВР и у здоровых лиц соответствовал нормальным показателям – не ниже 26 баллов (диапазон в основной и контрольной группе 26 – 29 и 28 – 30 баллов соответственно).

У здоровых лиц уровень депрессии и тревоги по шкале HADS не выходил за пределы нормальных значений (HADS-T – 6,0 [5,0; 6,0] и HADS-D – 4,0 [3,0; 4,5] баллов). При ДВР в некоторых случаях выявлена субклинически выраженная депрессия (HADS-D – 4,0 [3,0; 4,5]) и во всех случаях – субклинически/клинически выраженная тревога (HADS-T – 11,0 [10,0; 12,0] баллов).

Лабораторные характеристики. Результаты лабораторных исследований приведены в **таблице 3**.

Как видно из данных таблицы у пациентов с ДВР отмечался статистически значимо более высокий уровень инсулиноподобного фактора роста-1. Обращало внимание почти двукратное повышение уровня пролактина. Уровень тиреотропного гормона у пациентов с ДВР в среднем статистически значимо не отличался от такового группы здоровых лиц (**табл. 3**). Однако сравнение величин этого показателя в разных возрастных подгруппах показало существенное его увеличение в подгруппе более старшего возраста, что может быть отражением возрастного снижения функции щитовидной железы.

Анализ данных основной группы с учетом типа реакции ВНС (по данным КСВП)

Сравнение подгрупп с учетом типа реакции ВНС приведено в **таблице 4**.

Таблица 2. Показатели кожно-симпатических вызванных потенциалов у пациентов с дисфункциональными вегетативными расстройствами

Table 2. Indicators of dermal-sympathetic evoked potentials in patients with autonomic dysfunction

Показатель/Indicators	Основная группа/Main group (n = 46)	Контрольная группа/Control group (n = 20)	p
Порог реакции, мА/ Reaction threshold, mA	5,0 [4,0; 5,5]	4,0 [3,9; 4,1]	0,001
Латентный период, с/ Latent period, sec	1,40 [1,21; 1,54]	1,40 [1,36; 1,40]	>0,05
Амплитуда парасимпатического компонента (A1), мВ/ Amplitude of parasympathetic component (A1), mV	0,46 [0,18; 0,90]	0,56 [0,52; 0,58]	>0,05
Амплитуда симпатического компонента (A2), мВ/ Amplitude of sympathetic component (A2), mV	1,55 [0,50; 3,20]	1,38 [0,98; 1,70]	>0,05
A1/A2	0,32 [0,18; 0,67]	0,42 [0,31; 0,51]	>0,05
Габитуация, отклонение от нормы/Gabitation, deviation from normal	15 (32,6%)	-	0,003

Примечание. Для количественных показателей: медиана [Q1; Q3]; для качественных: частота (доля).

Note. For quantitative indicators: median [Q1; Q3]; for quality: frequency (proportion).

Таблица 3. Лабораторные показатели у пациентов с дисфункциональными вегетативными расстройствами

Table 3. Laboratory parameters in patients with autonomic dysfunction

Показатель/Indicators	Основная группа/Main group (n = 46)	Контрольная группа /Control group (n = 20)	p
Инсулиноподобный фактор роста-1, нг/мл/ Insulin-like growth factor-1, ng/ml	74,75 [72,30; 78,60]	71,65 [70,60; 72,35]	<0,001
Пролактин, мкМЕ/мл/Prolactin, μMe/m	364,0 [270,0; 484,0]	192,5 [159,0; 212,5]	<0,001
Тиреотропный гормон (мкМе/мл) / Thyrotropic hormone (μMe/ml)	1,78 [1,15; 2,15]	1,70 [1,42; 1,95]	>0,05

Примечание. Для количественных показателей: медиана [Q1; Q3].

Note. For quantitative indicators: median [Q1; Q3].

Подгруппы не имели значимых различий по демографическим показателям, давности возникновения, распространенности, характеристикам и динамике большинства оцениваемых клинических симптомов. Однако у пациентов с преобладанием симпатического ответа чаще отмечались повышение сухожильных и периостальных рефлексов, тремор век и пальцев рук.

Подгруппы различались по порогу реакции, латентному периоду, амплитуде симпатических компонентов. Различия по амплитуде парасимпатических компонентов и частоте обнаружения патологических изменений габитуации не были статистически значимыми.

Анализ основной группы с учетом возрастной категории. В связи с бимодальным распределением возраста пациентов в основной группе проведено сравнение показателей пациентов разных возрастных катего-

рий: 18-35 лет и 36-59 лет. Возрастная граница между подгруппами выбрана эмпирически. Результаты сравнения приведены в **таблице 5**.

Подгруппы не имели статистически значимых различий по полу. Длительность симптомов и их субъективная оценка также не различались между подгруппами. Однако пациенты в возрасте 36-59 лет чаще отмечали нарастание симптоматики и смену ведущего симптома. У пациентов в возрасте 36-59 лет чаще отмечались затруднения при выполнении координаторных проб, неустойчивость в позе Ромберга и снижение памяти. У пациентов в возрасте 18-35 лет более часто выявлялось повышение сухожильных и периостальных рефлексов. Кроме того, они чаще жаловались на нарушения сна и расстройства чувствительности, а головная боль у них была более интенсивной.

Таблица 4. Характеристика пациентов с дисфункциональными вегетативными расстройствами в зависимости от типа реакций вегетативной нервной системы

Table 4. Characteristics of patients with autonomic dysfunction depending on the type of reactions of the autonomic nervous system

Показатель / Indicators	Подгруппа с преобладанием симпатического компонента/Subgroup with predominant sympathetic component (n = 26)	Подгруппа без преобладания тонуса симпатической или парасимпатической системы/The subgroup without predominant sympathetic or parasympathetic system (n = 5)	Подгруппа с преобладанием парасимпатического компонента / Subgroup of the parasympathetic component (n = 14)	p
Возраст (лет)/Age (years)	31,5 [26,0; 44,0]	55,0 [31,0; 57,0]	46,0 [23,0; 50,0]	>0,05
Доля лиц мужского пола/Proportion of males	14 (53,8%)	2 (40,0%)	6 (42,9%)	>0,05
Повышение сухожильных рефлексов/Increasing tendon reflexes	20 (76,9%)	3 (60,0%)	4 (28,6%)	0,010
Тремор пальцев / Tremors of the fingers	25 (96,2%)	4 (80,0%)	8 (57,1%)	0,006
Тремор век/Eyelid tremor	25 (96,2%)	3 (60,0%)	9 (64,3%)	0,008
Порог реакции, мА/ Response threshold, mA	4,0 [4,0; 5,0]	6,0 [5,0; 6,0]	5,0 [4,0; 5,5]	0,048
Латентный период, с/Latency period, sec	1,37 [1,20; 1,50]	1,30 [0,30; 1,31]	1,48 [1,42; 1,70]	0,035
Амплитуда парасимпатического компонента (A1), мВ/Amplitude of parasympathetic component (A1), mV	0,54 [0,30; 1,05]	0,26 [0,06; 0,30]	0,68 [0,16; 0,90]	>0,05
Амплитуда симпатического компонента (A2), мВ/ Amplitude of sympathetic component (A2), mV	2,54 [1,50; 5,00]	0,85 [0,01; 1,10]	0,83 [0,20; 1,60]	0,002
A1/A2	0,23 [0,13; 0,43]	0,31 [0,16; 0,35]	0,69 [0,38; 0,86]	0,004
Габитуация: отклонение от нормы/, Gabbituation deviation from normal	6 (23,1%)	3 (60,0%)	6 (42,9%)	>0,05

Примечание. Для качественных показателей: частота (доля); для количественных: медиана [Q1;Q3].

Note. For qualitative indicators: frequency (proportion); for quantitative: median [Q1;Q3].

Анализ результатов КСВП не выявил значимых различий между подгруппами, за исключением порога реакции (у пациентов в возрасте 36-59 лет порог реакции оказался выше). Распределение различных типов реакции ВНС внутри подгрупп также не имело различий. Тем не менее, среди пациентов 18-35 лет преобладание симпатического ответа отмечалось чаще, чем преобладание парасимпатического ответа (69,2% против 23,1%), тогда как среди пациентов 36-59 лет распространенность этих вариантов была равной (42,1%).

Статистически значимых различий между подгруппами по результатам опросников и исследуемым лабораторным показателям выявлено не было, за исключением уровня ТТГ (в группе 36-59 лет уровень ТТГ оказался выше).

Обсуждение

У пациентов в возрасте 36-59 лет с ДВР отмечался более высокий уровень систолического артериального давления, а также чаще выявлялись дискоордина-

ция при выполнении координаторных проб, неустойчивость в позе Ромберга, снижение памяти, нарастание симптоматики и смена ведущего симптома.

У пациентов в возрасте 18-35 лет с ДВР чаще обнаруживалось повышение сухожильных и периостальных рефлексов. Кроме того, они чаще жаловались на интенсивную головную боль, нарушения сна и расстройства чувствительности.

В результате анализа результатов КСВП было выявлено, что в группе 18-35 лет пациентов с преобладанием симпатического ответа было больше, чем с преобладанием парасимпатического ответа (69,2% против 23,1%), тогда как среди пациентов 36-59 лет распространенность этих вегетативных компонентов была одинаковой (42,1%). Можно предположить, что исходная парасимпатическая недостаточность у пациентов молодого возраста с ДВР может определять больший дефицит вагальной активности при ингибирующих супрасегментарных влияниях во время стрессовых ситуаций, что будет проявляться усиленными симпатическими сердечно-сосудистыми реакциями. Этот дефект в вегетативном кон-

Таблица 5. Характеристика пациентов с дисфункциональными вегетативными расстройствами в зависимости от возрастной категории

Table 5. Characteristics of patients with autonomic dysfunction depending on the age category

Показатель / Indicators	Подгруппа в возрасте 18-35 лет /Subgroup aged 18-35 years old (n=27)	Подгруппа в возрасте 36-59 лет /Subgroup aged 36-59 years old (n = 19)	p
Доля лиц мужского пола/Proportion of males	16 (59,3%)	6 (31,6%)	>0,05
Систолическое артериальное давление (мм рт. ст.)/Systolic blood pressure (mm Hg)	120,0 [110,0; 125,0]	130,0 [120,0; 135,0]	0,002
Нарастание симптомов/Increase in symptoms	21 (77,8%)	19 (100,0%)	0,034
Смена ведущего симптома/Change in leading symptom	12 (44,4%)	15 (78,9%)	0,033
Неустойчивость в пробе Ромберга/Instability in the Romberg test	6 (22,2%)	13 (68,4%)	0,003
Дискоординация при выполнении координаторных проб/Dis-coordination when performing coordination tests	5 (18,5%)	12 (63,2%)	0,004
Снижение памяти/Decreased memory	14 (51,9%)	17 (89,5%)	0,010
Повышение сухожильных рефлексов/Increased tendon reflexes	21 (77,8%)	7 (36,8%)	0,007
Нарушения чувствительности (онемение, парестезии)/sensitivity disorder (numbness,paresthesia)	23 (85,2%)	11 (57,9%)	0,049
Засыпание в полночь /Falling asleep at midnight	22 (81,5%)	9 (47,4%)	0,025
Частота ночных пробуждений/Frequency of night awakenings	2,0 [2,0; 2,0]	2,0 [2,0; 3,0]	0,023
Интенсивность головной боли по ВАШ/Headache intensity according to VAS	6,0 [5,0; 7,0]	5,0 [4,0; 6,0]	0,006
Порог реакции, мА / Response threshold, mA	5,0 [4,0; 5,0]	5,0 [4,0; 6,0]	0,028
Тиреотропный гормон мкМе/мл /Thyroid hormone μMe/ml	1,60 [0,85; 2,06]	2,10 [1,60; 2,57]	0,016

Примечание. Для качественных показателей: частота (доля); для количественных: медиана [Q1; Q3]. ВАШ – визуально-аналоговая шкала.
Note. For qualitative indicators: frequency (proportion); for quantitative: median [Q1; Q3]. VAS is a visual analogue scale.

троле может быть одним из факторов, предрасполагающих к срыву симпатико-парасимпатического баланса и формированию патологических пароксизмальных симпатических реакций при дополнительных активационных нагрузках при ДВР.

Проведенные ранее исследования убедительно показывают, что ДВР чаще возникают на фоне симпатикотонии [1, 5, 9]. Большинство авторов решающую роль в возникновении вегетативных кризов отводят предшествующему повышению симпатического тонуса. Значительные отклонения вегетативного тонуса в сторону симпатикотонии характерны для эмоциональных расстройств [2, 4].

В ранее проведенных исследованиях отмечена взаимосвязь между тревогой и развитием артериальной гипертонии, в том числе повышенной variability артериального давления, отражающей вегетативную дисфункцию и снижение чувствительности барорефлекса [9].

Снижение когнитивных функций препятствует формированию адаптационных когнитивно-поведенческих механизмов, что может обуславливать повышенный уровень тревожности, дезадаптивный синдром и более высокую частоту пароксизмальных состояний в основной группе. Относительно взаимосвязи невротоподобных расстройств и когнитивных нарушений есть данные о влиянии тревоги на когнитивную гибкость у пожилых людей с уменьшением скорости обработки и воспроизводимости информации [10].

Т. Corrêa Rangel и соавт. (2022 г.) показали взаимосвязь между тревогой, головной болью, бессонницей и интернет-зависимостью у студентов университета [11, 12]. Ускоренный темп жизни и информационные перегрузки, являясь стрессовыми факторами, способствуют развитию невротоподобных расстройств у лиц молодого возраста, и как следствие, их частым проявлениям — головной боли и инсомническим нарушениям. В условиях хронического стресса адаптационные механизмы организма снижаются и нарушается взаимодействие нейротрансмиттерных систем [13]. Некоторые авторы подчеркивают сложный патофизиологический механизм регуляции болевой чувствительности, в которой особое место отводится психологической сфере человека. Хронический стресс, тревога, депрессия, личностные особенности со склонностью к катастрофизации и непереносимостью фрустрации негативно влияют на баланс ноцицептивной и антиноцицептивной систем, формируя тем самым «дисфункциональный» характер хронической боли [14]. В результате боль сама становится патогенным фактором, способствуя не только развитию и усугублению име-

ющихся психоэмоциональных нарушений, но и снижению качества жизни в целом [15].

Повышение уровня пролактина при ДВР является одним из возможных патофизиологически важных нейроэндокринных механизмов развития панических атак и отражением напряженной работы вегетативной нервной системы [5, 6]. Избыточный уровень пролактина может также свидетельствовать о несостоятельности дофаминергической системы и дисфункции нейроэндокринной системы регуляции в целом [7]. При изучении взаимосвязи между паническими атаками и функцией щитовидной железы [8] было выявлено, что у пациентов с высоким уровнем тревоги отмечался повышенный уровень тиреотропного гормона. Нами значимая разница в уровне тиреотропного гормона у пациентов ДВР была выявлена только в возрастном аспекте, что может быть отражением возрастного снижения функции щитовидной железы.

Заключение

Исследование показало большую распространенность и variability клинических и нейрофизиологических симптомов у пациентов с ДВР. Полученные результаты подтверждают актуальность дальнейшего изучения ДВР у пациентов разных возрастных групп и с различными типами вегетативных реакций. Обнаруженные у пациентов с ДВР гормональные изменения представляют интерес для дальнейшего изучения в плане понимания патогенетических основ симптоматики дисфункциональных вегетативных расстройств.

Литература

(п.п. 1-3; 5; 6; 8-13; 15 см. References)

4. Краснов В.Н. *Расстройства аффективного спектра*. М.: Практическая медицина, 2011. С. 156–160.
7. Хасанова Д.Р., Вагапова Г.Р., Житкова Ю.В., Абдулхаев Ф.А., Анцилевич Л.М., Сатарова Л.И. Некоторые особенности секреции пролактина у больных с паническими атаками различной тяжести. *Неврол. Вестник*. 2004; 36(1–2): 53–8.
14. Яхно Н.Н., Кукушкин М.Л., Подчуфарова Е.В. О дисфункциональном механизме хронической боли. *Российский журнал боли*. 2012; 1: 24–5.

References

1. Scarella T.M. *Somatiform disorders*. In: Neurology and psychiatry of women. O'Neal M., editor. Heidelberg; NY; Dordrecht; London: Springer, Cham; 2019: 47–67.
2. Kellner R. Psychosomatic syndromes, somatization and somatiform disorders. *Psychother Psychosom*. 1994; 61(1-2): 4-24. doi: 10.1159/000288868

3. Combs H., Markman J. Anxiety disorders in primary care. *Med Clin North Am.* 2014; 98(5): 1007–23. doi: 10.1016/j.mcna.2014.06.003
4. Krasnov, V.N. Affective spectrum disorders [*Rastroystva affektivnogo spectra*]. — Moscow: Prakticheskaya meditsina, 2011. S. 156–60. (in Russian)
5. McEwen B.S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 2000; 886(1–2): 172–89. doi: 10.1016/s0006-8993(00)02950-4
6. Bandelow B., Wedekind D., Pauls J., Broocks A., Hajak G., Rütger E. Salivary cortisol in panic attacks. *Am. J. Psychiatry.* 2000; 157(3): 454–6. doi: 10.1176/appi.ajp.157.3.454
7. Khasanova D.R., Vagapova G.R., Zhitkova Yu.V., Abdulkhaev F.A., Antsilevich L.M., Satarova L.I. Some features of prolactin secretion in patients with panic attacks of varying severity. *Nevrol. Vestnik.* 2004; 36(1–2): 53–8. (in Russian)
8. Kikuchi M., Komuro R., Oka H., Kidani T., Hanaoka A., Koshino Y. Relationship between anxiety and thyroid function in patients with panic disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2005; 29(1): 77–81. doi: 10.1016/j.pnpbp.2004.10.008
9. Johnson H.M. Anxiety and hypertension: is there a link? A literature review of the comorbidity relationship between anxiety and hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2019; 21(9): 66. doi: 10.1007/s11906-019-0972-5
10. Mella N., Vallet F., Beaudoin M., Fagot D., Baeriswyl M., Ballhausen N., et al. Distinct effects of cognitive versus somatic anxiety on cognitive performance in old age: the role of working memory capacity. *Aging Ment Health.* 2020; 24(4): 604–10. doi: 10.1080/13607863.2018.1548566
11. Corrêa Rangel T., Falcão Raposo M.C., Sampaio Rocha-Filho P.A. Internet addiction, headache, and insomnia in university students: a cross-sectional study. *Neurol Sci.* 2022; 43(2): 1035–41. doi: 10.1007/s10072-021-05377-x
12. Corrêa Rangel T., Falcão Raposo M.C., Sampaio Rocha-Filho P.A. The prevalence and severity of insomnia in university students and their associations with migraine, tension-type headache, anxiety and depression disorders: a cross-sectional study. *Sleep Med.* 2021; 88: 241–246. doi: 10.1016/j.sleep.2021.10.029
13. Mukharovskaya I.R., Markov M.V., Abdryakhimova Ts.B., Kleban K.I., Sapon D.M. Psychosomatic disorders in clinical practice. *Journal of Education, Health and Sport* 2019; 9(12): 181–5. doi: 10.12775/JEHS.2019.09.12.020
14. Yakhno N.N., Kukushkin M.L., Podchufarova E.V. About the dysfunctional mechanism of chronic pain. *Rossiyskiy zhurnal bo-li.* 2012; 1: 24–5. (in Russian)
15. Torrance N., Elliott A.M., Lee A.J., Smith B.H. Severe chronic pain is associated with increased 10 year mortality. A cohort record linkage study. *Eur J Pain.* 2010; 14(4): 380–6. doi: 10.1016/j.ejpain.2009.07.006

Сведения об авторах:

Максимова Марина Юрьевна, доктор мед. наук, проф., руководитель 2-го неврологического отд-ния, ФГБНУ «Научный центр неврологии», e-mail: ncnmaximova@mail.ru;

Галанина Анна Сергеевна, аспирант 2-го неврологического отд-ния, ФГБНУ «Научный центр неврологии», e-mail: taratuhinaanna@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2023

УДК 57.089:57.084

Ерофеева А.-М.В., Антипова О.А., Жаворонок И.П., Рябцева С.Н., Молчанова А.Ю.

Эффективность курсового применения пальмитоилэтаноламида и трансплантации мезенхимальных стволовых клеток при экспериментальной периферической нейропатической боли

ГНУ «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси»,
220072, Минск, Республика Беларусь, ул. Академическая, д. 28

Цель исследования – изучение влияния курсового внутрибрюшинного введения пальмитоилэтаноламида (PEA, 1 мг/кг) в комбинации с однократным внутримышечным введением мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ, 1×10^6 клеток/кг) на ноцицептивные реакции крыс и морфологию мягких тканей задней лапы крыс с периферической нейропатией (НП), вызванной перерезкой и иссечением участка седалищного нерва.

Методика. Исследование выполнено на 28 крысах-самцах стока Wistar. В соответствии с дизайном исследования, осуществили моделирование: 1) НП без лечения; 2) НП с однократной трансплантацией МСК ЖТ; 3) НП с однократной локальной трансплантацией МСК ЖТ и курсовым приемом PEA. Проведены измерения порога ноцицептивной реакции (ПНР) на механический стимул, латентного периода ноцицептивной реакции (ЛПНР) на термический стимул на протяжении 28 сут еженедельно и на 60-е сут. На 21-е сут после моделирования НП охарактеризована гистоструктура мягких тканей и сосудисто-нервного пучка задних лап крыс с периферической нейропатией на фоне трансплантации МСК ЖТ отдельно и в сочетании с курсовым приемом PEA

Результаты. Однократное введение МСК ЖТ приводило к увеличению ПНР и ЛПНР крыс с НП до исходных значений к 21-м сут после операции, подавляло воспаление периневральных тканей и способствовало неоваскуляризации сосудисто-нервного пучка в области аксотомии седалищного нерва. Курсовое внутрибрюшинное введение PEA на фоне трансплантации МСК приводило к увеличению ПНР начиная с 1-й инъекции PEA, но вместе с тем не приводило к восстановлению исходной ноцицептивной чувствительности на механический и термический стимулы на протяжении исследования, а также отменяло противовоспалительный эффект МСК ЖТ.

Заключение. Курсовое применение PEA при однократной трансплантации МСК ЖТ подавляло антиноцицептивное действие стволовых клеток, а также приводило к отмене их противовоспалительных эффектов в зоне иссечения седалищного нерва.

Ключевые слова: нейропатическая боль; мезенхимальные стволовые клетки; ноцицептивная чувствительность; пальмитоилэтаноламид

Для цитирования: Ерофеева А.-М.В., Антипова О.А., Жаворонок И.П., Рябцева С.Н., Молчанова А.Ю. Эффективность курсового применения пальмитоилэтаноламида и трансплантации мезенхимальных стволовых клеток при экспериментальной периферической нейропатической боли. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 2023; 67(1): 39-47.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.39-47

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Молчанова А.Ю.; сбор и обработка материала – Ерофеева А.-М.В., Антипова О.А., Жаворонок И.П.; статистическая обработка результатов – Ерофеева А.-М.В., Антипова О.А.; написание текста – Ерофеева А.-М.В.; редактирование – Рябцева С.Н., Молчанова А.Ю. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все авторы.

Для корреспонденции: Ерофеева Анна-Мария Вадимовна, email: amyerofeyeva@zoho.eu

Финансирование: Исследование проведено в рамках задания «Оценка влияния мезенхимальных стволовых клеток на ноцицептивную чувствительность и репаративные процессы в нерве и окружающих его тканях при экспериментальной нейропатии» ГПНИ «Трансляционная медицина» (№ госрегистрации 20191077).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.09.2022

Принята к печати 26.01.2023

Опубликована 17.02.2023

Yerofeyeva A.-M.V., Antipova O.A., Zhavoronok I.P., Rjabceva S.N., Molchanova A.Y.

Effectiveness of a course treatment with palmitoylethanolamide and transplantation of mesenchymal stem cells in experimental peripheral neuropathic painInstitute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus,
Akademicheskaya St. 28, Minsk 220072, Republic of Belarus

Aim. To study the effect of repeated intraperitoneal administration of palmitoylethanolamide (PEA, 1 mg/kg) in combination with a single intramuscular injection of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs, 1×10^6 cells/kg) on nociceptive reactions and morphological changes in tissues of the hind legs of rats with peripheral neuropathic pain (PNP) due to sciatic nerve transection.

Methods. The study was conducted on 28 Wistar male rats. The study design included modeling of NP without treatment; NP with a single transplantation of ADMSCs; and NP with a single local transplantation of ADMSCs and a course treatment with PEA. The mechanical withdrawal threshold (MWT) and the thermal withdrawal latency (TWL) were measured weekly for 28 days and on day 60. On day 21 of experiment, the histological structure of soft tissues and neurovascular bundle of the hind paws of NP rats was assessed after transplantation of ADMSCs alone and in combination with the PEA course treatment.

Results. A single administration of ADMSCs increased the MWT and TWL in rats with PNP to the baseline values of postoperative day 21, inhibited inflammation of perineural tissues, and improved neovascularization of the vascular bundle in the sciatic axotomy area. A course of PEA intraperitoneal injections in combination with the ADMSCs transplantation increased MWT after the first PEA injection but did not result in recovery of the nociceptive sensitivity to mechanical and thermal stimuli throughout the study, and also abolished the anti-inflammatory effect of ADMSCs.

Conclusion. A combination of repeated PEA injections and ADMSCs reduced the antinociceptive effect of stem cells and abolished their anti-inflammatory effect in the area of sciatic nerve resection.

Keywords: neuropathic pain; mesenchymal stem cells; nociceptive sensitivity; palmitoylethanolamide

For citation: Yerofeyeva A.-M.V., Antipova O.A., Zhavoronok I.P., Rjabceva S.N., Molchanova A.Y. Effectiveness of course application of palmitoylethanolamide and transplantation of mesenchymal stem cells in experimental peripheral neuropathic pain. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(1): 39-47. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.39-47

Author's contribution: concept and design of the study – Molchanova A.Y.; collection of material – Yerofeyeva A.-M.V., Antipova O.A., Zhavoronok I.P.; statistical data processing – Yerofeyeva A.-M.V., Antipova O.A.; writing of the text – Yerofeyeva A.-M.V.; editing of the text – Rjabceva S.N., Molchanova A.Y. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Anna-Maria V. Yerofeyeva, Post-Graduate Student, Junior Researcher of the Laboratory of Modulation of Body Function, email: amyerofeyeva@zoho.eu

Information about the authors:Yerofeyeva A.-M.V., <https://orcid.org/0000-0002-9407-9295>Antipova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5418-0874>Zhavoronok I.P., <https://orcid.org/0000-0001-9982-0719>Rjabceva S.N., <https://orcid.org/0000-0001-5960-3656>Molchanova A.Y., <https://orcid.org/0000-0001-5053-6602>

Financing. The study was performed within the framework of the project «Assessment of the influence of mesenchymal stem cells on nociceptive sensitivity and reparative processes in the nerve and surrounding tissues in experimental neuropathy» of the State research program «Translational Medicine» (registration number 20191077).

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

Received 27.09.2022

Accepted 26.01.2023

Published 17.02.2023

Введение

Нейропатическая боль, вызванная повреждением периферических нервов, проявляется хроническим болевым синдромом, который зачастую приводит к снижению дееспособности и инвалидности [1]. На сегодняшний день наблюдается неуклонный рост распространённости данной патологии, связанный в первую

очередь с ростом заболеваемости сахарным диабетом, увеличением выживаемости пациентов после курса химиотерапии, а также старением населения [1, 2]. Подбор эффективной терапии нейропатической боли осложнен не только разнообразием ее этиологии, но и побочными эффектами применяемых в клинике

стандартных схем фармакотерапии, включающих прием противосудорожных средств, трициклических антидепрессантов или даже опиоидов, что сопровождается побочным действием на ЦНС и может приводить к формированию зависимости [2].

Применение мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) для купирования периферической нейропатической боли перспективно так как: с одной стороны, доказаны их противовоспалительные, иммуномодулирующие и протекторные свойства [3, 4] и способность ослаблять болевые ощущения при периферической нейропатии на длительное время без психотропных побочных эффектов [5, 6], а с другой – относительно прост процесс выделения этих клеток по сравнению с МСК из других источников. Механизмы антиноцицептивного действия МСК ЖТ на сегодняшний день недостаточно изучены. Считается, что они реализуются в основном за счет паракринных факторов, секретлируемых стволовыми клетками. К основным биологически активным молекулам, секретлируемым МСК ЖТ и связанным с их обезболивающим и нейропротекторным действием, относят тканевый ингибитор металлопротеиназы-2, а также ряд факторов роста и цитокинов: трансформирующий фактор роста β (TGF- β), фактор роста гепатоцитов-1 (HGF-1), индуцируемый геном 6 фактор некроза опухолей (TSG-6) и интерлейкин-10 (IL-10) [7]. Кроме того, имеющиеся в научной литературе данные позволяют предполагать участие сигнальных липидных молекул в реализации анальгетического эффекта МСК ЖТ. В частности, при культивировании МСК человека обнаружены высокие концентрации эндогенных каннабиноидов 2-арахидоноилглицерола (2-AG), анандамида (AEA) и его конгенера пальмитоилэтаноламида (PEA) [8]. Среди них – PEA, известный своими противовоспалительными, анальгезирующими и нейропротекторными свойствами. Он не вызывает психотропных либо каких-либо иных побочных эффектов [9], способен при курсовом приеме эффективно купировать болевые ощущения при периферической нейропатии, что подтверждено как экспериментально [10, 11], так и в клинической практике [9, 11, 12]. Обезболивающие эффекты PEA реализуются непосредственно через рецепторы PPAR- α и GPR55 и опосредовано (посредством эффекта «свиты») на рецепторы CB₁, CB₂ и TRPV1 [9, 13-15]. Он подавляет воспаление, ингибируя активацию микроглии, астроцитов и тучных клеток и выделение таких медиаторов воспаления и аллогенов, как фактор некроза опухоли- α и другие провоспалительные цитокины, фактор роста нервов, циклооксигеназа-2, и индуцибельная синтаза оксида азота [9, 16]. При хрониче-

ческих воспалительных состояниях это позволяет PEA оказывать протекторное действие на морфологию периферических нервов, уменьшать эндоневральный отек и макрофагальную инфильтрацию [16]. Предположительно применение PEA в комбинации с трансплантацией МСК ЖТ могло бы оказать более эффективное антиноцицептивное и репаративное действие при периферической нейропатической боли, чем использование только МСК.

Цель исследования – изучение влияния курсового введения PEA после локальной трансплантации МСК ЖТ на ноцицептивную чувствительность и морфологические изменения седалищного нерва и периневральных тканей при экспериментальной посттравматической нейропатии (НП) у крыс.

Методика

Серии экспериментов выполнены на крысах-самцах стока Wistar ($n=28$) с исходной массой 200-220 г. Животных содержали в помещении вивария Института физиологии НАН Беларуси со свободным доступом к воде и пище и циклом день/ночь 12/12 ч. Методом рандомизации животных разделили на группы: 1-я группа – модель периферической нейропатии (НП) без лечения ($n=10$); 2-я – НП с однократной локальной трансплантацией МСК ЖТ в дозе 1×10^6 клеток/кг ($n=10$); 3-я группа – НП с однократной локальной трансплантацией МСК ЖТ в дозе 1×10^6 клеток/кг и курсовым приемом PEA в дозе 1 мг/кг ($n=8$). Все манипуляции с экспериментальными животными выполнены с соблюдением биоэтических принципов, изложенных в Хельсинкской декларации Международной Медицинской Ассоциации «О гуманном отношении к животным». Протоколы исследования одобрены комиссией по биоэтике при Институте физиологии НАН Беларуси.

Моделирование НП осуществляли методом аксономии седалищного нерва по ранее изложенной методике [5]. Хирургические манипуляции проводили под общим наркозом: тиопентал натрия (ОАО «Синтез», Россия) в дозе 20 мг/кг, внутривенно и местным обезболиванием (лидокаина гидрохлорид, ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Беларусь) в дозе 100 мкл, внутримышечно). После хирургического вмешательства животные находились под визуальным контролем в индивидуальных клетках до выхода из наркотического сна.

Аллогенную трансплантацию МСК ЖТ в дозе 1×10^6 клеток/кг выполняли крысам с НП на 7-е сут после операции. Суспензию клеток, разведенную в стерильном физиологическом растворе, вводили внутри-

мышечно в область аксотомии четырьмя инъекциями по воображаемому циферблату на 3, 6, 9 и 12 ч. Предварительное выделение МСК ЖТ из жировой ткани интактных крыс, а также их культивирование выполняли согласно ранее описанной методике [5].

Внутрибрюшинное введение РЕА (Sigma Aldrich, Германия) соответствующей группе животных в дозе 1 мг/кг осуществляли через 1 ч после трансплантации клеток, и далее ежедневно в течение 7 сут. РЕА предварительно растворяли в смеси из Tween 80 (Sigma, США), 96 % этанола и апиrogenного физиологического раствора (соотношение 1:1:8).

Оценку ноцицептивных реакций на механический стимул проводили с помощью теста «Рэндалла-Селитто», предполагающего определение порога ноцицептивной реакции (ПНР). Ноцицептивную чувствительность на тепловой стимул оценивали тестом «Горячая пластина», определяющим латентный период ноцицептивной реакции (ЛПНР) [17]. Измерения проводили до моделирования НП, а также на 7, 14, 21, 28 и 60-е сут исследования. На 21-е сут после моделирования НП у экспериментальных групп после эвтаназии проведен забор области хирургического вмешательства в зоне аксотомии седалищного нерва для последующего гистологического исследования. После фиксации в 10 % забуференном формалине и обезживания, фрагменты тканей заливали в парафиновые блоки и изготавливали срезы толщиной 3-4 мкм. Полученные препараты окрашивали гематоксилин-эозином по стандартной методике. Микрофотографирование участков области аксотомии (кожа фасции, поверхностные и глубокие мышцы, сосудисто-нервные пучки) осуществляли при увеличении 40 и 100.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы STATISTICA 10 (Statsoft Inc., США). Графическую обработку данных осуществляли с помощью пакета OriginPro 2021 (OriginLab Corp.). Для оценки значимых различий применяли дисперсионный анализ повторных измерений (repeated-measures ANOVA) с последующими апостериорными сравнениями по методу наименьшей значимой разности. Различия принимали за статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты

Индукция НП у крыс методом аксотомии седалищного нерва приводила к снижению ПНР ипсилатеральной конечности к 7-м сут после операции на 35,5 % (с $136,0 \pm 1,9$ г до $87,7 \pm 2,0$ г, $p < 0,001$), а также к снижению ЛПНР на 34,3 % (с $18,1 \pm 0,6$ с до $11,9 \pm 0,4$ с, $p < 0,001$). Механическая и термическая гипералгезии сохранялись в группе НП без лечения до конца иссле-

дования (рис. 1, а, 1, б). Однократное локальное введение МСК ЖТ в дозе 1×10^6 клеток/кг способствовало полному восстановлению исходных значений ПНР к 14-м сут после введения клеток и данный эффект наблюдали до конца эксперимента ($p > 0,05$) (рис. 1, а). Аналогичная тенденция наблюдалась и при оценке ЛПНР (рис. 1, б) [5].

Внутрибрюшинное введение РЕА в дозе 1 мг/кг с последующей трансплантацией МСК ЖТ приводило к увеличению ПНР ипсилатеральной конечности через 30 мин после инъекции клеток на 10,5 % (с $95,2 \pm 1,0$ г до $105,2 \pm 1,4$ г, $p < 0,05$). К 11-м суткам отмечен дальнейший рост ПНР - на 24,7 % по сравнению со значениями на 7-е сут до введения РЕА (до $118,7 \pm 2,5$, $p < 0,05$). Данная тенденция сохранялась по 60-е сут включительно (рис. 1, а). При исследовании ноцицептивной чувствительности на термический стимул, к 8-м сут после моделирования НП отмечено увеличение ЛПНР до исходного уровня ($p > 0,05$ по сравнению со значением до моделирования НП). С 11-х сут исследования наблюдали усиление термической гипералгезии, аналогичной НП без лечения ($p > 0,05$ по сравнению с НП без лечения) (рис. 1, б). Тенденция к увеличению ЛПНР в данной группе отмечена лишь к 60-м сут исследования.

Гистологическое исследование зоны аксотомии седалищного нерва без лечения на 21-е сут после травмы нерва показало наличие неравномерно выраженного фиброза поверхностной и межмышечной фасций, атрофических изменений мышц, воспалительной инфильтрации в области постоперационного рубца и дистальных участков седалищного нерва (рис. 2, а; рис. 3, а) [5].

После однократного внутримышечного введения исследуемой дозы МСК ЖТ крысам с НП, наблюдали отсутствие воспалительной инфильтрации и значительно менее выраженный фиброз зоны хирургического вмешательства, а также минимальные дистрофические изменения мышц и интенсивный неоангиогенез в сосудисто-нервном пучке (рис. 2, б; рис. 3, б) [5].

При курсовом внутрибрюшинном введении РЕА после однократной локальной трансплантации МСК ЖТ в зоне аксотомии седалищного нерва крыс наблюдали наличие отека подкожно-жировой клетчатки, дермы и межмышечной фасции, слабовыраженный фиброз поверхностной фасции с диффузной скудной лимфоцитарной инфильтрацией с примесью нейтрофилов, наряду с выраженным фиброзом межмышечной фасции с аналогичной воспалительной инфильтрацией (рис. 2, в). Очаги неравномерной атрофии отмечены у поверхностных и глубоких мышц на фо-

не умеренной гиперплазии глубоких мышц, фокусы межмышечного липоматоза, а также пролиферация клеток перимизия (рис. 2, в). В сосудисто-нервном пучке обнаружен выраженный фиброз эпи- и периневрия, отек периневрия и слабо выраженная воспалительная инфильтрация, а в нервных стволах — неоваскуляризация и пролиферация шванновских клеток (рис. 3, в). Глубокие ветви седалищного нерва задней лапы крысы характеризовались отеком нервных стволов в сосудисто-нервном пучке (рис. 3, в). В целом, при сочетании однократного введения МСК ЖТ в дозе 1 млн клеток с курсовым введением РЕА наблюдались признаки активного воспалительного процесса в сочетании с активацией и пролиферацией клеток перимизия, фибробластов, шванновских клеток по сравнению с группой животных, которым трансплантировали только МСК ЖТ.

Обсуждение

Нейропатическая боль — это стойкая боль, вызванная повреждением нерва, которая может длиться от нескольких месяцев до нескольких лет, даже после того, как первичное повреждение ткани зажило. Современ-

ные методы лечения нейропатической боли не всегда успешны и могут сопровождаться серьезными побочными эффектами. В этой связи поиск альтернативных подходов к купированию нейропатической боли остается по-прежнему актуальным. В ряде исследований было показано, что трансплантация МСК снижает прогрессирование боли при моделировании нейропатии различного происхождения. В различных моделях нейропатической боли МСК вводили как непосредственно в очаг поражения, так и системно в кровоток [11, 18]. Например, внутривенная инъекция МСК костного мозга уменьшала механическую аллодинию и термическую гипералгезию в моделях хронического лигирования седалищного нерва [18] и подглазничного нерва [19] у грызунов, а также в моделях частичного повреждения нерва [20]. Внутримышечная инъекция МСК уменьшала механическую аллодинию и боль, вызванную холодом, в модели диабета, индуцированного стрептозотоцином [21], а также в модели орофациальной боли, вызванной перевязкой подглазничного нерва [19]. Внутриванггионарные и интратекальные инъекции МСК ослабляли механическую аллодинию и термическую гипералгезию при лигировании периферического нерва у крыс [22].

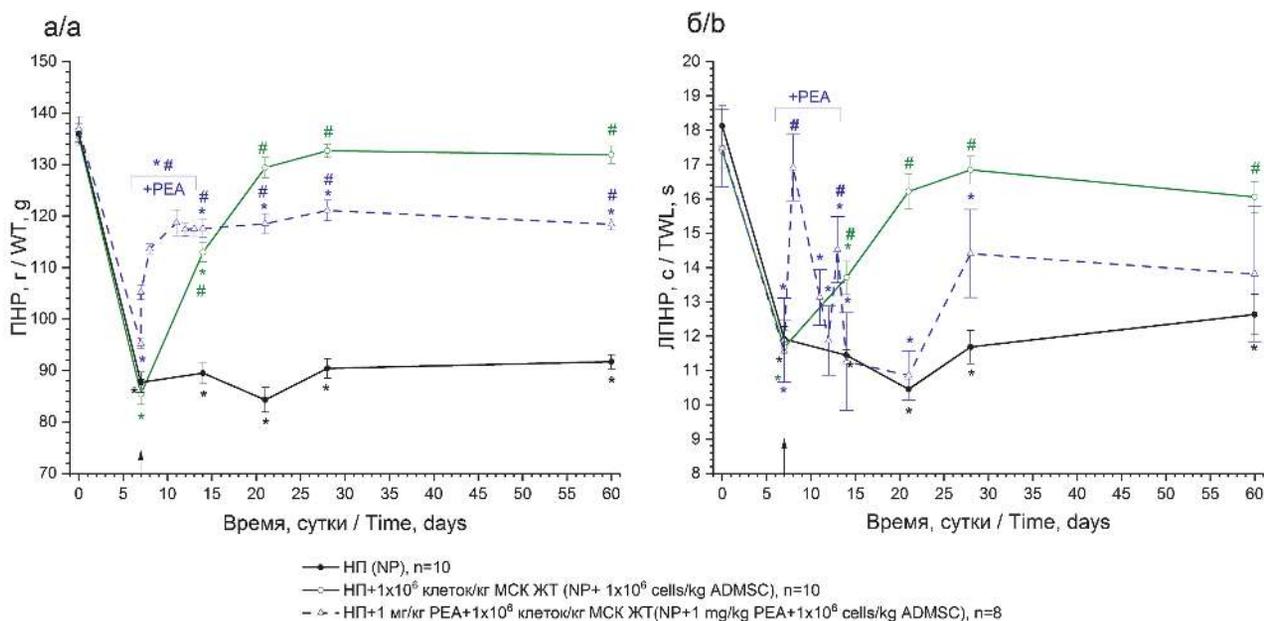


Рис. 1. Изменения порога ноцицептивной реакции (ПНР) ипсилатеральной конечности (а) и латентного периода ноцицептивной реакции (ЛПНР) (б) крыс после моделирования нейропатии (НП), однократного введения мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) (отмечено стрелкой) и курсовым внутрибрюшинным введением пальмитоилэтаноламида (РЕА); * – $p < 0,05$ по сравнению со значением до моделирования НП; # – $p < 0,05$ по сравнению с НП без лечения.

Fig. 1. Changes in withdrawal threshold (WT) of ipsilateral hind paw (a) and thermal withdrawal latency (TWL) (b) in rats with neuropathic pain model (NP) after single injection of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSC) and course intraperitoneal injections with palmitoylethanolamide (PEA) * – $p < 0.05$ compared to the baseline values; # – $p < 0.05$ compared to NP without treatment.

В нашей относительно недавней статье мы продемонстрировали долгосрочное анальгезирующее действие однократной трансплантации МСК ЖТ в зону повреждения нерва [5]. Внутримышечное введение МСК ЖТ в дозе 1×10^6 клеток/кг облегчало симптомы ранней и поздней нейропатической боли, включая механическую аллодинию и термическую гипералгезию, в течение нескольких месяцев на модели травматического повреждения седалищного нерва у крыс. Аналогичное по эффективности и продолжительности антиноцицептивное действие МСК ЖТ было воспроизведено и в представленном исследовании (рис. 1). Более того, гистологическое исследование показало, что введение МСК ЖТ в наших экспериментах пода-

вляло воспалительную инфильтрацию и прогрессирующее развитие фиброза в зоне повреждения, а также способствовало снижению степени атрофии мышечных волокон по сравнению с контрольной группой животных.

Все больше данных свидетельствует о том, что ключевую роль в возникновении и поддержании хронической боли (в том числе и нейропатической) играет воспаление в периферической и центральной нервной системе (ПНС и ЦНС). Характерные признаки нейровоспаления при хронических болевых состояниях включают инфильтрацию иммунных клеток в ПНС (например, седалищный нерв и ганглии задних корешков), активацию микроглии и астроцитов в ЦНС, и секрецию провоспалительных цитокинов и хемоки-

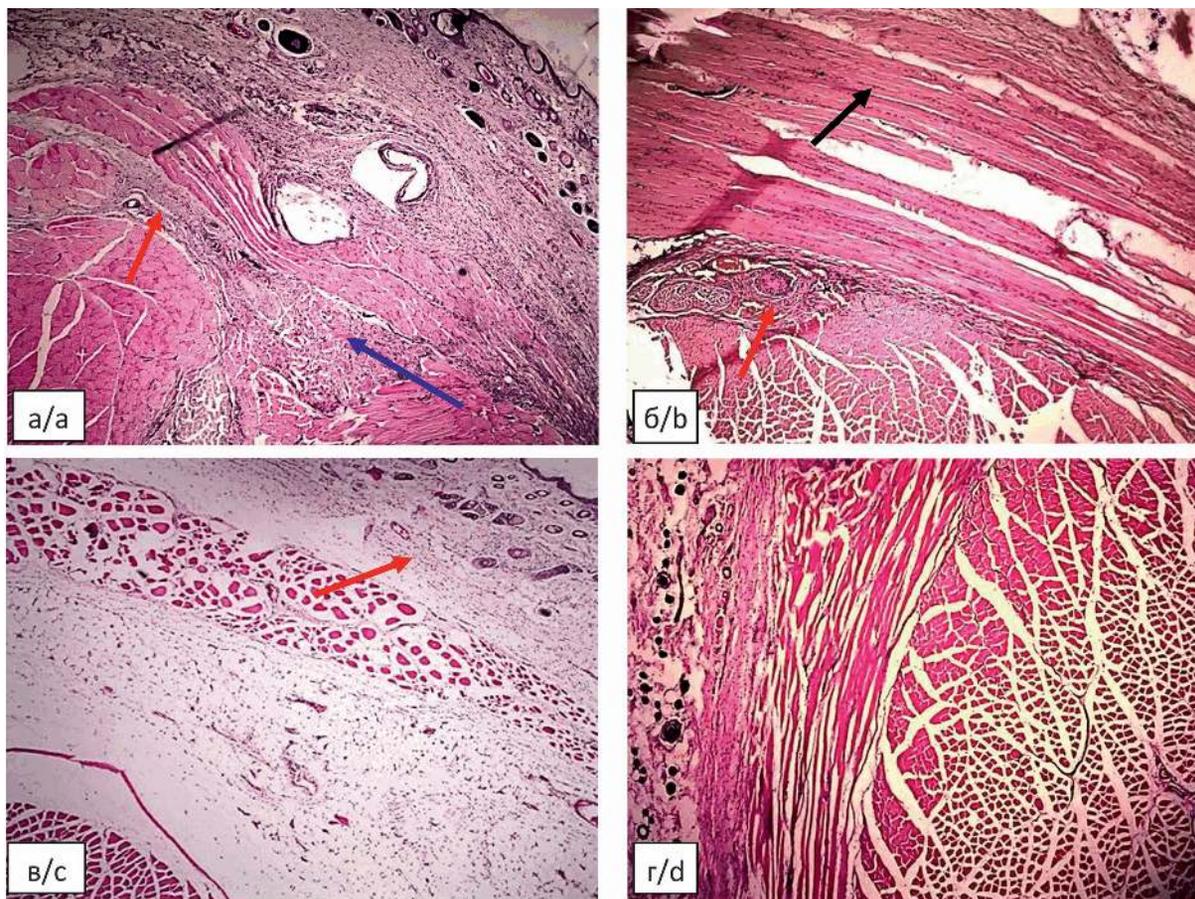


Рис. 2. Морфологические изменения мягких тканей задней лапы крыс на 21-е сутки после моделирования нейропатии без лечения (а), с аллогенной трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) (б) и в сочетании с курсовым внутривнутрибрюшинным введением пальмитоилэтаноламида (PEA) (в); гистоструктура мягких тканей задней лапы интактных крыс (г). Красная стрелка – воспалительная инфильтрация и фиброз; синяя стрелка – атрофия мышц; черная стрелка – гипертрофия мышц. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 40.

Fig. 2. Morphological changes in rat hind paw tissues on 21st day after modeling of neuropathic pain (a), with allogenic transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) (b) and combined with course intraperitoneal injections with palmitoylethanolamide (PEA) (c); histostructure of intact rat hind paw tissues (d). Red arrow – inflammatory infiltration and fibrosis; blue arrow – muscle atrophy; black arrow – muscle hypertrophy. Hematoxylin and eosin stain, magnification 40.

нов [7, 9]. Как уже было упомянуто выше, механизмы анальгетического действия МСК изучены не до конца. Вместе с тем принято считать, что антиноцицептивные эффекты стволовых клеток прежде всего обусловлены паракринным действием секретируемых ими биологически активных молекул. Именно продукцией и выделением таких иммуномодуляторных или противовоспалительных субстанций как TGF- β , IL-10, HGF-1 и др. может быть обусловлено обезболивающее и нейропротекторное действие МСК ЖТ. Накопленные данные свидетельствуют о том, что TGF- β 1 ингибирует вызванную повреждением нерва активацию и пролиферацию клеток микроглии и астроцитов, а также снижает экспрессию и секрецию воспалительных цитокинов [7]. HGF-1 представляет собой

паракринный фактор клеточного роста, подвижности и морфогенеза, с активацией которого связан ряд регенеративных процессов. Подобно другим ростовым факторам, участвующим в репарации тканей, HGF-1 проявляет иммуномодулирующую активность [7]. Его роль в уменьшении хронической боли была признана, и способность стволовых клеток к секреции субстанции также доказана [22].

С другой стороны, повреждение нервной ткани или воспаление может сопровождаться активацией образования эндогенных липидных сигнальных молекул, функционирование которых направлено на поддержание гомеостаза и оказание протекторных эффектов. Одной из таких молекул является PEA. Этот представитель семейства N-ацилэтаноломинов жирных кис-

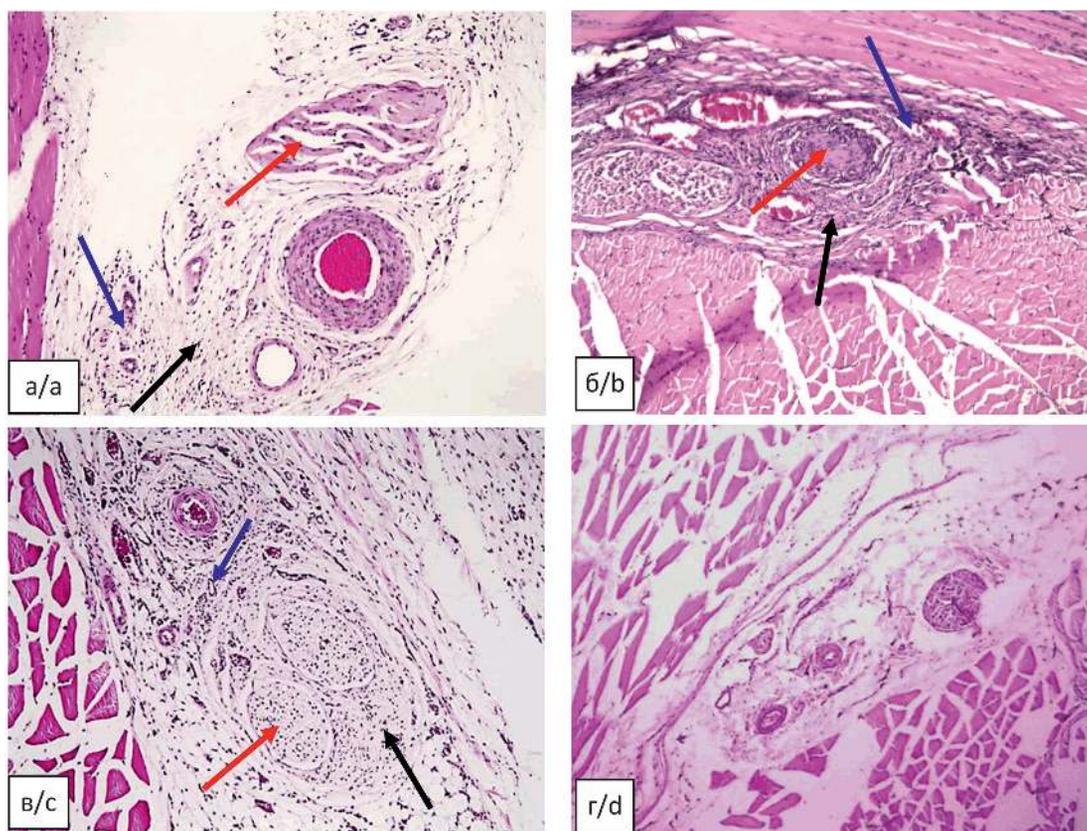


Рис. 3. Морфологические изменения сосудисто-нервного пучка мягких тканей задней лапы крыс на 21-е сут после моделирования нейропатии (НП) (а), с аллогенной трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) (б) и в сочетании с курсовым внутривенным введением пальмитоилэтананоламида (PEA) (в); гистоструктура мягких тканей задней лапы intactных крыс (г). Красная стрелка – демиелинизация и разволокнение нервного ствола; синяя стрелка – неоангиогенез; черная стрелка – фиброз. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 40.

Fig. 3. Morphological changes in rat hind paw neurovascular bundle on 21st day after modeling of neuropathic pain (a), with allogeneic transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) (b) and combined with course intraperitoneal injections with palmitoylethanolamide (PEA) (c); histostructure of intact rat hind paw tissues (d). Red arrow – demyelination and nerve tearing; blue arrow – neoangiogenesis; black arrow – fibrosis. Hematoxylin and eosin stain, magnification 40.

лот является аутоакоидом и вырабатывается “по требованию” во всех тканях в качестве защитной реакции на травму, воспаление и боль. [9, 23]. Однако при затянувшемся синдроме боли или хроническом воспалении может развиваться «истощение» РЕА. [23]. Экзогенное введение данного липида может в таких случаях служить восполнению его эндогенного уровня, восстанавливая его защитное, противовоспалительное и обезболивающее действие. Воздействуя прямо или опосредовано на различные мишени как на мембране клетки, так и внутри нее, РЕА, способен предотвращать дегрануляцию тучных клеток, а также, подобно МСК, модулировать выделение про- и противовоспалительных цитокинов и активность микроглии и астроцитов [9, 24].

На основании приведенных выше сведений литературы в совокупности с данными собственных исследований авторы статьи предположили, что комбинированное применение МСК ЖТ и РЕА приведет к синергетическому повышению эффективности их антиноцицептивного и репаративного действия. Последнее, как ожидалось, будет выражаться в существенном сокращении сроков развития как репаративных изменений в периневральных тканях, так и проявления обезболивающего эффекта по сравнению с действием только МСК, а также в еще большем повышении значений ПНР и ЛПНР. Проведенные исследования показали, что действительно у животных, получивших инъекции МСК в комбинации с курсовым введением РЕА, было отмечено быстрое начало антиноцицептивного эффекта при экспериментальном исследовании (рис. 1, а, 1, б). Однако в дальнейшем (после прекращения инъекций РЕА) эффективность анальгетического действия МСК ЖТ, напротив, снизилась по сравнению с таковой у животных, получивших лечение только стволовыми клетками (рис. 1, а, 1, б). Данные тестов на ноцицептивные реакции согласовываются с результатами гистологического исследования седалищного нерва и периневральных тканей крыс разных групп У животных, получивших МСК ЖТ в комбинации с РЕА состояние тканей в зоне аксотомии характеризовалось наличием признаков активного воспаления, тогда как при введении только МСК ЖТ воспалительные проявления были минимальными.

С одной стороны, отсутствие синергизма однократной трансплантации МСК ЖТ и курсового введения РЕА при их комбинации говорит о том, что маловероятно исследуемый аутоакоид вовлечен в реализацию анальгетического действия стволовых клеток в качестве одного из важных звеньев. С другой стороны, отсутствие подтверждения гипотезы о потенцировании

анальгетического и репаративного эффектов, и более того, практически антагонизм двух факторов, по отдельности обладающих выраженным антиноцицептивными и репаративными свойствами, требует отдельно изучения и объяснения.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что сочетание курсового введения РЕА с однократной трансплантацией МСК ЖТ приводило не только к ослаблению антиноцицептивного эффекта, но и к отмене противовоспалительного действия стволовых клеток. Трансплантация МСК ЖТ в комбинации с РЕА не только не превышала по эффективности как антиноцицептивное так и репаративное действие МСК ЖТ, но и приводила к ее снижению. Для объяснения антагонистического взаимодействия РЕА с МСК ЖТ при трансплантации в область повреждения нервной ткани необходимы дальнейшие исследования.

Литература

(п.п. 1–4; 6–9; 11–24 см. References)

- Ерофеева А.-М.В., Жаворонок И.П., Антипова О.А., Счастливая Н.И., Семёник И.А., Рябцева С.Н. и др. Оценка антиноцицептивного действия мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при экспериментальной периферической нейропатической боли. *Новости хирургии*. 2021; 29(5): 527–34. <https://dx.doi.org/10.18484/2305-0047.2021.5.527>
- Молчанова А.Ю., Жаворонок И.П., Пехтерева Е.И., Антипова О.А., Мелик-Касумов Т.Б., Павлють Т.О. и др. Антиноцицептивный эффект системного введения пальмитоилэтаноламида, стеароилэтаноламида и диклофенака натрия у крыс с экспериментальным нейрогенным болевым синдромом. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук*. 2018; 15(3): 331–8. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2018-15-3-331>

References

- Finnerup N.B., Kuner R., Jensen T.S. Neuropathic pain: from mechanisms to treatment. *Physiological Reviews*. 2021; 101(1): 259–301. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2019>
- Scuteri D., Piro B., Morrone L.A., Corasaniti M.T, Vulnera M., Bagetta G. The need for better access to pain treatment: learning from drug consumption trends in the USA. *Functional Neurology*. 2017; 22(4): 229–30. <https://doi.org/10.11138/fneur/2017.32.4.229>
- Han Y.H., Kim K.H., Abdi S., Kim T.K. Stem cell therapy in pain medicine. *Korean Journal of Pain*. 2019; 32(4): 245–55. <https://doi.org/10.3344/kjp.2019.32.4.245>
- Zhou Y., Yamamoto Y., Xiao Z., Ochiya T. The Immunomodulatory Functions of Mesenchymal Stromal/Stem Cells Mediated via Paracrine Activity. *Journal of Clinical Medicine*. 2019; 8(7): 1025. <https://doi.org/10.3390/jcm8071025>
- Yerofeyeva A.M.V., Zhavarank I.P., Antipova O.A., Schastnaya N.I., Siamionik I.A., Rjabceva S.N., et al. Assessment of anti-nociceptive

- actions of adipose-derived mesenchymal stem cells in experimental peripheral neuropathic Pain. *Novosti Khirurgii*. 2021; 29(5): 527–34. (in Russian) <https://dx.doi.org/10.18484/2305-0047.2021.5.527>
6. Yousof S.M., ElSayed D.A., El-Baz A.A., Sallam H.S., Abbas F. Combined treatment of adipose derived-mesenchymal stem cells and pregabalin is superior to monotherapy for the treatment of neuropathic pain in rats. *Stem Cells International*. 2021; 2021: 8847110. <https://doi.org/10.1155/2021/8847110>
 7. Huh Y., Ji R.R., Chen G. Neuroinflammation, bone marrow stem cells, and chronic pain. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8: 1014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01014>
 8. Rossi F., Bernardo M.E., Bellini G., Luongo L., Conforti A., Manzo I., et al. The cannabinoid receptor type 2 as mediator of mesenchymal stromal cell immunosuppressive properties. *PLoS One*. 2013; 8(11): e80022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080022>
 9. Clayton P., Subah S., Venkatesh R., Hill M., Bogoda N. Palmitoylethanolamide: A Potential Alternative to Cannabidiol [published online ahead of print]. *Journal of Diet Supplements*. 2021: 1-26. <https://doi.org/10.1080/19390211.2021.2005733>
 10. Molchanova A.Y., Zhavoronok I.P., Pekhtereva E.I., Antipova O.A., Melik-Kasumov T.B., Pavlyut' T.O., et al. Antinociceptive effect of a systemic administration of palmitoylethanolamide, stearoylethanolamide and dyclofenac in rats with experimental neurogenic pain syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Medical series*. 2018; 15(3): 331-8. (in Russian) <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2018-15-3-331>
 11. Scuteri D., Guida F., Boccella S., Palazzo E., Maione, S., Rodríguez-Landa J.F. Effects of palmitoylethanolamide (PEA) on nociceptive, musculoskeletal and neuropathic pain: systematic review and meta-analysis of clinical evidence. *Pharmaceutics*. 2022; 14(8): 1672. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081672>
 12. Keppel Hesselink J.M., Kopsky D.J. Palmitoylethanolamide, a nutraceutical, in nerve compression syndromes: efficacy and safety in sciatic pain and carpal tunnel syndrome. *Journal of Pain Research*. 2015; 8: 729-734. <https://doi.org/10.2147/JPR.S93106>
 13. Petrosino S., Schiano Moriello A., Cerrato S., Fusco M., Puigdemont A., De Petrocellis L., et al. The anti-inflammatory mediator palmitoylethanolamide enhances the levels of 2-arachidonoyl-glycerol and potentiates its actions at TRPV1 cation channels. *British Journal of Pharmacology*. 2016; 173: 1154-62. <https://doi.org/10.1111/bph.13084>
 14. Lo Verme J., Fu J., Astarita G., La Rana G., Russo R., Calignano A., et al. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Molecular Pharmacology*. 2005; 67(1): 15-19. <https://doi.org/10.1124/mol.104.006353>
 15. Ryberg E., Larsson N., Sjögren S., Hjorth S., Hermansson N.O., Leonova J., et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology*. 2007; 152(7): 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707460>
 16. Bettoni I., Comelli F., Colombo A., Bonfanti P., Costa B. Non-neuronal cell modulation relieves neuropathic pain: efficacy of the endogenous lipid palmitoylethanolamide. *CNS Neurological Disorders Drug Targets*. 2013; 12(1): 34-44. <https://doi.org/10.2174/1871527311312010008>
 17. Deuis J.R., Dvorakova L.S., Vetter I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2017; 10: 284. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00284>
 18. Guo W., Chu Y.X., Imai S., Yang J.L., Zou S., Mohammad Z., et al. Further observations on the behavioral and neural effects of bone marrow stromal cells in rodent pain models. *Molecular Pain*. 2016; 12: 1744806916658043. <https://doi.org/10.1177/1744806916658043>
 19. Guo W., Wang H., Zou S., Gu M., Watanabe M., Wei F., et al. Bone marrow stromal cells produce long-term pain relief in rat models of persistent pain. *Stem Cells*. 2011; 29(8): 1294-1303. <https://doi.org/10.1002/stem.667>
 20. Siniscalco D., Giordano C., Galderisi U., Luongo L., de Novellis V., Rossi F., et al. Long-lasting effects of human mesenchymal stem cell systemic administration on pain-like behaviors, cellular, and biomolecular modifications in neuropathic mice. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 2011; 5: 79. <https://doi.org/10.3389/fnint.2011.00079>
 21. Naruse K., Sato J., Funakubo M., Hata M., Nakamura N., Kobayashi Y., et al. Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells improves mechanical hyperalgesia, cold allodynia and nerve function in diabetic neuropathy. *PLoS One*. 2011; 6(11): e27458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027458>
 22. Li J., Deng G., Wang H., Yang M., Yang R., Li X., et al. Interleukin-1 β pre-treated bone marrow stromal cells alleviate neuropathic pain through CCL7-mediated inhibition of microglial activation in the spinal cord. *Scientific Reports*. 2017; 7: 42260. <https://doi.org/10.1038/srep42260>
 23. Skaper S.D., Facci L., Giusti P. Mast cells, glia and neuroinflammation: partners in crime? *Immunology*. 2014; 141(3): 314-27. <https://doi.org/10.1111/imm.12170>
 24. Cordaro M., Impellizzeri D., Paterniti I., Bruschetta G., Siracusa R., De Stefano D., et al. Neuroprotective Effects of Co-UltraPEALut on Secondary Inflammatory Process and Autophagy Involved in Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*. 2016; 33(1): 132-46. <https://doi.org/10.1089/neu.2014.3460>

Сведения об авторах:

Ерофеева Анна-Мария Вадимовна, аспирант, мл. науч. сотр., лаб. модуляции функций организма;

Антипова Ольга Александровна, науч. сотр., лаб. модуляции функций организма;

Жаворонок Ирина Петровна, канд. биол. наук, зав. лаб. модуляции функций организма;

Рябцева Светлана Николаевна, канд. мед. наук, зав. лаб. «Центр электронной и световой микроскопии»;

Молчанова Алла Юрьевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. модуляции функций организма.

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092

Гребнев Д.Ю.^{1,2}, Маклакова И.Ю.^{1,2}, Корнилов Д.О.¹, Симарзина В.М.¹, Тряпицын М.А.¹, Казанцев Ю.А.¹, Зорников Д.Л.¹, Григорьева Ю.В.¹, Фадеев Ф.А.^{1,2}

Ингибирование опухолевого роста в клеточной культуре остеосаркомы с помощью микроРНК mir162a

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**Цель исследования** – изучение влияния микроРНК mir162a на жизнеспособность опухолевых клеток линии остеосаркомы SAOS-2.**Методика.** Исследования выполнены на клеточной линии SAOS-2. Была произведена трансфекция микроРНК mir162a в дозе 90 пмоль. Через 24, 48 и 72 ч после трансфекции методом флуоресцентной микроскопии производился подсчет жизнеспособных клеток, клеток в состоянии некроза и апоптоза, а также оценивался уровень аутофагии.**Результаты.** Трансфекция клеток SAOS-2 микроРНК mir162a через 24, 48, 72 ч приводила к снижению доли жизнеспособных клеток, увеличению доли клеток с признаками апоптоза и некроза по сравнению с контрольными образцами. Через 24 ч с момента трансфекции процент жизнеспособных клеток в опытных образцах был ниже чем в контрольных на 29,3%, через 48 ч – на 33,9%, через 72 ч – на 47,4%. Трансфекция SAOS-2 микроРНК mir162a приводила к четырехкратному снижению активности аутофагии.**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о наличии у микроРНК mir162a терапевтического потенциала в качестве средства патогенетической терапии злокачественных опухолевых заболеваний.**Ключевые слова:** mTOR; mir162a; SAOS-2; микроРНК; РНК-интерференция; остеосаркома; апоптоз; некроз, жизнеспособность клеток; аутофагия**Для цитирования:** Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Корнилов Д.О., Симарзина В.М., Тряпицын М.А., Казанцев Ю.А., Зорников Д.Л., Григорьева Ю.В., Фадеев Ф.А. Ингибирование опухолевого роста в клеточной культуре остеосаркомы с помощью микроРНК mir162a. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(1): 48-55.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.48-55

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Корнилов Д.О.; сбор и обработка материала – Корнилов Д.О., Тряпицын М.А., Симарзина В.М.; подготовка иллюстративного материала – Симарзина В.М., Казанцев Ю.А., Григорьева Ю.В.; статистическая обработка – Тряпицын М.А., Зорников Д.Л.; написание текста – Корнилов Д.О., Казанцев Ю.А., Зорников Д.Л.; редактирование – Гребнев Д.Ю., Зорников Д.Л., Маклакова И.Ю., Фадеев Ф.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.**Для корреспонденции:** Гребнев Дмитрий Юрьевич, e-mail: dr-grebnev77@mail.ru**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям от 9 июня 2021 г.**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.06.2022

Принята к печати 26.01.2023

Опубликована 17.03.2023

Grebnev D.Ju.^{1,2}, Maklakova I.Ju.^{1,2}, Kornilov D.O.¹, Simarzina V.M.¹, Tryapitsyn M.A.¹, Kazancev Ju.A.¹, Zornikov D.L.¹, Grigoryeva Ju.V.¹, Fadeev F.A.^{1,2}

Inhibition of tumor growth in osteosarcoma cell culture with mir162a microRNA

¹Ural State Medical University, Repina St. 3, Yekaterinburg, 620028, Russian Federation;²Institute of Medical Cell Technologies, Karla Marxa St. 22a, Yekaterinburg, 620026, Russian Federation**Aim.** To study the effect of mir162a microRNA on the viability of SAOS-2 osteosarcoma tumor cells.**Methods.** The study was performed on SAOS-2 cell culture. The mir162a microRNA was transfected at a dose of 90 pmol. At 24, 48, 72 hours, viable, apoptotic, and necrotic cells were counted by fluorescence microscopy in the transfected cell culture. Also, the level of cell autophagy was evaluated.

Results. The transfection of SAOS-2 with mir162a decreased the proportion of viable cells and increased the proportion of apoptotic and necrotic cells at 24-72 hours after the procedure. Compared to the negative control, the proportion of viable cells in the mir162a-transfected SAOS-2 samples was decreased by 29.3%, 33.9%, 47.4% at 24, 48, and 72 hours, respectively. The transfection caused a 75% decrease in the autophagy level.

Conclusion. The results suggest that mir162a microRNA has a therapeutic potential for the pathogenetic therapy of malignant neoplasms.

Keywords: MTOR; mir162a; SAOS-2, microRNA; RNA interference; osteosarcoma; apoptosis; necrosis; viability; autophagy

For citation: Grebnev D.Ju., Maklakova I.Ju., Kornilov D.O., Simarzina V.M., Tryapitsyn M.A., Kazancev Ju.A., Zornikov D.L., Grigoryeva Ju.V., Fadeev F.A. Inhibition of tumor growth in osteosarcoma cell culture with mir162a microRNA. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(1): 48-55. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.48-55

Authors' contribution: conception and design of the research – Kornilov D.O.; collection and processing of material – Kornilov D.O., Tryapitsyn M.A., Simarzina V.M.; preparation of illustrative material – Simarzina V.M., Kazantsev Ju.A., Grigoryeva Ju.V.; statistical processing – Tryapitsyn M.A., Zornikov D.L.; writing the text – Kornilov D.O., Kazantsev Ju.A., Zornikov D.L.; editing the text – Grebnev D.Ju., Zornikov D.L., Maklakova I.Ju., Fadeev F.A. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: **Dmitry Ju. Grebnev**, doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Pathological Physiology of the Ural State Medical University, e-mail: dr-grebnev77@mail.ru

Information about the authors:

Grebnev D.Ju., <https://orcid.org/0000-0002-5698-8404>

Maklakova I.Ju., <https://orcid.org/0000-0002-6895-7947>

Kornilov D.O., <https://orcid.org/0000-0001-5311-1247>

Zornikov D.L., <https://orcid.org/0000-0001-9132-215X>

Financing. The study was carried out with financial support from the Foundation for the Promotion of Innovation of June 9, 2021.

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

Received 20.06.2022

Accepted 26.01.2023

Published 17.03.2023

Введение

МикроРНК – это эволюционно консервативные малые некодирующие молекулы РНК длиной 18 – 25 нуклеотидов, обнаруженные у растений, животных и некоторых вирусов, принимающие участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов путем РНК-интерференции. Благодаря уникальным биохимическим и биофизическим свойствам связанного с микроРНК каталитического белкового комплекса RISC (РНК-индуцируемый комплекс нокдаун гена), данные молекулы осуществляют эпигенетическую регуляцию экспрессии поразительно большого количества регуляторных мишеней, в том числе у человека [1].

Имеются данные, что микроРНК может осуществлять экзонный нокдаун эволюционно консервативных генов. В частности, было доказано, что микроРНК растений mir162a подавляет экспрессию mTOR (mTOR у человека) у пчелы медоносной (*Apis mellifera*) при алиментарном потреблении пыльцы, таким образом, останавливая половое созревание

и влияя на определение пчелиной касты как «рабочую» [2].

MTOR – это механическая мишень рапамицина. Является важным регулятором множества неврологических и иммунных процессов. Передача сигналов mTOR вовлечена в процесс старения и инициацию развития многих видов онкологических заболеваний.

Учитывая ключевую роль mTOR в росте и метаболизме клеток, вполне предсказуемо существование связи между активностью пути mTOR и патологическими процессами, включая неопластические. Активация передачи сигналов mTOR участвует в формировании злокачественных новообразований [3]. Передача сигналов mTOR активируется в условиях нарушения регуляции пролиферативных процессов [4]. Изучение способов подавления экспрессии mTOR с помощью микроРНК может иметь большое значение для терапии онкологических заболеваний.

Цель исследования – изучение влияния микроРНК mir162a на жизнеспособность опухолевых клеток линии остеосаркомы SAOS-2.

Методика

Культивирование клеточной линии. В качестве экспериментальной культуры были выбраны клетки остеосаркомы SAOS-2, так как имеются подтвержденные данные о том, что в данной клеточной культуре стабильно наблюдается повышенный уровень экспрессии гена-мишени mTOR [5].

Культивирование проводили в культуральных флаконах T-25 (TPP, Switzerland) в среде, содержащей 88% DMEM, 10% FBS, 0,01% L-глутамин, 0,01% раствора пенициллина и стрептомицина (1:1), в CO₂ инкубаторе (Thermo Scientific 8000, USA) 5% CO₂, при 37 °C. Выполнялся регулярный пересев клеток при достижении 80–100% конfluэнтности по следующей методике: удалялась среда, после трехкратного промывания раствором Хенкса без кальция и магния, во флакон вносили 1 мл 0,25% раствора трипсина с ЭДТА, после чего раствор сразу удалялся. Клетки помещали в CO₂ инкубатор на 3 мин. Затем во флакон вносили 3 мл свежей среды с 15% содержанием FBS. Проводился визуальный контроль отхождения клеток от покрытия флакона с помощью светового инвертированного микроскопа (UNICO IV950, USA). Клеточная суспензия отбиралась в пробирку и центрифугировалась со скоростью 1600 rpm в течение 3 мин. Супернатант удаляли. Осадок ресуспендировали в 12 мл свежей среды (10% FBS), после чего переносили клеточную суспензию в новый культуральный флакон.

Трансфекция образцов клеточной линии остеосаркомы SAOS-2. Была синтезирована антисмысловая микроРНК mir162a последовательности: 5'ucgaaaaaccucgcauccag3' с соответствующей ей комплементарной смысловой последовательностью (ДНК-синтез, Москва). Положительный контроль трансфекции представлял собой смесь микроРНК с аналогичными последовательностями, меченных FAM (флуоресцеин, 450/520 нм).

Для проведения эксперимента вносили клеточную суспензию в стандартные 6-луночные планшеты с указанной выше средой, после чего планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе до достижения 60–80% конfluэнтности.

Образцы культуры клеток были разделены на опытную группу (маркировки «24», «48», «72»), группу контроля трансфекции (маркировки «Negative 24», «Negative 48», «Negative 72») и группу контроля трансфектанта (маркировки «Transfectant Control 24», «Transfectant Control 48», «Transfectant Control 72»).

Для проведения трансфекции готовили реакционную смесь, содержащую 750 мкл среды Opti-MEM

и 45 мкл трансфектанта Lipofectamine RNAiMAX, (Invitrogen, USA). Согласно протоколу производителя, использовали 9 мкл трансфектанта на 1 лунку 6-луночного планшета, за исключением реакционной смеси для отрицательного контроля, в которой должно использоваться 3 мкл трансфектанта на 1 лунку.

Приготовленную реакционную смесь разливали по 150 мкл в 5 пробирок (рис. 1). После чего в пробирку 1 вносили 10 мкл (90 пмоль) положительного контроля трансфекции (микроРНК, меченая флуоресцентной меткой FAM), разбавленного в 140 мкл среды Opti-MEM. В пробирки 2,3 и 4 вносили по 10 мкл mir162a (90 пмоль), разбавленного в 140 мкл Opti-MEM. В пробирку 5 в качестве сравнительного контроля вносили 10 мкл реагента Silencer Select Negative Control No. 2 siRNA (Invitrogen, USA) (30 пмоль неспецифических микроРНК, не имеющих в человеческих клетках генов-мишеней), разбавленного в 140 мкл Opti-MEM. Все пробирки инкубировали 5 мин при комнатной температуре (Lipofectamine RNAiMAX protocol, Invitrogen, Protocol pub. No MAN0007825 Rev. 1.0) [6].

Далее в лунки с образцами клеток, маркированные «Positive», «24», «48», «72» вносили по 250 мкл смеси из пробирок 1, 2, 3 и 4, соответственно. По 100 мкл содержимого пробирки 5 внесли в три лунки с маркировкой «Negative 24», «Negative 48», «Negative 72». В три лунки с маркировкой «Transfectant Control 24», «Transfectant Control 48», «Transfectant Control 72» вносили по 250 мкл Opti-MEM с целью контроля токсичности трансфектанта (рис. 1).

После процедуры трансфекции клетки культивировали в течение 24, 48, 72 ч в CO₂-инкубаторе 5% CO₂, при 37 °C.

Положительный контроль трансфекции. Положительный контроль трансфекции производили с помощью люминесцентного микроскопа MCX 300 Orchid НВО (Micros, Austria). Через 24 ч после процедуры готовили клеточную суспензию по методике посева клеток, указанной в пункте «Культивирование клеточной линии» (за исключением того, что клетки ресуспендировали в холодном растворе PBS). Далее 10 мкл клеточной суспензии наносили на предметное стекло, высушивали и фиксировали метанолом. Полученный препарат в течение 10 мин обрабатывали DAPI (диапазон 340/425 нм) для визуализации ядер. Через 24 ч в диапазоне 340/425 нм визуализировали ядра клеток, в диапазоне 450/520 нм регистрировали люминесценцию меченой FAM микроРНК в липидных наногранулах в цитоплазме клеток, что свидетельствовало о проникновении mir162a в клетки. Предварительно был проведен отрицательный контроль – при люми-

несцентной микроскопии клеток без DAPI – аутолюминесценции не было обнаружено.

Анализ показателей некроза, апоптоза, жизнеспособности клеток. Клетки для приготовления микроскопических препаратов промывали раствором солей Хенкса без кальция и магния, после чего заливали 1 мл холодного раствора Версена. Далее клетки аккуратно «отскребали» от поверхности лунок цитологическим скребком (так как добавление раствора трипсина может приводить к нарушению целостности мембран исследуемых клеток и, соответственно, к искажению результатов анализа). Отделенные клетки в холодном растворе Версена отбирали в пробирку типа Эппендорф, центрифугировали при 300g 5 мин, после чего удаляли супернатант.

Для выявления клеток с индуцированным апоптозом, некрозом, жизнеспособных клеток использовали набор Apoptosis/Necrosis Assay Kit (blue, red, green) (Abcam, UK). Была приготовлена реакционная смесь согласно протоколу производителя (Ab176750 Apoptosis/Necrosis Detection Kit (blue, red, green) protocol, Abcam, Version 2c Last Updated 12 December 2018) [8], в которой ресуспендировали образец клеток и инкубировали 60 мин при комнатной температуре. После чего 10 мкл суспензии с окрашенными клетками переносили на предметное стекло, высушивали и фиксировали метанолом.

После испарения метанола препараты микроскопировали в каналах FITC (диапазон 450/520 нм) для анали-

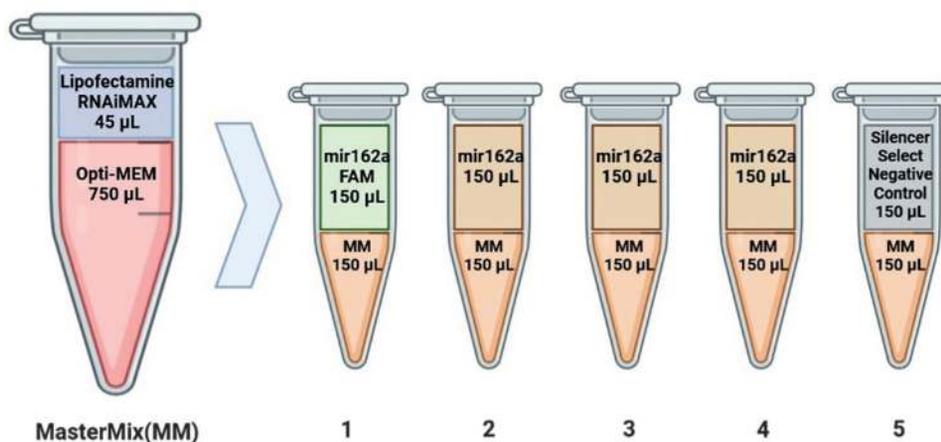


Рис. 1. Схема приготовления реакционных смесей для трансфекции.

Fig. 1. Scheme of preparation of reaction mixtures for transfection.

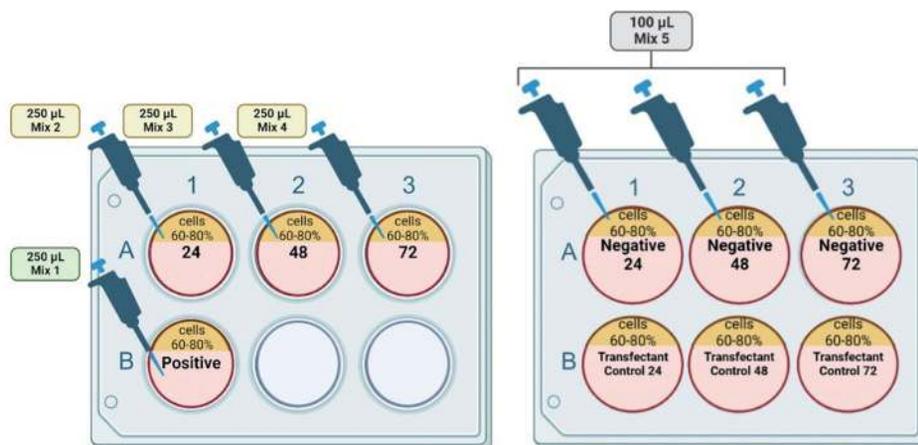


Рис. 2. Схема трансфекции экспериментальной микроРНК mir162a в культуру клеток SAOS-2.

Fig. 2. Scheme of transfection of experimental mir162a microRNA into SAOS-2 cell culture.

за Aproxin Green Indicator (клетки с индуцированным апоптозом), TRITC (диапазон 630/660 нм) для анализа 200X 7-AAD (клетки с индуцированным некрозом) и Violet (диапазон 340/425 нм) для анализа Cyto Calcein Violet 450 (жизнеспособные клетки). В 10 полях зрения (одинаковые 10 полей для всех трех длин волн), меняя светофильтр, подсчитывали количество клеток с индуцированным апоптозом, некрозом и жизнеспособных клеток (микроскоп MCX 300 Orchid HBO, Micros, Austria).

Анализ показателя индуцированной аутофагии. Препараты клеток для оценки аутофагии получали таким же способом как для оценки апоптоза, некроза, жизнеспособности. Для выявления клеток с индуцированной аутофагией был использован набор Autophagy Assay Kit (Merck, Germany), содержащий МАК-138 согласно протоколу производителя с 30-минутной инкубацией (МАК138 Autophagy Assay Kit Technical bulletin, Sigma-Aldrich, Merck, Germany, last updated 2020) [9]. С помощью микроскопа MCX 300 Orchid HBO (Micros, Austria) в 10 полях зрения подсчитывали количество клеток с индуцированной аутофагией в канале Violet (диапазон 340/425 нм) и общее количество клеток в проходящем свете.

Методы статистического анализа. Для сравнения доли клеток с индуцированным апоптозом, некрозом,

жизнеспособных клеток, клеток с индуцированной аутофагией в опытных и контрольных образцах рассчитывали двусторонний критерий Фишера в свободно распространяемой программе WinPepi 11.65. Различия считали статистически значимыми при уровне $\alpha=0,05$.

Результаты

Через 24 ч после трансфекции в диапазоне 450/520 нм регистрировали люминесценцию липидных наногранул с меченой FAM микроРНК в цитоплазме клеток, что свидетельствовало об успешной трансфекции образцов клеток.

Визуализация клеток представлена на **рис. 3**.

Для опытных и контрольных образцов (контроль трансфекции и контроль трансфектанта) SAOS-2 подсчитывали количество клеток с индуцированным апоптозом, некрозом и жизнеспособных клеток в 10 полях зрения для каждого образца перед трансфекцией и через 24, 48, 72 ч. Далее в каждом исследуемом образце рассчитывали долю клеток с индуцированным апоптозом, некрозом и жизнеспособных клеток от их общего количества в наблюдаемых полях зрения (**рис. 4, 5**).

Непосредственно перед трансфекцией отмечали одинаковый процент жизнеспособных клеток, клеток с индуцированным апоптозом и некрозом в опытном образце и образце культуры клеток SAOS-2, трансфицированных Silencer Select Negative Control No. 2. Через 24, 48 и 72 ч после трансфекции фиксировали значительно меньшую долю жизнеспособных клеток в опытных образцах. Уже через 24 ч с момента трансфекции доля жизнеспособных клеток была на 29,3% ниже чем в контрольном образце ($p<0.001$), через 48ч – на 33,9% ($p<0.001$), через 72ч – на 47,7% ($p<0.001$). Соответственно, в трансфицированных mir162a образцах увеличивались доли клеток с индуцированным апоптозом и некрозом. Соответственно, в трансфицированных mir162a образцах увеличивались доли клеток с индуцированным апоптозом и некрозом. Через 24 ч отмечали на 16,5% большую долю клеток с апоптозом, через 48 ч – на 13% большую долю клеток с апоптозом и на 20,8% большую долю клеток с некрозом, через 72 ч – на 40,8% большую долю клеток с некрозом (все различия статистически значимы, $p<0,05$).

Учитывая разные количества микроРНК и липофектамина, использованные при трансфекции mir162a и Silencer Select Negative Control No. 2, был проведен дополнительный контроль токсичности трансфектанта. В качестве данного контроля (контроля трансфектанта) использовали образцы клеток в среде Opti-MEM свободные от липофектамина

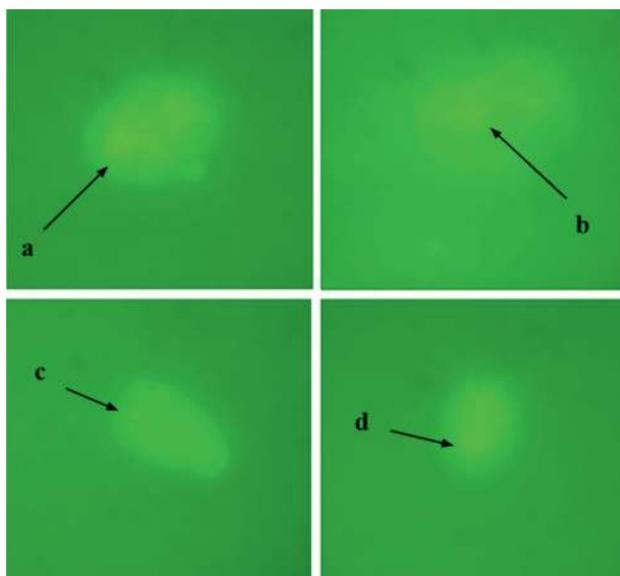


Рис. 3. Люминесценция липидных наногранул с меченой FAM микроРНК в цитоплазме трансфицированных клеток (a, b, c, d) (ув.1000, диапазон 450/520 нм).

Fig. 3. Luminescence of lipid nanogranules with FAM-labeled microRNA in the cytoplasm of transfected cells (a, b, c, d) (1000 magnification, 450/520 nm range).

и экспериментальных микроРНК. Отсутствие значимых различий по показателям жизнеспособности клеток в образцах SAOS-2, трансфицированных Silencer Select Negative Control No. 2 (контроль трансфекции) и в образцах SAOS-2 без трансфекции (контроль трансфектанта) свидетельствует об отсутствии влияния трансфектанта Lipofectamine RNAiMAX и реагента Silencer Select Negative Control No. 2 на жизнеспособность исследуемых клеток.

Для оценки индуцированной аутофагии в опытных и контрольных образцах SAOS-2 аналогичным образом рассчитывали количество и процент клеток в 10 полях

зрения для каждого образца перед трансфекцией и через 24, 48, 72 часа после (рис. 6, а).

Непосредственно перед трансфекцией и через 24 ч от момента процедуры фиксировали сопоставимые проценты клеток с индуцированной аутофагией в опытных и контрольных образцах. Через 48 и 72 ч доля клеток с индуцированной аутофагией в образцах SAOS-2, трансфицированных mir162a, была значимо ниже таковой в контрольных образцах. Так, через 72 ч в опытном образце регистрировали четырехкратно меньший процент клеток с индуцированной аутофагией (76% против 19% в образце группы контроля трансфекции).

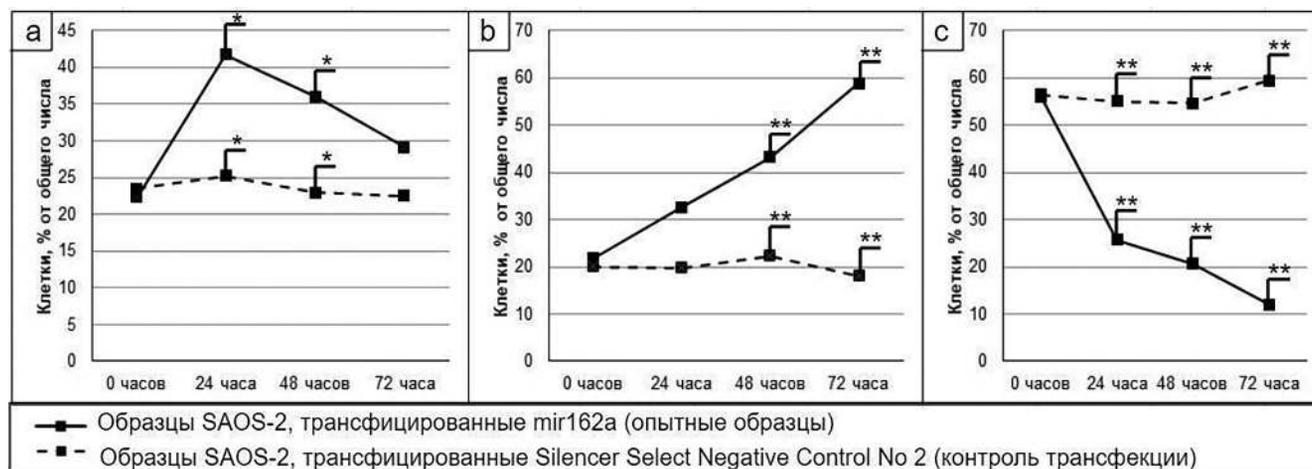


Рис. 4. Показатели индуцированного апоптоза (а), некроза (б) и жизнеспособности (с) в образцах культуры клеток SAOS-2, трансфицированных mir162a и Silencer Select Negative Control No. 2. * Различия статистически значимы при $p < 0.05$, ** Различия значимы при $p < 0.001$.

Fig. 4. Induced apoptosis (a), necrosis (b), and viability (c) indices in SAOS-2 cell culture samples transfected with mir162a and Silencer Select Negative Control No. 2. * Differences are statistically significant at $p < 0.05$, ** Differences are significant at $p < 0.001$.

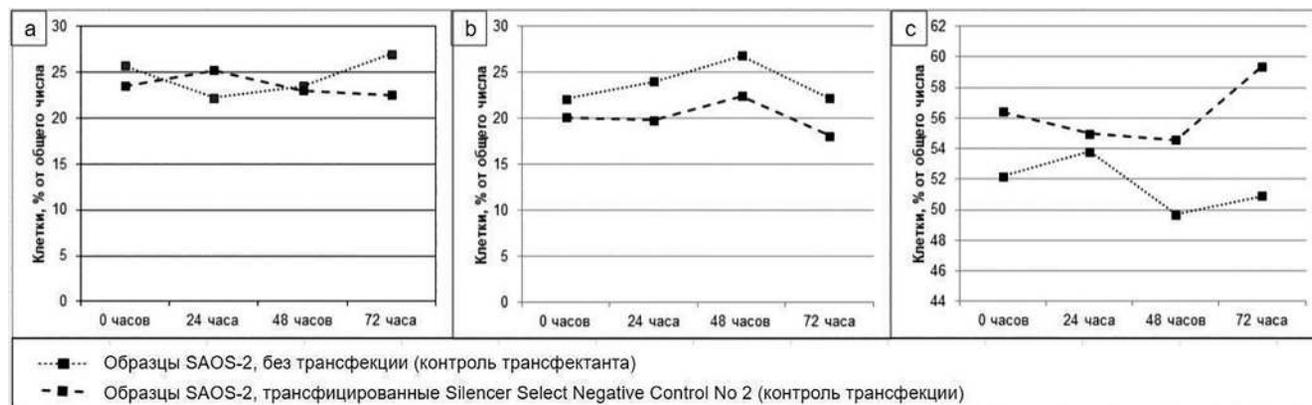


Рис. 5. Показатели индуцированного апоптоза (а), некроза (б) и жизнеспособности (с) в образцах культуры клеток SAOS-2, без трансфекции и трансфицированных Silencer Select Negative Control No. 2.

Fig. 5. Induced apoptosis (a), necrosis (b), and viability (c) indices in SAOS-2 cell culture samples without transfection and transfected with Silencer Select Negative Control No. 2.

Отсутствие значимых различий по показателям индуцированной аутофагии в образцах SAOS-2, трансфицированных Silencer Select Negative Control No. 2 (контроль трансфекции) и в образцах SAOS-2 без трансфекции (контроль трансфектанта) свидетельствовало об отсутствии влияния трансфектанта Lipofectamine RNAiMAX и реагента Silencer Select Negative Control No. 2 на уровень индуцированной аутофагии в исследуемых клетках (рис. 6, b).

Обсуждение

Полученные результаты могут быть связаны с ролью mTOR в пролиферации опухолевых клеток. В частности, ингибирование mTOR с помощью микроРНК miR162a приводит к снижению синтеза ДНК, снижает пролиферацию и подавляет пластический обмен, способствуя инициации апоптоза [7].

Статистически значимое снижение жизнеспособности трансфицированных клеток на третьи сутки может свидетельствовать о значительном нокдауне гена-мишени mTOR.

Зарегистрированное снижение уровня аутофагии опухолевых клеток SAOS-2 в течение 48-72 ч после трансфекции miR162a может свидетельствовать о подавлении mTOR зависимой аутофагии. Учитывая возможную роль mTOR-зависимой аутофагии в активации пролиферации опухолевых клеток [10], снижение аутофагии в результате трансфекции miR162a может являться одним из механизмов, приводящих к гибели опухолевых клеток.

Увеличение числа клеток с индуцированным некрозом на фоне пропорционального снижения количества апоптотизированных клеток через 48-72 ч с момента трансфекции может быть связано с особенностью работы тест-системы. Краситель 7-AAD, используемый для визуализации клеток с индуцированным некрозом, обнаруживает клетки связываясь с ДНК при повышении проницаемости клеточной мембраны. Следовательно, данный реактив детектирует и некротизированные клетки, и клетки с индуцированным апоптозом по прошествии достаточного периода времени для нарушения целостности клеточных мембран [8].

Исследование онкосупрессорных микроРНК в диагностике и лечении остеосаркомы имеет большое прикладное значение. Ранее, при остеосаркоме исследователями изучались онкосупрессорные свойства микроРНК miR-410, мишенью которой является ген TRIM44 в клетках остеосаркомы; miR-410 подавляла пролиферацию, миграцию и инвазию опухолевых клеток, что было выяснено методом иммуногистохимии [11].

Другие исследователи отмечали ингибирование экспрессии гена HMGB1 в клетках остеосаркомы методом проточной цитометрии, что приводило к снижению их пролиферации [12]. Имеются сведения об ингибировании пролиферации и инвазии клеток остеосаркомы путем нокдауна гена ZEB2 микроРНК miR-101 [13]. Однако использование микроРНК растительного происхождения в качестве средств патогенетической терапии остеосаркомы ранее не рас-

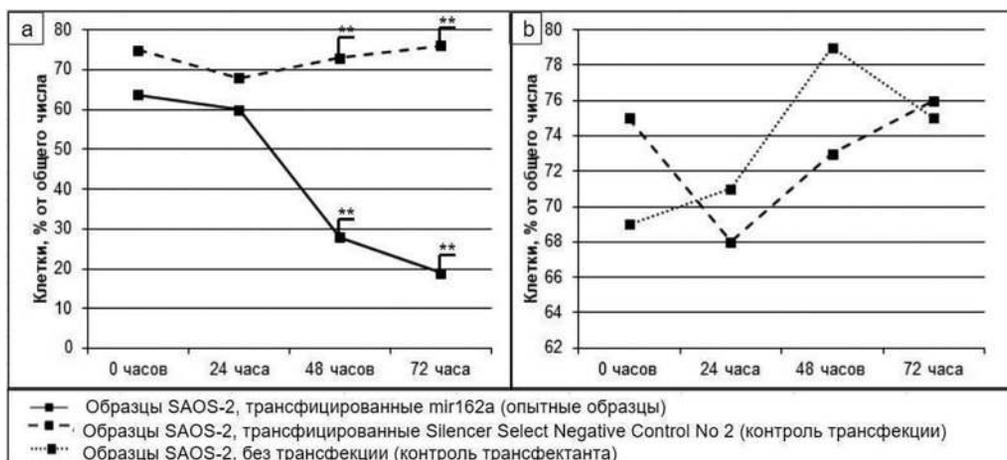


Рис. 6. Доля клеток с индуцированной аутофагией в образцах культуры клеток SAOS-2, трансфицированных miR162a и Silencer Select Negative Control No. 2. (a), без трансфекции и трансфицированных Silencer Select Negative Control No. 2. (b); ** – различия статистически значимы, $p < 0.001$.

Fig. 6. Proportion of cells with induced autophagy in SAOS-2 cell culture samples transfected with miR162a and Silencer Select Negative Control No. 2. (a), without transfection and transfected with Silencer Select Negative Control no. 2. (b); ** – differences are statistically significant, $p < 0.001$.

смачивалось. Таким образом, в исследовании были впервые описаны онкосупрессорные свойства растительной микроРНК miR162a в клетках остеосаркомы SAOS-2.

Выводы

Трансфекция микроРНК miR162a образцов клеток остеосаркомы SAOS-2 приводила к статистически значимому снижению жизнеспособности клеток по сравнению с контрольными образцами через 24, 48 и 72 ч.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии у микроРНК miR162a терапевтического потенциала в качестве средства патогенетической терапии злокачественных опухолевых заболеваний.

Литература/References

- Cheng C., Wang Q., You W.; et al. MiRNAs as Biomarkers of Myocardial Infarction: Meta-Analysis. *PLoS One*. 2014; 9(2): e88566.
- Zhu K., Liu M., Fu Z., et al. Plant microRNAs in larval food regulate honey bee caste development. *PLoS genetics*. 2017; 13(8): e1006946.
- Weichhart T. mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology*. 2017; 84(2): 127–34.
- Schreiber K., Kennedy B. When lamins go bad: nuclear structure and disease. *Cell*. 2013; 152: 1365–75.
- Lemma Silvia, Avnet Sofia Meade M. Validation of Suitable Housekeeping Genes for the Normalization of mRNA Expression for Studying Tumor Acidosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19(10): 2930.
- Yang H.L., Thiagarajan V., Shen P.C., Mathew D.C., Lin K.Y., Liao J.W.; et al. Anti-EMT properties of CoQ0 attributed to PI3K/AKT/NFKB/MMP-9 signaling pathway through ROS-mediated apoptosis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2019; 38(1): 186.
- Tian T., Li X., Zhang J. mTOR signaling in cancer and mTOR inhibitors in solid tumor targeting therapy. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20(3): 755.
- Gao X., Liu J., Cho K.B., Kedika S., Guo B. Chemopreventive Agent 3,3'-Diindolylmethane Inhibits MDM2 in Colorectal Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(13): 4642.
- Liu Y., Jiang Y., Li W., Han C., Qi Z. MicroRNA and mRNA analysis of angiotensin II-induced renal artery endothelial cell dysfunction. *Exp Ther Med*. 2020; 19(6): 3723–37.
- Zubova S. The diversity of autophagy and its controversial role in biological processes. *Scientific journal "Cytology"*. 2019; 61(12): 941–50.
- Wang H., Fang Z.L., Zhang G.H., Ma X. TRIM44, a crucial target of miR-410, functions as a potential oncogene in osteosarcoma. *Oncotargets Ther*. 2018; 11: 3637–47.
- Li G., Liu F., Miao J., Hu Y. miR-505 inhibits proliferation of osteosarcoma via HMGB1. *FEBS Open Bio*. 2020; 10(7): 1251–60.
- Lin H., Zheng X., Lu T., Gu Y., Zheng C., Yan H. The proliferation and invasion of osteosarcoma are inhibited by miR-101 via targeting ZEB2. *Biosci Rep*. 2019; 39(2): BSR20181283

Сведения об авторах:

Гребнев Дмитрий Юрьевич, доктор мед. наук, зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России; ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», e-mail: dr-grebnev77@mail.ru;

Маклакова Ирина Юрьевна, канд. мед. наук, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России;

Корнилов Даниил Олегович, студент 5-го курса педиатрического факультета, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: danilovkornil@gmail.com;

Симарзина Вероника Михайловна, студентка 5-го курса педиатрического факультета, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: beatle-eye@yandex.ru;

Тряпцын Михаил Андреевич, студент 5-го курса педиатрического факультета, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: misha.tryapitsyn@yandex.ru;

Казанцев Юрий Антонович, студент 6-го курса лечебно-профилактического факультета, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: jk1999@yandex.ru;

Зорников Данила Леонидович, канд. мед. наук, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: zornikov.rus@gmail.com;

Григорьева Юлия Витальевна, канд. биол. наук, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: gjv66@yandex.ru;

Фадеев Федор Алексеевич, канд. биол. наук, ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России; ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», e-mail: fdf79@mail.ru

© Четверяков А.В., Цепелев В.Л., 2023

УДК 616-092.9

Четверяков А.В., Цепелев В.Л.

Концентрация ко-ингибирующих иммунных контрольных точек и их лигандов в крови у пациентов с опухолью толстой кишки

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

Введение. Опухолевые клетки способны модулировать иммунный ответ используя ко-ингибирующие иммунные контрольные точки, что позволяет им «ускользнуть» от иммунного надзора. **Цель** – определение уровня ко-ингибирующих иммунных контрольных точек (CTLA-4, TIM-3, LAG-3, PD-1) и их лигандов (B7-2, Galectin-9, PD-L1) в сыворотке крови у пациентов с опухолью толстой кишки.

Методика. Под наблюдением находились 44 больных с колоректальным раком, 25 – с доброкачественной опухолью толстой кишки и 25 – контрольная группа (пациенты, которым выполняли пластику колостомы, сформированной ранее по поводу травмы толстой кишки). Уровень ко-ингибирующих иммунных контрольных точек (CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG-3) и их лигандов (B7-2, Galectin-9, PD-L1) определяли в крови методом проточной цитофлуометрии на анализаторе CytoFlex LX (Beckman Coulter, США), используя набор для мультиплексного анализа LEGENDplex™ HU (Immune Checkpoint, США).

Результаты. Установлено, что у больных с раком толстой кишки в крови уровень ко-ингибирующих иммунных контрольных точек (TIM-3, CTLA-4, LAG-3) выше, чем в группе контроля. Уровень белка TIM-3 увеличивается в 11,7 раза ($p < 0,001$), CTLA-4 – в 2,77 раза ($p < 0,001$), LAG-3 – в 2,42 раза ($p = 0,02$). Также у пациентов с колоректальным раком концентрация TIM-3 превышала аналогичный показатель больных с доброкачественной опухолью толстой кишки в 7,1 раза ($p < 0,001$), LAG-3 в 2,4 ($p = 0,01$) раза. У больных со злокачественным новообразованием толстой кишки уровень лиганда TIM-3 (Galectin-9) превышал показатель группы контроля в 33,3 раза ($p < 0,001$), а лиганда CTLA-4 (B7-2) – в 2,51 раза ($p = 0,002$).

Заключение. Увеличение уровня CTLA-4, TIM-3, LAG-3 и их лигандов – B7-2 и Galectin-9 свидетельствует об участии данных ко-ингибирующих молекул в патогенезе колоректального рака. Установлена диагностическая значимость исследования уровня CTLA-4 и его лиганда B7-2 в выявлении онкологической патологии.

Ключевые слова: колоректальный рак; иммунные контрольные точки; TIM-3; CTLA-4; LAG-3

Для цитирования: Четверяков А.В., Цепелев В.Л. Концентрация ко-ингибирующих иммунных контрольных точек и их лигандов у пациентов с опухолью толстой кишки. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(1): 56-62.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.56-62

Участие авторов: концепция дизайна исследования – Цепелев В.Л., Четверяков А.В.; сбор материала, анализ и интерпретация данных – Четверяков А.В., Цепелев В.Л.; статистическая обработка данных, подготовка иллюстративного материала, написание текста – Четверяков А.В.; редактирование текста – Цепелев В.Л.; обсуждение окончательной версии статьи – Цепелев В.Л., Четверяков А.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.
Для корреспонденции: Четверяков Андрей Валерьевич, e-mail: yasnogorsk94@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 24.10.2022

Принята к печати 26.01.2023

Опубликована 17.03.2023

Chetveryakov A.V., Tsepelev V.L.

Concentration of co-inhibiting immune checkpoints and their ligands in blood of patients with colon tumor

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

Tumor cells can modulate the immune response using co-inhibiting immune checkpoints, which allows them to “escape” from immunity. **The aim** of this study was to measure concentrations of co-inhibiting immune checkpoints (CTLA-4, TIM-3, LAG-3, PD-1) and their ligands (B7-2, Galectin-9, PD-L1) in blood serum of patients with colon tumor.

Methods. The study included 44 patients with colorectal cancer, 25 patients with benign colon tumors, and 25 patients of the control group (patients after plastic surgery for colostomy that had been formed earlier due to colon injury). Blood concentrations of co-inhibiting immune checkpoints (CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG-3) and their ligands (B7-2, Galectin-9, PD-L1) were measured by flow cytometry with a CytoFlex LX analyzer (Beckman Coulter, USA) using a LEGENDplex™ HU multiplex analysis kit (Immune Checkpoint, USA).

Results. In patients with colon cancer, the serum concentrations of co-inhibiting immune checkpoints (TIM-3, CTLA-4, LAG-3) were higher than in the control group. The level of TIM-3 protein increased by 11.7 times ($p < 0.001$), CTLA-4 by 2.77 times ($p < 0.001$), and LAG-3 by 2.42 times ($p = 0.02$). Also, in patients with colorectal cancer, the concentration of TIM-3 exceeded the value in patients with benign colon tumor by 7.1 times ($p < 0.001$) and LAG-3 by 2.4 ($p = 0.01$) times. In patients with malignant colon neoplasm, the level of TIM-3 ligand (Galectin-9) was higher than in the control group by 33.3 times ($p < 0.001$) and the level of CTLA-4 ligand (B7-2) by 2.51 times ($p = 0.002$).

Conclusion. The increases in CTLA-4, TIM-3, LAG-3, and their ligands B7-2 and Galectin-9 indicate the participation of these co-inhibiting molecules in the pathogenesis of colorectal cancer. When analyzing the data, we identified parameters that may be essential in a diagnostic model for determining the probability of oncological pathology.

Keywords: colorectal cancer; immune checkpoints; TIM-3; CTLA-4; LAG-3

For citation: Chetveryakov A.V., Tsepelev V.L. Concentration of co-inhibiting immune checkpoints and their ligands in blood serum in patients with colon tumor. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(1): 56-62. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.56-62

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

For correspondence: **Andrey V. Chetveryakov**, postgraduate student of the Department of Hospital Surgery of FSBEI VO CHMA, surgeon of Regional Oncologic Dispensary Chita, e-mail: yasnogorsk94@gmail.com

Information about the authors:

Chetveryakov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-8472-107X>

Tsepelev V.L., <https://orcid.org/0000-0002-2166-5154>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 24.10.2022

Accepted 26.01.2023

Published 17.03.2023

Введение

Колоректальный рак (КРР) является одной из ведущих причин смертности у онкологических больных во всем мире [1, 2]. Несмотря на комплексное лечение КРР, прогноз для жизни пациентов остается неблагоприятным [3]. Для улучшения показателей выживаемости ведется изучение новых видов лечения, в особенности иммунотерапии [4]. Основным направлением последнего является блокирование иммунных контрольных точек [5]. Иммунные контрольные точки (immune control points, ИКТ) являются регуляторами иммунного ответа, предотвращают развитие гиперреактивности иммунной системы и повреждение собственных тканевых структур [6]. Злокачественные клетки используют ИКТ для «ускользания» от иммунного надзора, что способствует росту и развитию рака [7]. Основными ко-ингибирующими ИКТ, посредством которых опухоль угнетает иммунный ответ, являются белки TIM-3, CTLA-4, LAG-3, PD-1. Цитотоксический Т-лимфоцитарно-ассоциированный бе-

лок (Cytotoxic T-lymphocyte associated protein-4, CTLA-4, CD152) – это трансмембранный гликопротеин, который экспрессируется преимущественно на поверхности CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Лигандами для CTLA-4 является B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86) [8]. Белок запрограммированной клеточной гибели (Programmed cell death-1, PD-1, CD279) мембранный рецептор, его роль заключается в регулировании Т-клеточного ответа путем угнетения эффекторных функций Т-лимфоцитов (цитотоксичность, секреция цитокинов) и их пролиферации [9]. Для реализации своих функций PD-1 взаимодействует со своими лигандами PD-L1 (Programmed cell death ligand 1, B7-H1, CD274) и PD-L2 (Programmed cell death ligand 2, B7-DC, CD273) [9]. Белок TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain 3) является трансмембранным белком I типа, функция которого заключается в снижении иммунного ответа путем истощения CD8⁺Т-лимфоцитов. Основным лигандом TIM-3 является Galectin-9 [10]. Ген активации лимфо-

цитов-3 (Lymphocyte-activation gene 3, LAG-3, CD223) — это мембранный белок суперсемейства иммуноглобулинов. Основная функция LAG-3 заключается в подавлении активности Т-лимфоцитов и снижении секреции цитокинов [11]. Для взаимодействия с этими ко-ингибирующими молекулами опухоль способна продуцировать их лиганды на своей поверхности. Высокий уровень белка CTLA-4, TIM-3, PD-1 и LAG-3 отмечался в ткани опухоли у пациентов с раком легкого, щитовидной железы, желудка, молочной железы, при меланоме и других локализациях [12, 13, 14]. В сыворотке крови также отмечается высокая концентрация растворимой формы ко-ингибирующих ИКТ при злокачественных новообразованиях различной локализации [11]. В исследовании Ghorbaninezhad (2022) у больных с раком молочной железы, отмечалось увеличение уровня CTLA-4 в сыворотке крови в 7 раз в сравнении с контрольной группой. В ткани опухоли исследуемый белок также превышал показатели группы контроля [8].

Целью нашего исследования стало изучение уровня ко-ингибирующих иммунных контрольных точек (CTLA-4, TIM-3, LAG-3, PD-1) и их лигандов (B7-2, Galectin-9, PD-L1) в сыворотке крови у пациентов с доброкачественными и злокачественными новообразованиями толстого кишечника.

Методика

Под наблюдением находилось 44 больных с колоректальным раком, 25 — с доброкачественной опухолью толстой кишки, 25 — контрольная группа (пациенты, которым выполняли пластику колостомы, сформированной ранее по поводу травмы толстой кишки). При гистологическом исследовании у пациентов с колоректальным раком в 39 случаях (88,6%) ткань опухоли была представлена умереннодифференцированной аденокарциномой (G2). В 3-х случаях (6,8%) — высокодифференцированной аденокарциномой (G1). В 2-х случаях (4,6%) — низкодифференцированной аденокарциномой (G3). У 6 пациентов диагностирована I стадия процесса, у 24 — II стадия, у 8 — III стадия и у 6 — IV стадия.

Все больные были обследованы в соответствии с клиническими рекомендациями общероссийского национального союза «Ассоциация онкологов России» для пациентов со злокачественными новообразованиями ободочной кишки и ректосигмоидного отдела. В каждом случае получено информированное добровольное согласие пациента. Исследование выполнено согласно требованиям комиссии по этике ФГБОУ ВО Читинской государственной медицинской акаде-

мии Минздрава России, а также в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации всемирной медицинской ассоциации (2013). Критерии включения в исследование: согласие пациента на участие в исследовании, наличие опухоли толстого кишечника. Критерии исключения: пациенты с положительным ВИЧ-статусом; аутоиммунными заболеваниями; вирусными и бактериальными инфекциями; больные, проходившие курс химиотерапевтического или лучевого лечения перед оперативным пособием. Уровень растворимой формы исследуемых иммунных контрольных точек (CTLA-4, PD-1, TIM-3, LAG-3) и их лигандов (B7-2, Galectin-9, PD-L1) определяли в сыворотке крови. Забор осуществляли в утренние часы, за два часа до выполнения оперативного пособия. Концентрацию исследуемых ИКТ в крови определяли методом проточной цитофлуометрии на анализаторе CytoFlex LX (Beckman Coulter, США), используя набор для мультиплексного анализа LEGENDplex™ HU (Immune Checkpoint, США).

При проведении статистического анализа руководствовались принципами Международного комитета редакторов медицинских журналов (ICMJE) и рекомендациями «Статистический анализ и методы публикуемой литературе» (SAMPL) [15, 16]. Номинальные данные описывали с указанием абсолютных и относительных значений. Сравнение номинальных данных исследования проводили при помощи критерия χ^2 Пирсона [15]. Нормальность распределения количественных признаков при численности исследуемых групп менее 50 человек оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Ранговый анализ вариаций проводили по Краскелу—Уоллису (H). Затем, при наличии статистически значимых различий, с учетом поправки Бонферрони, проводили попарное сравнение с помощью критерия Манна—Уитни (U) [16]. Диагностическая модель была построена путем бинарной логистической регрессии. Для установления ценности указанной модели использовался ROC-анализ, что позволило оценить чувствительность, специфичность и точность модели. Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics Version 25.0 (International Business Machines Corporation, США). Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics Version 25.0 (International Business Machines Corporation, США).

Результаты

Установлено, что у больных с раком толстой кишки в сыворотке крови уровень TIM-3 увеличивается в 11,7

раза в сравнении с группой контроля ($U=23,0, p<0,001$), белка CTLA-4 – в 2,7 раза ($U=119,0, p<0,001$), LAG-3 – в 2,4 раза ($U=273,5, p=0,02$). Достоверных изменений уровня PD-1 в сыворотке крови у больных с колоректальным раком выявлено не было. У пациентов с КРР по сравнению с группой больных доброкачественными новообразованиями толстого кишечника концентрация TIM-3 была выше в 7,1 раза ($U=59,0, p<0,001$), LAG-3 – в 2,4 раза ($U=266,0, p=0,01$). Достоверных различий уровня CTLA-4 больных со злокачественными и доброкачественными новообразованиями толстой кишки не обнаружено (табл. 1).

В результате проведенных исследований установлено, что уровень лиганда TIM-3 (Galectin-9) в сыворотке крови у пациентов с КРР превышал данный показатель группы контроля в 33,3 раза

($U=0,0, p<0,001$), лиганда CTLA-4 (B7-2) – в 2,5 раза ($U=302,5, p=0,002$). Концентрация Galectin-9 у пациентов с КРР по отношению к группе больных доброкачественной опухолью толстой кишки была выше в 4,4 раза ($U=46,0, p<0,001$). Уровень B7-2 в сыворотке крови у больных со злокачественными и доброкачественными новообразованиями толстого кишечника статистически значимых различий не имеет. В отношении лиганда PD-L1 между исследуемыми группами статистически значимых различий выявлено не было (табл. 2).

Установлена заметная корреляционная связь между уровнем белка CTLA-4 и лигандом B7-2 в сыворотке крови ($\rho=0,57, p<0,01$). Концентрация TIM-3 сыворотки крови коррелирует с уровнем его лиганда Galectin-9 в сыворотке крови ($\rho=0,68, p<0,001$).

Таблица 1. Уровень ко-ингибирующих иммунных контрольных точек в сыворотке крови у больных с опухолью толстой кишки

Table 1. Co-inhibiting immune control points level in the blood serum of patients with colon tumor

Концентрация в сыворотке крови (пг/мл)/Serum concentration (pg/ml)	Группы исследуемых пациентов/Study patient groups			Тестовая статистика/Test statistics df=2
	Контрольная группа/control group n=25	Доброкачественная опухоль/Benign tumor, n=25	Колоректальный рак/Colorectal cancer, n=44	
CTLA-4	4,88 [4,38; 6,22]	10,48 [10,30; 14,50]	13,50 [13,07; 20,80]	H=34,26 p<0,001
TIM-3	58,0 [55,8; 72,8]	95,6 [88,3; 164,2]	677,1 [663,8; 854,1]	H=61,94 p<0,001
PD-1	10,9 [10,6; 13,0]	18,0 [17,6; 23,5]	20,5 [18,6; 27,4]	H=5,52 p=0,06
LAG-3	15,0 [14,5; 20,8]	15,2 [15,1; 23,4]	36,3 [35,1; 49,7]	H=9,3 p=0,009

Таблица 2. Уровень лигандов ко-ингибирующих иммунных контрольных точек в сыворотке крови у пациентов с опухолью толстой кишки

Table 2. Ligands of co-inhibiting immune control points level in the blood serum of patients with colon tumor

Концентрация в сыворотке крови (пг/мл)/Serum concentrations (pg/ml)	Группы исследуемых пациентов/Study patient groups			Тестовая статистика/Test statistics df=2
	Контрольная группа/control group n=25	Доброкачественная опухоль/Benign tumor n=25	Колоректальный рак/Colorectal cancer, n=44	
B7-2	33,00 [30,08; 40,11]	79,00 [78,68; 97,46]	82,93 [76,70; 113,26]	H=23,08 p<0,001
Galectin-9	1789,1 [1742,6; 2091,9]	13527,1 [12988,3; 14902,9]	59528,6 [55839,2; 66722,0]	H=75,88 p<0,001
PD-L1	23,2 [22,1; 27,5]	25,9 [24,1; 33,7]	27,9 [27,5; 40,1]	H=0,17 p=0,92

При анализе данных определены параметры, которые могут иметь значимость в структуре диагностической модели для определения вероятности наличия онкологической патологии (табл. 3).

На основании этих параметров получено уравнение вида:

$$K = \frac{1}{1 + e^{3,25 - 0,42 * CTLA4_{сыв} - 0,03 * B7-2_{сыв}}}$$

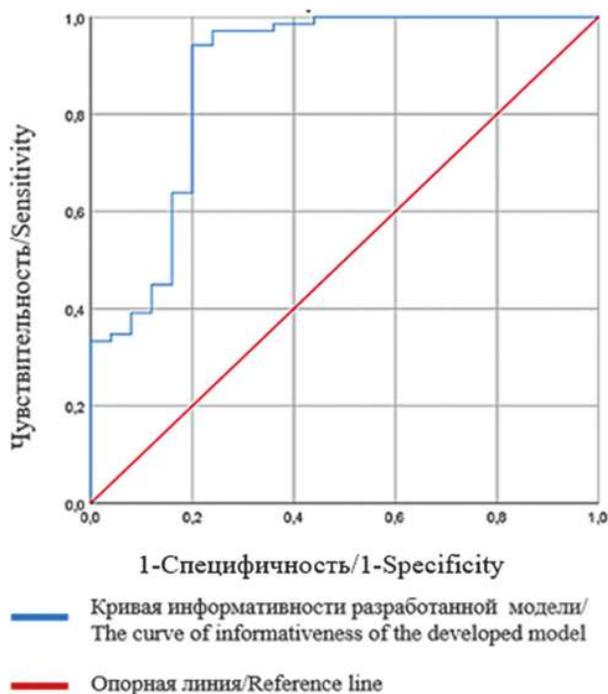
где: CTLA-4_{сыв} – уровень белка CTLA-4 в сыворотке крови; B7-2_{сыв} – уровень B7-2 в сыворотке

крови; 3,25 – константа уровня логистической регрессии; 0,42 и 0,03 – нестандартизированные коэффициенты B, e-экспонента ~ 2,72.

При значении коэффициента $K \geq 0,59$ диагностируется развитие онкологической патологии толстого кишечника. Для группы контроля данный показатель (K) составляет 0,40 [0,36; 0,50], для пациентов с онкологической патологией – 0,86 [0,82; 0,87]. В группе контроля $K \geq 0,59$ встречалось в 20% случаев (5/25), у больных онкологической патологией – в 94,2% (65/69) случаев ($\chi^2 = 53,14$, $df = 1$, $p < 0,001$). Чувствительность данного заключения составляет 0,94, специфичность – 0,80, точность – 0,90 (AUC = 0,88 [95% CI 0,79-0,97], $p < 0,001$).

Оценка информативности разработанной модели представлена на рисунке.

Описанный способ можно использовать у пациентов для определения вероятности наличия онкологической патологии толстого кишечника. Для упрощения способа при использовании в клинической практике разработана программа для операционной системы Windows в среде разработки Object Pascal (Borland Delphi). Набор действий создается в специальном режиме работы пользовательского окна, в котором пользователь получает доступ к вводу данных об уровне в сыворотке крови цитотоксического Т-лимфоцитарно-ассоциированного белка 4 (CTLA-4, пг/мл) и его лиганда B7-2 (B7-2, пг/мл) у пациентов с жалобами на функциональные расстройства кишечника. Программа носит прикладной характер, обеспечивает возможность определения вероятности онкологической патологии толстого кишечника, что позволяет выделить группу риска и оптимизировать тактику их обследования и лечения.



Оценка информативности разработанной модели путем ROC-анализа. Evaluation of the informativeness of the developed model by ROC analysis.

Обсуждение

Нами установлено, что в сыворотке крови у пациентов с колоректальным раком наблюдается увеличение уровня ко-ингибирующих контрольных точек (TIM-3, LAG-3, CTLA-4) и их лигандов (B7-2, Galec-

Таблица 3. Значимость параметров CTLA-4 и B7.2 в структуре диагностической модели

Table 3. Significance of CTLA-4 and B7.2 parameters in the structure of the diagnostic model

Параметр/Parameter	B	Среднеквадратичная ошибка/Quare Error	Вальд	Степень свободы ErrorSquare df	Значимость Significance, p	Exp (B)	95% DI для Exp B
CTLA-4 сыворотки крови/of blood serum	0,42	0,132	9,98	1	0,002	1,52	1,17-1,96
B7-2 сыворотки крови/of blood serum	0,03	0,013	3,78	1	0,05	1,03	1,01-1,05
Константа/Constanta	-3,25	0,968	11,28	1	0,001	0,04	

tin-9). Кроме того, были установлены корреляционные связи между исследуемыми молекулами в сыворотке крови и ткани опухоли. Стоит отметить, что увеличение концентрации TIM-3, LAG-3 и Galectin-9 отмечалось у больных с доброкачественной опухолью толстой кишки. Увеличение уровня ко-ингибирующих иммунных контрольных точек в сыворотке крови у пациентов с КРР свидетельствует о развитии системного снижения иммунного ответа, что способствует росту и развитию злокачественного новообразования. Наиболее вероятная причина повышения концентрации растворимых форм контрольных точек иммунитета в кровотоке, является миграция из опухолевого микроокружения, а также с поверхности различных иммунных клеток. Мы полагаем, что исследуемые ИКТ являются важнейшим звеном канцерогенеза при колоректальном раке. Иммунные контрольные точки реализуют свои эффекты посредством регуляторных Т-клеток (Treg), которые выполняют функцию ингибиторов иммунного ответа [17]. В настоящее время доказано, что LAG-3 способствует дифференцировке регуляторных Т-клеток (Treg), а белок CTLA-4 повышает функциональную активность последних [18, 19]. Белок CTLA-4 блокирует активацию антигенпрезентирующих клеток (АПК), макрофагов и дендритных клеток, а также нарушает пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов (cytotoxic T-cell, CTL), которые играют основную роль в сдерживании роста и развития опухоли [18]. Следует уделить внимание факту высокой экспрессии LAG-3 на различных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs). Роль LAG-3 в патогенезе развития злокачественного новообразования обусловлена взаимодействием вышеуказанной молекулы с МНС-II, подавлением сигнала TCR, что приводит к нарушению пролиферации Т-клеток и секреции цитокинов. Высокая экспрессия LAG-3 на TILs обнаружена при меланоме, раке молочной железы, колоректальном раке, особенно в случаях агрессивного течения процесса, раннего метастазирования и отсутствия периода ремиссии заболевания [20].

Особое внимание следует уделить CD8⁺Т-клеткам, которые в свою очередь включают в себя популяцию цитотоксических лимфоцитов. Цитотоксические лимфоциты участвуют в уничтожении клеток-мишеней, которыми являются клетки рака. Выявлена статистически значимая корреляция экспрессии TIM-3 на CD4⁺Т-клетках с клинико-морфологическими особенностями опухоли (стадия, размер опухоли, лимфогенное и гематогенное метастазирование) [21]. Повышенная экспрессия TIM-3 на иммунных клетках отмечалась при раке лёгкого, щитовидной железы, молочной железы, эндометрия и раке

других локализаций [21, 22]. Мембранный белок TIM-3 регулирует иммунный ответ и играет прямую роль в патогенезе роста и прогрессирования злокачественного новообразования [21]. Молекула TIM-3 взаимодействует со своим лигандом (Galectin-9), который находится на поверхности опухолевых клеток, что приводит к снижению продукции цитокинов и истощению Т-клеток [21]. Роль исследуемых ИКТ в механизмах «ускользания» злокачественных клеток от иммунного надзора при колоректальном раке заслуживает дальнейшего изучения.

Результаты наших исследований уровня ко-ингибирующих ИКТ у больных с колоректальным раком могут стать основанием для применения комбинированной таргетной терапии направленной на блокирование соответствующих ИКТ моноклональными антителами. В настоящее время особое внимание уделяется изучению двойного блокирования ко-ингибирующих контрольных точек, например, LAG-3/TIM-3 [23]. Эффективность такого способа заключается в предупреждении развития устойчивости опухолевой клетки и поиску другого патогенного пути для ингибирования иммунного ответа.

Полученные нами данные в отношении белка CTLA-4 и его лиганда В7-2 позволили создать диагностическую модель в виде программы для операционной системы Windows. Программа обеспечивает возможность ввода значений белка CTLA-4 и В7-2 в сыворотке крови, на основании этого происходит определение вероятности онкологической патологии толстого кишечника, что позволяет выделить группу риска и оптимизировать тактику обследования и лечения пациентов [URL: <https://new.fips.ru/ofpstorage/Doc/PrEVM/RUNWPR/000/002/022/613/721/2022613721-00001/document.pdf>].

Заключение

Увеличение уровня CTLA-4, TIM-3, LAG-3 и их лигандов – В7-2 и Galectin-9 свидетельствует об участии данных ко-ингибирующих молекул в патогенезе колоректального рака. Установлена диагностическая значимость исследования уровня CTLA-4 и его лиганда в выявлении онкологической патологии.

Литература

(п.п. 1-14; 17-23 см. References)

15. Мудров В.А. Алгоритмы статистического анализа качественных признаков в биомедицинских исследованиях с помощью пакета программ SPSS. *Забайкальский медицинский вестник*. 2020; 1: 151-63.
16. Мудров В.А. Алгоритмы статистического анализа количественных признаков в биомедицинских исследованиях с по-

мощью пакета программ SPSS. *Забайкальский медицинский вестник*. 2013; 1: 140-50.

References

1. Cao M., Isaac R., Yan W., Ruan X. Cancer-cell-secreted extracellular vesicles suppress insulin secretion through miR-122 to impair systemic glucose homeostasis and contribute to tumour growth. *Nature Cell Biology*. 2022; 1(2): 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00919-7>
2. Richards J., Chambers T., Hales S., Joy M. Nitrate contamination in drinking water and colorectal cancer: Exposure assessment and estimated health burden in New Zealand. *Environmental Research*. 2022; 14: 112322. doi: 10.1016/j.envres.2021.112322
3. Sung H. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021; 71(3): 209-49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
4. Kalyan A. Updates on immunotherapy for colorectal cancer. *Journal of gastrointestinal oncology*. 2018; 9(1): 160. <https://doi.org/10.21037/jgo.2018.01.17>
5. Xie Y. H., Chen Y. X., Fang J.Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal transduction and targeted therapy*. 2020; 5(1): 1-30. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>
6. Reticker-Flynn N.E. Lymph node colonization induces tumor-immune tolerance to promote distant metastasis. *Cell*. 2022; 185(11): 1924-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.04.019>
7. Al-Mterin M.A. Associations of different immune checkpoints-expressing CD4+ Treg/T cell subsets with disease-free survival in colorectal cancer patients. *BMC cancer*. 2022; 22(1): 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09710-1>
8. Ghorbaninezhad F., Masoumi J., Bakhshvand M., Baghbanzadeh A. CTLA-4 silencing in dendritic cells loaded with colorectal cancer cell lysate improves autologous T-cell responses in vitro. *Front Immunol*. 2022; 1(13):931316. doi: 10.3389/fimmu.2022.931316
9. Li X., Zhou X., Liu J., Zhang J., Feng Y., Wang F. Liposomal Co-delivery of PD-L1 siRNA/Anemoside B4 for Enhanced Combinational Immunotherapeutic Effect. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2022; 14(25): 28439-54. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c01123>
10. Joller N., Kuchroo K. Tim-3, Lag-3, and TIGIT. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017; 410: 127-56. <https://doi.org/10.1007/82.2017.62>
11. Liao X. A Review of emerging biomarkers for immune checkpoint inhibitors in tumors of the gastrointestinal tract. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2022; 28: 935348-1. <https://doi.org/10.12659/MSM.935348>
12. Wu J., Sun Y., Li J., Ai M., You L., Shi J., Yu F. Analysis of prognostic alternative splicing reveals the landscape of immune microenvironment in thyroid cancer. *Front Oncol*. 2021; 18(11): 763886. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.763886>
13. Ju M.H., Byun K.D., Park E.H., Lee J.H., Han S.H. Association of Galectin 9 expression with immune cell infiltration, programmed cell death ligand-1 expression and patient's clinical outcome in triple-negative breast cancer. *Biomedicines*. 2021; 9(10): 1383. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101383>
14. Cao W., Ma X., Fischer J.V., Sun C., Kong B., Zhang Q. Immunotherapy in endometrial cancer: rationale, practice and perspectives. *Biomark Res*. 2021; 9(1): 49. <https://doi.org/10.1186/s40364-021-00301-z>
15. Mudrov V.A. Algorithms for statistical analysis of qualitative features in biomedical research using the SPSS software package. *Zabaikalskiy meditsinskiy vestnik*. 2020; 1: 151-63. (in Russian)
16. Mudrov V.A. Algorithms for statistical analysis of quantitative features in biomedical research using the SPSS software package. *Zabaikalskiy meditsinskiy vestnik*. 2020; 1: 140-50. (in Russian)
17. O'Donnell J.S., Teng M.W.L., Smyth M.J. Cancer immunoeediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 2019; 16(3): 151-67. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0142-8>
18. Bagbudar S., Karanlik H., Cabioglu N., Bayram A., Ibis K., Aydin E., Yavuz E., Onder S. Prognostic implications of immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: the role of expressions of CTLA-4, PD-1, and LAG-3. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2022; 30(2): 99-107.
19. Toor S. M. Immune checkpoints in circulating and tumor-infiltrating CD4+ T cell subsets in colorectal cancer patients. *Frontiers in immunology*. 2019; 10: 2936. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02936>
20. Guo X.J., Lu J.C., Zeng H.Y., Zhou R., Sun Q.M., Yang G.H., et al. CTLA-4 synergizes with PD1/PD-L1 in the Inhibitory tumor microenvironment of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Front Immunol*. 2021; 12: 705378. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.705378>
21. Ahmed S., Shaikh F. Increased Tim-3 and Gal-9 expression are related to poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. 2022; <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1418045/v1>
22. Peng Y.A comprehensive profiling of soluble immune checkpoints from the sera of patients with non-small cell lung cancer. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2022; 36(2):24224. <https://doi.org/10.1002/jcla.24224>
23. Li J., Wang J. Serum t cell immunoglobulin mucin 3 predicts worse prognosis in hepatocellular carcinoma patients undergoing transcatheter arterial chemoembolization. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2022; 28: 935326-1.

Сведения об авторах:

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

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

© Коллектив авторов, 2023

УДК 612.285.1

Данилова Г.А., Александров В.Г., Александрова Н.П.

Влияние внутривенного введения провоспалительного цитокина ИЛ-1 β на хеморецепторный контроль дыхания

ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН»,
199034, Санкт-Петербург, Россия, наб. Макарова, д. 6

Введение. Интерлейкин-1бета (ИЛ-1 β) играет ведущую роль в индуцировании цитокинового шторма, являясь ключевым цитокином управляющим развитием провоспалительной активности при повреждении легких. **Цель** исследования – изучение механизмов влияния ИЛ-1 β на хеморецепторный контроль дыхания.

Методика. Исследование проведено на 32 наркотизированных трахеостомированных спонтанно дышащих крысах. Регистрация параметров внешнего дыхания производилась пневмотахографическим методом. Для оценки вентиляционной реакции на гипоксию использовался метод возвратного дыхания. Для оценки влияния ИЛ-1 β на хеморецепторный контроль дыхания производилось сравнительное исследование вентиляционного ответа на гипоксию при повышении содержания ИЛ-1 β в циркуляторном русле и при сочетанном действии ИЛ-1 β и диклофенака – ингибитора циклооксигеназной активности.

Результаты. Показано, что внутривенное введение ИЛ-1 β вызывает статистически значимое снижение вентиляционного ответа на гипоксическую стимуляцию, ослабляя тем самым компенсаторные возможности системы внешнего дыхания. Ингибирование циклооксигеназной активности устраняет влияние ИЛ-1 β на гипоксический вентиляционный ответ.

Заключение. Полученные данные позволяют предполагать, что активация циклооксигеназных путей может быть одним из основных механизмов влияния провоспалительных цитокинов на рефлекторный контроль дыхания.

Ключевые слова: цитокины; интерлейкин-1бета; гипоксия; вентиляция легких; хеморефлекторная регуляция дыхания

Для цитирования: Данилова Г.А., Александров В.Г., Александрова Н.П. Влияние внутривенного введения провоспалительного цитокина ИЛ-1 β на хеморецепторный контроль дыхания. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(1): 63-70.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.63-70

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Данилова Г.А., Александрова Н.П.; сбор и обработка материала – Данилова Г.А.; подготовка иллюстративного материала – Данилова Г.А., Александров В.Г.; статистическая обработка материала – Данилова Г.А.; написание текста – Александров В.Г., Александрова Н.П.; редактирование – Александрова Н.П. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Александрова Нина Павловна, e-mail: aleks@infran.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.12.2022

Принята к печати 26.01.2023

Опубликована 17.03.2023

Danilova G.A., Aleksandrov V.G., Aleksandrova N.P.

Effect of intravenous administration of the proinflammatory cytokine IL-1 β on the chemoreceptor control of respiration

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences,
Naberezhnaya Makarova 6, St. Petersburg, 199034, Russian Federation

Interleukin-1 beta (IL-1 β) plays a leading role in inducing cytokine storm, since it is the key cytokine that is responsible for the development of the proinflammatory activity in lung injury. **Aim.** To study the mechanisms of the effect of IL-1 β on the chemoreceptor control of respiration. To achieve that, the ventilatory response to hypoxia in the presence of increased blood concentration of IL-1 β was compared with the hypoxic response in the presence of a combination of IL-1 β and diclofenac, an inhibitor of cyclooxygenase activity.

Methods. The study was performed on 32 anesthetized and tracheostomized, spontaneously breathing rats. Respiratory parameters were recorded with a pneumotachograph. To assess the hypoxic ventilatory response, the rebreathing technique was used.

Results. The intravenous administration of IL-1 β induced a significant decrease in the ventilatory response to hypoxic stimulation, thereby weakening the compensatory capabilities of the respiratory system. The inhibition of the cyclooxygenase activity abolished the effect of IL-1 β on the hypoxic ventilatory response.

Conclusion. The study suggests that the activation of the cyclooxygenase pathways is one of the main mechanisms of the effect of proinflammatory cytokines on the reflex control of breathing.

Keywords: cytokines; interleukin-1 beta; hypoxia; lung ventilation; chemoreflex control of breathing

For citation: Danilova G.A., Aleksandrov V.G., Aleksandrova N.P. Influence of intravenous administration of the proinflammatory cytokine IL-1 β on chemoreceptor control of respiration. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(1) 63-70. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.63-70

Author's contribution: concept and design of the study – Danilova G.A., Aleksandrova N.P.; collection and processing of material – Danilova G.A.; preparation of illustrative material – Danilova G.A., Aleksandrov V.G.; statistical processing – Danilova G.A.; text writing – Aleksandrov V.G., Aleksandrova N.P.; editing – Aleksandrova N.P. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Nina P. Aleksandrova*, Doctor of Biological Sciences, Head of Laboratory of Respiratory Physiology, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences»», 6, Makarova emb., St. Petersburg, 199034, Russian Federation, e-mail: aleks@infran.ru

Information about the authors:

Danilova G.A., <https://orcid.org/0000-0001-8091-0618>

Aleksandrov V.G., <https://orcid.org/0000-0002-5079-633X>

Aleksandrova N.P., <https://orcid.org/0000-0002-5564-161X>

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

Financing. The study had no sponsorship.

Received 15.12.2022

Accepted 26.01.2023

Published 17.03.2023

Введение

В настоящее время в связи возникновением и широким распространением коронавирусной инфекции COVID-19 особую актуальность приобретает исследование молекулярных механизмов влияния гиперцитокинемии, так называемого «цитокинового шторма», на физиологические функции организма. Именно с развитием цитокинового шторма связаны осложнения и летальные случаи этого заболевания [1, 2]. В развитии цитокинового шторма принимают участие цитокины различных семейств: интерлейкины (ИЛ), интерфероны, хемокины, колонии стимулирующие факторы, факторы некроза опухоли (ФНО) [3]. Важно выявить роль каждого из них для разработки таргетной терапии цитокинового шторма. В настоящее время в качестве ключевого провоспалительного цитокина, играющего ведущую роль в индуцировании цитокинового шторма рассматривается ИЛ-1 β [1, 4, 5].

Цитокиновый шторм имеет широкий спектр неблагоприятных последствий, среди которых наиболее тяжелым является острый респираторный дистресс синдром (ОРДС) [2, 6]. В его основе лежит эндотелиальная дисфункция, диффузное и экссудативное повреждение альвеол, вследствие которых резко ухудшается диффузионная способность легких и оксигенация крови, развивается гипоксемия и дыхательная недостаточность [7–9]. Однако, имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют предполагать, что влияние гиперцитокинемии на систему внешнего дыхания

не ограничивается только морфологическими повреждениями легочных структур, но затрагивает также нейрональные, рефлекторные механизмы регуляции дыхания, в которой важная роль принадлежит периферической хеморецепции. Известно, что повышение системного уровня провоспалительных цитокинов вызывает морфологические изменения каротидных тел – периферических артериальных хеморецепторов, участвующих в реализации гипоксического хеморефлекса. Установлено, что гломусные клетки каротидных тел экспрессируют рецепторы цитокинов ФНО- α (TNF-R1 и TNF-R2) и ИЛ-1 β (типа I) [10, 11]. Поэтому логично предположить, что повышение системного уровня этих цитокинов будет влиять на гипоксический хеморефлекс, обеспечивающий компенсаторное увеличение вентиляции легких в ответ на снижение напряжения кислорода в артериальной крови.

Влияние цитокинов на физиологические функции может быть опосредовано несколькими путями: высвобождением простагландинов, норадреналина, рилизинг-фактора, кортикотропина и оксида азота [12, 13]. В отношении влияния цитокинов на периферическую хеморецепцию наиболее вероятным механизмом является активации циклооксигеназных путей, способствующая усилению синтеза простагландинов (PG). Еще в 1974 году было показано, что PGE2 при введении в сонную артерию вызывает дозозависимое снижение активности каротидных хеморецепто-

ров [14]. Тогда как ацетилсалициловая кислота, ингибирующая циклооксигеназную активность, усиливает разряды синусного нерва, передающего афферентную информацию от каротидных тел в дыхательный центр ствола мозга [15]. Вместе с тем, на сегодняшний день по-прежнему имеется очень мало данных о возможной модулирующей роли мессенджеров циклооксигеназы в процессе каротидной хеморецепции.

Цель исследования – изучение влияния повышенного системного уровня ИЛ-1 β на вентиляционную чувствительность к изменению газового состава крови и выявление в этом процессе роли циклооксигеназных механизмов. Для этого производилось сравнительное исследование вентиляционного ответа на гипоксию в обычных условиях, при повышении содержания ИЛ-1 β в циркуляторном русле и при сочетанном действии ИЛ-1 β и диклофенака, ингибитора циклооксигеназной активности.

Методика

Исследование выполнено на 32 наркотизированных трахеостомированных спонтанно дышащих крысах самцах линии Wistar массой 270 ± 20 г (ЦКП Биокolleкция ИФ РАН). Все животные находились под общей анестезией (уретан, 1400 мг/кг интраперитонеально). При работе с животными соблюдались все этические стандарты, соответствующие принципам Базельской декларации и требованиям Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Для регистрации скорости инспираторного потока (Винсп), частоты дыхательных движений (ЧД) и дыхательного объема (ДО) использовалась пневмотахографическая методика. К трахеостомической канюле подключалась пневмометрическая трубка MLT-1L (AD Instruments, Австралия), соединенная с пневмотахографом. Минутный объем дыхания (МОД) рассчитывали, как произведение дыхательного объема на частоту дыхания. Парциальное давление кислорода и углекислого газа в конечной порции выдыхаемого воздуха (PE T_{O_2} и PE T_{CO_2}) измерялось с помощью респираторного газоанализатора (Gemini, США).

Животные были разделены на 4 группы, по 8 животных в каждой группе. Животным 1-й группы в хвостовую вену вводили рекомбинантный человеческий ИЛ-1 β (1,5 мкг/кг, ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА). Животным 2-й группы за 20 мин до введения ИЛ-1 β производилось внутрибрюшинное введение диклофенака, ингибитора циклооксигеназы (1 мг/кг, Nemofarm). В 3-й группе вводили только диклофенак для выявления

возможного собственного респираторного эффекта диклофенака. Животным 4-й группы вводили внутривенно 0,25 мл физиологического раствора.

Вентиляционную реакцию на гипоксический стимул исследовали классическим методом возвратного дыхания, адаптированным нами к использованию на мелких лабораторных животных. Дыхание производилось в замкнутом контуре, заполненном азотно-гипоксической газовой смесью (15% O $_2$ в азоте). Содержание CO $_2$ в дыхательной смеси не увеличивалось за счет его удаления с помощью адсорбента из выдыхаемого воздуха, поступающего в мешок (объем 50 мл) для возвратного дыхания. При дыхании из мешка происходило постепенное снижение O $_2$ в дыхательной смеси, что приводило к усилению стимуляции периферических хеморецепторов и увеличению легочной вентиляции. Продолжительность проведения пробы с возвратным дыханием составляла 4 мин. Гипоксический вентиляционный ответ оценивался до введения препаратов, а затем на 20-й, 40-й, 60-й и 90-й мин после их введения.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовался программный пакет STATISTICA 7.0. Все значения представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Для проверки нормальности распределения данных применялись критерии Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Значения до и после введения препаратов оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Установлено, что внутривенное введение ИЛ-1 β оказывает активирующее влияние на систему внешнего дыхания, вызывая увеличение средней скорости инспираторного потока, дыхательного объема и минутного объема дыхания (табл.).

Максимальные изменения в величине этих параметров наблюдались через 40 мин после введения ИЛ-1 β . Существенного увеличения частоты дыхательных движений не наблюдалось, хотя отмечалась тенденция к ее повышению. При проведении 2 контрольных серий экспериментов, с введением физиологического раствора и диклофенака, не было выявлено статистически значимых изменений дыхательных параметров.

Анализ вентиляционного ответа на гипоксию выявил значительное изменение чувствительности дыхательной системы к гипоксической стимуляции при внутривенном введении ИЛ-1 β . Было показано, что после введения ИЛ-1 β уменьшается угол наклона ли-

ний тренда, усредняющих вентиляционные ответы на гипоксическое воздействие (рис. 1, А, В, С). Как и следовало ожидать, при возвратном дыхании гипоксической газовой смесью по мере уменьшения парциального давления O_2 в крови наблюдалось увеличение $V_{инсп}$ и МОД как до введения ИЛ-1 β , так и после его введения. Однако после введения ИЛ-1 β линии тренда становились более пологими, гипоксический прирост вентиляционных параметров замедлялся, что сви-

детельствовало о снижении вентиляционной чувствительности к гипоксии.

Проведение количественных расчетов показало статистически значимое снижение вентиляционного ответа на гипоксическую стимуляцию на фоне действия ИЛ-1 β . Вентиляционная чувствительность к гипоксии также статистически значимо снижалась через 20 мин действия ИЛ-1 β и не восстанавливалась даже через 90 мин после его введения. Максималь-

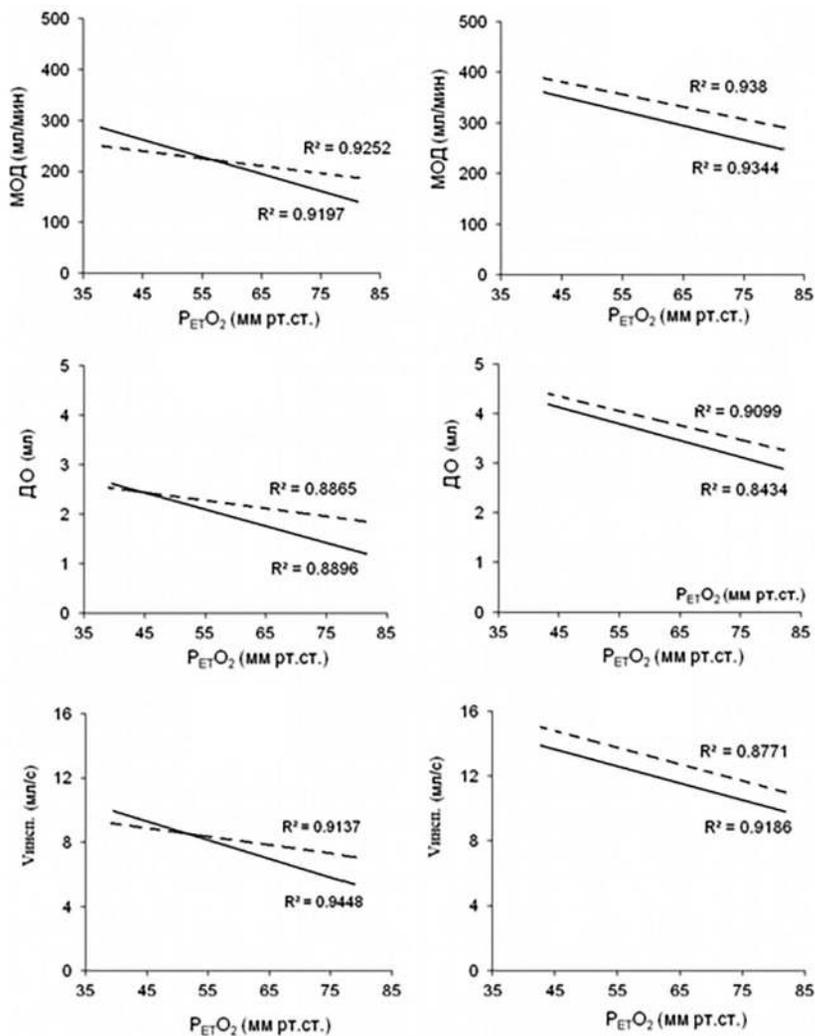


Рис. 1. Вентиляционные ответы на гипоксию в группе с введением ИЛ-1 β без предварительного введения диклофенака (А–С) и после предварительного введения диклофенака (D–F). Сплошная линия – ответ на гипоксию до введения ИЛ-1 β , штриховая линия – ответ на гипоксию после введения ИЛ-1 β . R_2 – коэффициент аппроксимации. По оси ординат – величина регистрируемого параметра; по оси абсцисс – содержание кислорода в конечной порции выдыхаемого воздуха.

Fig 1. A representative ventilatory responses to hypoxia in the IL-1 β administration group without diclofenac pretreatment (A–C) and after diclofenac pretreatment (D–F). The response to hypoxia before the administration of IL-1 β (solid line), the response to hypoxia after the administration of IL-1 β (dashed line). R_2 is the approximation coefficient. The ordinate axis is the value of the registered parameter; the abscissa axis is the oxygen content in the final portion of exhaled air.

ное снижение вентиляционного ответа на гипоксию отмечалось на 40-й мин. При этом прирост МОД при уменьшении $P_{ET}O_2$ на 1 мм рт. ст. снижался на 31%, прирост ДО – на 30% и Винс – на 46% по сравнению с фоновыми величинами (рис. 2).

Внутривенное введение ИЛ-1β на фоне действия диклофенака, ингибитора циклооксигеназ, не вызвало ослабления вентиляционного ответа на гипоксию: угол наклона линий тренда, характеризующий зависимость дыхательных параметров от величины гипоксической стимуляции, не изменялся после введения ИЛ-1β (рис. 1). На протяжении всего эксперимента не наблюдалось статистически значимого снижения приростов МОД, ДО и Винс относительно фоновых значений (рис. 2). Кроме того, были выявлены значимые различия в величине гипоксических приростов вентиляционных параметров между разными экспериментальными группами: в группе с введением ИЛ-1β приросты были существенно ниже, чем в группе с введением ИЛ-1β на фоне действия диклофенака.

Обсуждение

В представленной работе выполненной на наркотизированных крысах для выяснения влияния провоспалительных цитокинов на хеморефлекторный контроль дыхания использовался рекомбинантный человеческий ИЛ-1β. Эксперименты с различными вариантами рекомбинантных молекул интерлейкина 1 показали, что его введение в организм млекопитающих приводит к развитию целого ряда биологических реакций, одной из которых является пирогенность. Пирогенный эффект считается одной из главных характеристик ИЛ-1 [16]. В основополагающих экспе-

риментальных исследованиях *in vivo* девяностых годов неоднократно было показано, что интрацеребровен-

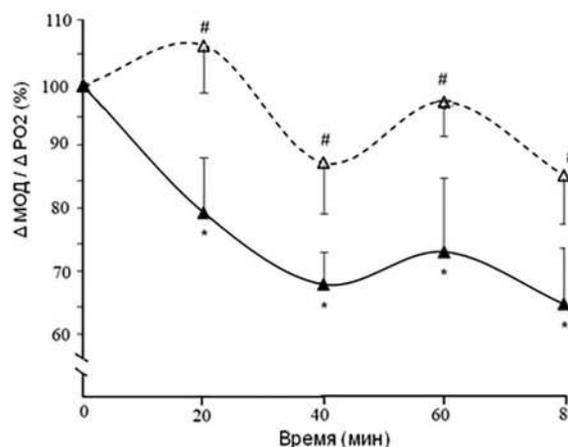


Рис. 2. Динамика вентиляционного ответа на гипоксию в группе с внутривенным введением ИЛ-1β (сплошная линия) и в группе с сочетанным введением ИЛ-1β и диклофенака (пунктирная линия). По оси ординат – величина прироста МОД при снижении $P_{ET}O_2$ на 1 мм рт. ст., выраженная в процентах. За 100% принята величина данного параметра до введения ИЛ-1β. По оси абсцисс – время после внутривенного введения ИЛ-1β. Данные представлены как $m \pm SEM$; Статистическая значимость: * – $p \leq 0,05$ – отличие показателя от исходного значения (до введения ИЛ-1β) внутри группы; # – $p \leq 0,05$ – между группами.

Fig. 2. Dynamics of the ventilatory responses to hypoxia in the group after the intravenous administration of IL-1β (solid line) and in the group with combined administration of IL-1β and diclofenac (dashed line). On the y-axis – the increase in minute ventilation with a decrease in $P_{ET}O_2$ by 1 mm Hg., expressed as a percentage. The value of this parameter before the introduction of IL-1β was taken as 100%. The abscissa shows the time after intravenous administration of IL-1β. Data are presented as $m \pm SEM$. * – $p \leq 0,05$, significant difference from the initial value (before the introduction of IL-1β) within the group; # – $p \leq 0,05$, significant differences between groups.

Таблица. Влияние физиологического раствора, диклофенака и ИЛ-1β на параметры дыхания

Table. Effect of saline, diclofenac and IL-1β on respiratory parameters

Показатели Indicats	Физиологический раствор Saline (n = 8)		Диклофенак Diclofenac (n = 8)		ИЛ-1β IL-1β (n = 8)	
	фон baseline	40 мин 40 min	фон baseline	40 мин 40 min	фон baseline	40 мин 40 min
Минутный объем дыхания (мл·мин ⁻¹) Minute ventilation (ml·min ⁻¹)	100±5,2	97± 4,0	110±8.2	117±6.5	117±10,6	143±12,8*
Дыхательный объем (мл) Tidal volume (ml)	1,0± 0,02	0,9± 0,05	1.1±0.05	1.12±0.05	1,0±0,08	1,4±0,07*
Частота дыхания (цикл·мин ⁻¹) Respiratory rate (breath·min ⁻¹)	107±2	105±4,1	105±7,1	107±6,0	113±7,2	106±9,0
Скорость инспираторного потока (мл·с ⁻¹) Inspiratory flow (ml·s ⁻¹)	3,8±0,29	3,9±0,17	3.8±0.30	4.1±0,36	3,8±0,18	4,3*±0.28

Примечание. Значения параметров представлены как $m \pm SEM$. * – $p \leq 0,05$ в сравнении с фоном.

Note. Data are presented as $M \pm SEM$. * $p < 0.05$ significant differences vs. baseline.

трикулярное, внутривенное, а также внутрибрюшинное введение рекомбинантного человеческого ИЛ-1 β крысам Вистар оказывает выраженный пирогенный эффект [17–19]. Кроме того, при введении человеческого ИЛ-1 β крысам был зафиксирован и характерный для данного цитокина анорексический эффект [19]. Данные факты говорят о наличии лиганд-рецепторного взаимодействия и передаче сигнала при взаимодействии человеческого рекомбинантного ИЛ-1 β с рецепторами к ИЛ-1 крысы. На этом основании можно с значительной долей уверенности полагать, что и прочие биологические реакции, развивающиеся при введении человеческого рекомбинантного ИЛ-1 β в организм крыс Вистар, будут в значительной мере совпадать с реакциями, развивающимися при введении крысам крысиного варианта данного цитокина. Так, например, показано влияние рекомбинантного человеческого ИЛ-1 β (ФГУП «ГосНИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург), именно этот препарат использовался и в нашем исследовании, на перекисное окисление липидов в эмоциогенных структурах головного мозга крыс [20], на процесс заживления язвы желудка и кожных ран у крыс [21, 22]. Установлено, что ИЛ-1 β крысы ортологичен ИЛ-1 β человека, у рецепторов ИЛ-1 мыши, крысы и кролика продемонстрировано 77, 75 и 78% гомологии последовательности с ИЛ-1 человека. Вероятно, этим объясняется и низкая видоспецифичность ИЛ-1. Исходя из всего вышеизложенного мы посчитали возможным использование рекомбинантного человеческого ИЛ-1 β в экспериментах на крысах.

Результаты, полученные в проведенном исследовании, указывают на то, что внутривенное введение ИЛ-1 β в условиях нормоксии оказывает активизирующее влияние на систему внешнего дыхания, увеличивая минутный объем дыхания, дыхательный объем и среднюю скорость инспираторного потока. В тоже время наблюдается ослабление гипоксического хеморефлекса и снижение вентиляционной чувствительности к гипоксии, что свидетельствует об ухудшении компенсаторных возможностей системы внешнего дыхания. Ранее нами было установлено, что внутривенное введение другого провоспалительного цитокина ФНО- α , близкого по своим свойствам к ИЛ-1 β , оказывает такое же влияние на функциональное состояние дыхательной системы [23].

Как известно, интегрированные вентиляционные ответы, которые регистрировались в нашем исследовании, соответствуют ответам синусного нерва, иннервирующего гломусные клетки каротидного тела, которые выполняют функцию артериальных хеморецепторов,

реагирующих на изменение газового состава крови. Гломусные клетки являются первичными сенсорами, которые в ответ на гипоксию, гиперкапнию и ацидоз высвобождают медиаторы, воздействующие на нервные окончания и повышающие частоту разрядов синусного нерва, что приводит к увеличению легочной вентиляции. Установлено, что внутрибрюшинное введение липополисахарида (LPS), приводящее к эндогенному высвобождению провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6), вызывая увеличение частоты разрядов синусного нерва в фоне, в тоже время снижает его активность в ответ на острые возбуждающие (гипоксия, аноксия) или тормозные (гипероксия) стимулы [24]. Эти данные позволяют предполагать, что обнаруженный нами двойственный респираторный эффект ИЛ-1 β связан с его влиянием на каротидные тела. Известно, что цитокины реализуют свои биологические эффекты посредством взаимодействия с мембранными рецепторами. Установлено, что гломусные клетки каротидных тел конститутивно экспрессируют рецепторы ФНО- α и ИЛ-1 β . Эти цитокины могут распознаваться своими мембранными рецепторами, расположенными в гломусных клетках и индуцировать высвобождение ими ингибирующего медиатора, такого как дофамин [24–26]. В результате хемосенсорная чувствительность каротидных тел будет снижена. Поскольку афферентные волокна, идущие от каротидных тел, достигают инспираторных нейронов дорсальной респираторной группы, входящей в состав медуллярного дыхательного центра, можно ожидать, что повышенный уровень ИЛ-1 β или ФНО- α в крови приведет к снижению чувствительности к гипоксии. Результаты нашего исследования подтверждают это предположение. Кроме того, циркулирующие цитокины могут влиять на периферическую артериальную хеморецепцию, вызывая морфологические изменения каротидного тела, приводящие к снижению гипоксической хемочувствительности. У взрослых крыс воспалительная реакция, вызванная системным введением LPS вызывает инфильтрацию белых кровяных клеток внутри кровеносных сосудов и дезорганизует кластеры клеток первого типа. У новорожденных крыс разовая доза LPS данная на 2-й постнатальный день вызывает разрушение клеточной архитектуры внутри каротидного тела. Через 48 ч в ультраструктуре каротидных тел отмечаются расширенные кровеносные сосуды, нерегулярная хроматиновая конденсация, разбухшие митохондрии и комплекс Гольджи в клетках 1-го типа. Клеточные повреждения присутствуют в течении 7 сут после экспозиции LPS [11]. Основываясь на этих данных, мы предполагаем, что респираторные эффекты цитокинов, обнаруженные в наших исследованиях, были свя-

заны с влиянием повышенного уровня провоспалительных цитокинов в циркулирующей крови на хемосенсорную активность каротидного тела.

Кроме того, проведенное исследование, а также результаты, полученные нами ранее [23] показали, что респираторные эффекты ключевых провоспалительных цитокинов, ИЛ-1 β и ФНО- α , опосредованы активацией циклооксигеназных путей: предварительное введение диклофенака устраняло влияние ФНО- α и ИЛ-1 β на гипоксический вентиляционный ответ. Это позволяет предполагать, что ослабление вентиляционного ответа на гипоксию, вызванное действием цитокинов, может осуществляться через усиление синтеза простагландинов (PG), которые образуются в результате метаболизма арахидоновой кислоты при последовательном действии изоформ циклооксигеназы (COX-1 и COX-2). PG могут опосредовать действие воспалительных цитокинов на периферическую хеморецепцию, участвуя в модуляции активности каротидного тела и оказывая ингибирующее действие на артериальные хеморецепторы [26]. Активация циклооксигеназных путей и синтез простагландинов может быть одним из основных механизмов влияния цитокинов на рефлекторный контроль дыхания и лежать в основе влияния воспаления на дыхательные хеморефлексы, играя существенную роль в патогенезе цитокинового шторма.

Заключение

Таким образом, проведенное нами исследование в совокупности с результатами, полученными в работах других авторов, позволяет предполагать, что острое повышение уровня циркулирующих цитокинов, ослабляет активность каротидных хеморецепторов, влияя тем самым на рефлекторные механизмы регуляции дыхания, среди которых важное место занимает гипоксический хеморефлекс. Взаимодействие цитокинов со своими рецепторами на гломусных клетках каротидного тела инициирует каскад событий, уменьшающих возбудимость этих клеток и активность синусного нерва. Как следствие снижается и вентиляционный ответ на гипоксию, что способствует ослаблению компенсаторных возможностей системы внешнего дыхания.

Литература

(п.п. 1-6; 9-15; 17-19; 23-26 см. References)

- Чучалин А.Г. Тяжелый острый респираторный синдром. *Архив патологии*. 2004; 3: 5–11.
- Мороз В.В., Голубев А.М., Марченков Ю.В., Городовикова Ю.А., Зорина Ю.Г., Лысенко Д.В. и др. Морфологические признаки острого повреждения легких различной этиоло-

гии (экспериментальное исследование). *Общая реаниматология*. 2010; 6(3): 29-34. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2010-3-29>

- Симбирцев А.С. Интерлейкин-1: от эксперимента в клинику. *Медицинская иммунология*. 2001; 3(3): 431-8.
- Перцов С.С., Коплик Е.В., Калиниченко Л.С., Симбирцев А.С. Влияние интерлейкина-1 β на перекисное окисление липидов в эмоциогенных структурах головного мозга крыс при острой стрессорной нагрузке. *Бюл. exper. биол. мед.* 2010. 150(7): 13-6.
- Сазонова Т.А., Варюшина Е.А., Александров Г.В., Гудима Г.О., Симбирцев А.С. Перспективы использования рекомбинантного интерлейкина-1 β человека для лечения острых повреждений слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта у крыс. *Российский аллергологический журнал*. 2012; 6: 70-1.
- Варюшина Е.А., Анциферова М.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Гудима Г.О., Симбирцев А.С. Регуляторная роль интерлейкина-1 при местном воспалении и регенерации тканей в модели кожной раны. *Российский аллергологический журнал*. 2012; 6: 62-3.

References

- Conti P., Caraffa A.I., Gallenga C.E., Ross R., Kritas S.K., Frydas I., et al. Coronavirus-19 (SARS-CoV-2) induces acute severe lung inflammation via IL-1 causing cytokine storm in COVID-19: a promising inhibitory strategy. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 2020; 34(6): 1971-5. <https://doi.org/10.23812/20-1-E>
- Lin S.-H., Zhao Y.-S., Zhou D.-X., Zhou F.-C., Xu F. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): cytokine storms, hyper-inflammatory phenotypes, and acute respiratory distress syndrome. *Genes Dis*. 2020; 7(4): 520-7. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.06.009>
- Tisoncik J.R., Korth M.J., Simmons C.P., Farrar J., Martin T.R., Katze M.G. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012; 76(1): 16-32. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05015-11>
- Ferrara J.L., Abhyankar S., Gilliland D.G. Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1. *Transplant. Proc.* 1993; 25(Pt 2): 1216-7.
- Pugin J., Ricou B., Steinberg K.P., Suter P.M., Martin T.R. Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for interleukin-1. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153: 1850-6.
- Channappanavar R., Perlman S. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin. Immunopathol.* 2017; 39: 529-39. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0629-x>
- Chuchalin A.G. Severe acute respiratory syndrome. *Arhiv patologii*. 2004; 3: 5–11. (In Russian)
- Moroz V.V., Golubev A.M., Marchenkov Y.V., Gorodovikova Y.A., Zorina Y.G., Lysenko D.V., et al. Morphological signs of acute lung injury of various etiologies (experimental study). *Obshchaya-reanimatologiya*. 2010; 6(3): 29-34. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2010-3-29>. (In Russian)
- Dushianthan A., Grocott M., Postle A., Cusack R. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. *Postgrad. Med. J.* 2011; 87(1031): 612-22.
- Lam S.Y., Tipoe G.L., Liang E.C., Fung M.L. Chronic hypoxia up-regulates the expression and function of proinflammatory cytokines

- in the rat carotid body. *Histochem. Cell Biol.* 2008; 130(3): 549–59. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0437-4>
11. Gauda E.B., McLemore G.L. Premature birth, homeostatic plasticity and respiratory consequences of inflammation. *Respir Physiol Neurobiol.* 2020; 274: 103337. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2019.103337>
 12. Graff G.R., Gozal D. Cardiorespiratory responses to interleukin-1beta in adult rats: role of nitric oxide, eicosanoids and glucocorticoids. *Arch. Physiol. Biochem.* 1999; 107(2): 97–112.
 13. Herlenius E. An inflammatory pathway to apnea and autonomic dysregulation. *Respiratory Physiology and Neurobiology.* 2011; 178: 449–57. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.06.026>
 14. McQueen D.S. The effects of some prostaglandins on respiration in anaesthetized cats. *Br J Pharmacol.* 1974; 50(4): 559–68. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1974.tb08589.x>
 15. McQueen D.S., Ritchie I.M., Birrell G.J. Arterial chemoreceptor involvement in salicylate-induced hyperventilation in rats. *Br J Pharmacol.* 1989; 98(2): 413–24. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1989.tb12612.x>
 16. Simbirtsev A.S. Interleukin-1: from the experiment to the clinic. *Meditsynskaya immunologiya.* 2001; 3 (3): 431–8. (In Russian)
 17. Dascombe M.J., Rothwell N.J., Sagay B.O., Stock M.J. Pyrogenic and thermogenic effects of interleukin 1 beta in the rat. *Am. J. Physiol.* 1989; 256: E7–11. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1989.256.1.E7>
 18. Morimoto A., Murakami N., Sakata Y., Watanabe T., Yamaguchi K. Functional and structural differences in febrile mechanism between rabbits and rats. *Journal of Physiology.* 1990; 427: 227–39. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1990.sp018169>
 19. McCarthy H.D., Dryden S., Williams G. Interleukin-1 P-induced anorexia and pyrexia in rat: relationship to hypothalamic neuropeptide Y. *Am. J. Physiol.* 1995; 269: E852–E857. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1995.269.5.E852>
 20. Pertsov S.S., Koplík E.V., Kalinichenko L.S., Simbirtsev A.S. Influence of interleukin-1β on lipid peroxidation in the emotogenic brain structures of rats under acute stress. *Byull. exper. biol. Med.* 2010; 150(7): 13–6. (In Russian)
 21. Sazonova T.A., Varyushina E.A., Aleksandrov G.V., Gudima G.O., Simbirtsev A.S. Prospects for the use of recombinant human interleukin-1β for the treatment of acute lesions of the mucous membrane of the gastrointestinal tract in rats. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal.* 2012; 6: 70–1. (In Russian)
 22. Varyushina E.A., Antsiferova M.A., Aleksandrov G.V., Sazonova T.A., Gudima G.O., Simbirtsev A.S. Regulatory role of interleukin-1 in local inflammation and tissue regeneration in a skin wound model. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal.* 2012; 6: 62–3. (In Russian)
 23. Aleksandrova N.P., Klinnikova A.A., Danilova G.A. Cyclooxygenase and nitric oxide synthase pathways mediate the respiratory effects of TNF-α in rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2021; 284: 103567. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2020.103567>
 24. Fernández R., González S., Rey S., Cortés P.P., Maisey K.R., Reyes E.P., et al. Lipopolysaccharide-induced carotid body inflammation in cats: functional manifestations, histopathology and involvement of tumour necrosis factor-α. *Exp. Physiol.* 2008; 93(7): 892–907. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2008.041152>
 25. Zhang X.J., Wang X., Xiong L.Z., Fan J, Duan X.L., Wang B.R. Up-regulation of IL-1 receptor type I and tyrosine hydroxylase in the rat carotid body following intraperitoneal injection of IL-1beta. *Histochem Cell Biol.* 2007; 128(6): 533–40.
 26. Gómez-Niño A., Almaraz L., González C. In vitro activation of cyclooxygenase in the rabbit carotid body: effect of its blockade on [3H] catecholamine release. *J Physiol.* 1994; 476(2): 257–67.

Сведения об авторах:

Данилова Галина Анатольевна, канд. биол. наук, науч. сотр., лаб. физиологии дыхания ФГБУН ИФ РАН;

Александров Вячеслав Георгиевич, доктор биол. наук, проф., руководитель группы нейрофизиологии висцеральных систем ФГБУН ИФ РАН;

Александрова Нина Павловна, доктор биол. наук, зав. лаб. физиологии дыхания ФГБУН ИФ РАН.

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092

Гераськин И.В.¹, Гераськин В.А.¹, Гераськина Н.В.²

Влияние гемотрансфузий у новорожденных и детей грудного возраста на состав и сродство к кислороду физиологического гемоглобина

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет», 603005, Нижний Новгород, Россия, пл. Минина и Пожарского. д.10/1;

²ГБУЗ НО «Нижегородская областная детская клиническая больница», 603005, Нижний Новгород, Россия, ул. Ванеева, д. 211

В клинической практике гемотрансфузий используется переливание эритроцитов крови от взрослых доноров реципиентам неонатального и младенческого периода развития с динамично изменяющимся уровнем фетального гемоглобина крови HbF (70-90%). Именно эта возрастная группа отличается уникальными физиологическими особенностями в быстро изменяющихся соотношениях гемоглобинов крови при росте и взрослении организма. Сохраняется ситуация неопределенности четких научных критериев изменчивости состава гемоглобинов крови у пациентов неонатального периода, способности динамично-меняющейся структуры гемоглобинов новорожденных к обеспечению тканей кислородом.

Цель исследования – изучение влияния гемотрансфузий у новорожденных и детей грудного возраста на изменение состава и сродство к кислороду физиологического гемоглобина.

Методика. Работа основана на результатах анализа клинических данных неонатологических отделений, отделений реанимации и интенсивной терапии. Систематизированы 923 исследования показателей типов гемоглобинов крови, кислотно-щелочного баланса и газового состава крови у 256 пациентов. Проведено сравнение динамики показателей структуры гемоглобинов крови и сродства к кислороду у новорожденных детей и младенцев до и после переливания эритроцитосодержащих компонентов донорской крови в процессе лечения.

Результаты. При сравнении показателей фетального гемоглобина (HbF%) у новорожденных детей в зависимости от наличия или отсутствия гемотрансфузий показано, что снижение уровня фетального гемоглобина от общего гемоглобина крови, более выражено у пациентов, получавших трансфузии эритроцитов крови. Более значителен был уровень снижения HbF% при переливаниях крови у недоношенных детей (до 29,81% по сравнению с 17,83% в группе доношенных). Определены уровни парциального давления кислорода в крови у новорожденных, при которых достигается 50 %-я сатурация (P50 mmHg) – по этому параметру оценивается сродство гемоглобина к кислороду. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости достижения большей величины парциального давления кислорода (pO₂) для 50% насыщения гемоглобина крови у новорожденных после проведения гемотрансфузий.

Заключение. В отличие от старших возрастных групп накопление и выделение кислорода в ответ на потребности тканей у детей первого года жизни зависит не только от количественных показателей общего гемоглобина крови, но также от состава и соотношения типов. Снижение уровня фетального гемоглобина как физиологическое, так и при трансфузиях эритроцитов крови, сопровождается снижением сродства общего гемоглобина к кислороду у детей первого года жизни. Последнее обуславливает уменьшение способности к адресной доставке кислорода в участки тканей с наиболее выраженным ацидозом и гипоксией.

Ключевые слова: гемотрансфузии; фетальный гемоглобин; диссоциация оксигемоглобина; сродство гемоглобина к кислороду; неонатальный период

Для цитирования: Гераськин И.В., Гераськин В.А., Гераськина Н.В. Влияние гемотрансфузий у новорожденных и детей грудного возраста на состав и сродство к кислороду физиологического гемоглобина. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(1): 71-78.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.71-78

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Гераськин И.В.; сбор и обработка материала – Гераськин И.В., Гераськина Н.В.; подготовка иллюстративного материала – Гераськин В.А.; статистическая обработка материала – Гераськин И.В.; написание текста – Гераськин И.В., Гераськина Н.В.; редактирование – Гераськин В.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Гераськин Иван Владимирович, e-mail: ivan_geraskin19@mail.ru (аспирант кафедры нормальной и патологической физиологии; ординатор ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет»)

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.07.2022

Принята в печать 2023

Опубликована 2023

Geraskin I.V.¹, Geraskin V.A.¹, Geraskina N.V.²

Effect of hemotransfusions in newborns and infants on the composition and oxygen affinity of physiological hemoglobin

¹Privolzhsky Research Medical University,
Ploshchad Minina i Pozharskogo 10/1, Nizhny Novgorod 603005

²Nizhny Novgorod Regional Children's Clinical Hospital,
Vaneeva St. 211, Nizhny Novgorod 603005

In the clinical practice of transfusions, red blood cells containing adult-type hemoglobin (HbA, 98-100%) are transfused from adult donors to neonatal and infant recipients with dynamically changing levels of fetal blood hemoglobin (HbF, 70-90%). It is this age group that is distinguished by unique physiological features of the rapidly changing ratios of blood hemoglobins with the growth and maturation of the body. The situation of uncertainty remains with respect of clear scientific criteria for the variability of the composition of blood hemoglobins in neonatal patients, specifically, the ability of the dynamically changing hemoglobin structure of newborns to provide oxygen to tissues.

Aim was to physiological hemoglobin. determine the effect of blood transfusions on changes in the composition and functions of he moglobins in neonatal patients and infants.

Methods. The work was based on the analysis of clinical data from neonatology departments and intensive care units and systematized 923 studies of indicators of blood hemoglobin types, acid-base state. and blood gas composition in 256 patients. The dynamics of indicators of physiological hemoglobin and oxygen affinity were compared in newborns and infants before and after blood transfusion during treatment.

Results. Comparing the values of HbF % in newborns, depending on the use of hemotransfusions showed that a decrease in fetal hemoglobin proportion of total blood hemoglobin was more pronounced in patients receiving blood transfusions. A more significant decrease in fetal hemoglobin during blood transfusions was observed in premature infants, up to 29.81% vs. 17.83% in the full-term group. The partial oxygen pressure in the blood of newborns, at which 50% saturation (P50 mmHg) is achieved was determined. This parameter is used to estimate the hemoglobin oxygen affinity. The study results indicate that a higher oxygen partial pressure (pO₂) is required for 50% saturation of hemoglobin in the blood of newborns after hemotransfusion.

Conclusion. In contrast to older age groups, the accumulation and release of oxygen in response to the tissue demands in children of the first year of life depend not only on the quantitative values of total blood hemoglobin, but also on its composition, the hemoglobin fraction ratio. A decrease in the proportion of fetal hemoglobin, both physiological and induced by blood transfusion, is accompanied by a decrease in the total hemoglobin oxygen affinity in children of the first year of life. This reduces the capability for targeted oxygen delivery to tissue areas with the most pronounced acidosis and hypoxia.

Keywords: hemotransfusion; fetal hemoglobin; dissociation of oxyhemoglobin; hemoglobin oxygen affinity; neonatal period

For citation: Geraskin I.V., Geraskin V.A., Geraskina N.V. The effect of hemotransfusions in newborns and infants on the composition and oxygen affinity of physiological hemoglobin. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimentalnaya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(1) 71-78. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.71-78

For correspondence: Ivan Vladimirovich Geraskin (postgraduate student of the Department of Normal and Pathological Physiology; place of work – resident of the Volga Research Medical University) ivan_geraskin19@mail.ru

Author's contribution: The concept and design of the study – Geraskin I.V.; collection and processing of the material – Geraskin I.V., Geraskina N.V.; preparation of illustrative material – Geraskin V.A.; statistical processing of the material – Geraskin I.V.; Writing of the text – Geraskin I.V., Geraskina N.V.; editing – Geraskin V.A. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors

Information about the authors

Geraskin I.V., <https://orcid.org/0000-0003-3978-2268>

Geraskin V.A., <https://orcid.org/0000-0002-0607-7004>

Geraskina N.V., <https://orcid.org/0000-0002-6312-6538>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 03.07.2022

Accepted 2023

Published 2023

Введение

К наиболее распространенным формам анемии у пациентов неонатального периода относится физиологическая анемия новорожденных и анемия недоношенных. Анемия в неонатальном периоде может быть обусловлена кровопотерей, уменьшением продукции эритроцитов или усилением гемолиза. Значительная распространенность неонатальной анемии тяжелой степени в отделениях интенсивной терапии новорожденных обуславливает необходимость в переливании эритроцитов донорской крови пациентам [1]. Ни в какой иной период жизни пациента процесс принятия врачебного решения о переливании компонентов крови не является таким сложным и ответственным, как в период новорожденности. Именно эта возрастная группа при росте и взрослении организма, отличается уникальными физиологическими особенностями состава гемоглобинов крови: фетального (HbF) и гемоглобина взрослого человека (HbA). Необходимо констатировать, что в существующей практике трансфузий, осуществляется переливание эритроцитов крови от взрослых доноров с содержанием гемоглобина HbA (98-100%) реципиентам неонатального и младенческого периода развития с динамично изменяющимся уровнем гемоглобина HbF (70-90%). В отличие от взрослых у новорожденного ребенка способность эритроцитов связывать и выделять кислород в ткани зависит как от сродства гемоглобина к кислороду (p50), его концентрации, так и от количества HbF в составе общего гемоглобина крови – totHb [2].

При патологии неонатального периода регуляторные факторы структуры гемоглобина крови мобильны, постоянно трансформируются и не всегда предсказуемым образом. Потенциальное воздействие стремительных изменений соотношения фракций гемоглобинов крови при гемотрансфузиях, последующее влияние на сродство гемоглобина к кислороду и его доступность тканям пациентов периода новорожденности и младенчества остаются малоизученными [3].

Если индивидуальные параметры состава и кислородтранспортной функции гемоглобинов крови новорожденного не могут быть установлены, возрастает вероятность гемотрансфузии на основе лишь клинической картины и базовых лабораторных показателей крови: количества эритроцитов, общего гемоглобина, гематокрита. Изучение способности у каждого больного ребенка к пропорциональному обеспечению кислородом относительно потребности способствует рационализации принятия решения – когда и как переливать донорские трансфузионные среды с эритроцитами [4-5].

Цель исследования – изучение влияния гемотрансфузий у новорожденных и детей грудного возраста на изменение состава и на сродство к кислороду физиологического гемоглобина.

Методика

Проведено сравнение динамики показателей HbF% и p50 mmHg у новорожденных детей и младенцев до и после гемотрансфузий. Исследования осуществлялись по принципу случайной выборки клинических показателей пациентов в неонатологических отделениях и отделениях реанимации и интенсивной терапии [6].

В обследование включены клинические данные 256 пациентов педиатрического профиля, выполнено 923 исследования показателей типов гемоглобинов крови. Возраст пациентов в группах составлял от 0 до 29 сут жизни что соответствовало неонатальному периоду развития. Кроме того, проведены исследования динамики HbF% и p50 mmHg у пациентов в возрастном интервале от 29 до 60 сут жизни, входящему в период младенческого возраста. У детей в возрасте первого года жизни, находящихся в критическом состоянии, трансфузия компонентов донорской крови содержащих эритроциты, проводилась при уровне гемоглобина менее 85 г/л. Объем проводимых трансфузий эритроцитарной массы у новорожденных детей определялся из расчета 1 мл/кг. Использовались компоненты крови, содержащие эритроциты со сроком хранения не более 10 сут с момента заготовки. Приведенные данные – соответствуют требованиям Приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации (Минздрав России) от 2 апреля 2013 г. N 183н г. Москва «Об утверждении правил клинического использования донорской крови и (или) ее компонентов». Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом университета. Все исследования выполнялись по международным правилам работы с биоматериалом людей.

Отдельные исследования выполнены у пациентов в возрастном интервале от 0 до 60 сут, так как это позволяло отследить динамику изменений в течение более продолжительного времени. Количество исследований в выборках по показателю HbF % составило 811, а количество исследований в выборках по показателю p50 mmHg – 768. Результаты получены при анализе данных историй болезней в педиатрических отделениях на этапах лечебно-диагностического процесса (табл. 1). Распределение исследований типов гемоглобина у пациентов проводилось в соответствии с международной классификации болезней (МКБ-10):

отдельные состояния, возникающие в перинатальном периоде (P00-P96) – 467 исследований, врожденные аномалии, деформации и хромосомные нарушения (Q00-Q99) – 92 исследования, другие формы заболеваний – 76 исследований. Сформировано распределение количества обследованных пациентов по критериям доношенности: д – доношенные дети, н – недоношенные дети. Учитывая выраженную зависимость регистрируемых показателей объемов и концентраций относительно массы тела и циркулирующей крови пациентов, в категории детей первого года жизни выделено 4 группы исследований (табл. 1) [7-8].

Фиксация возраста после рождения в сутках обусловлена высокими скоростными параметрами изменений регистрируемых показателей. В качестве критерия тяжести состояния использовали показатели выраженности гипоксии и объема врачебного вмешательства для достижения компенсации патологического процесса.

Исследования проведены при помощи анализатора оксиметрии и газов крови «Radiometer ABL 800 basic». Осуществлен анализ показателей: уровня фетального гемоглобина (HbF); концентрации взрослого гемоглобина (HbA); фракции метгемоглобина – MetHb. Для оценки сродства гемоглобина к кислороду p50, определялась величина парциального давления кислорода (pO₂) в крови. Выборка результатов исследований осуществлялась в группах по критерию не связанных совокупностей. Данное распределение исследований основано на сравнении показателей у различных категорий пациентов: без гемотрансфузий и при проведении гемотрансфузий.

Обработка результатов исследования проведена с помощью статистического анализа «Medstatistic» и прикладного пакета программ Microsoft Office Excel 2010 с использованием ресурса «Анализ данных». Для сравнения выборок использован параметрический t-критерий Стьюдента. Критическим уровнем статистической значимости различий (p) считали p < 0,05. Средние значения (M) и стандартные откло-

нения (σ) определены данными вариационных рядов. Распределение признаков соответствует нормальному (распределение Гаусса) [9].

Результаты

При анализе зависимости исследуемых показателей от проведения гемотрансфузий обнаружено, что снижение доли фетального гемоглобина (HbF) в общем количестве физиологического гемоглобина крови было статистически значимо (p < 0,05) более выраженным в группе новорожденных, получавших переливания эритроцитов крови (табл. 2). При увеличении временного интервала исследований с 0 до 60 сут жизни (n-410) сохранялась аналогичная тенденция – отмечалось снижение уровня HbF в группе пациентов (2), получавших гемотрансфузии (n-125) по отношению к показателям в группе (1) без проведения гемотрансфузий (n-285). Причем, разница между значениями HbF до и после гемотрансфузии возрастала до 25,4%; (табл. 2). Снижение содержания фетального гемоглобина в крови пациентов, получавших гемотрансфузии, в возрастном интервале от 29 до 60 сут жизни, по сравнению с группой без гемотрансфузий также было статистически значимым (p < 0,01).

Результаты исследования динамики HbF у пациентов неонатального периода по признаку доношенности и недоношенности свидетельствуют о более выраженном снижении уровня фетального гемоглобина при гемотрансфузиях у недоношенных пациентов. Если у доношенных детей в группах сравнения: (1) без гемотрансфузий и (2) на фоне гемотрансфузий, показатель снижения уровня фетального гемоглобина (Δ HbF) составил 17,83%, то у недоношенных детей аналогичный показатель соответствовал 29,81%. Более значительное увеличение Δ HbF в группе с гемотрансфузиями у недоношенных детей свидетельствует о более выраженном изменении соотношения фракций физиологических типов гемоглобинов крови (табл. 3).

Сродство гемоглобина к кислороду, определяемое по величине значений p50, в клинической прак-

Таблица 1. Количество исследований в выборках по группам, в зависимости от возраста пациентов

Table 1. The number of research results in samples by groups, depending on the age of patients

Количество исследований/Number of studies	HbF % n	HbA n
Исследования у новорожденных (возраст < 29 сут жизни) / Studies in newborns (age < 29 days of life)	299	292
Исследования у доношенных (возраст < 29 сут жизни) / Studies in term baby (age < 29 days of life)	73	81
Исследования у недоношенных (возраст < 29 сут жизни) / Studies in premature baby (age < 29 days of life)	376	324
Исследования у младенцев (возраст 29 - 60 сут жизни) / Studies in infants (age 29 days to 60 days of life)	63	71

тике при исследовании крови, зачастую является недооцененным параметром [10]. Выполнены сравнения изменений уровней сродства гемоглобина крови к кислороду р50 mmHg в группах пациентов неан-

тологических отделений при гемотрансфузиях и без них (табл. 4).

Данные, выявленные при обследованиях пациентов неонатального и младенческого периода

Таблица 2. Влияние гемотрансфузий на динамику уровней HbF % у детей (n-285)

Table 2. The effect of blood transfusions on the dynamics of HbF% levels in children (n-285)

Группы пациентов/patient groups	HbF %	
	Без гемотрансфузий (1) / no hemotransfusions	Гемотрансфузии(2)/hemotransfusions-
Новорожденные (возраст < 29 сут жизни) / newborns (age < 29 days of life)	72,63±2,6 n-120	57,76±3,2 * n-179
Доношенные (возраст < 29 сут жизни/term baby (age < 29 days of life)	85,47±1,7 n-45	67,64±4,7 * n-28
Недоношенные (возраст < 29 сут жизни)/preterm baby (age < 29 days of life)	74,69±3,2 n-119	44,88±3,0 * n-257
Младенцы (возраст 29 - 60 сут жизни)/infant (age 29-60 days)	61,47±7,6 n-19	41,95±3,6 * n-44

Примечание. * – $p < 0,01$, статистическая значимость различий с показателями контрольной группы (без гемотрансфузий)

Note. * – $p < 0,01$, statistical significance of differences with the control group (without hemotransfusions)

Таблица 3. Влияние гемотрансфузий на динамику изменений показателей Δ HbF % и Δ р50 mmHg у новорожденных (n-285)

Table 3. The effect of blood transfusions on the dynamics of the values of Δ HbF % and Δ P50 mmHg in newborns (n-285)

Группы пациентов / patient groups	Δ HbF%	Δ p50 mmHg
Новорожденные (возраст < 29 сут жизни)/newborns (age < 29 days of life)	14,87	- 2,95
Доношенные (возраст < 29 сут жизни)/term baby (age < 29 days of life)	17,83	-3,87
Недоношенные (возраст < 29 сут жизни)/preterm baby (age < 29 days of life)	29,81	-2,02
Новорожденные и младенцы (возраст 29 – 60 сут жизни) /Младенцы (возраст 29 – 60 сут жизни)/infant (age 29-60 days)	19,52	-3,98

Примечание. Δ – показатель разности значений величин в группах сравнения до и после гемотрансфузий

Note. Δ – index of the difference between the values in the comparison groups before and after hemotransfusions.

Таблица 4. Влияние гемотрансфузий на динамику уровней сродства гемоглобина крови к кислороду р50 mmHg у детей (n-285)

Table 4. The effect of blood transfusions on the dynamics of blood hemoglobin affinity to oxygen p50 mmHg in children (n-285)

Группы пациентов/patient groups	p50 mmHg	
	Без гемотрансфузий(1)	Гемотрансфузии(2)
Новорожденные (возраст < 29 сут жизни)/newborns (age < 29 days of life)	19,89±0,3 n-168	22,84±0,5* n-124
Доношенные (возраст < 29 суток жизни)/term baby (age < 29 days of life)	19,29±0,5 n-61	23,16±1,1* n-20
Недоношенные (возраст < 29 сут жизни)/preterm baby (age < 29 days of life)	21,52±0,4 n-159	23,54±0,6* n-165
Младенцы (возраст 29 – 60 суток жизни) /infant (age 29-60 days)	22,67±0,5 n-14	26,65±1,0* n-57

Примечание. * – $p < 0,05$ – статистически значимое отличие показателей от значений в контрольной группе (пациенты без гемотрансфузий)

Note. * – $p < 0.05$ – statistically significant difference in indicators from the values in the control group (patients without blood transfusions)

развития получавших гемотрансфузии, свидетельствуют о формировании низких значений HbF % и возрастании величины p50. Причем, во всех группах исследования зафиксированы отрицательные значения Δ p50 (табл. 3), что свидетельствует о возрастании уровня p50 после проведения гемотрансфузий и необходимости большего парциального давления кислорода для 50% насыщения гемоглобина крови. Приходится констатировать, что снижение уровня фракции HbF % определяет последующее уменьшение сродства общего гемоглобина к кислороду и ускоренное высвобождение его в тканях. Если у взрослых и пациентов старших возрастных групп ускорение и усиление высвобождения O₂ в тканях является ожидаемым конечным результатом проведенных гемотрансфузий, то у новорожденных и младенцев посттрансфузионная ситуация отличается в значительной степени.

У новорожденных детей и младенцев с момента рождения существует уникальное состояние гетерогенности структур гемоглобина крови. Физиологически в крови ребенка одновременно, в пропорциях зависящих от постнатального возраста, присутствуют 2 наиболее крупные фракции оксигемоглобина – HbF+O₂ и HbA+O₂. Соответственно диссоциация общего оксигемоглобина у новорожденных детей

и младенцев многоконтурная и зависит от динамики соотношений величин физиологических гемоглобинов. Известно, что общий гемоглобин донора состоит из фракции HbA гемоглобина взрослого человека, способного диссоциировать при определенном сочетании: насыщения O₂%, напряжения кислорода PO₂ и показателя концентрации водородных ионов pH (рис. 1).

Как правило, в источниках литературы, кривая диссоциации оксигемоглобина крови однокомпонентная и обозначается как (HbO₂) – так как в старших возрастных группах, структура оксигемоглобина крови однородна и представлена фракцией HbA.

Преобладание HbF в составе структуры гемоглобинов у новорожденного обуславливает увеличение сродства гемоглобина к кислороду и способствует доставке и высвобождению кислорода в участках тканевой гипоксии. По сравнению с гемоглобином пациентов старших возрастных групп и взрослых более высокое сродство фетального гемоглобина к кислороду определяет его особенность диссоциировать в условиях более низких значений pH (рис. 2). Наиболее значимы эти изменения для клеток и тканей пациентов неонатального периода, находящихся в состоянии ишемии и гипоксии – головной мозг, сердце, почки, кишечник, железы внутренней секреции.

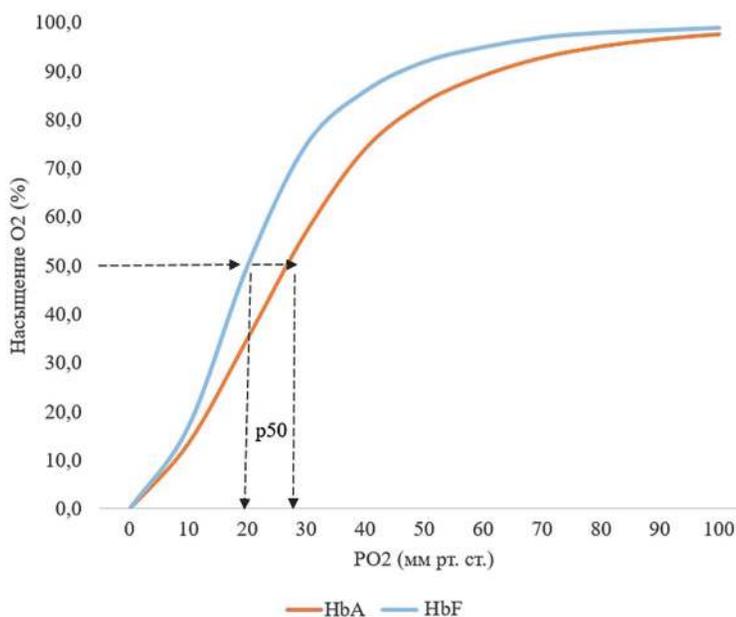


Рис. 1. Кривые диссоциации оксигемоглобинов – HbF и HbA

Fig. 1. Oxyhemoglobin dissociation curves – HbF and HbA

Существующая в настоящее время практика трансфузий эритроцитарной среды с гемоглобином HbA, от взрослого донора новорожденному реципиенту с высоким уровнем HbF в крови определяет развитие последовательности причинно-следственных событий, связанных с трансформацией состава общего гемоглобина крови [11].

В посттрансфузионном периоде зарегистрирована отчетливая динамика снижения уровня фетального гемоглобина в совокупности с обратной зависимостью величин p50 (табл. 3). Причем, данная зависимость зафиксирована во всех возрастных интервалах у обследованных пациентов от рождения до младен-

ческого периода развития. При переливании эритроцитов крови взрослого донора в кровеносной системе ребенка реципиента возрастает объем циркулирующей крови на величину объема трансфузии, увеличивается содержание гемоглобина HbA и снижается концентрация фетального гемоглобина. В ходе исследований, решено данные изменения концентрации фетального гемоглобина обозначить как «эффект разведения HbF».

Снижение уровня концентрации фетального гемоглобина в посттрансфузионном периоде способствует уменьшению способности оксигемоглобина, к адресной диссоциации в участках ткани с наиболее выраженным ацидозом и гипоксией (рис. 3).

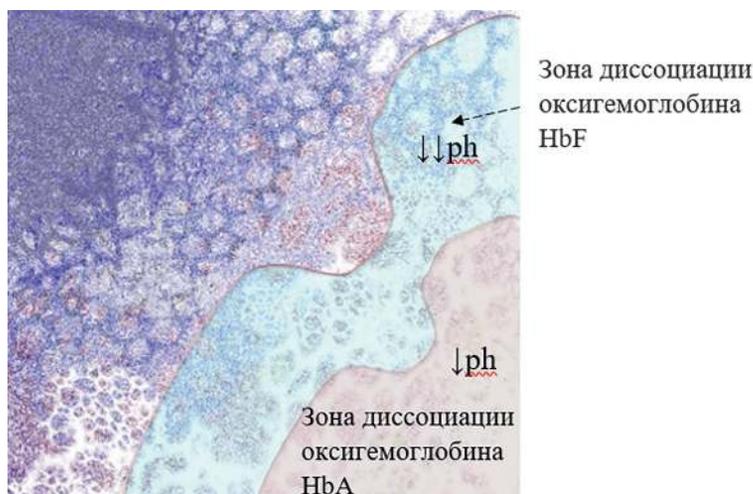


Рис. 2. Структура обеспечения O₂ гипоксической зоны повреждения у новорожденных до гемотрансфузии.

Fig. 2. The structure of the provision of O₂ hypoxic damage zone in newborns before hemotransfusion.

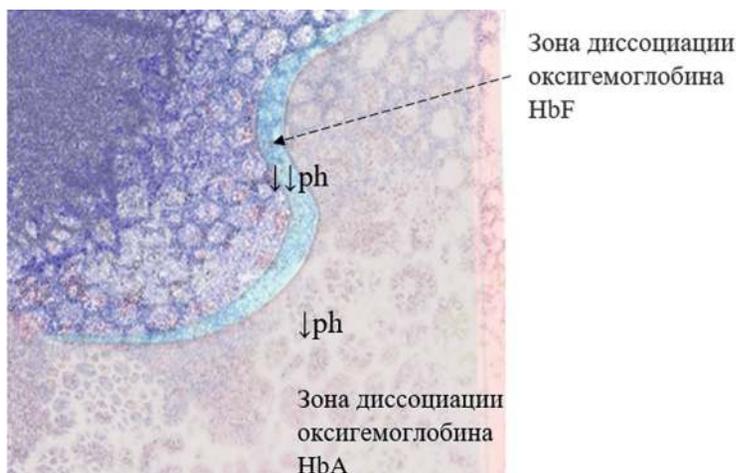


Рис. 3. Структура обеспечения гипоксической зоны повреждения у новорожденных при гемотрансфузии.

Fig. 3. The structure of the hypoxic zone of damage in newborns during hemotransfusion.

Заключение

Восстановление уровня общего гемоглобина при гемотрансфузии и, соответственно, повышение общей способности транспортировки кислорода не является единственным и всеобъемлющим критерием компенсации нарушений критических функций крови. У новорожденных детей и младенцев формирование баланса кислорода в крови, его доставки к тканям при патологии происходит в состоянии непрерывных изменений структуры физиологических гемоглобинов, в отличие от стабильных значений состава гемоглобина у детей старшего возраста и взрослых пациентов. У новорожденных и младенцев снижение уровня фетального HbF % как физиологическое, так и при гемотрансфузиях, сопутствующее понижению сродства общего гемоглобина к кислороду определяют уменьшение способности к адресной доставке O₂ в участки тканей с наиболее выраженным ацидозом и гипоксией.

Показания к проведению гемотрансфузий в неонатологии должны быть детально обоснованы. Если существует возможность стабилизации состояния пациента без осуществления гемотрансфузии или отсутствует уверенность, что она принесет ему пользу, то от переливания эритроцитов крови целесообразно воздержаться.

Литература

(п.п. 1-3; 5; 7; 8; 10; 11 см. References)

4. Аксельрод Б.А., Балашова Е.Н., Баутин А.Е., и др. Клиническое использование эритроцит содержащих компонентов донорской крови. *Гематология и трансфузиология*. 2018; 63(4): 372-435. <https://doi.org/10.25837/HAT.2019.62.39.006>
6. Матвеев В.А. *Статистика*. М.: Типография Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. 2015.
9. Полякова В.В. *Основы теории статистики*. М.: Издательство Уральского университета; 2015.

References

1. Aher S., Malwatkar K., Kadam S. Neonatal anemia. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2008 Aug; 13(4): 239-47. doi: 10.1016/j.siny.2008.02.009. Epub 2008 Apr 14. PMID: 18411074.
2. Storz J.F. Gene Duplication and Evolutionary Innovations in Hemoglobin-Oxygen Transport. *Physiology (Bethesda)*. 2016 May;31(3):223-32. doi: 10.1152/physiol.00060.2015. PMID: 27053736; PMCID: PMC5005275.
3. Stockman J.A. 3rd. Anemia of prematurity. Current concepts in the issue of when to transfuse. *Pediatr Clin North Am*. 1986; 33(1): 111-28. doi: 10.1016/s0031-3955(16)34972-0. PMID: 3513096.
4. Akselrod B.A., Balashova E.N., Bautin A.E., et al. Clinical guidelines for red blood cell transfusion. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2018; 63(4): 372-435. <https://doi.org/10.25837/HAT.2019.62.39.006> (in Russian)
5. Ree I.M.C., Lopriore E. Updates in Neonatal Hematology: Causes, Risk Factors, and Management of Anemia and Thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2019 Jun;33(3):521-532. doi: 10.1016/j.hoc.2019.01.013. Epub 2019 Mar 23. PMID: 31030817.
6. Matveev V.A. *Statistics. [Statistika]*. Moscow: Printing House of Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky. 2015. (in Russian)
7. Hasanbegovic E., Cengic N., Hasanbegovic S., Heljic J., Lutolli I., Begic E. Evaluation and Treatment of Anemia in Premature Infants. *MedArch*. 2016; 70(6): 408-12. doi: 10.5455/medarch.2016.70.408-412. PMID: 28210010; PMCID: PMC5292221.
8. Liao Z., Zhao X., Rao H., Kang Y. Analysis of correlative risk factors for blood transfusion therapy for extremely low birth weight infants and extreme preterm infants. *Am J Transl Res*. 2021; 13(7): 8179-85. PMID: 34377303; PMCID: PMC8340198.
9. Polyakova. V. *Fundamentals of the theory of statistics. [Osnovy teorii statistiki]* Moscow; Publishing House of the Ural Federal University, 2015. (in Russian)
10. Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Hernández Cáceres J.L., et al. A new model of hemoglobin oxygenation. *Entropy (Basel)*. 2022; 24(9): 1214. doi: 10.3390/e24091214. PMID: 36141103; PMCID: PMC9498255.
11. Gavulic A.E., Dougherty D., Li S.H., et al. Fetal hemoglobin levels in premature newborns. Should we reconsider transfusion of adult donor blood? *J Pediatr Surg*. 2021; 56(11): 1944-8. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2021.04.018. Epub 2021 Apr 24. PMID: 34052004.

Сведения об авторах:

Гераськин Иван Владимирович, аспирант, каф. нормальной и патологической физиологии; место работы — ординатор ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет», e-mail: ivan_geraskin19@mail.ru;
Гераськин Владимир Анатольевич, канд. мед. наук, доцент каф. анестезиологии, реаниматологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет»;
Гераськина Наталья Валентиновна, врач — неонатолог, ГБУЗ НО «Нижегородская областная детская клиническая больница».

© Коллектив авторов, 2023

УДК 615.849.11.015.43.076.9

Терехина Н.А.¹, Селин А.Д.¹, Горячева О.Г.¹, Терехин Г.А.²

Прогностическое значение определения активности гамма-глутамилтранспептидазы в плазме крови крыс при действии электромагнитного излучения

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

²ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, 614089, Пермь, Россия, ул. Полевая, д. 2

Цель исследования – оценка уровня активности γ -глутамилтранспептидазы в плазме крови крыс при действии электромагнитного излучения дециметрового диапазона и проведение корреляционного анализа взаимосвязи активности этого фермента с основными показателями антиоксидантной защиты.

Методика. Эксперимент выполнен на крысах, которые находились под действием электромагнитного излучения дециметрового диапазона в течение 3 мес. В динамике исследования через 1, 2 и 3 мес в плазме крови спектрофотометрически определяли активность фермента γ -глутамилтранспептидазы. Проведен корреляционный анализ взаимосвязи активности γ -глутамилтранспептидазы и содержания восстановленного глутатиона, а также активности этого фермента и содержания церулоплазмينا в плазме крови.

Результаты. Длительное пребывание животных в условиях воздействия электромагнитного излучения дециметрового диапазона приводит к увеличению активности γ -глутамилтранспептидазы в плазме крови наряду с увеличением уровня церулоплазмينا и глутатиона. Установлены тесные корреляционные связи активности γ -глутамилтранспептидазы с содержанием восстановленного глутатиона в эритроцитах, а также активности этого фермента с содержанием церулоплазмينا в плазме крови крыс.

Заключение. Дана экспериментальная оценка влияния электромагнитного излучения на активность γ -глутамилтранспептидазы в плазме крови крыс. Фермент γ -глутамилтранспептидаза, наряду с антиоксидантами глутатионом и церулоплазмином, является мишенью для действия электромагнитного излучения. Электромагнитное излучение — один из возможных факторов формирования патологии сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: γ -глутамилтранспептидаза; глутатион; церулоплазмин; электромагнитное излучение; инфаркт миокарда

Для цитирования: Терехина Н.А., Селин А.Д., Горячева О.Г., Терехин Г.А. Прогностическое значение определения активности гамма-глутамилтранспептидазы в плазме крови крыс при действии электромагнитного излучения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(1): 79-86.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.79-86

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, редактирование статьи — Терехина Н.А.; сбор и обработка материала — Селин А.Д., Горячева О.Г., Терехин Г.А.; написание статьи и статистическая обработка результатов исследования — Терехина Н.А., Селин А.Д., Горячева О.Г. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

Для корреспонденции: Терехина Наталья Александровна, e-mail: terekhina@list.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.12.2022

Принята к печати 26.01.2023

Опубликована 17.03.2023

Terekhina N.A.¹, Selin A.D.¹, Goryacheva O.G.¹, Terekhin G.A.²

The prognostic value of determining gamma-glutamyltranspeptidase activity in blood plasma of rats under the action of electromagnetic radiation

¹Vagner Perm State Medical University,
Petropavlovskaya St. 26, Perm, 614990, Russian Federation;

²Perm State Pharmaceutical Academy,
Polevaya St. 2, Perm, 614089, Russian Federation

The aim of the research was to measure the activity of γ -glutamyltranspeptidase in rat plasma under the action of decimeter-range electromagnetic radiation and to assess correlations between the enzyme activity and major indexes of the antioxidant defense.

Methods. Experiments were performed on rats exposed to electromagnetic radiation for 3 mos. The γ -glutamyltranspeptidase activity was measured in blood plasma spectrophotometrically at 1, 2, and 3 mos. Correlations were determined between the γ -glutamyltranspeptidase activity and the concentration of reduced glutathione and between the γ -glutamyltranspeptidase activity and the concentration of ceruloplasmin in plasma.

Results. The long-term exposure of animals to decimeter-range electromagnetic radiation resulted in increases in the γ -glutamyltranspeptidase activity and concentrations of ceruloplasmin and glutathione. Significant correlations were found between the γ -glutamyltranspeptidase activity and the red cell concentration of reduced glutathione and between the γ -glutamyltranspeptidase activity and ceruloplasmin concentration.

Conclusion. An experimental study of the effect of electromagnetic radiation on the activity of γ -glutamyltranspeptidase in rat plasma was performed. The enzyme γ -glutamyltranspeptidase along with glutathione and ceruloplasmin, are targets for the action of electromagnetic radiation. Electromagnetic radiation is a possible factor in the development of cardiovascular pathology.

Keywords: γ -glutamyltranspeptidase; glutathione; ceruloplasmin; electromagnetic radiation; myocardial infarction

For citation: Terekhina N.A., Selin A.D., Terekhin G.A. The prognostic value of determining the activity of gamma-glutamyltranspeptidase in the blood plasma of rats under the action of electromagnetic radiation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(1): 79-86. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.79-86

Author's contribution: concept and design of the study, editing – Terekhina N.A.; collection and processing of material – Selin A.D., Goryacheva O.G., Terekhin G.A.; text writing, statistical processing – Terekhina N.A., Selin A.D., Goryacheva O.G. Approval of the final version of the article, responsibility of the integrity of all parts of the article – all co-authors. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: **Terekhina Natalya Aleksandrovna**, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Biochemistry Department, Perm State Medical University named after academician E.A. Vagner, 26, Petropavlovskaya Str, 614990, Perm, Russian Federation, e-mail: terekhina@list.ru

Information about the authors:

Terekhina N.A., <https://orcid.org/0000-0002-0168-3785>

Selin A.D., <https://orcid.org/0000-0001-7514-3768>

Goryacheva O.G., <https://orcid.org/0000-0002-3336-229X>

Terekhin G.A., <https://orcid.org/0000-0001-5633-0242>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 15.12.2022

Accepted 26.01.2023

Published 17.03.2023

Введение

В настоящее время мобильные устройства являются неотъемлемой частью жизни современного человека. В период пандемии COVID-19 для большинства групп населения потребность в использовании мобильных средств связи значительно возросла [1]. К воздействию электромагнитного излучения дети являются особо уязвимой социальной группой, поскольку состояние их здоровья и качество интеллектуального развития определяет перспективы общества на

поколения вперед [2]. Электромагнитное излучение (ЭМИ), генерируемое от мобильных телефонов, способно нарушать нормальное протекание биохимических и физиологических процессов посредством изменения параметров электромагнитной системы гомеостаза [3]. Длительное использование мобильных устройств способно оказывать влияние на работу проводящей системы сердца [4, 5]. При резонансе происходит совпадение частоты электромагнитных импуль-

сов с частотой сердечного ритма [6]. Координированная работа всех отделов сердечно-сосудистой системы является важным критерием протекания метаболизма в различных органах и тканях, обеспечивая транспорт газов, питательных и биологически активных веществ, выведение токсических продуктов. Разобщение координированной работы различных отделов сердца при хроническом воздействии ЭМИ в долгосрочной перспективе приводит к изменению параметров variability сердечного ритма, снижению артериального давления и частоты сердечных сокращений, замедлению внутрижелудочковой проводимости с последующей гипертрофией и деструкцией кардиомиоцитов [4, 7, 8]. Особую опасность источники ЭМИ представляют для людей с кардиостимуляторами.

Сердечно-сосудистые заболевания -- ведущая причина смертности населения в экономически развитых странах. Ишемическая болезнь сердца является наиболее распространённой нозологической единицей в структуре заболеваемости сердечно-сосудистой системы [9]. Инфаркт миокарда занимает лидирующее место среди всех летальных исходов, обусловленных кардиологической патологией [9, 10]. В настоящее время инфаркт миокарда манифестирует в более раннем возрасте без видимых факторов риска коронарных катастроф [9]. Формирующееся электромагнитное «загрязнение» может стать дополнительным фактором риска развития болезней сердечно-сосудистой системы [11, 12].

Окислительный стресс является основой для формирования механизмов развития сердечно-сосудистых заболеваний атеросклеротического и ишемического генеза [13]. Развитие окислительного стресса в кардиомиоцитах сопровождается снижением параметров антиоксидантной защиты (АОЗ) и увеличением продукции активных форм кислорода с последующим повреждением эндотелия стенок сосудов [14, 15]. Дисфункция эндотелия, нарушение систолической и диастолической функции сердца при инфаркте миокарда ассоциирована с воспалительным процессом [16]. Интенсификация своднорадикального окисления является пусковым механизмом в формировании воспалительного ответа при сердечно-сосудистых заболеваниях. Нахождение живых клеток в условиях воздействия ЭМИ способствует усилению образования свободных радикалов [17], изменяет активность компонентов АОЗ [18, 19], способствует повреждению структуры клеточных мембран [20].

Установлено, что увеличение в плазме крови содержания белков острой фазы воспаления, активности γ -глутамилтранспептидазы (γ -ГТП) отражает те-

чение деструктивных и репаративных процессов при инфаркте миокарда, определяет общий ответ организма на развивающийся патологический процесс и могут быть использованы в диагностике и прогнозировании коронарных катастроф [10, 21].

Цель исследования — оценка в динамике активности γ -глутамилтранспептидазы при электромагнитном излучении дециметрового диапазона в плазме крови крыс и проведение корреляционного анализа взаимосвязи активности этого фермента с основными показателями антиоксидантной защиты.

Методика

Биохимические исследования были проведены в лаборатории кафедры биохимии ФГБОУ ВО «ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера». На базе токсикологической лаборатории ФГБОУ ВО «ПГФА» проводили затравку и облучение животных, производили расчеты значений плотности потока электромагнитной энергии. Экспериментальное исследование проведено в соответствии с международными требованиями правил проведения работ на позвоночных животных, с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕСС) и Хельсинской декларации. Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера» МЗ РФ (протокол №1 от 25 января 2022).

Исследование проведено на 50 белых нелинейных самцах крыс массой 150–220 г, содержащихся на стандартном рационе вивария со свободным доступом к пище и воде. Животные были разделены на 4 группы и содержались в клетках, изготовленных из радиопрозрачного материала «Plexiglas». 1-я контрольная группа включала 20 интактных крыс, которые находились в обычном режиме—вивария. Животные со 2-й по 4-ю группы были размещены в изолированном помещении и находились под воздействием электромагнитного излучения дециметрового диапазона: 2-я группа крыс ($n=10$)—в течение 1 мес, 3-я группа ($n=10$) — 2 мес, 4-я группа ($n=10$) — 3 мес. Спроектирована экспериментальная модель облучения животных со следующими характеристиками: несущая частота 1745 МГц, экспозиция 170 мин/сут, средняя плотность потока электромагнитной энергии $67 \pm 5,0$ мкВт/см² [19]. Таким образом, достигался предельно допустимый суточный уровень энергетических экспозиций с равномерным распределением в 200 мкВт/см²/ч для дециметрового диапазона частот. По завершении облучения животных выводили из эксперимента декапитацией под эфирным наркозом. Активность γ -ГТП определяли по методу [22], содержание церулоплазмина (ЦП) в плазме

крови по методу [23], уровень восстановленного глутатиона в эритроцитах по методу [24].

Корреляционный анализ проведен между активностью γ -ГТП и содержанием основного антиоксиданта эритроцитов глутатиона, а также между активностью этого фермента и содержанием главного антиоксиданта плазмы крови церулоплазмينا при ЭМИ дециметрового диапазона.

Статистическую обработку результатов проводили с применением методов вариационной статистики в программах Statistica 10.0 (StatSoft, USA) и Microsoft Excel. С помощью расчета критерия Шапиро–Уилка определяли характер распределения данных. При наличии согласия с нормальным распределением количественных показателей в изучаемых группах рассчитывались средние величины (M), ошибка средних величин (m). Оценку статистической значимости выявленных изменений проводили с помощью *t*-критерия. Различия между сравниваемыми группами считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Степень тесноты корреляционной связи между исследуемыми параметрами определяли с помощью расчета линейного коэффициента корреляции. Результат оценки значимости уравнения линейной регрессии представлен коэффициентом детерминации R^2 . Определение прочности связи между исследуемыми параметрами оценивали по шкале Чеддока.

Результаты

В плазме крови крыс контрольной группы активность γ -ГТП составила $16,72 \pm 0,74$ ед/л (табл. 1). Воздействие ЭМИ дециметрового диапазона уже в течение 1 мес—приводило к статистически значимым изменениям активности γ -ГТП в плазме крови живот-

ных. При нахождении в течение 2 мес в условиях воздействия ЭМИ активность фермента в плазме крови крыс — увеличивается в 2,3 раза, а через 3 мес в 4 раза по сравнению с контролем (табл. 1).

Главный антиоксидант эритроцитарных мембран — глутатион и основной антиоксидант плазмы крови — церулоплазмин являются мишенью для действия электромагнитного излучения дециметрового диапазона [19].

Представляло интерес провести корреляционный анализ между активностью γ -ГТП и содержанием антиоксидантов (глутатион, церулоплазмин) для определения степени тесноты связи исследуемых параметров. При проведении корреляционного анализа взаимосвязи между активностью γ -ГТП в плазме крови и содержанием восстановленного глутатиона в эритроцитах интактной группы крыс была установлена высокая прочность связи ($r = +0,93$; $R^2 = 0,86$) (табл. 2). При воздействии ЭМИ в течение 1, 2 и 3 мес коэффициент детерминации (R^2) находился уже в диапазоне от 0,80 до 0,95, что свидетельствует о высокой тесноте связи изученных параметров.

Необходимо отметить, что изменение активности γ -ГТП и уровня восстановленного глутатиона находятся в отрицательной корреляционной зависимости, свидетельствующей о том, что увеличение одной переменной (γ -ГТП) ведет к закономерному уменьшению другой переменной (восстановленный глутатион) (табл. 2).

В группе интактных животных соотношение γ -ГТП/глутатион составляет 1/7, против 1/11 в опытной группе (ЭМИ — 1 мес), 1/15,5 (ЭМИ — 2 мес), 1/23 (ЭМИ — 3 мес). Г-ГТП — мембраносвязанный фермент, способствующий поддержанию физиологических концентраций восстановленного глутатио-

Таблица 1. Активность γ -ГТП (ед/л) в плазме крови крыс при электромагнитном облучении дециметрового диапазона, ($M \pm m$)
Table 1. Gamma-glutamyltranspeptidase activity (IU/L) in the blood plasma of rats exposed to the decimeter-range electromagnetic radiation, ($M \pm m$)

Группы животных / Animal groups	γ -глутамилтрансептидаза γ -glutamyltranspeptidase
Интактная группа / Intact group	$16,72 \pm 0,74$
Опытная группа / Experimental group	
ЭМИ (1 мес) / EMR (1 months)	$25,48 \pm 3,27^*$
ЭМИ (2 мес) / EMR (2 months)	$38,56 \pm 2,82^{**}$
ЭМИ (3 мес) / EMR (3 months)	$65,67 \pm 1,64^{**}$

Примечание. ЭМИ — Электромагнитное излучение; * — статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой интактных животных. ** — статистически значимые различия ($p < 0,05$) между группами.

Note. EMR — electromagnetic radiation; * $p < 0.05$ — significant differences from control rats.

** $p < 0.05$ — significant differences between groups.

на. Расчет соотношения активности γ -ГТП в плазме и уровня восстановленного глутатиона в эритроцитах крови крыс в динамике через 1, 2 и 3 мес воздействия ЭМИ свидетельствует, что увеличение активности γ -ГТП происходит более интенсивно, чем увеличение уровня восстановленного глутатиона, что свидетельствует о развитии дисбаланса в γ -глутамильном цикле.

Статистически значимые изменения содержания глутатиона в эритроцитах и церулоплазмине в плазме крови крыс наблюдаются лишь спустя 3 мес воздействия ЭМИ [19]. Результаты корреляционного анализа между активностью γ -ГТП и содержанием ЦП при длительном действии ЭМИ представлены в **табл. 3**. В интактной группе животных теснота корреляционной связи между исследуемыми показателями – высокая, коэффициент детерминации 0,60. Снижение коэффициента детерминации до 0,47 наблюдалось у крыс, находящихся под действием ЭМИ в течение 1 мес. У крыс опытной

группы, которые находились под действием ЭМИ в течение 2, либо 3 мес, коэффициент детерминации находился в диапазоне от 0,51 до 0,79, что свидетельствует о преэмпственности исследуемой модели (**табл. 3**).

В группе интактных животных соотношение γ -ГТП/ЦП составляет 15/1, против 10/1 в опытной группе (ЭМИ – 1 мес). Вместе с тем, расчет соотношения содержания γ -ГТП/ЦП спустя 2 мес воздействия ЭМИ составил 7/1, а через 3 мес – 4,5/1.

Таким образом, длительное пребывание крыс в условиях воздействия ЭМИ приводит к статистически значимым однонаправленным изменениям активности γ -ГТП и содержания ЦП. При этом следует заметить, что изменения активности γ -ГТП более значимы.

Обсуждение

Длительное нахождение животных под воздействием ЭМИ дециметрового диапазона сопровожда-

Таблица 2. Корреляционный анализ показателей активности γ -глутамилтранспептидазы (ед/л) в плазме и содержания глутатиона (мкмоль/г Hb) в эритроцитах периферической крови крыс при электромагнитном облучении

Table 2. Correlation analysis of γ -glutamyltranspeptidase activity (units/L) in plasma and glutathione content (μ mol/g Hb) in peripheral blood erythrocytes of rats under electromagnetic radiation

Исследуемая группа Study group	a_0	a_1	r_{xy}	Теснота связи/ Tightness of communication	R^2
Интактная группа / Intact group	+0,11	+4,20	+0,93	Высокая/High	0,86
Опытная группа / Experimental group					
ЭМИ (1 мес)/EMR (1months)	-0,05	+3,60	-0,90	Высокая/High	0,80
ЭМИ (2 мес)/EMR (2 months)	-0,06	+4,91	-0,97	Весьма высокая/Strong	0,95
ЭМИ (3 мес)/EMR(3 months)	-0,05	+5,84	-0,95	Весьма высокая/Strong	0,89

Примечание. Перевод количественного значения (r_{xy}) в качественное по шкале Чеддока: 0,1–0,3 – слабая, 0,3–0,5 – умеренная, 0,5–0,7 – заметная, 0,7–0,9 – высокая (тесная), 0,9–0,99 – весьма высокая (очень тесная).

Note. Converting of the quantitative value (r_{xy}) into qualitative on the Cheddock scale: 0.1-0.3 – insignificant, 0.3-0.5 – moderate, 0.5-0.7 – perceable, 0.7-0.9 – high (close), 0.9-0.99 – very high (very close).

Таблица 3. Корреляционный анализ показателей активности γ -глутамилтранспептидазы (ед/л) и церулоплазмине (мг/л) в плазме крови крыс при электромагнитном облучении

Table 3. Correlation analysis of γ -glutamyl transpeptidase activity (UI/L) and ceruloplasmin (mg/L) in rat blood plasma during electromagnetic radiation

Исследуемая группа Animal group	a_0	a_1	r_{xy}	Теснота связи/ Tightness of communication	R^2
Интактная группа / Intact group	+13,01	+37,14	+0,77	Высокая/High	0,60
Опытная группа / Experimental group					
ЭМИ (1 мес)/EMR(1months)	+4,21	+150,53	+0,68	Заметная/Visible	0,47
ЭМИ (2 мес)/EMR(2 months)	+4,00	+117,33	+0,72	Высокая/High	0,51
ЭМИ (3 мес)/EMR(3 months)	+0,10	+37,37	+0,89	Высокая/High	0,79

ется статистически значимым увеличением в плазме крови активности γ -ГТП и содержания ЦП, в эритроцитах периферической крови уровня восстановленного глутатиона. ЦП – белок острой фазы воспаления, осуществляющий транспорт двухвалентной меди в организме. Установленные корреляционные взаимосвязи между уровнем γ -ГТП и ЦП имеют однонаправленный характер изменений, ассоциированный с ответной воспалительной реакцией организма при длительном воздействии ЭМИ. При оценке соотношений между γ -ГТП и ЦП в эксперименте у крыс было показано, что при длительном воздействии ЭМИ увеличение активности γ -ГТП происходит более интенсивно по сравнению с изменениями содержания в плазме крови ЦП. Одновременное увеличение сразу нескольких белков острой фазы воспаления, является неблагоприятным прогностическим фактором, многократно увеличивающим вероятность возникновения катастроф сосудистого генеза [25]. Увеличение содержания ЦП и активности γ -ГТП в плазме крови коррелирует с выраженностью воспалительного процесса.

γ -ГТП является единственным экзоцелочным ферментом, лимитирующим процессы катаболизма и ресинтеза главного антиоксиданта эритроцитов – глутатиона [26]. Механизм синтеза глутатиона определяется высокой специфичностью γ -ГТП к гидролитическому разрыву γ -глутамильной связи в молекуле глутатиона. γ -ГТП повышает доступность аминокислот для ресинтеза глутатиона в γ -глутамильном цикле. Известно, что система глутатиона является естественной цитопротекторной системой при острых интоксикациях [27]. Несмотря на значимое увеличение глутатиона, проницаемость эритроцитарных мембран в эксперименте у крыс при длительном воздействии ЭМИ достоверно увеличивается [20]. Проведение корреляционного анализа между активностью γ -ГТП и содержанием восстановленного глутатиона свидетельствует о том, что при действии ЭМИ изменения данных показателей находятся в отрицательной корреляционной зависимости, а процессы катаболизма глутатиона преобладают над процессами его ресинтеза. Длительное воздействие ЭМИ в течение 3 мес сопровождается компенсаторным увеличением на 20% содержания восстановленного глутатиона [20]. Статистически значимое увеличение проницаемости эритроцитарных мембран свидетельствует о том, что увеличение уровня восстановленного глутатиона не способно обеспечить необходимый уровень АОЗ клеточных мембран эритроцитов крыс от неблагоприятного воздействия ЭМИ [20].

γ -ГТП является мишенью для действия многих токсикантов [28]. Значимое увеличение активности

γ -ГТП отмечается у лиц контактирующих с аммиаком и углеводородами, при острой алкогольной интоксикации, обострении хронического панкреатита, механической желтухе и холестазах [28], инфаркте миокарда и сердечной недостаточности [21]. Увеличение активности γ -ГТП рассматривается в качестве достоверного маркера сердечно-сосудистых заболеваний ассоциированных с высоким кардиоваскулярным риском [21, 29, 30]. Показана ценность определения γ -ГТП в плазме крови для прогноза течения инфаркта миокарда и появления его фатальных осложнений [30].

Инфаркт миокарда сопровождается системной и локальной воспалительной реакцией приводящей к повреждению эндотелиальных структур с последующим нарушением сердечного ритма [16]. В условиях хронического воздействия ЭМИ, нарушения в работе сердечно-сосудистой системы могут способствовать развитию ишемии приводящей к деструкции клеток миокарда [4, 7]. В случае продолжающейся деструкции острофазные реактанты могут длительное время персистировать в организме. Вместе с тем, при воздействии ЭМИ в течение 3 мес содержание γ -ГТП и ЦП в плазме крови крыс увеличивается. Определение активности γ -ГТП в плазме крови -- поздно реагирующий маркер при инфаркте миокарда, который отражает вовлечение в патологический процесс существенной миокардиальной массы с формированием постинфарктной сердечной недостаточности [30]. Увеличение содержания ЦП в плазме крови и слюне может использоваться в качестве дополнительного диагностического маркера при остром коронарном событии [25], гипертрофической кардиомиопатии и сердечной недостаточности [31]. Показано, что при инфаркте миокарда содержание ЦП увеличивается на 16% и на 22% при инфаркте миокарда, осложненном острой левожелудочковой недостаточностью [32]. Вместе с тем, длительное нахождение крыс в условиях воздействия ЭМИ сопровождается увеличением более чем на 13% ЦП. Увеличение содержания ЦП рассматривается в качестве независимого предиктора долгосрочной смертности у больных с сердечной недостаточностью [15]. Однонаправленный характер изменений активности γ -ГТП и содержания ЦП у крыс при длительном воздействии ЭМИ и у больных инфарктом миокарда, позволяет рассматривать ЭМИ дециметрового диапазона в качестве возможного фактора формирования болевой системы кровообращения.

Заключение

Дана экспериментальная оценка влияния электромагнитного излучения на активность γ -глутамил-

транспептидазы в плазме крови крыс. Фермент γ -глутамилтранспептидаза, наряду с антиоксидантами глутатионом и церулоплазмином, является мишенью для действия электромагнитного излучения. Электромагнитное излучение – возможный фактор формирования патологии сердечно-сосудистой системы.

Литература

(п.п. 3-5; 7; 8; 13-15; 17; 18; 22; 24; 27; 29; 31; 32 см. References)

1. Лола И.С., Бакеев М.Б. Пульс мирового рынка электронной коммерции в условиях пандемии COVID-19. М.: НИУ ВШЭ; 2020.
2. Григорьев Ю.Г., Григорьев О.А. Сотовая связь и здоровье: электромагнитная обстановка, радиобиологические и гигиенические проблемы, прогноз опасности. Москва; Экономика; 2016.
6. Орешина М.Н., Савенко Е.Ю. Исследования воздействия электромагнитных излучений на организм человека. *Известия ТулГУ. Технические науки*. 2021; 3: 342–7.
9. Глущенко В.А., Иркиенко Е.К. Сердечно-сосудистая заболеваемость – одна из важнейших проблем здравоохранения. *Медицина и организация здравоохранения*. 2019; 4(1): 56–63.
10. Терехина Н.А., Горячева О.Г., Петрович Ю.А., Реук С.Э., Зубарев М.А. Исследование α_1 -антитрипсина, орозомукоида и церулоплазмينا в крови и ротовой жидкости при инфаркте миокарда и пародонтите. Подтверждение роли пародонтита как фактора риска инфаркта миокарда. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012; 2: 18–21.
11. Гудина М.В., Волкотруб Л.П., Бородин А.С. Риск развития инфаркта миокарда на участках территорий с различными уровнями электромагнитных полей. *Казанский медицинский журнал*. 2009; 90(4): 481–4.
12. Яценко С.Г., Рыбалко С.Ю., Шибанов С.Э., Григорьев О.А. Электромагнитная обстановка радиочастотного диапазона мобильной связи и заболеваемость взрослого населения болезнями системы кровообращения. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(12): 1184–8.
16. Горячева О.Г., Терехина Н.А., Зубарев М.А. Диагностическое значение определения содержания церулоплазмينا в ротовой жидкости при инфаркте миокарда. *Материалы VI Национального конгресса терапевтов*. М.; 2011; 54–5.
19. Терехина Н.А., Селин А.Д., Терехин Г.А. Влияние электромагнитного излучения на показатели антиоксидантной защиты в эритроцитах и плазме крови крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2021; 65(3): 73–9.
20. Селин А.Д., Терехина Н.А., Терехин Г.А. Влияние электромагнитного излучения на проницаемость эритроцитарных мембран. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2020; 10(4): 43–9.
21. Терехина Н.А., Горячева О.Г., Анисимов Г.В., Орбиданс А.Г., Терехин Г.А. Прогностическое значение определения активности гамма-глутамилтранспептидазы в биологических жидкостях при терминальных состояниях. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 9: 30–1.
23. Камышников В.С. *Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: Справочник*. М.: МЕД. пресс-информ; 2009.
25. Терехина Н.А., Горячева О.Г., Реук С.Э., Зубарев М.А. Диагностическое определение острофазных белков в слюне больных инфарктом миокарда. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2010; 3: 3–5.
26. Александрова Л.А. Новые перспективы использования гамма-глутамил-транспептидазы в энзимодиагностике. *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова*. 2016; 23(2): 6–11.
27. Глушков С.И., Куценко С.А. Система глутатиона как естественная цитопротекторная система в условиях острых интоксикаций. *Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты*. 2004; 67–8.
28. Терехина Н.А., Терехин Г.А., Жидко Е.В., Горячева О.Г. Окислительная модификация белков, проницаемость эритроцитарных мембран и активность гамма-глутамилтранспептидазы при различных интоксикациях. *Медицинская наука и образование Урала*. 2019; 20(4): 78–82.
30. Терехина Н.А., Горячева О.Г., Зубарев М.А. Диагностическое значение определения активности ферментов ротовой жидкости больных инфарктом миокарда. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2010; 9: 62–2.

References

1. Lola I.S., Bakeev M.B. The pulse of the global e-commerce market amid the COVID-19 pandemic. [*Pul's mirovogo rynka elektronnoy kommersii v usloviyakh pandemii COVID-19*]. Moscow; NIU «VSHÉ» Publ.; 2020. (in Russian)
2. Grigoriev Yu.G., Grigoriev O.A. Cellular communication and health. Electromagnetic environment. Radiobiological and hygienic problems. The prognosis of hazard. [*Sotovaya svyaz' i zdorov'e: elektromagnitnaya obstanovka, radiobiologicheskie i gigienicheskie problemy, prognoz opasnosti*]. Moscow; Economica; 2016. (in Russian)
3. Gherardini L., Ciuti G., Tognarelli S., Cinti C. Searching for the perfect wave: the effect of radiofrequency electromagnetic fields on cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15: 5366–87.
4. Colak C., Parlakpinar H., Ermis N., Tagluk M.E., Sarihan E., Dilek O.F., et al. Effects of electromagnetic radiation from 3G mobile phone on heart rate, blood pressure and ECG parameters in rats. *Toxicology and industrial health*. 2012; 28(7): 629–638.
5. Ekici B., Tanındı A., Ekici G., Diker E. The effects of the duration of mobile phone use on heart rate variability parameters in healthy subjects. *Anatolian Journal of Cardiology*. 2016; 16(11): 833–8.
6. Orëshina M.N., Savenko E.Yu. Studies of the effects of electromagnetic radiation on the human body. *Izvestia of TulGU. Technical Sciences*. 2021; 3: 342–7. (in Russian)
7. Ahamed V.I., Karthick N.G., Joseph P.K. Effect of mobile phone radiation on heart rate variability. *Computers in biology and medicine*. 2008; 38(6): 709–12.
8. Parazzini M., Ravazzani P., Tognola G., Thuroczy G., Molnar F.B., Sacchetti A., Mainardi L.T. Electromagnetic fields produced by GSM cellular phones and heart rate variability. *Bioelectromagnetics*. 2007; 28(2): 122–9.
9. Glushhenko V.A., Irklienko E.K. Cardiovascular morbidity – one of the most vital problems of modern health care. *Meditsina i organizatsiya zdoravookhraneniya*. 2019; 4(1): 56–63. (in Russian)
10. Terekhina N.A., Goryacheva O.G., Petrovich Yu.A., Reuk S.E., Zubarev M.A. The investigation of α_1 -antitripsin, orozomucoid and ceruloplasmin in peripheral blood and oral fluid. Parodontitis is one of more risk factors of cardio vascular diseases. *Patologicheskaya*

- fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2012; 56(2): 18-21. (in Russian)
11. Gudina M.V., Volkotrub L.P., Borodin A.S. The prevalence of socially significant diseases in areas with different levels of electromagnetic fields of industrial frequency. *Kazanskiy medicinskiy zhurnal*. 2009; 90(4): 481-484. (in Russian)
 12. Yaschenko S.G., Rybalko S.Yu., Shibano S.E., Grigoriev O.A. Monitoring of electromagnetic situation of radio frequency range of the mobile communication and prevalence indices of diseases of the circulatory system in the adult population. *Gigiena i sanitariya*. 2018; 97(12): 1184-8. (in Russian)
 13. Sack M.N., Fyhrquist F.Y., Saijonmaa O.J., Fuster V., Kovacic J.C. Basic Biology of Oxidative Stress and the Cardiovascular System: Part 1 of a 3-Part Series. *Journal of the American College of Cardiology*. 2017; 70(2): 196-211.
 14. Hill M.F., Singal P.K. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am. J. Pathol.* 1996; 148(1): 291-300.
 15. Terekhina N.A., Goryacheva O.G. The role of oxidative stress and antioxidants in occurrence of myocardial infarction and chronic heart failure. *Medical University*. 2020; 4(3): 155-64.
 16. Goryacheva O.G., Terekhina N.A., Zubarev M.A. Diagnostic value of determining the content of ceruloplasmin in the oral fluid in myocardial infarction. [*Materialy VI Natsionalnogo kongressa terapevtov*]. Moscow; 2011; 54-5. (in Russian)
 17. Achudume A., Onibere B., Aina F., Tchokossa P. Induction of Oxidative Stress in Male Rats Subchronically Exposed to Electromagnetic Fields at Non-Thermal Intensities. *Journal of Electromagnetic Analysis and Application*. 2010; 2(8): 482-7.
 18. Kivrak E.G., Yurt K.K., Kaplan A.A. et al. Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system. *J. Microsc. Ultrastruct.* 2017; 5(4): 167-76.
 19. Terekhina N.A., Selin A.D., Terekhin G.A. The effect of electromagnetic radiation on indexes of antioxidant defense in rat erythrocytes and blood plasma. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2021; 65(3): 73-9. (in Russian)
 20. Selin A.D., Terekhina N.A., Terekhin G.A. Influence of electromagnetic radiation on the permeability of erythrocyte membranes. *Krymskiy zhurnal eksperimental'noy i klinicheskoy meditsiny*. 2020; 10(4): 43-9. (in Russian)
 21. Terekhina N.A., Goryacheva O.G., Anisimov G.V., Orbidans A.G., Terekhin G.A. Prognostic value of determining the activity of gamma-glutamyltranspeptidase in biological fluids in terminal conditions. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 9: 30-1. (in Russian)
 22. Kulhanek V., Dimov D.M. Comparison of four methods for the estimation of gamma-glutamyltranspeptidase activity in biological fluids. *Clin. Chem. Acta*. 1967; 12(2): 271-7.
 23. Kamyshnikov V.S. *Clinical and biochemical laboratory diagnostics: Guide. [Kliniko-biokhimitskaya laboratornaya diagnostika: Spravochnik]*. Moscow: MED. press-inform; 2009. (in Russian)
 24. Beutler E. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. 3rd ed. New York: Grune & Stratton; 1990: 131-4.
 25. Terekhina N.A., Goryacheva O.G., Reuk S.E., Zubarev M.A. Diagnostic value of the determination of salivary acute-phase proteins in patients with myocardial infarction. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2010; 3: 3-5. (in Russian)
 26. Alexandrova L.A. New perspectives for use of gamma-glutamyltranspeptidase in clinical enzymes tests. *Uchenye zapiski SPbGMU im. akad. I.P. Pavlova*. 2016; 23(2): 6-11. (in Russian)
 27. Glushkov S.I., Kutsenko S.A. The glutathione system as a natural cytoprotective system under conditions of acute intoxication. *Mediko-biologicheskie problemy protivoluchevoy i protivokhimicheskoy zashchity*. 2004; 67-8. (in Russian)
 28. Terekhina N.A., Terekhin G.A., Zhidko E.V., Goryacheva O.G. Oxidative modification of proteins, permeability of erythrocyte membranes and activity gamma-glutamyltranspeptidase in various intoxications. *Meditinskaya nauka i obrazovanie Urala*. 2019; 20(4): 78-82. (in Russian)
 29. Lee D.S., Evans J.C., Robins S.J., Wilson P.W., Albano I., Fox C.S. et al. Gamma Glutamyltransferase and metabolic syndrome, cardiovascular disease, and mortality risk: the Framingham Heart study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007; 27: 127-133.
 30. Terekhina N.A., Goryacheva O.G., Zubarev M.A. Diagnostic value of the determination of enzyme activity in the oral fluid in patients with myocardial infarction. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2010; 9: 62-2. (in Russian)
 31. Kennedy D.J., Fan Y., Wu Y., Pepoy M., Hazen S.L., Tang W.H. Plasma ceruloplasmin, a regulator of nitric oxide activity, and incident cardiovascular risk in patients with CKD. *Clin J. Am. Soc. Nephrol.* 2014; 9(3): 462-7.
 32. Jenkins D.J.A., Spence J.D., Giovannucci E.L., Kim Y.I., Josse R., Vieth R. et al. Supplemental Vitamins and Minerals for CVD Prevention and Treatment. *Am. Coll. Cardiol.* 2018; 71(22): 2570-84.

Сведения об авторах:

Терехина Наталья Александровна, зав. каф. биохимии ФГБОУВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, доктор мед. наук, проф., e-mail: terekhina@list.ru;

Селин Алексей Дмитриевич, ст. преподаватель каф. биохимии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, e-mail: adselin13@gmail.com;

Горячева Ольга Георгиевна, канд. мед. наук, доцент каф. пропедевтики внутренних болезней «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России, -mail: o.goryacheva@mail.ru

Терехин Георгий Анатольевич, зав. каф. экстремальной медицины и товароведения ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, доктор мед. наук, проф., e-mail: terehin-ga@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-001.4:616:5-001/-002:026.746-08

Мелконян К.И., Никифорова Е.Б.

Разработка и изучение влияния дермального гидрогеля с экстрактом кукурузы столбиков с рыльцами на процесс репарации скарифицированных ран в эксперименте

ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет Минздрава» России, 350063, Краснодар, Россия, ул. им. Митрофана Седина, д. 4

Введение. Одним из наиболее перспективных способов терапии раневых поражений является использование коллагеновых гидрогелей. Добавление растительных БАВ кукурузы столбиков с рыльцами (КСР) может значительно повысить антиоксидантное, кровоостанавливающее и противовоспалительное действие коллагеновых гидрогелей. **Цель** работы – оценка цитотоксических и репаративных свойств поликомпонентного дермального гидрогеля (ДГ) с экстрактом КСР.

Методика. Густой экстракт КСР получали вакуумфльтрационным экстрагированием кукурузы столбиков с рыльцами. Для получения ДГ образцы свиной дермы подвергали децеллюляризации 5% NaOH. Для оценки цитотоксичности использовали дермальные фибробласты DF-1 с последующим анализом жизнеспособности методом Live&Dead. Исследование эффективности использования ДГ с 2% экстрактом КСР проводили на самцах крыс Вистар: группа 1-я – крысы без лечения (контрольная группа), 2-я – крысы с лечением ДГ с экстрактом КСР (опытная группа), 3-я – крысы с лечением ДГ без экстракта КСР (группа сравнения). Крысам в области холки наносили скарифицированные раны 30x20x2 мм, после чего раны крыс группы 2-й и 3-й обрабатывали ДГ в течение 7 сут. Препараты образцов кожи крыс обрабатывали антителами к CD68, CD3 или окрашивали гематоксилином и эозином.

Результаты. ДГ и экстракт КСР в разведении 1:50 не проявляли токсических эффектов, поэтому данное разведение экстракта КСР было выбрано для получения комбинированного ДГ с 2% экстрактом КСР. По результатам визуальной, гистологической и иммуногистохимической оценки эффективности репарации в контрольной группе и группе сравнения на 7-е сут эксперимента в области раны отмечалось образование струпа, а в опытной группе на те же сроки формирование всех слоёв кожи. В опытной группе на 2-е сут в препаратах определялось значительное количество CD3 и CD68-позитивных клеток, а на 7-е сут данных клеток обнаружено не было.

Заключение. Используемая для получения комбинированного ДГ концентрация экстракта КСР не токсична для клеток. При оценке результатов лечения исследуемым комбинированным ДГ отмечается положительный репаративный эффект как относительно контрольной группы, так и группы сравнения.

Ключевые слова: дерма; гидрогель; экстракт кукурузы рыльцев со столбиками; регенерация; скарифицированные раны; экспериментальное лечение

Для цитирования: Мелконян К.И., Никифорова Е.Б. Разработка и изучение влияния дермального гидрогеля с экстрактом кукурузы столбиков с рыльцами на процесс репарации скарифицированных ран в эксперименте. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(1): 87-93.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.87-93

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, написание текста – Мелконян К.И.; сбор и обработка материала – Никифорова Е.Б. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Мелконян Карина Игоревна, e-mail: cnil.ksma@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.12.2022

Принята к печати 26.01.2023

Опубликована 17.03.2023

Melkonyan K.I., Nikiforova E.B.

Development and study of the effect of a dermal hydrogel with corn silk extract on repair of scarified wounds in the experiment

Kuban State Medical University,
Mitrofana Sedina St. 4, Krasnodar 350063, Russian Federation

Introduction. One of the most promising methods for the treatment of wounds is application of collagen hydrogels. Supplements of plant bioactive compounds of corn silk (CS) can significantly enhance antioxidant, hemostatic, and anti-inflammatory effects of collagen hydrogels.

The aim of the study was to evaluate the cytotoxic and reparative properties of a multicomponent dermal hydrogel (DH) with the CS extract.

Methods. We obtained a thick CS extract by vacuum filtration. To obtain DH, samples of porcine dermis were decellularized with 5% NaOH. Cytotoxicity was assessed with DF-1 dermal fibroblasts, and their viability was determined by the Live&Dead method. The effect of DH with the 2% CS extract was evaluated on Wistar male rats: group 1, rats without treatment (control group); group 2, rats treated with DH with the CS extract (experimental group); and group 3, rats treated with DH without the CS extract (comparison group). Scarified wounds (30x20x2 mm) were inflicted in the shoulder area, then the wounds of groups 2 and 3 rats were treated for 7 days. Samples of rat skin were stained with hematoxylin and eosin or with CD68, CD3 antibodies.

Results. The DH with the CS extract at a 1:50 dilution did not show toxic effects; thus, this dilution was chosen for the development of a composite DH with the 2% CS extract. According to the results of visual and histological assessment of the reparation effectiveness, a scab formed in the wound area in the control and comparison groups on day 7 of experiment, while in the experimental group, all skin layers formed during the same period. A considerable number of CD3, CD68-positive cells was detected in the preparations of the experimental group on day 2, while these cells were not found on day 7.

Conclusion. The concentration of the CS extract used for the development of DH is not toxic to cells. Evaluation of the experimental treatment with the composite DH showed a positive reparative effect compared to the control or the comparison group.

Keywords: dermis; hydrogel; corn silk; regeneration; scarified wounds; experimental treatment

For citation: Melkonyan K.I., Nikiforova E.B. Development and study of the effect of a dermal hydrogel with corn silk extract on repair of scarified wounds in the experiment *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(1): 87-93. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.87-93

Author's contribution: research concept and design, writing the text – Melkonyan K.I.; collection and processing of material – Nikiforova E.B. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Karina I. Melkonyan*, Ph.D. in Medicine, Head of Central Research Laboratory, Kuban State Medical University; 4 Mitrofana Sedina str., Krasnodar, 350063, Russian Federation, e-mail: cnil.ksma@yandex.ru

Information about the authors:

Melkonyan K.I., <https://orcid.org/0000-0003-2451-6813>

Nikiforova E.B., <https://orcid.org/0000-0001-7081-3523>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 20.12.2022

Accepted 26.01.2023

Publised 17.03.2023

К настоящему времени лечение ран различной этиологии с помощью консервативных методов не всегда приводит к ожидаемым результатам [1]. В зависимости от характеристик раневой поверхности, таких как глубина поражения, локализация и степень воспалительной реакции, подбирается определённое лечение [2]. Одним из наиболее эффективных и перспективных способов терапии раневых поражений является использование поликомпонентных гидрогелей на основе полимеров природного происхождения.

На сегодняшний день основным биополимером природного происхождения является коллаген, а од-

ним из доступных материалов для получения коллагенового геля – дерма свиньи [3]. Коллаген – основной структурный белок соединительной ткани, являющийся естественным субстратом для клеток [4]. Данный белок успешно выполняет роль носителя других структурных элементов, используемых в целях регенеративной медицины, например, антибиотиков, факторов роста и других биологически активных веществ (БАВ) [5]. Особый интерес представляют БАВ кукурузы столбиков с рыльцами (КСР), такие как ситостерол, стигмастерол, флавоноиды, витамины К и С, жирные масла, обладающие подтвержденными антиоксидантным,

иммуноотропным и противовоспалительным эффектами, как *in vivo*, так и *in vitro* [6]. Вышесказанное обуславливает актуальность разработки поликомпонентных коллагеновых гелей с фитоконпонентами как перспективных материалов для лечения репаративных процессов, кроме того, важными требованиями к созданию таких поликомпонентных материалов является их биологическая активность и биосовместимость.

Цель исследования — оценка цитотоксических и репаративных свойств поликомпонентного дермального геля (ДГ) с экстрактом КСР.

Методика

Получение экстракта КСР и дермального гидрогеля.

Густой экстракт КСР получали вакуумфильтрационным экстрагированием растительного сырья — кукурузы столбиков с рыльцами спиртом этиловым 70% в соотношении 1:3 с последующим сгущением извлечения до остаточной влажности не более 25% [7]. Основой для создания ДГ была нативная дерма поросенка породы Ландрас возрастом 4 мес. Образцы дермы ($n=10$, размеры $30 \times 20 \times 0,5$ мм) подвергали химической децеллюляризации щелочным раствором. Дерму обрабатывали 5% раствором NaOH в течение 22 ч, при соотношении масса дермы к объёму раствора — 1:5. После этого полученный гидрогель промывали деионизированной водой до нейтрального значения pH.

Оценка цитотоксичности. Для оценки цитотоксичности ДГ и экстракта КСР (в разведениях 1:50, 1:40, 1:20 и 1:10) использовали линию человеческих дермальных фибробластов DF-1, полученную из Российской коллекции клеточных культур позвоночных ФГБУН Института цитологии РАН, 9 пассаж. Подсчёт клеток производили по стандартной методике в камере Горяева. К образцам в объёме 150 мкл добавляли по 200 мкл клеток (1 млн/мл) в полной питательной среде. Далее образцы инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре +37 °C и концентрации CO₂ 5%. Оценка жизнеспособности клеток проводилась через 48 и 96 ч инкубации. Эксперимент проводили в 3 итерациях.

Для оценки цитотоксичности образцов *in vitro* использовался метод Live/Dead (ThermoFisher Scientific Inc., США), по протоколу фирмы-производителя. При этом живые клетки приобретали зелёное, а мёртвые — красное свечение за счёт взаимодействия с кальцеином-AM и гомодимером этидия соответственно. Флуоресцентные исследования проводились в 3 полях зрения для каждого образца с использованием микроскопа со светофильтром Olympus CX 41, данные и изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения Olympus CellSens Entry.

Экспериментальное лечение дермальным гидрогелем с экстрактом КСР.

Густой экстракт КСР растворяли в очищенной воде в соотношении 1:50 и вводили в полученный гидрогель в массо-объёмной концентрации 2%.

Исследование клинической эффективности полученного ДГ с экстрактом КСР было проведено на 30 самцах крыс Вистар массой 160-200 г, возраст 3-4 месяца, содержащихся в условиях вивария при сбалансированном питании и естественном освещении. Работа проводилась в соответствии с регламентом декларации ЕС от 22 Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Крысы были разделены на 3 группы: 1-я — крысы без лечения, или контрольная группа ($n=10$), 2-я — крысы с лечением ДГ с экстрактом КСР, или опытная группа ($n=10$), 3-я группа — с лечением ДГ без экстракта КСР, или группа сравнения ($n=10$). Крысам под общим газовым наркозом «Изофлуран» (индукция 2-5%, поток 0,25-4%; Laboratorios Karizoo, Испания) в области холки на размеченной заранее поверхности наносили скарифицированные раны $30 \times 20 \times 2$ мм, после чего раны крыс группы 2-й и 3-й обрабатывали ежедневно в течение 7 сут ДГ с экстрактом КСР и ДГ без экстракта КСР в объёме 0,5 г соответственно. Всем животным после оперативного вмешательства вводился анальгезирующий препарат Кетопрофен 10% (5 мг/кг; Нита-Фарм, Россия) и антибиотик Конвенция (4 мг/кг; Конвенция, Zoetis, США).

Гистологический и иммуногистохимический анализ.

На 2-е и 7-е сут эксперимента образцы кожи крыс эксплантировались с прилежащими нативными тканями с помощью устройства для биопсии кожи диаметром 8 мм (Medax, Италия) для проведения дальнейшего гистологического и иммуногистохимического анализа. Исследование проводили на двух независимых биопсийных фрагментах образцов, для каждого из них было выполнено и проанализировано 5 срезов. Для гистологического анализа проводилось окрашивание гематоксилином и эозином. Для иммуногистохимического анализа использовали термическую демаскировку антигена и поликлональные антитела к Т-лимфоцитарному рецептору — CD3 (кат. номер DF7518, Affinity Biosciences, Китай) и к интегральному трансмембранному белку, маркеру клеток моноцитарной и макрофагальной линии — CD68 (кат. номер DF7518, Affinity Biosciences, Китай). Все образцы исследовали с помощью микроскопа Olympus CX 41 (Olympus, Япония) при увеличении 400. Для количественной оценки патогистологических изменений использовали компьютерную морфометрию с помощью программы ImageJ (National Institution of Health, США) и плагина IHC metrics. При количествен-

ном подсчете результатов иммуногистохимического исследования использовали цветовую сегментацию с выделением зеленого канала, бинаризацию по цвету и инструмент «анализатор частиц».

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов исследования выполняли с помощью программы MedCalc Statistical Software (Бельгия). Для проверки характера распределения значений в вариационных рядах использовали критерий Шапиро–Уилка. Поскольку распределение отличалось от нормального, результаты представлены в виде медианы, интерквартильного размаха $Me[Q_1; Q_3]$. Значимость различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Нулевая гипотеза отвергалась при значении порога доверительной вероятности $p < 0,05$.

Результаты

По результатам количественного анализа клеток в образцах с ДГ было установлено, что через 48 ч процент живых клеток составил $92 \pm 7,4$, при этом в контрольных образцах (ППС без ДГ) – $88 \pm 5,1\%$. Через 96 ч количество клеток в образцах с ДГ незначимо повышалось до $94,3 \pm 3,2\%$ ($p > 0,05$) живых клеток против $79,3 \pm 4,2\%$ клеток в контроле ($p < 0,05$).

Анализ данных при оценке жизнеспособности клеток в присутствии экстракта КСР в различных разведениях показал, что наиболее высокий процент живых

клеток по сравнению с контролем был зафиксирован в образцах с разведением экстракта КСР 1:50 ($84 \pm 4,2\%$ живых клеток) через 48 ч инкубации, при этом через 96 ч в образцах с тем же разведением экстракта КСР наблюдалось $88,3 \pm 1,2\%$ живых клеток, что незначимо отличалось от показателей в образцах с разведением экстракта КСР 1:40 на те же сутки ($87,4 \pm 2,1\%$; $p > 0,05$). Полученные данные позволяют сделать заключение об отсутствии токсических эффектов ДГ и экстракта КСР в разведении 1:50 *in vitro*.

Сравнительный анализ результатов визуальной оценки репаративного действия 2% экстракта КСР в ДГ при экспериментальном лечении крыс породы Вистар показал, что в группе без лечения (рис. 1, А, Б) заживление проходило медленнее, и на 7-е сут в области раны оставался струп. Схожая картина отмечалась в группе сравнения (рис. 1, Д, Е), при этом в опытной группе (рис. 1, В, Г) к 7-м сут уже наблюдалось почти полное удаление струпа и отмечалось формирование здоровой кожи в области нанесения раны.

Данные сравнительного гистологического анализа показали, что на 2-е сут в биопсийных образцах крыс контрольной группы отмечались признаки выраженного воспаления, диапедезные кровоизлияния, а на поверхности – слой фибринозно-гнойного экссудата (рис. 2, А). К концу эксперимента в образ-

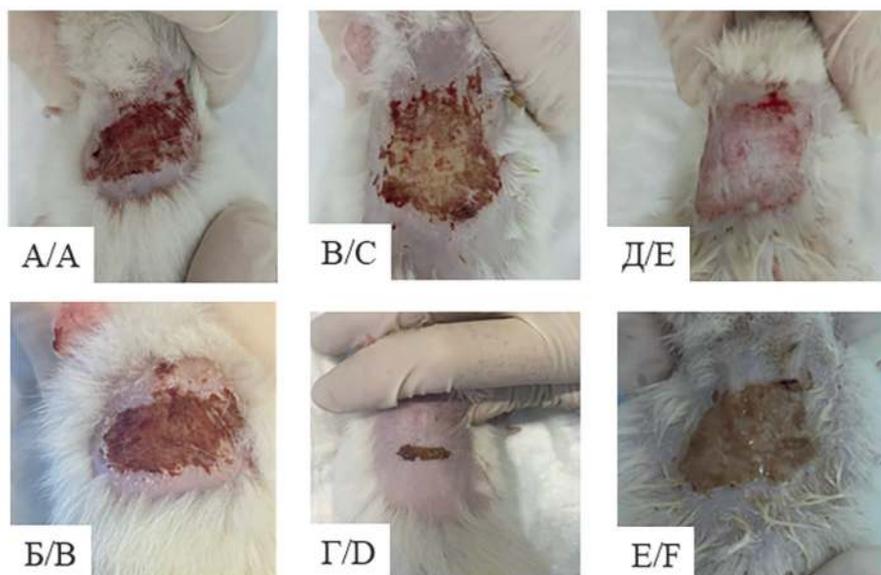


Рис. 1. Внешний вид раны животных в течение эксперимента. А, Б – контрольная группа, без лечения, В, Г – опытная группа, лечение дермальным гидрогелем с КСР, Д, Е – группа сравнения, лечение дермальным гелем. А, В, Д – 2-е сут, Б, Г, Е – 7-е сут эксперимента.

Fig. 1. Appearance of the wound of the animals during the experiment. А, В – control group, no treatment, С, D – experimental group, treatment with dermal hydrogel with CSR, E, F – comparison group, treatment with dermal gel. А, С, D – 2nd day, В, D, E – 7th day of the experiment.

цах крыс этой же группы отмечалось полнокровие сосудов, в ткани наблюдалось умеренно выраженное воспаление, а также эпителий на поверхности раны с явлениями паракератоза (рис. 2, Б). В группе сравнения на 2-е сут морфологическая картина характеризовалась наличием на поверхности раны слоя фибринозно-гнойного экссудата, при этом сосуды были незначительно полнокровны (рис. 2, Д). На 7 сут у крыс этой же группы не было признаков воспаления, а на поверхностном эпителии отмечался выраженный роговой слой (рис. 2, Е). На 2-е сут после операции в препаратах животных опытной группы эпидермис отсутствовал, в поверхностных слоях дермы выявлялись признаки фибринозно-гнойного воспаления и выраженная инфильтрация нейтрофильными гранулоцитами и макрофагами; коллагеновые волокна выглядели набухшими и частично фрагментированными. На поверхности раны отмечался фибринозно-геморрагический экссудат (рис. 2, В). На 7-е сут после операции у этой же группы животных гистологическая картина характеризовалась полностью сформированным эпидермисом со слабо выраженным очаговым акантозом и полным отсутствием воспалительной реакции (рис. 2, Г).

В дальнейшем проводился иммуногистохимический анализ образцов биопсии крыс в указанные сроки (рис. 3). Иммунофенотипирование воспалительного инфильтрата на 2-е сутки в контрольной группе выявило 14,2 [11,8; 16,6] макрофагов (CD68⁺- клеток)

на 1 мм² ткани (рис. 3, А). На 7-е сут в образцах крыс этой же группы наблюдались остаточные воспалительные изменения с незначительной лимфомакрофагальной инфильтрацией (4,6 [2,2; 5,7] макрофагов на 1 мм² ткани) (рис. 3, Б). По данным компьютерной морфометрии в срезах группы сравнения на 2-е сут присутствовало 8,7 [7,9; 10,4] макрофагов на 1 мм² ткани (рис. 3, Д). Морфологический анализ тканей животных группы сравнения на те же сутки выявил минимальное количество лейкоцитов (2,4 [1,8; 1,9] макрофагов на 1 мм² ткани по данным компьютерной морфометрии), однако здесь отмечалось более выраженное полнокровие сосудов, некробиотические изменения стромы и её отёк. В опытной группе на 2-е сут после операции в препаратах определялось значительное количество CD68-позитивных клеток (по данным компьютерной морфометрии – 23,14 [19,55; 27,04] клеток на 1 мм²ткани) (рис. 3, В). При иммуногистохимическом выявлении маркера CD68 на 7-е сут в опытной группе положительного сигнала не было обнаружено (рис. 3, Г).

На 2-е сут в срезах ткани раны животных, не получавших лечения, выявлено значительное количество CD3-позитивных лимфоцитов. У животных, для лечения которых использовался гидрогель, обнаружена умеренно выраженная лимфоцитарная инфильтрация. Наконец, животные, получавшие экстракт кукурузных рылец, имели слабо выраженные скопления CD3-позитивных лимфоцитов.

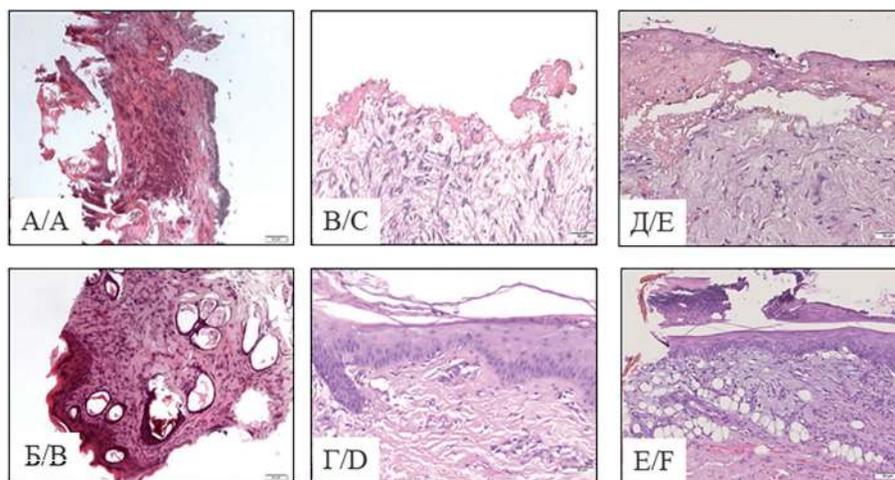


Рис. 2. Гистологический анализ образцов биопсии области раны крыс. А, Б – контрольная группа, без лечения, В, Г – опытная группа, лечение дермальным гидрогелем с КСР, Д, Е – группа сравнения, лечение дермальным гидрогелем. А, В, Д – 2-е сутки, Б, Г, Е – 7-е сутки эксперимента. Ув. 400.

Fig. 2. Histological analysis of rat biopsy samples. А, В – the control group, rats without treatment; С, D – the experimental group, rats treated with the dermal hydrogel with the corn silk extract; E, F – the comparison group, rats treated with the dermal hydrogel without corn silk extract. А, С, Е – day 2, В, D, F – day 7. Magnification $\times 400$.

На 7-е сут в образцах от контрольного животного выявлена умеренная лимфоцитарная инфильтрация. У животных, получавших гидрогель, выявлена слабо-выраженная лимфоцитарная инфильтрация. Наконец, в образцах от животного, на котором применяли экстракт кукурузных рылец, выявлены лишь единичные лимфоциты.

Заключение

Компоненты комбинированного препарата и все разведения экстракта КСР не проявляют цитотоксичности по сравнению с контролем ($p < 0,05$) на ранних сроках эксперимента (48 ч), при этом наилучшая жизнеспособность клеток наблюдалась при разведении

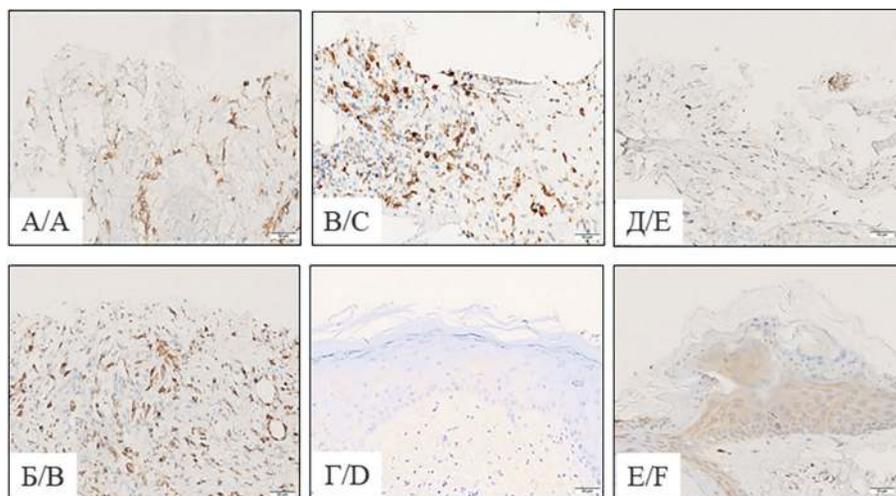


Рис. 3. Иммуногистохимический анализ (иммунотипирование CD68) образцов биопсии из области раны крыс. А, Б – контрольная группа, без лечения, В, Г – опытная группа, лечение дермальным гидрогелем с КСР, Д, Е – группа сравнения, лечение дермальным гидрогелем. А, В, Д – 2-е сут, Б, Г, Е – 7-е сут эксперимента. Ув. 400.

Fig. 3. Immunohistochemical analysis (CD68 immunotyping) of biopsy specimens from the wound area of rats. А, В – control group, no treatment, С, D – experimental group, dermal hydrogel treatment with CSR, E, F – comparison group, dermal hydrogel treatment. А, С, D – 2nd day, В, D, E – 7th day of the experiment. Magnification $\times 400$.

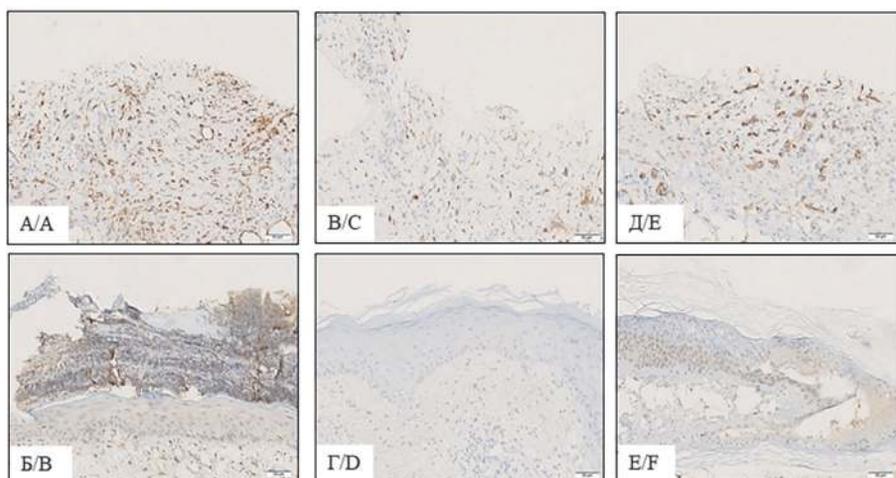


Рис. 4. Иммуногистохимический анализ (иммунотипирование CD3) образцов биопсии из области раны крыс. А, Б – контрольная группа, без лечения, В, Г – опытная группа, лечение дермальным гидрогелем с КСР, Д, Е – группа сравнения, лечение дермальным гидрогелем. А, В, Д – 2-е сут, Б, Г, Е – 7-е сут эксперимента. Ув. 400.

Fig. 4. Immunohistochemical analysis (immunotyping CD3) of biopsy specimens from the wound area of rats. А, В – the control group, rats without treatment; С, D – the experimental group, rats treated with the dermal hydrogel with the corn silk extract; E, F – the comparison group, rats treated with the dermal hydrogel without corn silk extract. А, С, E – day 2; В, D, F – day 7. Magnification $\times 400$.

экстракта КСР 1:50 в течение 4 сут. При оценке эффективности экспериментального лечения *in vivo* ДГ с 2% экстрактом КСР отмечался положительный репаративный эффект по данным гистологического и иммуногистохимического анализа как относительно контрольной группы, так и группы сравнения. Это указывает на эффективность биологически активных веществ экстракта КСР, а также его потенциальную возможность использования в качестве ранозаживляющего препарата на гидрогелевой основе.

Литература (п.п. 3 см. References)

1. Гильмутдинова И.Р., Мустафина Р.Д., Еремин П.С. Исследование биологических свойств раневого покрытия на основе компонентов внеклеточного матрикса. *Гены и клетки*. 2019; 14(5): 62-2.
2. Ниязов Б.С., Мамакеев Ж.Б., Сабитов А.А., Маманов Н.К. Современный взгляд на этиологию и патогенез раневого процесса (обзор литературы). *Бюллетень науки и практики*. 2020; 6(12): 176-90.
4. Алексеев А.А., Пантелеев А.А., Мальцев В.И. Современные биотехнологические методы в комплексном лечении термических поражений. *Высокотехнологическая медицина*. 2019; 6(3): 22-33.
5. Нащекина Ю.А., Дарвиш Д.М., Луконина О.А., Сироткина М.С., Блинова М.И., Михайлова Н.А. Коллагеновые носители различной формы и архитектуры для целей и задач регенеративной медицины. *Гены и клетки*. 2019; 14(3): 109.
6. Мельник С.И., Торикашвили В.Д., Якута К.Д., Лебедева С.А. Раневые повязки и мягкие лекарственные формы на основе кол-

лагена для лечения ран различной этиологии. *Фармацевтическое дело и технология лекарств*. 2020; 6: 10-6.

7. Никифорова Е.Б., Мелконян К.И., Веселова Д.В., Нечаева А.Г., Козмай Я.А. Изучение осмотической активности поликомпонентного геля репаративного действия. *Медико-фармацевтический журнал Пульс*. 2022; 24(6): 79-83.

References

1. Gilmutdinova I.R., Mustafina R.D., Yeregin P.S. Study of the biological properties of wound dressing based on extracellular matrix components. *Geny i kletki*. 2019; 14(5):62. (in Russian)
2. Niyazov B.S., Mamakeev Zh.B., Sabitov A.A., Mamanov N.K. Modern view on the etiology and pathogenesis of the wound process (literature review). *Byulleten' nauki i praktiki*. 2020; 6(12): 176-90. (in Russian)
3. Araujo T.A.T., Almeida M.C., Avanzi I., Parisi J., Simon Sales A.F., Na Y., et al. Collagen membranes for skin wound repair: a systematic review. *Journal of Biomaterial Applications*. 2021; 36(1): 95-112.
4. Alekseev A.A., Pantelev A.A., Maltsev V.I. Modern biotechnological methods in the complex treatment of thermal. *Vysokotekhnologicheskaya meditsina*. 2019; 6(3): 22-33. (in Russian)
5. Nashchekina Yu.A., Darvish D.M., Lukonina O.A., Sirotkina M.S., Blinova M.I., Mihaylova N.A. Collagen carriers of various shapes and architectures for the goals and objectives of regenerative medicine. *Geny i kletki*. 2019; 14(3): 109-9. (in Russian)
6. Melnik S.I., Torikashvili V.D., Yakuta K.D., Lebedeva S.A. Wound dressings and soft medicinal forms based on collagen for the treatment of wounds of various etiologies. *Farmatsevticheskoye delo i tekhnologiya lekarstv*. 2020; 6: 10-6. (in Russian)
7. Nikiforova E.B., Melkonyan K.I., Veselova D.V., Nechaeva A.G., Kozmai Ya.A. Study of the osmotic activity of a multicomponent reparative gel. *Mediko-farmatsevticheskiy zhurnal Pul's*. 2022; 24(6): 79-83. (in Russian)

Сведения об авторах:

Мелконян Карина Игоревна, канд. мед. наук, доцент, зав. центральной научно-исследовательской лаб. ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России, e-mail: cnil.ksma@yandex.ru;

Никифорова Елена Борисовна, канд. фарм. наук, доцент каф. фармации, ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

ОБЗОРЫ

© Терехина О.Л., Кирова Ю.И., 2023
УДК 612.013.1:616.831-002:547.461.4

Терехина О.Л., Кирова Ю.И.

Анализ причин и подходов к регуляции цитотоксического состояния микроглии стареющего мозга

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

С момента эпохального открытия микроглии Пио дель Рио Ортегой минуло столетие многоплановых исследований, которые подтвердили гениально предсказанные испанским гистологом свойства и функции микроглиальных клеток. Однако причины возрастзависимого снижения гомеостатического/репаративного потенциала микроглии, также как подходы к модуляции цитотоксического состояния микроглии стареющего мозга остаются нерешенными вопросами на текущем этапе развития нейробиологии, в то время как возраст-ассоциированные нейровоспаление, нейродегенерация и нейродисфункция представляют собой угрожающий вызов современному «стареющему» социуму. **Цель обзора** – анализ представлений о причинах развития дистрофического/старческого фенотипа микроглии и подходов к увеличению ее нейрорепаративного потенциала в стареющем мозге. В работе обсуждаются прогрессирующая с возрастом глюкокортикоидная гиперпродукция и недостаточность про-разрешающих/про-анаболических факторов как ведущие механизмы в развитии возрастных дистрофических изменений микроглии.

Ключевые слова: микроглия; нейровоспаление; старение; гиперактивация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси; проразрешающие/проанаболические факторы

Для цитирования: Терехина О.Л., Кирова Ю.И. Анализ причин и подходов к регуляции цитотоксического состояния микроглии стареющего мозга. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(1): 94-109. DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.94-109

Участие авторов: Концепция – Кирова Ю.И.; сбор и обработка материала – Кирова Ю.И., Терехина О.Л.; написание текста – Кирова Ю.И., Терехина О.Л. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Кирова Юлия Игоревна, e-mail: bioenerg@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.01.2023

Принята к печати 26.01.2023

Опубликована 17.03.2023

Terekhina O.L., Kirova Y.I.

Analysis of the causes and approaches to the regulation of the cytotoxic state of microglia in the aging brain

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

Since the epoch-making discovery of microglia by Pio del Rio Ortega, a century of multifaceted studies has passed, which confirmed the properties and functions of microglial cells ingeniously predicted by the Spanish histologist. However, the reasons for the steady age-dependent decrease in the homeostatic/repairative potential of microglia, as well as approaches to modulating the cytotoxic state of microglia in the aging brain, remain unresolved issues at the current state of neurobiology, while age-associated neuroinflammation, neurodegeneration and neurodysfunction represent a threatening challenge to the modern “aging” society. **The aim** of this review was to analyze the ideas about the causes for the development of the microglia dystrophic/senescent phenotype of microglia and approaches to enhancing its neuroreparative potential in the aging brain. The authors discussed the age-related progression of glucocorticoid hyperproduction and the shortage of pro-resolving/pro-anabolic factors as the leading mechanisms in the development of age-related dystrophic changes in microglia.

Keywords: microglia; neuroinflammation; aging; hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivation; pro-resolving/pro-anabolic factors

For citation: Terekhina O.L., Kirova Y.I. Analysis of the causes and approaches to the regulation of the cytotoxic state of microglia in the aging brain. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(1): 94-109. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.94-109

Author's contribution: the concept – Kirova Y.I.; collection and processing of material – Kirova Y.I., Terekhina O.L.; writing the text – Kirova Y.I. Terekhina O.L. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

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

Information about the authors:

Terekhina O.L., <https://orcid.org/0000-0001-5128-1912>

Kirova Yu.I., <https://orcid.org/0000-0002-2436-3661>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 09.01.2023

Accepted 26.01.2023

Published 17.03.2023

Список сокращений:

АКТГ – адренкортикотропный гормон	ERR – estrogen related receptor
АР – андрогеновый рецептор	FGF – fibroblast growth factor
АФК – активные формы кислорода	GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
БА – болезнь Альцгеймера	GRE – glucocorticoid response elements
ГН – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось	GSTM – glutathione S transferase
ГК – глюкокортикоидные гормоны	HIF – hypoxia-inducible factor
ГКГ – главный комплекс гистосовместимости	Iba1 – ionized calcium-binding adapter molecule 1
ГР – глюкокортикоидный рецептор	IFN – interferon
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер	IGF – insulin-like growth factor
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота	IκBα – nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
КГМ – кора головного мозга	IL – interleukin
КРГ – кортикотропин релизинг гормон	iNOS – inducible nitric oxide synthase
ЛПС – липополисахарид	IRF – interferon regulatory factor
МР – минералокортикоидный рецептор	NDUFV2 – NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2
НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты	NF-κB – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты	NMDAR – N-methyl-D-aspartate receptor
ПОМК – проопиомеланокортин	NOX – NADPH oxidase
ПР – прогестероновый рецептор	NRF – nuclear respiratory factor
ТР – рецептор тиреоидных гормонов	PDGF – platelet-derived growth factor
ЦНС – центральная нервная система	PGC-1α – peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha
ЦОГ – циклооксигеназа	PGE2 – prostaglandin E2
ЭР – эстрогеновый рецептор	PPAR – peroxisome proliferator-activated receptors
AMPA – α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor	RXR – retinoid X receptor
AP-1 – activating protein-1	SASP – senescence-associated secretory phenotype
APP – amyloid-beta precursor protein	SDHA – a flavochrome subunit of succinate dehydrogenase
ARE – androgen response element	SOD – superoxide dismutase
ATP5A – ATP synthase alpha chain	STAT – signal transducer and activator of transcription
Aβ – amyloid beta	TFAM – mitochondrial transcription factor A
BACE1 – beta-site APP-cleaving enzyme 1	TGF – transforming growth factor
BDNF – brain-derived neurotrophic factor	TLR – toll-like receptor
COX2 – cytochrome c oxidase subunit II	
cyt b – cytochrome b	

TNF – tumor necrosis factor

TREM – triggering receptor expressed on myeloid cells

VEGF – vascular endothelial growth factor

Введение

Проблема персистирующего старческого системного воспаления, провоцирующего и потенцирующего развитие возраст-ассоциированных заболеваний, связана с недостаточным пониманием причин и механизмов этого явления, получившего в англоязычной литературе выразительное определение «inflammaging», закрепившее прочную связь между старением и воспалением. Хроническое нейровоспаление, прогрессирующее от пожилого к старческому возрасту, представляет собой главный патогенетический механизм нейрокогнитивных нарушений и нейродегенерации. Обзор посвящен анализу новейших и более ранних представлений о причинах развития воспалительно-дегенеративных изменений центральной нервной системы (ЦНС) при старении организма, обсуждаются провоспалительные и атрофогенные эффекты хронической гиперпродукции глюкокортикоидов в стареющем организме.

В работе освещается новое «про-разрешающее» направление (resolving pharmacology) в фармакологической коррекции старческого хронического нейровоспаления, обосновывается необходимость критического пересмотра допустимости применения глюкокортикоидной терапии в пожилом и старческом возрасте.

Были использованы следующие интернет-ресурсы и базы данных: PubMed, PubMed Central, MEDLINE, Google, Medline Complete, elibrary.ru. Проанализированы 185 статей, отобранные по ключевым словам: нейровоспаление, стареющая микроглия, гомеостатический/провоспалительный/противовоспалительный микроглиальные фенотипы, проразрешающие факторы, нейростероиды, глюкокортикоиды, ядерные рецепторы, противовоспалительная терапия.

1. Микроглия в регуляции церебрального гомеостаза, иммунных ответов и стресс-реакций.

Микроглиоциты – резидентные макрофаги ЦНС – происходят от примитивных гемопоэтических предшественников желточного мешка, колонизирующих нервную ткань в раннем эмбриональном периоде до формирования гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Микроглиоциты подобно другим мононуклеарным фагоцитам костномозгового происхождения (моноциты, макрофаги, дендритные клетки) способны мигрировать, фагоцитировать, презентировать антиген, однако обладают рядом уникальных черт, обусловленных их эмбриональным происхождением [1].

Микроглиоциты представляют собой доминирующую популяцию иммунных клеток ЦНС. Другие типы иммунных клеток в паренхиме мозга в физиологических условиях не представлены, что обеспечивается ГЭБ и глиальной продукцией иммуносупрессорного цитокина TGF- β 1 (transforming growth factor), инициирующего апоптоз высокоспециализированных иммунных клеток (лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов), но не микроглиоцитов, представляющих собой популяцию макрофагов с наиболее подавленным иммунофенотипом [2].

Незрелое состояние микроглиальных клеток, отличающее их от макрофагов и дендритных клеток костномозгового происхождения, проявляется низкой экспрессией белков главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) класса II и костимулирующих молекул, ослабленной антигенпрезентирующей функцией и ограниченной способностью к активации Т-клеток, что предотвращает развитие аутоиммунной реакции, вызванной презентацией гликолипидных аутоантигенов ЦНС. В частности, индукция *in vitro* дифференцировки моноцитов в зрелые антиген-представляющие дендритные клетки достигается воздействием GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), IL-4 (interleukin 4) и ЛПС (липолисахарид), а микроглия в тех же условиях снижает экспрессию белков ГКГ класса II и формирует макрофагоподобный фенотип, экспрессирующий противовоспалительный IL-10 [3].

Гомеостатическая (покоящаяся, надзорная, разветвленная) микроглия выявляется в здоровом мозге, характеризуется развитием тонких подвижных сильно разветвленных отростков, обследующих микроокружение на наличие сигналов клеточного повреждения и инфекционной инвазии. Покоящаяся микроглия поддерживает тканевой гомеостаз за счет продукции нейротрофических факторов (IGF1/2, insulin-like growth factor 1/2; FGF2, fibroblast growth factor 2; BDNF, brain derived neurotrophic factor; PDGF, platelet-derived growth factor) и иммуносупрессорного цитокина TGF- β 1, способствует выживанию и созреванию клеток-предшественников нейронов и олигодендроцитов. При фармакологическом истощении микроглии в развивающемся мозге увеличивается количество гибнущих нейронов и клеточного дебриса [4].

В формировании разветвленного микроглиального фенотипа определяющую роль играют астроци-

тарные сигналы. Астроциты, как основные стероидогенные клетки ЦНС, продуцируют нейроактивные стероиды (прогестерон, эстрадиол, дегидроэпиандростерон, андростендион, тестостерон), которые являются наиболее мощными эндогенными модуляторами клеток микроглии и способны через активацию специфических ядерных рецепторов ограничивать микроглиальную реактивность, индуцировать рост отростков и увеличивать экспрессию микроглией нейротрофинов [5]. При культивировании в стандартных условиях микроглия приобретает амeboидную форму, но при совместном культивировании с астроцитами демонстрирует разветвленную морфологию [6]. Разветвленное строение приобретают моноциты крови в присутствии астроцитов, однако они не формируют транскриптом идентичный микроглии зародышевого происхождения и могут быть определены как микроглиально-подобные клетки (microglia-like cells). Истинная микроглия характеризуется активацией специфических генов (*Sall1*, *P2ry12*, *Tmem119*), которые не экспрессируются у микроглиально-подобных клеток моноцитарного происхождения [2]. Транскрипционный фактор *Sall1* (Spalt-Like transcription factor 1) признан критически значимым для поддержания фенотипа покоящейся микроглии с подавленными генами воспалительного ответа, в то время как микроглиально-подобные клетки моноцитарного происхождения, обладая сходной с микроглией разветвленной морфологией, характеризуются большей степенью активации про-воспалительных генов [7].

Гомеостатическая микроглия осуществляет иммунологическую функцию синаптического ремоделирования посредством частичного фагоцитоза (трогоцитоз) малоактивных синапсов, дендритных шипов, дендритов небольшого размера и чрезмерно разветвленных аксонов. Микроглия устраняет преимущественно возбуждающие глутаматергические синапсы, ограничивая возбудимость нейронов и глутаматную токсичность, провоцирующую нейровоспаление [8].

Микроглия эффективнее чем моноцитарные макрофаги фагоцитирует фрагменты миелина, причем провоспалительные цитокины TNF- α и IFN- γ способствуют микроглиальному фагоцитозу миелина, в то время как у макрофагов моноцитарного происхождения тормозят. Микроглия фагоцитирует апоптотические клетки в ЦНС. Компоненты апоптотических клеток служат лигандами микроглиальному рецептору TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2), активирующему фагоцитоз и ингибирующему воспалительную активацию микроглии [9].

Гомеостатический фенотип микроглии контролируется нейронами и астроглией. Нейроны конститутивно экспрессируют сигналы «выключения» («off» signals), ингибирующие активацию микроглии и формирующие иммуносупрессивную среду в ЦНС. Наиболее полно охарактеризованы нейрональные гликопротеины CD200, CD47 и микроРНК-124-3p [10]. Ключевая роль в поддержании гомеостатического состояния микроглии отводится астроглиальным нейростероидам (прогестерон, эстрадиол, дегидроэпиандростерон, тестостерон), поскольку возрастное снижение продукции половых гормонов астроцитами и гонадами провоцирует устойчивую провоспалительную активацию микроглии в стареющем мозге [5].

Микроглия подобно другим тканевым макрофагам проявляет фенотипическую пластичность, способность активироваться в зависимости от сигналов микроокружения. Провоспалительная активация микроглии развивается в течение нескольких минут после травмы или воздействия инфекционных агентов, что приводит к быстрому изменению экспрессии генов, морфологической и функциональной трансформации [1, 6].

Провоспалительный (цитотоксический) M1-фенотип микроглии характеризуется увеличенным клеточным телом (микроглиальная гипертрофия), короткими расширенными слаборазветвленными отростками. M1-микроглия проявляет цитотоксичность, высокую миграционную и пролиферативную активность. Главными функциями M1-микроглии являются иммуностимулирующая (рекрутинг и активация периферических иммуноцитов), бактерицидная, антигенпрезентирующая [1].

Провоспалительный M1-фенотип микроглии формируется после вирусной/бактериальной инвазии, травмы, гипоксии, ишемии, стресса. Триггерными сигналами к M1-активации являются инфекционные антигены, белки и нуклеиновые кислоты поврежденных клеток, АТФ, глутамат, провоспалительные цитокины IFN- γ (interferon γ), TNF- α (tumor necrosis factor α), IL-1. Микроглиальный рецептор TLR4 (toll-like receptor 4) распознает бактериальные антигены, пуриновые рецепторы (P2X4, P2X7, P2Y6, P2Y12) – АТФ, TLR2/4 – белки теплового шока, TLR9 – ДНК. Активация ионотропных AMPAR (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor), NMDAR (N-methyl-D-aspartate receptor) и метаботропных (mGluR2, mGluR3) глутаматных рецепторов вызывает провоспалительную M1-активацию микроглии [1, 11].

Молекулярный механизм M1-поляризации микроглии заключается в активации транскрипцион-

ных факторов NF- κ B (nuclear factor κ B) и HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1), отвечающих за инициацию и развитие воспалительной реакции. NF- κ B активирует экспрессию генов провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6), iNOS (inducible NO synthase), хемокинов, матриксных металлопротеиназ [12]. NF- κ B активирует экспрессию гена *HIF-1 α* , координирующего метаболическое репрограммирование микроглии, подавление митохондриогенеза и окислительного фосфорилирования, переход к гликолитической анаэробной энергопродукции, что необходимо для генерации активированной микроглией цитотоксичных активных форм кислорода (АФК). HIF-1 является не только главным регулятором механизмов адаптации к гипоксии, но и механизмов воспаления, играет критическую роль в воспалительной поляризации макрофагов [13]. Делеция HIF-1 α в макрофагах приводит к нарушению их миграционной активности. HIF-1 активирует экспрессию генов хемокиновых рецепторов (CXCR1, CXCR4), TLR4, iNOS, NOX2 (NADPH oxidase), MMP-1 (matrix metalloproteinase 1), провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8), способных через рецептор-опосредованные пути активировать NF- κ B. NF- κ B, наиболее значимый в развитии воспалительных и иммунных ответов транскрипционный фактор, является, подобно HIF-1 α , гипоксическим, поскольку в его инактивации задействованы O₂-зависимые пролилгидроксилазы. Гипоксия тесно связана с воспалением (воспалительная гипоксия) в связи с повышенным потреблением кислорода провоспалительно поляризованными макрофагами, генерирующими в НАДФН-оксидазной реакции супероксидный радикал [13, 14].

Таким образом, гипоксия провоцирует и потенцирует механизмы воспаления. Уже однократное гипоксическое воздействие (7% O₂, 24 ч) вызывает увеличение экспрессии маркеров M1-фенотипа микроглии (Iba1, CD86, TNF- α , IL-6, CCL2, CCL3) и снижение содержания маркеров противовоспалительного фенотипа M2 (аргиназа 1, CD206, IL-4, IL-10) у мышей дикого типа [15]. В культивируемой первичной микроглии после однократной 3-часовой гипоксии выявляется увеличение уровня мРНК iNOS, TNF- α , IL-1 β (маркеры M1-фенотипа), снижение Tmem2 и Arg-1 (маркеры M2-фенотипа) [16]. Хроническая интервальная гипоксия (чередующиеся 2-минутные эпизоды гипоксии (10,5% O₂) и нормоксии (21% O₂) в течение 8 ч в сутки; 14 сут) увеличивает экспрессию TNF- α , IL-1 β , IL-6, ЦОГ2 (циклооксигеназа), TLR-4 микроглией крыс [17].

Стрессовые воздействия (острый, субхронический, хронический стресс) вызывают типичные для M1 фенотипа микроглии морфологические изменения, повышенную экспрессию молекул ГКГ II, TLR4, провоспалительных цитокинов и хемокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-6, CCL2), снижение экспрессии противовоспалительного цитокина IL-10. Сверхэкспрессия провоспалительных цитокинов сохраняется в микроглии не менее 24 сут после стресса. Ключевую роль в формировании стресс-индуцированного провоспалительного состояния микроглии играют глутаматергическая, норадренергическая и глюкокортикоидная сигнальные системы, активация которых запускается стрессорами [18].

Глутаматная сигнализация при стрессе активируется мгновенно, происходит выброс глутамата, активация ионотропных глутаматных NMDA-рецепторов, возбуждение глутаматергических нейронов. При этом быстрый массивированный вход ионов кальция в нейроны вызывает активацию Ca²⁺-зависимых оксидаз, каспаз, фосфолипаз, что сопровождается увеличением потребления кислорода, изменением паттерна экспрессируемых генов и снижением экспрессии нейрональных иммуносупрессивных сигналов, таких как CD200, TGF- β , выключающих иммунофенотип микроглии. Более того, при стрессе гиперактивированные нейроны секретируют во внеклеточную среду адениловые нуклеотиды, которые через активацию пуриновых рецепторов вызывают провоспалительную поляризацию микроглии. Глутамат/NMDAR сигнализация имеет ключевое значение в увеличении микроглиальной продукции TNF- α при стрессе [18, 19].

При стрессе уровень норадреналина значительно повышается в разных областях мозга, включая кору, гипоталамус, гиппокамп, миндалину. Высокие концентрации норадреналина активируют α 2-адренорецепторы микроглии, связанные с Gi/o-белками, ингибирующими аденилатциклазу и сопряженные противовоспалительные сигнальные пути [20].

Глюкокортикоиды (ГК) – конечные гормоны гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой (ГГН) системы – связываются с высоким сродством с минералокортикоидными рецепторами (МР) (Kd=0,5 нМ) и с меньшим сродством с глюкокортикоидными рецепторами (ГР) (Kd=5,0 нМ), что приводит в состоянии покоя к насыщению 80% МР и 10% ГР, а при стрессе – к их полному насыщению. ГР оказывают противовоспалительное влияние на микроглию, напрямую в виде мономера взаимодействуя с ДНК-связанными провоспалительными факторами транскрипции, такими как NF- κ B, AP1 (activator protein 1), IRF (interferon

regulatory factor), STAT (signal transducer and activator of transcription), и подавляя их активность (транспрессия по механизму белок-белкового взаимодействия) [21]. ГР в виде гомодимеров/гомотетрамеров связываются с GRE (glucocorticoid response element) ДНК, активируют экспрессию генов, противодействующих сигналам воспаления: липокортина I, ингибитора NF- κ B (I κ B α), IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β , MAPK-фосфатазы 1 [22]. ГК признаются критически значимыми физиологическими ограничителями активации микроглии в низких и средних концентрациях (0,2-0,6 мкМ), а более высокие уровни ГК (1 мкМ) при продолжительном стрессе (7 дней и более) потенцируют экспрессию микроглией провоспалительных цитокинов, что связано со способностью ГР усиливать экспрессию, фосфорилирование и активацию нейрональных и микроглиальных NMDAR и AMPAR, потенцируя провоспалительную глутаматную сигнализацию [23]. Воспалительные микроглиальные цитокины IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- α вызывают секрецию кортикотропин-рилизинг гормона (КРГ) и адренкортикотропного гормона (АКТГ), способствуют устойчивой активации ГГН-оси, повышению уровня циркулирующих ГК и стресс-реактивности организма [24].

Противовоспалительный (проразрешающий, иммунорегуляторный, репаративный) M2-фенотип микроглии отличается от M1-фенотипа крупными размерами, амебoidalной формой, высокой фагоцитарной активностью, секрецией противовоспалительных цитокинов (TGF- β , IL-10), ростовых факторов (VEGF α , PDGFA), нейротрофинов (BDNF, FGF2), что способствует ангиогенезу, нейрогенезу, митохондрио- и синаптогенезу [4, 12]. Главная функция M2-микроглии заключается в разрешении воспаления и репарации ткани. M2-фенотип индуцируется гормонами противовоспалительного действия (ГК, половые и тиреоидные гормоны), нейротрансмиттерами (γ -аминомасляная кислота, норадреналин, ацетилхолин), противовоспалительными цитокинами (TGF- β 1, IL-4, IL-10, IL-13), метаболитами (аденозин, лактат, итаконат), производными полиненасыщенных жирных кислот (липоксисины, резольвины, протектины, марезины), фагоцитируемыми апоптотическими клетками, аннексином A1 (липокортин) [25].

В развитии противовоспалительной M2-поляризации микроглии/макрофагов ключевым молекулярным механизмом является переход клеток от анаэробной гликолитической энергопродукции к высокоэффективной аэробной митохондриальной энергопродукции. Это метаболическое перепрограммирование регулируется несколькими факторами транскрипции: NRF1/2 (nucle-

ar respiratory factor), PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor) и ERR α (estrogen receptor related receptor). NRF1/2 активируют экспрессию свыше 70% ферментов дыхательной цепи митохондрий и TFAM (transcription factor A of mitochondria), PPAR γ индуцирует экспрессию ферментов окисления высших жирных кислот, ERR α активирует экспрессию генов NRF1/2, PPAR γ , а также антиоксидантных ферментов и ангиогенных факторов, что необходимо для поддержания кислородного обеспечения окислительного фосфорилирования в митохондриях. PPAR γ и ERR α , подобно ГР, подавляют активность NF- κ B, снижают экспрессию TNF- α , IL-1, IL-6, iNOS, MMP9 и, тем самым, вовлекаются в механизмы ограничения воспалительной реакции [26, 27, 28]. Важно отметить, что PPAR γ обладает широкой субстратной специфичностью, активируется полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК), их производными (липоксисины, резольвины, протектины, марезины) и, таким образом, опосредует эффекты обширной группы липидных регуляторов разрешения воспаления. Лиганды PPAR γ индуцируют гены IL-13, Arg-1, CD206, CD36 противовоспалительного M2-фенотипа макрофагов [27]. Важно отметить, что активность рассматриваемых проразрешающих факторов транскрипции (PPAR γ , ERR α , NRF1/2) проявляется в присутствии транскрипционного коактиватора PGC-1 α (peroxisome-proliferator activated receptor 1 alpha) [29]. PGC-1 α необходим для альтернативной M2-активации макрофагов. При возрастном снижении экспрессии PGC-1 α происходит неконтролируемая прогрессия воспаления, системное повышение уровня провоспалительных факторов даже в отсутствии провоцирующих провоспалительных факторов [30].

Таким образом, морфофункциональное состояние (фенотип) микроглии определяется влиянием сложной совокупности регуляторных факторов и, в конечном итоге, соотношением провоспалительных и противовоспалительных сигналов. Старение организма характеризуется прогрессирующим дефицитом ключевых проанаболических/ проразрешающих гормонов (половые, тиреоидные гормоны). Гиперпродукция ГК при старении организма ответственна за дистрофические (дегенеративные) изменения на организменном, тканевом и клеточном уровне, в частности формирование дистрофического фенотипа нейронов (утрата дендритов и синаптических шипов), астроцитов и микроглии в стареющем мозге [31, 32].

2. Микроглия в контексте глюкокортикоидной гипотезы старения мозга. Структурно-функциональные особенности микроглии стареющего мозга остаются малоизученными, также как причины развития ми-

крогиальной цитотоксичности, дистрофических изменений, снижения репаративного потенциала, определяющих прогрессию возрастного нейровоспаления и неврологической дисфункции [33].

Популяция микроглии в стареющем мозге морфологически и функционально гетерогенна, представлена гомеостатическим/разветвленным фенотипом, M1-провоспалительным и специфическим для старческого мозга дистрофическим фенотипом. M1-реактивная и дистрофическая микроглия количественно увеличиваются в гиппокампе, префронтальной и лобной коре в процессе старения [34]. Впервые дистрофическая микроглия была описана в 2004 г. у здоровых пожилых людей и определена как фенотип стареющей микроглии. В последующих работах было показано, что количество дистрофически измененной микроглии в нормально стареющем мозге минимально (не более 9% микроглиальных клеток), но увеличивается до 45% при развитии нейродегенеративных заболеваний [35].

Морфологические особенности дистрофической микроглии заключаются в характерных изменениях цитоплазматических отростков, включая уменьшение их количества и полную утрату (дереамификация), уменьшение разветвленности, появление прерывистых (фрагментированных) и извилистых отростков. Ассоциированный со старением секреторный фенотип микроглии (senescence-associated secretory phenotype; SASP) представляет собой устойчиво повышенную продукцию провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ), белков острой фазы, хемокинов, экстраклеточных матриксных протеаз, цитотоксических АФК, провоцирующих развитие хронического асептического нейровоспаления в стареющем мозге [36].

Дистрофическая микроглия менее чувствительна к противовоспалительным регуляторным сигналам, таким как TGF- β 1 или GM-CSF. TGF- β 1 ингибирует продукцию NO в микроглие крыс 3-месячного возраста, но не 12- и 24-месячных крыс. Старые животные демонстрируют преувеличенный иммунный ответ («праймированное» состояние микроглии) на геморрагический инсульт, травму, нейротоксины. Так, после внутрибрюшинной инъекции ЛПС в мозге молодых мышей экспрессия мРНК IL-1 β и TNF- α остается повышенной до 24 ч, а в мозге старых особей – свыше 72 часов. Эти изменения не только нивелируют нейропротективные свойства микроглии, но провоцируют апоптотическую гибель нейронов. Микроглия стареющего мозга проявляет митохондриальную дисфункцию, снижение активности лизосомальных

ферментов, ослабление способности к миграции, фагоцитозу, аутофагии [37].

Дистрофические изменения и праймирование микроглии, как наиболее долгоживущих клеток среди гемопоэтических линий, предположительно связаны с накоплением повреждений и нарушением репарации ДНК. Однако недавние исследования показали быструю ротацию клеток в микроглиальной популяции за счет сбалансированных и динамично протекающих процессов апоптоза и пролиферации. Микроглия головного мозга мыши обновляется каждые 95 дней, человеческого мозга – в течение 3,5 лет [38]. Было показано, что фармакологическое истощение стареющей микроглии на 99%, вызванное применением ингибитора рецептора макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSFR), приводило спустя 14 дней к полному восстановлению популяции микроглии, также как ее старческого фенотипа [39]. Более того, истощение стареющей микроглии и последующее заселение паренхимы мозга культурой микроглиоцитов, выделенных из мозга молодых особей, приводило к быстрому формированию у «молодых» микроглиоцитов морфологических черт стареющей микроглии. Также было показано, что введение в паренхиму мозга старых животных ростовых факторов и противовоспалительных цитокинов приводило к восстановлению у старой микроглии морфологии гомеостатической/разветвленной микроглии типичной для здорового мозга молодых и взрослых животных. Растворимые факторы, высвобождаемые микроглией молодых животных, инициируют поглощение β -амилоидных (A β) агрегатов стареющей микроглией. Нарушенная у микроглиоцитов старых животных функция поглощения A β восстанавливалась даже на поздних стадиях образования амилоидных отложений при введении GM-CSF. M-CSF, также как GM-CSF, активирует пролиферацию микроглии и лизосомальную активность, необходимые для эффективного удаления амилоида [40]. В целом, данные свидетельствуют об определяющем влиянии сигнального паттерна стареющего мозга на формирование праймированного состояния микроглии и обратимом характере ее дистрофических/цитотоксических изменений.

Широко обсуждаемые причины развития устойчивого провоспалительного состояния стареющей микроглии множественны, разнородны, включают как эндогенные, так и внешние факторы: (1) возрастное накопление повреждений ДНК; (2) формирование сенильных амилоидных бляшек; (3) возрастная фрагментация миелина; (4) церебральная гипоперфузия/гипоксия, связанная с изреживанием сосудистой сети в ста-

реющем мозге; (5) возраст-ассоциированное системное воспаление; (6) хронический стресс; (7) возрастная резистентность к глюкокортикоидам [41]. В литературе, посвященной механизмам дистрофии/праймирования микроглии стареющего мозга, не анализируется влияние прогрессирующего возрастзависимого дисбаланса между катаболическими регуляторными сигналами (старческая гиперкортизолемиа) и анаболическими стимулами (снижение уровня половых гормонов, старческий субклинический гипотиреоз, резистентность к инсулину), однако именно дефицит анаболических регуляторов пластических процессов может иметь решающее значение в развитии как дистрофических изменений, так и хронического неразрешимого воспаления («inflammaging») в стареющем организме [18].

Повышенное содержание ГК в крови и мозге при старении сопровождается развитием дегенеративно-дистрофических изменений головного мозга и сердечно-сосудистой системы, атрофии мышц, инволюции тимуса, потери костной массы. Атрофогенные эффекты ГК при старении прогрессируют, что связано с нарастающей дисрегуляцией ГН-оси и гиперпродукцией ГК. Снижение чувствительности ГН-оси к отрицательной обратной регуляции не является исключительной прерогативой старческого организма, а прогрессирует во взрослом возрасте. «Старение» ГН-оси признается триггерным и центральным механизмом в биологии старения человека [42]. Молекулярную основу дегенеративных возрастных изменений составляют хорошо известные ГК-опосредованные катаболические эффекты: активация протеолиза и торможение синтеза белка в клетках-мишенях, супрессия биогенеза митохондрий, подавление продукции/секреции и сигнальных путей главных анаболических регуляторов репаративных процессов – половых гормонов, тиреоидных гормонов, инсулина [43]. Атрофические изменения в стареющем мозге идентичны последствиям хронического стресса или продолжительного введения ГК в сверхфизиологических дозах и включают: уменьшение объема серого вещества (в особенности височной, лобной коры и гиппокампа), деградацию белого вещества, увеличение желудочков [31, 44]. Патологически старение мозга связано с уменьшением размера нейронов, сокращением длины и количества дендритов, утратой дендритных шипов и синаптических контактов, укорочением аксонов, дезорганизацией миелиновых оболочек, изреживанием сосудистой сети, дистрофическими изменениями астроцитов и микроглии [32, 45]. Возрастной и стресс-индуцированный избыток ГК подавляет нейрогенез, снижает выживаемость незрелых нейро-

нов зубчатой извилины и блокирует формирование зрелого нейронального фенотипа. Глюкокортикоидная гипотеза старения мозга выделяет длительное воздействие ГК как основную причину функционального снижения и уязвимости нейронов к повреждающим факторам [44].

Возрастзависимое увеличение концентрации циркулирующих ГК и АКТГ связано с уменьшением чувствительности нейроэндокринной ГН-оси к отрицательной регуляции. В норме базовые концентрации ГК (10-20 нМ), связываясь с высокоаффинными МР, подавляют экспрессию генов КРГ и предшественника АКТГ проопиомеланокортина (ПОМК), ограничивая стресс-реактивность организма. При старении уменьшается экспрессия МР и, как следствие, снижается порог базовой активации ГН-оси [21, 46]. При стрессе концентрация ГК увеличивается до 200 нМ, происходит их связывание с низкоаффинными ГР, осуществляющими отрицательную регуляцию генов КРГ и ПОМК. Таким образом, участие МР и ГР в регуляции ГН-оси сводится к определяющей роли МР в тоническом тормозящем влиянии ГК на активность ГН-оси, в то время как ГР гипоталамуса опосредуют подавление стресс-индуцированной активности ГН-оси. При старении экспрессия ГР уменьшается, что приводит к снижению чувствительности ГН-оси к отрицательной обратной регуляции в условиях стресса [47].

В модуляции активности ГН-оси и церебральных эффектов ГК задействованы половые и тиреоидные гормоны, реализующие свое действие через собственные рецепторы, составляющие совместно с ГР единое суперсемейство ядерных рецепторов/лиганд-зависимых факторов транскрипции, в структуре которых тождественность аминокислотной последовательности ДНК-связывающего домена составляет не менее 47%. Рецепторы тестостерона (андрогеновый рецептор, АР), прогестерона (ПР), МР распознают собственные участки связывания с ДНК, но также способны взаимодействовать с GRE ДНК и составляют подсемейство глюкокортикоидных рецепторов [48]. Тестостерон ингибирует активацию ГН-оси, связываясь с АР, который в виде гомодимера взаимодействует с ARE (androgen response element) в промоторе гена КРГ и блокирует его транскрипцию [49]. Применение малых доз тестостерона или прогестерона (предшественник тестостерона) способствует снижению чрезмерно увеличенных уровней кортизола и тяжелых когнитивных нарушений при нейродегенеративных патологиях [50]. Более того, АР и ПР гетеродимеризуются с ГР на GRE ДНК как *in vitro*, так *in vivo*, что приводит к взаимному ингибированию транскрипционной активности [51]. Показано,

что этот механизм отменяет в случае высоких (стрессорных) концентраций ГК связывание гомодимеров ГР с негативными GRE в гене ГР и, таким образом, нивелирует явление отрицательной ауторегуляции гена ГР, резистентности к ГК и гиперактивации ГГН-оси. Важно, что анаболическое действие андрогенов и эстрогенов обусловлено не только их способностью активировать гены нейротрофинов (BDNF), активаторов митохондриогенеза (ERR α , NRF1/2, PGC-1 α), ростовых факторов (IGF-1, VEGF), но и со способностью связываться с ГР в качестве естественных антагонистов, блокировать их транскрипционную активность и катаболические эффекты ГК (антиглюкортикоидное действие) [51, 52]. Половые и тиреоидные гормоны вызывают сходные церебральные трофические/проанаболические эффекты: пролиферацию нейрональных клеток-предшественников, увеличение тел нейронов, размеров/разветвленности дендритных отростков и аксонов, плотности синапсов, скорости миелинизации. AP, PR, ЭР, тиреоидный рецептор (TR), экспрессируемые микроглией, подавляют транскрипционную активность NF- κ B через белок-белковые взаимодействия без связывания с ДНК по механизму транс-репрессии, индуцируют противовоспалительный фенотип микроглии, рост разветвленных микроглиальных отростков, активируют фагоцитарную функцию [51–53].

ГК осуществляют отрицательную регуляцию гонадотропных гормонов и тиреотропного гормона, экспрессия α -субъединицы которых блокируется при связывании ГР в nGRE (negative GRE) кодирующего ее гена, что отмечается при хроническом тяжелом стрессе и при старении. Возрастное снижение продукции половых и тиреоидных гормонов связано с усилением влияния ГК и усугубляется в условиях хронического стресса. Снижение уровня половых гормонов провоцирует развитие провоспалительного фенотипа микроглии, также как экспериментальная овариэктомия у крыс и мышей [54–56]. Субклинический гипотиреоз пожилого возраста вызывает развитие дистрофических/провоспалительных изменений микроглии в виде уменьшения количества отростков и их разветвленности, сопровождается когнитивными нарушениями и высоким риском болезни Альцгеймера [57]. В целом прогрессирующий с возрастом дефицит тиреоидных и половых гормонов приводит к ГК-опосредованному усилению дистрофических изменений в мозге, включая подавление белкового синтеза и базовых нейропротекторных процессов (митохондрио-, ангио-, синапто-, нейрогенез), торможение пластических механизмов разрешения нейровоспаления, праймирование микроглии [58].

Таким образом, множественные дегенеративные/дистрофические изменения в ЦНС, проявляющиеся при старении на уровне субклеточных органелл (уменьшение митохондриальной массы), клеток (сокращение длины и количества клеточных отростков) и ткани (подавление нейрогенеза, активация апоптоза), являются результатом избыточной ГК регуляции. В этой связи возникающее в пожилом возрасте хроническое системное и нейровоспаление представляется исключением из ряда типичных эффектов ГК, известных высокой противовоспалительной активностью, и рассматривается многими авторами как свидетельство возрастной резистентности к ГК, снижения экспрессии ГР и чувствительности клеток-мишеней к ГК [59, 60]. Развитие возрастной ГК-резистентности остается обсуждаемым и нерешенным вопросом, поскольку старческие изменения в организме, включая старение иммунитета (лимфопения, инволюция тимуса) отражают ГК-специфические генно-опосредованные эффекты, также как механизмы развития умеренного неразрешаемого старческого нейровоспаления, связанные с ГК-зависимым усилением провоспалительной глутаматной сигнализации и репрессией ангиогенеза. ГК подавляют ангиогенез за счет индукции антиангиогенного фактора тромбоспондина-1, что провоцирует возрастное изреживание сосудистой сети и усиление гипоксического фактора в стареющем организме [61, 62]. Гипоперфузия/гипоксия является хорошо известным триггером в развитии воспаления. Макрофаги/микроглия способны к быстрой гипоксической провоспалительной поляризации, сопряженной с подавлением экспрессии транскрипционного коактиватора PGC-1 α , роль которого в активации факторов транскрипции проразрешающего/противовоспалительного действия (PPAR γ , ERR α , TR, ЭР, AP, PR) является определяющей. Клетки микроглии реагируют на гипоксию переходом от разветвленного фенотипа к амебоидному, усилением секреции провоспалительных медиаторов (iNOS, TNF- α , IL-1, CCL5) и снижением фагоцитарной активности [14-16, 27-30]. Таким образом, ГР-зависимая прогрессия гипоксических условий в стареющем организме и потенцирование глутаматной сигнализации в мозге являются триггерными факторами в провоспалительной поляризации микроглии.

Секретируемые провоспалительными периферическими макрофагами и микроглией воспалительные цитокины IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- α вызывают секрецию КРГ и АКТГ и, тем самым, способствуют устойчивой активации ГГН-оси, повышению уровня циркулирующих ГК, усилению дегенеративных ГК-опосредованных процессов в старческом организме [24, 55].

Повышение уровня воспалительных цитокинов многие исследователи рассматривают как главную причину возрастной гиперактивации ГГН-оси [63, 64]. Следовательно, возрастное снижение анаболического потенциала организма приводит к усилению ГК влияний, развитию ГК-опосредованных катаболических, гипоксических, воспалительных механизмов, гиперактивации ГГН-оси и нерегулируемой прогрессии ГК-зависимых системных дегенеративно-воспалительных изменений старческого организма.

Таким образом, патогенетически обоснованная коррекция старческого хронического асептического нейровоспаления должна включать наряду с противовоспалительной терапией препараты антиглюкокортикоидного, проразрешающего/проанаболического и антигипоксического действия, рассмотрению которых посвящен следующий раздел.

3. Фармакологическая модуляция цитотоксического состояния микроглии стареющего мозга.

Системное асептическое неразрешимое воспаление, ассоциированное с пожилым и старческим возрастом, остается плохо понимаемым явлением, провоцирующим развитие неврологических, сердечно-сосудистых, онкологических и обменных заболеваний в стареющем организме. Проблема усугубляется устойчивостью воспалительно-дегенеративных возрастных изменений к стандартным фармакологическим противовоспалительным стратегиям [59].

Фармакологическая коррекция старческого нейровоспаления и сопряженных нейрокогнитивных нарушений, направленная на купирование провоспалительного состояния микроглии в стареющем мозге, включает нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) и синтетические аналоги глюкокортикоидов. Однако попытки корректировать цитотоксическое состояние стареющей микроглии с помощью широко применяемых НПВП оказались малоэффективными [33, 37, 66]. НПВП, действующие как неспецифические ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ), такие как индометацин, ацетилсалициловая кислота, мелоксикам, ибупрофен, могут снижать риск нейродегенеративных заболеваний лишь при условии применения на предсимптомных этапах болезни Альцгеймера (БА), а в симптоматической фазе неэффективны [66, 67].

Низкая эффективность НПВП в пожилом и старческом возрасте связана с их способностью подавлять не только механизмы развития, но и разрешения воспалительного процесса. Противовоспалительное действие НПВП связано с ингибированием ЦОГ и нарушением продукции простагландина E2 (PGE2), наи-

более распространенного в организме липидного медиатора воспаления, способного вызывать вазодилатацию артерий, повышать проницаемость микрососудов, активировать продукцию воспалительных хемокинов и цитокинов дендритными клетками, макрофагами, Т-лимфоцитами. Однако PGE2 участвует не только в инициации, но и в разрешении воспаления, индуцируя экспрессию липоксигеназ, продуцирующих про-разрешающие липидные медиаторы (липоксины, нейротектины, марезины, резольвины). Более того, PGE2 через $G\alpha_s$ -сопряженные рецепторы EP2 и EP4 ограничивает секрецию TNF- α и IL-1 β , усиливает экспрессию противовоспалительного IL-10 в ответах микроглии на ЛПС, стимулирует ангиогенез и митогенез, координирует процесс разрешения воспаления и восстановления тканевого гомеостаза [68]. Таким образом, терапевтические подходы, направленные на блокаду синтеза PGE2 необходимо критически пересмотреть при возрастном персистирующем воспалении, так как истощение PGE2 приводит к хроническому воспалению из-за недостаточности механизмов разрешения.

Попытки купировать старческое нейровоспаление и нейродегенерацию с помощью ГК и их синтетических аналогов оказались безуспешными. Лечение ГК сопровождалось существенным ухудшением когнитивных, исполнительных функций, особенно рабочей памяти, атрофией гиппокампа и миндалина [43, 69]. В настоящее время убедительно продемонстрирована связь старения и нейродегенеративных заболеваний с гиперактивацией ГГН-оси, а гиперкортизолемиа рассматривается как биомаркер нейродегенеративных процессов у человека [70]. Несмотря на то, что ГК оказывают сильное противовоспалительное действие на микроглию, существенно превышающее действие ибупрофена, индометацина и миноциклина, ГК активируют экспрессию ионотропных глутаматных рецепторов и потенцируют в мозге глутаматную эксайтотоксичность [4, 43]. Наличие GRE в промоторных областях генов амилоидного предшественника (APP) и BACE1 (beta-site APP-cleaving enzyme 1; амилоидогенный фермент) объясняет стимулирующее влияние стресса и ГК на неправильный процессинг APP и образование A β [70, 71]. ГК снижают уровни мРНК генов, ответственных за митохондриогенез, включая PGC-1 α , NRF1, сиртуин-1, BDNF в различных тканях [43]. ГК подавляют ангиогенез за счет индукции антиангиогенного фактора тромбоспондина-1 [62]. В целом, несмотря на широкое признание ГК как наиболее эффективных противовоспалительных агентов, в нервной системе хроническое чрезмерное воздействие ГК ока-

зывает провоспалительные и дегенеративные эффекты, в связи с чем ГК-терапия не может применяться для предотвращения нейровоспаления и прогрессирования БА. Более того, приоритетной должна быть терапия, направленная на снижение высоких уровней ГК у пожилых людей и пациентов с ранней стадией БА [61, 70]. Неселективный антагонист ГР мифепристон (RU486) проявляет высокую эффективность при лечении патологических состояний, связанных с гиперкортизолиемией, вызывает быстрое улучшение психотических депрессивных симптомов, ослабляет повреждение гиппокампа при старении и хорошо переносится пациентами [46, 70, 71].

Таким образом, применение подходов, направленных на прямое ингибирование воспалительных путей, включая НПВП, ГК и их синтетические аналоги, показало низкую эффективность при старческих воспалительно-дегенеративных заболеваниях, что предопределило развитие нового «про-разрешающего» направления (*resolution pharmacology*) в фармакологии воспалительных состояний, нацеленного на активацию анаболических восстановительных/репаративных процессов [33, 72]. В отличие от иммуносупрессорных препаратов, которые блокируют некоторые ключевые провоспалительные медиаторы, препараты «разрешающего» действия активируют множество механизмов: предотвращают нейтрофильную инфильтрацию, подавляют экспрессию провоспалительных цитокинов и хемокинов, индуцируют апоптоз нейтрофилов и фагоцитоз нейтрофилов макрофагами, инициируют M2-противовоспалительную поляризацию макрофагов, восстанавливают тканевую гомеостаз без фиброза [25]. Учитывая патофизиологические особенности старческого воспаления, основной причиной которого является критическое снижение продукции эндогенных про-разрешающих факторов (половых гормонов), проявляющих наряду с противовоспалительной активностью проанаболические эффекты, одним из наиболее перспективных, патогенетически обоснованных подходов к коррекции возрастного системного и нейровоспаления является применение селективных модуляторов рецепторов половых гормонов [33, 37, 66].

Половые гормоны синтезируются всеми клетками нервной системы, что свидетельствует об исключительной важности этих нейростероидов в ограничении чрезмерной активации микроглии, поддержании тканевого гомеостаза и базовых функций нервной системы. Способность активированных AP, ЭР и ПР блокировать транскрипционную активность NF-κB, подобно ГР, определяет их противовоспалительную активность. Однако, их высокая проанаболическая активность, ан-

тиглюкокортикоидные свойства как естественных антагонистов ГР, способность увеличивать экспрессию VEGF, BDNF, IGF-1, активировать в головном мозге митохондри-, ангио-, нейрогенез, трансформировать микроглию в противовоспалительный M2-фенотип определяет их высокий нейрорепаративный потенциал и проразрешающее действие при нейровоспалении [5, 50]. Терапия тестостероном у пациентов с рассеянным склерозом увеличивала объем серого вещества и улучшала когнитивные способности. У женщин андрогенная терапия в низких дозах хорошо переносится, безопасна для краткосрочного и долгосрочного лечения [50]. Введение эстрадиола оказывало нейропротекторное, антиамилоидное, противовоспалительное действие, уменьшало когнитивные нарушения [66]. Эстрадиол и тестостерон могут вызывать побочные эффекты, связанные с повышенным риском тромбоза, инсульта, инфаркта миокарда, что предопределило разработку селективных модуляторов рецепторов половых гормонов. Наиболее известные селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов – ралоксифен и тамоксифен – проникают через ГЭБ, ограничивают глиоз и нейровоспаление. Тиболон подавляет экспрессию TNF-α и окислительный стресс, увеличивает выживаемость клеток, повышает экспрессию генов ранней пластичности *c-fos*, что сопряжено с улучшением обучения и снижением тревожности у крыс [73].

Помимо рецепторов половых гормонов, другие группы ядерных рецепторов, такие как PPAR, RXR (*retinoid X receptor*), ERR, также признаются транскрипционными факторами противовоспалительного и проразрешающего действия. Механизм их противовоспалительной активности сходен с глюкокортикоидным и осуществляется ДНК-независимо через белок-белковые взаимодействия и трансрепрессию провоспалительных факторов транскрипции AP-1, NF-κB, STAT-1 [66].

PPARγ экспрессируется в различных иммунных клетках, регулирует дифференцировку макрофагов, противовоспалительную M2-поляризацию, экспрессию IL-4, IL-10, IL-13, CD206, TGF-β, аргиназы, метаболизм липидов в иммунных клетках. PPARγ имеет решающее значение для формирования противовоспалительного M2-фенотипа макрофагов. Изотип PPARγ представляет собой доминирующую изоформу в микроглии. Наиболее изученными синтетическими лигандами PPARγ являются тиазолидиндионы (росиглитазон, пиоглитазон). Агонисты PPARγ ингибируют продукцию провоспалительных молекул периферическими иммунными и глиальными клетками. Пероральное введение агониста PPARγ пиоглитазона снижает

активацию глии и накопление А β -бляшек в гиппокампе и КГМ [74]. В животных моделях БА пиоглитазон и росиглитазон ослабляют астроцитарную и микроглиальную активацию, снижают уровни провоспалительных медиаторов (IL-6, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , ЦОГ-2, iNOS), амилоида, тау-белка, ослабляют окислительный стресс, восстанавливают уровни нейротрофических факторов и активность митохондрий, улучшают выживаемость нейронов и память. В настоящее время PPAR γ , также как GP α , признаны транскрипционными факторами с клинически значимыми иммуномодулирующими свойствами, способными ингибировать экспрессию генов цитокинов в основном за счет подавления транскрипционной активности NF-kB. PPAR γ имеет широкую субстратную специфичность, связывает ПНЖК, их проразрешающие производные (протектины, резольвины, марезины), а также НПВП. Таким образом, PPAR γ опосредует нейропротективное и проразрешающее действие НПВП. PPAR γ , а также транскрипционный коактиватор PGC-1 α представляются многообещающими мишенями в терапии воспалительных, неврологических, нервно-психических заболеваний. Безафибрат (панагонист PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ) положительно влияет на функцию митохондрий и когнитивные функции при болезни Паркинсона [75]. PPAR α негативно влияет на транскрипционную активность GP при одновременном усилении противовоспалительной GRE-независимой активности GP. Применение агонистов PPAR α (фибраты) позволяет существенно снизить дозы ГК и их побочные эффекты при лечении хронических воспалительных заболеваний [76].

Исключительная роль в развитии механизмов разрешения воспаления отводится ядерному рецептору ERR α , контролирующему экспрессию генов, связанных с митохондриогенезом и окислительным фосфорилированием (ERR α , PPAR α , PPAR β/δ , PPAR γ , NRF1/2), антиоксидантной системой (SOD2, GSTM1), ангиогенезом (VEGF), что в целом инициирует антигипоксические, антиоксидантные, энерготропные механизмы, препятствующие провоспалительной поляризации микроглии/макрофагов. Активаторами ERR α являются растительные полифенолы, такие как генистеин, апигенин, ресвератрол, пикетатанол, дайдзеин. Потенциальными фармакологическими агонистами ERR α являются гипополипидемические препараты статины (аторвастатин, флувастатин, левастатин) [77].

Таким образом, в качестве клинически значимых препаратов проразрешающего действия при возрастном нейровоспалении могут быть использованы се-

лективные модуляторы эстрогеновых и андрогеновых рецепторов, тиазолидиндионы (агонисты PPAR γ), фибраты (агонисты PPAR α), статины (ERR α), для многих из которых при продолжительном приеме показана кардио- и гепатотоксичность [78]. В связи с чем, разработка высокоэффективных и безопасных проразрешающих фармакоагентов составляет в настоящее время один из наиболее перспективных фармакологических подходов к коррекции хронических воспалительных состояний и старческого персистирующего воспаления.

Исследования открытого в 2004 г. сукцинатного рецептора SUCNR1/GPR91 показали его высокую конститутивную экспрессию макрофагами, что предопределило последующее изучение вовлеченности сукцинатной сигнализации в механизмы врожденного, приобретенного иммунитета и развитие воспалительной реакции [79]. В 2021 г. было показано, что сукцинат индуцирует противовоспалительную гиперполяризацию макрофагов через активацию Gq-белков и внутриклеточного кальциевого сигнального каскада [80]. Однако оценка влияния сукцинатной сигнализации на морфофункциональное состояние микроглии в стареющем мозге с явлениями хронического нейровоспаления не проводилась.

Исследования 2018-2021 гг. [81-83] влияния отечественного сукцинатсодержащего препарата мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат, ЭМГП сукцинат) на морфофункциональное состояние микроглии коры головного мозга стареющих крыс показали при 14-дневном внутривенном введении (100 мг/кг) усиление экспрессии противовоспалительных и синаптогенных факторов (TGF- β 1, BDNF), фагоцитарного маннозного рецептора CD206, снижение уровня экспрессии провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF α), цитозольного маркера микроглиальной активации Iba1 (ionized calcium binding adapter molecule) [81]. Методом иммуногистохимического окрашивания были выявлены индуцированные ЭМГП сукцинатом морфологические изменения микроглии в виде увеличения количества, длины и разветвленности отростков в префронтальной коре и CA1-поле гиппокампа, что было сопряжено с уменьшением количества микроглиальных клеток до их численности у молодых животных [82]. Более того, курсовое введение мексидола активировало экспрессию белков-маркеров митохондриогенеза (PGC-1 α , NRF-1, TFAM, NDUFB2, SDHA, cyt b, COX2, ATP5A) и VEGF, что свидетельствует о проанаболической/проразрешающей активности препарата [83].

Важно отметить, что помимо Gq-опосредованной противовоспалительной поляризации микроглии/макрофагов, SUCNR1 является уникальной системой инициации системных и тканеспецифических сукцинатзависимых механизмов адаптации к гипоксии, таких как: стимуляция сердечной деятельности, секреция почками ренина и увеличение артериального давления, стимуляция эритропоэза и ангиогенеза [79]. Таким образом, сукцинат/SUCNR1-сигнализация ограничивает в организме гипоксический фактор как главный триггер асептического воспаления, в инициации и развитии которого задействованы два ключевых провоспалительных фактора транскрипции NF-κB и HIF-1α, активируемых в гипоксических условиях [13-17].

Выявленные иммуномодулирующие эффекты сукцинат/SUCNR1 сигнализации в мозге, включая противовоспалительный, проразрешающий, противогипоксический, позволяют заключить, что янтарная кислота и сукцинатсодержащие препараты могут быть использованы в коррекции старческих воспалительно-дегенеративных неврологических нарушений, связанных с ГК-гиперпродукцией, а также с целью купировать нейротоксические и провоспалительные последствия при длительной терапии глюкокортикоидами.

Заключение

Увеличение доли пожилого населения в демографической структуре развитых стран привело к тенденции роста возраст-ассоциированных заболеваний (неврологические, сердечно-сосудистые, онкологические патологии), лечение которых остается неэффективным, существенно снижает качество жизни лиц пожилого и старческого возраста, представляет глобальную проблему для современной медицины и экономики.

На текущем этапе патофизиологических представлений о биологии старения и патогенезе возраст-ассоциированных дисфункций в качестве ключевой причины развития возрастных патологий выделяют системное персистирующее воспаление, вызванное атрофогенными и провоспалительными эффектами чрезмерно и длительно увеличенной глюкокортикоидной регуляции.

Применение препаратов, сочетающих антиглюкокортикоидную, антигипоксическую, противовоспалительную и проразрешающую активность, представляет собой перспективную стратегию фармакологической коррекции хронических возрастных заболеваний, ассоциированных с персистирующим асептическим воспалением. Активно изучаемая в по-

следние годы иммуномодулирующая активность сукцинат/SUCNR1-сигнализации, координирующей системные и тканеспецифические механизмы адаптации к гипоксии, позволяет рассматривать янтарную кислоту и сукцинатсодержащие препараты как высокоэффективные фармакоагенты в разрешении старческого системного и нейровоспаления.

Литература

(п.п. 1-46; 48-81 см. References)

47. Большаков А.П., Третьякова Л.В., Квичанский А.А., Гуляева Н.В. Глюкокортикоиды в нейровоспалении гиппокампа: доктор Джекилл и мистер Хайд. *Биохимия*. 2021; 86(2): 186 – 99. <https://doi.org/10.1134/S0006297921020048>
82. Кирова Ю.И., Терехина О.Л., Шакова Ф.М. Морфофункциональные особенности астроцитов и микроглии в мозге стареющих крыс при курсовом применении этилметилгидроксипиридина сукцината. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(1): 4–16. <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.01.4-16>
83. Кирова Ю.И., Шакова Ф.М., Германова Э.Л., Романова Г.А., Воронина Т.А. Влияние Мексидола на церебральный митохондриогенез в молодом возрасте и при старении. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020; 120(1); 62-9.

References

1. Jurga A.M., Paleczna M., Kuter K.Z. Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Front. Cell. Neurosci.* 2020; 14: 198. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>
2. Cuadros M.A., Sepulveda M.R., Martin-Oliva D., Marin-Teva J.L., Neubrand V.E. Microglia and microglia-like cells: similar but different. *Front. Cell. Neurosci.* 2022; 16: 816439. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.816439>
3. Lambert C., Desbarats J., Arbour N., Hall J.A., Olivier A., Bar-Or A., et al. Dendritic cell differentiation signals induce anti-inflammatory properties in human adult microglia. *J Immunol* 2008; 181:8288-97. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8288>
4. Abe N., Nishihara T., Yorozuya T., Tanaka J. Microglia and macrophages in the pathological central and peripheral nervous systems. *Cells*; 2020; 9: 2132. <https://doi.org/10.3390/cells9092132>
5. Germelli L., Da Pozzo E., Giacomelli C., Tremolanti C., Marchetti L., Wetzel C.H., et al. De novo neurosteroidogenesis in human microglia: involvement of the 18 kda translocator protein. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22: 3115. <https://doi.org/10.3390/ijms22063115>
6. Grassivaro F., Menon R., Acquaviva M., Ottoboni L., Ruffini F., Bergamaschi A.6 et al. Convergence between microglia and peripheral macrophages phenotype during development and neuroinflammation. *The Journal of Neuroscience*. 2020; 40(4): 784–95. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1523-19.2019>
7. Utz S.G., See P., Mildenerger W., Thion M.S., Silvina A., Lutz M.6 et al. Early fate defines microglia and non-parenchymal brain macrophage development. *Cell*. 2020; 181: 557–73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.021>
8. Lim T.K.Y., Ruthazer E.S. Microglial trogocytosis and the complement system regulate axonal pruning in vivo. *eLife*. 2021; 10: e62167. <https://doi.org/10.7554/eLife.62167>

9. Andoh M., Koyama R. Comparative review of microglia and monocytes in CNS phagocytosis. *Cells*. 2021; 10: 2555. <https://doi.org/10.3390/cells10102555>
10. Peng H., Harvey B.T., Richards C.I., Nixon K. Neuron-derived extracellular vesicles modulate microglia activation and function. *Biology*. 2021; 10: 948. <https://doi.org/10.3390/biology10100948>
11. Liu H., Leak R.K., Hu X. Neurotransmitter receptors on microglia. *Stroke and Vascular Neurology*. 2016; 1: e000012. <https://doi.org/10.1136/svn-2016-000012>
12. Jiang C.T., Wu W.F., Deng Y.H., Ge J.W. Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke. *Molecular Medicine Reports*. 2020; 21: 2006–18. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11003>
13. Malkov M.I., Lee C.T., Taylor C.T. Regulation of the hypoxia-inducible factor (HIF) by pro-inflammatory cytokines. *Cells*. 2021; 10: 2340. <https://doi.org/10.3390/cells10092340>
14. Kiani A.A., Elyasi H., Ghoreyshi S., Nouri N., Safarzadeh A., Nafari A. Study on hypoxia-inducible factor and its roles in immune system. *Immunological Medicine*. 2021; 44(4): 223–36. <https://doi.org/10.1080/25785826.2021.1910187>
15. Zhang F., Zhong R., Li S., Fu Z., Cheng C., Cai H., et al. Acute hypoxia induced an imbalanced M1/M2 activation of microglia through NF- κ B signaling in Alzheimer's disease mice and wild-type littermates. *Front. Aging Neurosci.* 2017; 9: 282. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00282>
16. Habib P., Slowik A., Zendedel A., Johann S., Dang J., Beyer C. Regulation of hypoxia-induced inflammatory responses and M1–M2 phenotype switch of primary rat microglia by sex steroids. *J. Mol. Neurosci.* 2014; 52: 277–85. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0137-y>
17. Kiernan E.A., Smith S.M.C., Mitchell G.S., Watters J.J. Mechanisms of microglial activation in models of inflammation and hypoxia: implications for chronic intermittent hypoxia. *J Physiol.* 2016; 594(6): 1563–77. <https://doi.org/10.1113/JP271502>
18. Niraula A., Sheridan J.F., Godbout J.P. Microglia priming with aging and stress. *Neuropharmacology*. 2017; 42: 318–33. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.185>
19. Fiebich B.L., Akter S., Akundi R.S. The two-hit hypothesis for neuroinflammation: role of exogenous ATP in modulating inflammation in the brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2014; 8: 260. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00260>
20. Calcia M.A., Bonsall D.R., Bloomfield P.S., Selvaraj S., Barichello T., Howes O.D. Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology*. 2016; 233: 1637–50. <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4218-9>
21. Daskalakis N.P., Meijer O.C., Kloet E.R. Mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor work alone and together in cell-type-specific manner: implications for resilience prediction and targeted therapy. *Neurobiology of Stress*. 2022; 18: 100455. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2022.100455>
22. Johnson T.A., Paakinaho V., Kim S., Hager G.L., Presman D.M. Genome-wide binding potential and regulatory activity of the glucocorticoid receptor's monomeric and dimeric forms. *Nature Communications*. 2021; 12: 1987. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22234-9>
23. Sanguino-Gomez J., Buurstedde J.C., Abiega O., Fitzsimons C.P., Lucassen P.J., Eggen B.J.L., et al. An emerging role for microglia in stress-effects on memory. *European Journal of Neuroscience*. 2022; 55(9-10): 2491–518. <https://doi.org/10.1111/ejn.15188>
24. Lucassen P.J., Oomen C.A., Naninck E.F.G., Fitzsimons C.P., Dam A.M., Czeh B., et al. Regulation of adult neurogenesis and plasticity by (early) stress, glucocorticoids, and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 7: a021303. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021303>
25. Sugimoto M.A., Sousa L.P., Pinho V., Perretti M., Teixeira M.M. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front. Immunol.* 2016; 7: 160. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00160>
26. Amici S.A., Dong J., Guerau-de-Arellano M. Molecular mechanisms modulating the phenotype of macrophages and microglia. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01520>
27. Croasdell A., Duffney P.F., Kim N., Lacy S.H., Sime P.J., Phipps R.P. PPAR γ and the innate immune system mediate the resolution of inflammation. *PPAR Res.* 2015; 2015: 549691. <https://doi.org/10.1155/2015/549691>
28. Yuk J.M., Kim T.S., Kim S.Y., Lee H.M., Han J., Dufour C.R., et al. Orphan nuclear receptor ERR α controls macrophage metabolic signaling and A20 expression to negatively regulate TLR-induced inflammation. *Immunity*. 2015; 43: 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.003>
29. Rius-Perez S., Torres-Cuevas I., Millan I., Ortega A.L., Perez S. PGC-1 α , inflammation, and oxidative stress: An integrative view in metabolism. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020; 2020: 1452696. <https://doi.org/10.1155/2020/1452696>
30. Eisele P.S., Silvia S., Jens S., Hottiger M.O., Handschin C. The peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α/β (PGC-1) coactivators repress the transcriptional activity of NF- κ B in skeletal muscle cells. *Journal of biological chemistry*. 2013; 288(4): 2246–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.375253>
31. Blinkouskaya Y., Caçoilo A., Gollamudi T., Jalalian S., Weickenmeier J. Brain aging mechanisms with mechanical manifestations. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2021; 200: 111575. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111575>
32. Popov A., Brazhe A., Denisov P., Sutyagina O., Li L., Lazareva N., et al. Astrocyte dystrophy in ageing brain parallels impaired synaptic plasticity. *Aging Cell*. 2021; 20: e13334. <https://doi.org/10.1111/acel.13334>
33. Rodriguez-Gomez J.A., Kavanagh E., Engskog-Vlachos P., Engskog M.K.R., Herrera A.J., Espinosa-Oliva A.M., et al. Microglia: agents of the CNS pro-inflammatory response. *Cells*. 2020; 9: 1717. <https://doi.org/10.3390/cells9071717>
34. Shahidehpour R.K., Higdon R.E., Crawford N.G., Neltner J.H., Ig-hodaro E.T., Patel E., et al. Dystrophic microglia are associated with neurodegenerative disease and not healthy aging in the human brain. *Neurobiol Aging*. 2021; 99: 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.12.003>
35. Candlish M., Hefendehl J.K. Microglia phenotypes converge in aging and neurodegenerative disease. *Front. Neurol.* 2021; 12: 660720. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.660720>
36. Costa J., Martins S., Ferreira P.A., Cardoso A.M.S., Guedes J.R., Peça J., et al. The old guard: age-related changes in microglia and their consequences. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2021; 197: 111512. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111512>
37. Edler M.K., Mhatre-Winters I., Richardson J.R. Microglia in aging and Alzheimer's disease: a comparative species review. *Cells*. 2021; 10: 1138. <https://doi.org/10.3390/cells10051138>
38. Askew K., Li K., Olmos-Alonso A., Garcia-Moreno F., Liang Y., Richardson P., et al. Coupled proliferation and apoptosis maintain the rapid turnover of microglia in the adult brain. *Cell Reports*. 2017; 18: 391–405. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.041>

39. Najafi A.R., Crapser J., Jiang S., Ng W., Mortazavi A., West B.L., et al. A limited capacity for microglial repopulation in the adult brain. *Glia*. 2018; 66: 2385e2396. <https://doi.org/10.1002/glia.23477>
40. Daria A., Colombo A., Llovera G., Hampel H., Willem M., Liesz A., et al. Young microglia restore amyloid plaque clearance of aged microglia. *The EMBO Journal*. 2017; 36: 583–603. <https://doi.org/10.15252/embj.201694591>
41. Keane L., Antignano I., Riechers S.P., Zollinger R., Dumas A.A., Offermann N., et al. mTOR-dependent translation amplifies microglia priming in aging mice. *J Clin Invest*. 2021; 131(1): e132727. <https://doi.org/10.1172/JCI132727>
42. Thompson M.E., Fox S.A., Berghanel A., Sabbi K.H., Phillips-Garcia S., Enigk D.K., et al. Wild chimpanzees exhibit humanlike aging of glucocorticoid regulation. *PNAS*. 2020; 117(15): 8424–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920593117>
43. Choi G.E., Han H.J. Glucocorticoid impairs mitochondrial quality control in neurons. *Neurobiology of Disease*. 2021; 152: 105301. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105301>
44. Herbert J., Goodyer I.M., Grossman A.B., Hastings M.H., de Kloet E.R., Lightman S.L., et al. Do corticosteroids damage the brain? *Journal of Neuroendocrinology*. 2006; 18: 393–411. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01429.x>
45. Castelli V., Benedetti E., Antonosante A., Catanesi M., Pitari G., Ippoliti R., et al. Neuronal cells rearrangement during aging and neurodegenerative disease: metabolism, oxidative stress and organelles dynamic. *Front. Mol. Neurosci*. 2019; 12: 132. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00132>
46. Viho E.M.G., Buurstede J.C., Mahfouz A., Koorneef L.L., Weert L.T.C.M., Houtman R., et al. Corticosteroid action in the brain: the potential of selective receptor. *Modulation Neuroendocrinology*. 2019; 109: 266–76. <https://doi.org/10.1159/000499659>
47. Bolshakov A.P., Tretyakova L.V., Kvichansky A.A., Gulyaeva N.V. Glucocorticoids in hippocampal neuroinflammation: Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Biokhimiya*. 2021; 86(2): 186–99. (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0006297921020048>
48. Aranda A., Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews*. 2001; 81(3): 1269–304. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1269>
49. Bao A.M., Fischer D.F., Wu Y.H., Hol E.M., Balesar R., Unmehopa U.A., et al. A direct androgenic involvement in the expression of human corticotropin-releasing hormone. *Mol. Psychiatry*. 2006; 11(6): 567–76. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001800>
50. Bianchi V.E., Rizzi L., Bresciani E., Omeljaniuk R.J., Torsello A. Androgen therapy in neurodegenerative diseases. *Journal of the Endocrine Society*. 2020; 4(11): 1–18. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvaa120>
51. Bereshchenko O., Bruscoli S., Riccardi C. Glucocorticoids, sex hormones, and immunity. *Front. Immunol*. 2018; 9: 1332. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01332>
52. Liu J.J., He X., Liu J., Shi J.S. Sexual steroids and their receptors affect microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Biomed J Sci & Tech Res*. 2020; 25(2): 18886–96. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2020.25.004160>
53. Singh B.K., Sinha R.A., Tripathi M., Mendoza A., Ohba K., Sy J.C., et al. Thyroid hormone receptor and ERR α coordinately regulate mitochondrial fission, mitophagy, biogenesis, and function. *Science signaling*. 2018; 11(536): eaam5855. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aam5855>
54. Dostert A., Heinzl T. Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Current Pharmaceutical Design*. 2004; 10: 2807–16. <https://doi.org/10.2174/1381612043383601>
55. Sapolsky R.M., Krey L.C., McEwen B.S. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocrine Reviews*. 1986; 7(3): 284–301. <https://doi.org/10.1210/edrv-7-3-284>
56. Acosta-Martinez M. Shaping microglial phenotypes through estrogen receptors: relevance to sex-specific neuroinflammatory responses to brain injury and disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2020; 375(1): 215–28. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.264598>
57. Gesing A., Lewinski A., Karbownik-Lewinska M. The thyroid gland and the process of aging; what is new? *Thyroid Research*. 2012; 5: 16. <http://www.thyroidresearchjournal.com/content/5/1/16>
58. Schimanski L.A., Barnes C.A. Neural protein synthesis during aging: effects on plasticity and memory. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2010; 2: 26.
59. Franceschi C., Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014; 69(S1): S4–9. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu057>
60. Wilkinson L., Verhoog N.J.D., Louw A. Disease- and treatment-associated acquired glucocorticoid resistance. *Endocrine Connections*. 2018; 7: R328–49. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0421>
61. Bauer M.E. Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress*. 2005; 8(1): 69–83. <https://doi.org/10.1080/10253890500100240>
62. Logie J.J., Ali S., Marshall K.M., Heck M.M.S., Walker B.R., Hadoke P.W.F. Glucocorticoid-mediated inhibition of angiogenic changes in human endothelial cells is not caused by reductions in cell proliferation or migration. *PLOS ONE*. 2010. 5(12): e14476. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014476>
63. Straub R.H., Cutolo M. Glucocorticoids and chronic inflammation. *Rheumatology*. 2016; 55: ii6–14. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew348>
64. Ayroldi E., Cannarile L., Adorisio S., Delfino D.V., Riccardi C. Role of endogenous glucocorticoids in cancer in the elderly. *Int. J. Mol. Sci*. 2018; 19: 3774. <https://doi.org/10.3390/ijms19123774>
65. Puspitasari Y.M., Ministrini S., Schwarz L., Karch C., Liberale L., Camici G.G. Modern concepts in cardiovascular disease: inflamm-aging. *front. Cell Dev. Biol*. 2022; 10: 882211. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.882211>
66. Arbo B.D., Schimith L.E., Santos M.G., Hort M.A. Repositioning and development of new treatments for neurodegenerative diseases: focus on neuroinflammation. *European Journal of Pharmacology*. 2022; 919: 174800. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174800>
67. Mahesh G., Kumar K.A., Reddanna P. Overview on the discovery and development of anti-inflammatory drugs: should the focus be on synthesis or degradation of PGE2? *Journal of Inflammation Research*. 2021; 14: 253–63. <https://doi.org/10.2147/JIR.S278514>
68. Schmid T., Brune B. Prostanoids and resolution of inflammation – beyond the lipid-mediator class switch. *Front. Immunol*. 2021; 12: 714042. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.714042>
69. Coluccia D., Wolf O.T., Kollias S., Roozendaal B., Forster A., Quervain D.J.F. Glucocorticoid therapy-induced memory deficits: acute versus chronic effects. *The Journal of Neuroscience*. 2008; 28(13): 3474–8. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4893-07.2008>

70. Canet G., Chevallier N., Zussy C., Desrumaux C., Givalois L. Central role of glucocorticoid receptors in Alzheimer's disease and depression. *Front. Neurosci.* 2018; 12: 739. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00739>
71. Nicola A.F., Meyer M., Guennoun R., Schumacher M., Hunt H., Belano J., et al. Insights into the therapeutic potential of glucocorticoid receptor modulators for neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21: 2137. <https://doi.org/10.3390/ijms21062137>
72. Perretti M., Leroy X., Bland E.J., Montero-Melendez T. Resolution pharmacology: opportunities for therapeutic innovation in inflammation. *Trends in pharmacological sciences.* 2015; 36(11): 737-55. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.07.007>
73. Crespo-Castrillo A., Arevalo M.A. Microglial and astrocytic function in physiological and pathological conditions: estrogenic modulation. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21: 3219. <https://doi.org/10.3390/ijms21093219>
74. Hernandez-Quiles M., Broekema M.F., Kalkhoven E. PPAR gamma in metabolism, immunity, and cancer: unified and diverse mechanisms of action. *Front. Endocrinol.* 2021; 12: 624112. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.624112>
75. Ponce J., Ulu A., Hanson C., Cameron-Smith E., Bertoni J., Wuebker J., et al. Role of specialized pro-resolving mediators in reducing neuroinflammation in neurodegenerative disorders. *Front. Aging Neurosci.* 2022; 14: 780811. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.780811>
76. Wójtowicz S., Strosznajder A.K., Mieszko J., Strosznajder J.B. The Novel role of PPAR alpha in the brain: promising target in therapy of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Neurochemical Research.* 2020; 45: 972–88. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-02993-5>
77. Saito K., Cui H. Emerging roles of estrogen-related receptors in the brain: potential interactions with estrogen signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19: 1091. <https://doi.org/10.3390/ijms19041091>
78. Uittenbogaard M., Chiaramello A. Mitochondrial biogenesis: a therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. *Curr Pharm Des.* 2014; 20(35): 55745593. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140305224906>
79. Kizak G., Willis C.M., Smith J.A., Pluchino S., Peruzzotti-Jametti L. Succinate Receptor 1: an emerging regulator of myeloid cell function in inflammation. *Trends Immunol.* 2021; 42(1): 45-58. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.11.004>
80. Trauelsen M., Hiron T.K., Lin D., Petersen J.E., Breton B., Husted A.S., et al. Extracellular succinate hyperpolarizes M2 macrophages through SUCNR1/GPR91-mediated Gq signaling. *Cell Reports.* 2021; 35: 109246. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109246>
81. Kirova Y.I., Shakova F.M., Voronina T.A. Ethylmethylhydroxypyridine succinate induces anti-inflammatory polarization of microglia in the brain of aging rat. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology.* 2021; 15(4): 356–64. <https://doi.org/10.1134/S1990747821060040>
82. Kirova Yu.I., Terekhina O.L., Shakova F.M. Morpho-functional features of astrocytes and microglia in the brain of ageing rat during the course of ethylmethylhydroxypyridine succinate treatment. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2022; 66(1): 4–16. (in Russian). <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2022.01.4-16>
83. Kirova Y.I., Shakova F.M., Germanova E.L., Romanova G.A., Voronina T.A. The effect of Mexidol on cerebral mitochondriogenesis at a young age and during aging. *Zhurnal nevrologii i psikhatrii im. S.S. Korsakova.* 2020; 120(1): 62-9. (in Russian). <https://doi.org/10.17116/jnevro202012001155>

Сведения об авторах:

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

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

© Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б., 2023

УДК 616-092

Пальцын А.А.^{1,2}, Свиридкина Н.Б.¹

Движение и мышление

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

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

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

123993, Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

Мозг – мышление управляет активностью мышц, всеми видами движений тела. Постоянный и достаточный объем двигательной и когнитивной (связанной и несвязанной с движением) активности – обязательное условие сохранения физического (двигательного) и когнитивного здоровья. Таким образом, для того, чтобы человек успешно двигался и разумно мыслил следует на протяжении всей жизни сочетать оба вида активности на высоком, но не разрушительном уровне, с обязательным учетом возрастных изменений когниции и моторики. Чем гармоничнее будет сочетание – тем успешнее по качеству и продолжительности жизни будет организм.

Ключевые слова: когниция; сознание; физические нагрузки; фитнес; глутамат; физкультура**Для цитирования:** Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б. Движение и мышление. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(1): 110-116.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.110-116

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, написание текста – Пальцын А.А.; сбор, обработка материала, редактирование – Свиридкина Н.Б.. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.**Для корреспонденции:** Пальцын Александр Александрович, e-mail: lrrp@mail.ru**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.07.2022

Принята к печати 26.01.2023

Опубликована 17.03.2023

Paltsyn A.A.^{1,2}, Sviridkina N.B.¹

Movement and thinking

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology,

Baltiyskaya St. 8, Moscow, 125315, Russian Federation;

²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education,

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

The brain, i.e., thinking, controls the muscle activity and all kinds of body movements. Constant and sufficient motor and cognitive (movement-related and -unrelated) activity is a prerequisite for maintaining physical (motor) and cognitive health. Thus, for a person, in order to move successfully and think rationally, both types of activity should be combined throughout life at a high, but not destructive level, with an obligatory consideration of age-related changes in cognition and motor skills. The more harmonious the combination is, the more successful the body will be in terms of the quality of life and life expectancy.

Keywords: cognition; consciousness; physical exercise; fitness; glutamate; physical fitness**For citation:** Paltsyn A.A., Sviridkina N.B. Movement and thinking. *Pathological physiology and experimental therapy. Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya.* 2023; 67(1): 110-116.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.110-116

Author's contribution: study concept and design, text writing – Paltsyn A.A.; material collection, editing – Sviridkina N.B. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.**For correspondence:** Aleksandr A. Paltsyn, e-mail @mail.ru**Financing.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare there is no conflict of interest.

Receiving 14.07.2022

Accepting 26.01.2023

Publishing 17.03.2023

Введение

Движение и мышление слова многозначные. Мы имеем в виду и обсуждаем лишь малую область этой обширной темы: активность мышц, её неровную регуляцию и некоторые двигательные и когнитивные результаты взаимодействия мышц и мозга.

О старении населения Земли сегодня знают все и знают, что оно будет продолжаться как следствие увеличения продолжительности жизни. Однако, в этой сфере не всё благополучно и медицинское вмешательство необходимо. Медицина должна уменьшить распространение и тяжесть болезней старости, сдвинуть их в более поздний возраст. Современное старение — это не только увеличение возраста и доли старых в структуре населения, но и возрастание среди старых процента когнитивно недостаточных и физически слабых. Сегодня обсуждаются и применяются несколько способов противодействия этой тенденции. Например, неинвазивной стимуляцией мозга: транскраниальной электрической стимуляцией (ТЭС) и транскраниальной магнитной стимуляцией (ТМС) [1].

Авторы обзора представили результаты литературного поиска, указывающие на принципиальную *возможность* исправления воздействиями ТЭС и ТМС ментальной и физической деградации -- нарушений речи.

Регулярные аэробные нагрузки, в среднем и пожилом возрасте, могут обеспечить защиту мозга от возрастного когнитивного снижения, профилактику и лечение гипертонической болезни [2]. Авторы подчеркивают необходимость индивидуализации программ физических нагрузок. Их продолжительность и интенсивность не должны превышать возможности индивида-пациента, но в этой рамке должны быть близки к максимуму.

Китайско-американский коллектив опубликовал результаты метаанализа 17 исследований с 9949 участниками [3] показавшего, что малая скорость ходьбы в значительной степени связана с повышенным риском снижения когнитивных функций и развитием деменции у пожилых людей.

Определив влияние скорости ходьбы на когнитивные функции, тот же коллектив занялся анализом литературы по связи походки с развитием инсульта [4]. Рассмотрены 2229 случаев инсульта. Сделан вывод, что вероятность инсульта обратно пропорциональна скорости ходьбы.

Быстрая походка — 5,6 км/час снижает риск инсульта на 44%, а на каждый 1 км/ч увеличения скорости ходьбы риск инсульта понижается на 13%.

Когнитивные нарушения при медленной ходьбе сочетались с сокращением объема гиппокампа в правом полушарии [5]. Для снижения риска возрастных когнитивных изменений, «сдвигания» их в более поздний возраст Rosso с соавторами предложили усложненный стиль походки: рекомендована быстрая ходьба и/или ходьба с двойной задачей, иными словами, усиление когнитивной составляющей ходьбы [6]. Ускоренная походка и ходьба с двойной задачей замедляли развитие возрастной когнитивной недостаточности. Быстрая ходьба и ходьба с двумя задачами могут явиться простыми и эффективными способами предотвращения или, по крайней мере, хронологической задержки снижения когнитивных функций у пожилых людей.

Анализом 2229 случаев инсульта со средним возрастом больных 63.6 года, средним сроком постинсультного наблюдения 8 лет, определили группы медленно ходящих — 1.6 км/час и быстро ходящих — 5.6 км/час. У последних риск инсульта был на 44% ниже. Констатировали по сути прямую связь вероятности инсульта со скоростью ходьбы, а также снижение заболеваемости на 13% с увеличением скорости ходьбы на 1 км/час [4].

Характерные для саркопении трудности движения часто сочетаются с когнитивными ограничениями. В исследовании [7] было 1175 участников, со средним возрастом 80.9 года, 77% женщин. Нередко саркопения сочеталась с болезнью Альцгеймера или умеренной когнитивной недостаточностью. Мышечная недостаточность проявлялась, в основном, утратой силы (кисти), а не массы мышц. Срок наблюдения 5,6 года. Более выраженная саркопения на старте наблюдения часто сочеталась с последующим развитием болезни Альцгеймера и ускорением когнитивной деградации. Авторы заключают, что мышечная функция (точнее, её недостаточность), а не мышечная масса предрасполагает к развитию болезни Альцгеймера, умеренным когнитивным нарушениям и снижению физической силы.

Литература о связи движение-когниция огромна. Ради популярности ссылаемся на публикацию широко известного учреждения — клиники Майо [8]. Определяли могут ли физические нагрузки препятствовать развитию деменции у пожилых (>70 лет, в среднем 81 год) людей с умеренными когнитивными нарушениями в начале исследования (280 участников исследования, 165 мужчин, средний срок наблюдений — 3 года). Проведен регрессионный анализ результатов исследования с поправкой на пол, образование, сопутствующие заболевания, депрессию. В исследованном контингенте физические нагрузки умеренной интенсивности в среднем возрасте существенно уменьша-

ли (устраняли, сдвигали в поздний возраст) риск деменции. Нагрузки средней интенсивности в позднем возрасте также подавляли проявления деменции. Резюме: физическая активность в старости задерживает проявления умеренной когнитивной недостаточности.

Авторы бразильско-австралийского исследования с 2040 участниками доложили, что среди двигательных людей деменция (умеренные когнитивные нарушения) развивалась в 9 раз реже в сравнении с пассивными [9]. Метаанализ таких клинических результатов был осуществлен Chuui Ma с сотрудниками [10]. В 13 рандомизированных клинических исследованиях с 514 участниками они нашли, что физические нагрузки благоприятно изменяют концентрации BDNF, других факторов роста, цитокинов. Концентрации стимуляторов и нейропротекторов — увеличиваются, блокаторов и проинфламаторных веществ — снижаются. Такими событиями авторы объясняют молекулярный механизм когнитивных улучшений достигаемых физическими нагрузками. Исследования показывают эффективность этого механизма. Так даже при умеренной физической активности снижается риск всех видов деменции. У людей 80 лет и старше с умеренной или интенсивной двигательной нагрузкой снижался риск развития всех видов деменции равно или даже значительно, чем в выборках более молодых (50-69 лет), но физически пассивных лиц [11]. Аэробные нагрузки сохраняют и даже увеличивают размер гиппокампа, снижающийся у физически пассивных сверстников, повышают содержание BDNF в сыворотке и улучшают пространственную память [12]. Сила сжатия кисти — многократно проверенный, простой и широко используемый, интегральный показатель общего состояния здоровья, который теперь многими и резонно воспринимается как индекс риска психических заболеваний и нейродегенерации у пожилых людей [13].

В статье Rongtao Jiang и соавт. [13] сообщается об исследовании более 40 000 участников контингента британского биобанка. Изучалась связь силы кисти с показателями здоровья. Обнаружили, что большая сила кисти рук была связана с лучшим когнитивным статусом, высокой удовлетворенностью жизнью, субъективным благополучием, отсутствием симптомов депрессии и тревоги. При контроле многих демографических, антропометрических и социально-экономических факторов, здоровье и даже финансовая удовлетворенность были прямо связаны с силой кисти. Например, исследования в популяционном масштабе выявили устойчивую связь между максимальной силой кисти и выполнением когнитивных задач по вербальному мышлению, времени реакции и рабочей па-

мяти как у населения в целом, так и у людей с шизофренией, биполярным расстройством или депрессией. Вполне разумным представляется использование силы кисти для диагностики и контроля терапевтических эффектов. Результаты биобанка выявили выраженную прямую связь между большей силой кисти и увеличением объема серого вещества, особенно в подкорковых областях и височной коре. В целом, используя для убедительности крупнейший доступный в настоящее время набор данных (более 40000) можно и нужно в качестве эффективного способа сохранения здоровья и эмоционального комфорта на протяжении всей жизни развивать и поддерживать силу мышц предплечья.

Люди с ментальными болезнями часто бывают физически слабее представителей генеральной популяции и характеризуются укороченной сравнительно с последними продолжительностью жизни. Причем, укорочение не вследствие ментальной болезни, а от других причин, например, сердечно-сосудистой патологии. Частой причиной такого положения является малоподвижный образ жизни, постоянное физическое «нездоровье», неизбежное при таком образе жизни, уже вследствие малой концентрации миокинов в крови.

Международный коллектив (14 авторов из 5 стран) исследовал связь силы мышц кисти с деменцией и обусловленной деменцией смертностью [14]. Масштаб исследования уникальный — 466 830 участников со средним периодом наблюдений за каждым — 9 лет. Анализировали 4087 случаев деменции и 1309 смертей. «Малая сила хвата» оказалась статистически значимо связанной с высоким риском развития деменции и смертности от неё ($p < 0.001$). Деменция и смертность существенно не зависели от множества других факторов, умоглядно могущих повлиять на заболеваемость и смертность. У людей со слабыми кистями повышались частота развития сердечно-сосудистых, респираторных болезней, рака и общей смертности. «Слабый хват» воплотился в весомый предиктор развития болезни Альцгеймера. Авторы определили, что снижение силы кисти на 5 кг повышает на 14% риск развития деменции от любых причин и на 17% риск смерти от деменции.

Перейдем от медицинского значения «хвата» к здравоохранительной роли физических нагрузок вообще. Есть серьезные основания признать, что многовековая мечта всех народов о панацее в большой степени не мечта, а отражение объективной реальности — существования и широкой известности способа профилактики и лечения, если не «всех болезней», то большинства. Эта панацея называется движением, физическими нагрузками. В. Pedersen и В. Saltin в сво-

ей статье-монографии [15] показали, что миокины, выделяемые в кровь работающими мышцами – химический посредник благотворного действия физических нагрузок на структуру и функцию без преувеличения всех органов и систем организма, важнейший профилактический и лечебный фактор большинства современных «незаразных» пандемий. Наиболее популярный миокин – нейротрофический фактор мозга – BDNF. Он, хотя и фактор мозга, всё же истинный миокин, поскольку [16]. Matthews с сотрудниками [17]. выяснили, что у местного, мышцами созданного BDNF, есть и местная, мышечная задача – регенерация и дифференцировка миобластов [18].

Гораздо длиннее известный сегодня список местных функций, выполняемых тем BDNF, который синтезируется при физических нагрузках в мозге. Роль и значение BDNF обусловлены его связью с серотонинэргической системой мозга и, следовательно, участием в регуляции многих состояний и форм поведения: гомеостаза глюкозы и липидного метаболизма, сна и бодрствования, настроения, способности к физическим нагрузкам, агрессивности, сексуальности, стресс устойчивости, нейроэндокринной регуляции, склонности-устойчивости к депрессии и суициду. BDNF оказывает выраженное стимулирующее влияние на нейропластичность и нейрогенез. Наиболее высокие концентрации BDNF находят в неокортексе, гиппокампе, мозжечке, миндалине [19].

Интересны результаты шведско-американского коллектива ученых, сравнившего содержание BDNF в сыворотке здоровых 70-летних людей (58% женщин) после 35-минутной физической или когнитивной нагрузки. Все занятия повышали содержание BDNF, но двигательная нагрузка значительно больше других [20].

Задачи, созданной мышечной работой BDNF, в мозге многочисленны. Например, он играет ключевую роль в обучении и памяти. В рандомизированном исследовании [21] пожилых людей (средний возраст 67,6 года) обнаружено, что аэробные нагрузки в течение года увеличили объем гиппокампа на 2%. Тогда как без нагрузок он уменьшается за это время на 1-2%. У тренирующихся повышалось содержание BDNF в сыворотке, улучшалась память. Результаты этой работы снискали большую популярность (785 цитирований к 11.08.19) и развитие, в котором нам кажется интересной статья из Магдебурга [22]. Авторы сравнили нейропластические эффекты двух видов физической активности (спорт и танцы) одинаковых по продолжительности сеанса у людей в возрасте 63-80 лет. Срок тренинга – 18 месяцев. В обеих группах отмечено улучшение внимания и вербальной памяти.

Однако, у танцоров было выше содержание BDNF в плазме, объем прецентральной извилины и парагиппокампальной извилины. В спортивной группе изменения этих объемов либо отсутствовали, либо не были статистически значимыми. Авторы объясняют результат тем, что у танцоров физическая нагрузка совмещалась с когнитивной. На наш взгляд, эмоциональность музыки и психологической поддержки занятия мощно усиливали когнитивную составляющую танца. В танцевальном исследовании греческих авторов [23] 130 человек старше 60 лет (средний возраст 67) танцевали в течение 32 недель 2 раза в неделю по 75 мин. Перед началом и после окончания исследования участники прошли испытания во многих двигательных тестах и показали существенное улучшение силы, гибкости, ловкости, баланса. И, что очень важно, у пожилых людей улучшалось самочувствие, повышались самостоятельность, самооценка.

Физические нагрузки (кардиореспираторный фитнес от умеренной до высокой интенсивности) у мужчин и женщин снижают уровень смертности от сердечно-сосудистых заболеваний независимо от возраста, телосложения, курения и других риск-факторов. В том числе нагрузки снижают наряду с ограничением питания [24] риск смерти, обусловленный ожирением. Для совершенствования терапии данные фитнеса должны включаться в традиционные показатели клинических исследований наряду с артериальным давлением и химией крови [25].

Duck-chul Lee и соавт. [26] считают данные кардиореспираторного фитнеса наиболее точными показателями развития болезни и вероятно риска смерти по сравнению с другими (традиционными) риск-факторами (гипертонической болезнью, диабетом, курением, тучностью). Фитнес повышает инсулин-чувствительность, нормализует липидный профиль крови, улучшает телосложение, ослабляет интенсивность воспаления, снижает артериальное давление.

Органичность связи движения с мышлением проявляется в частом использовании людьми жестов для того, чтобы усилить впечатление, подчеркнуть, «иллюстрировать» важные по мнению рассказчика особенности сюжета [25]. Нервная система управляет работой мышц, обеспечивает их связь с головным и спинным мозгом. Короткие веретеновидные клетки гладких мышц образуют пластины. Сокращаются они медленно и ритмично, подчиняясь сигналам вегетативной нервной системы. Медленные и длительные их сокращения происходят произвольно, без непосредственной зависимости от сознания и желания человека. Мышечное волокно поперечно-полосатых мышц представ-

ляет собой многоядерную клетку. Мышечное сокращение — реакция мышечных клеток на воздействие нейромедиатора ацетилхолина — биологически активного химического вещества, посредством которого осуществляется передача электрохимического импульса от нервной клетки.

Глутаминовая кислота (глутамат) — главный возбуждающий нейромедиатор в нервной системе позвоночных и посредник в интересующей нас связи: мышление—движение [27]. Глутамат является наиболее распространенной аминокислотой в мозге участвует в нескольких метаболических путях. При избыточном возбуждении клетки могут гибнуть в процессе, который сейчас называют «эксайтотоксичностью». Такое действие обусловлено наличием глутаматных рецепторов на поверхности клеток головного мозга. Мощные системы поглощения (переносчиков глутамата) предотвращают чрезмерную активацию этих рецепторов, непрерывно удаляя глутамат из внеклеточной жидкости головного мозга. Кроме того, гематоэнцефалический барьер защищает мозг от глутамата крови. Самые высокие концентрации глутамата обнаруживаются в синаптических везикулах нервных окончаний, откуда он может высвободиться путем экзоцитоза. Фактически, глутамат является основным возбуждающим нейротрансмиттером в центральной нервной системе млекопитающих. Однако потребовалось много времени, чтобы понять это. За пределами сообщества ученых-биомедиков глутамат, наиболее известный как «глутамат натрия» — представляет собой натриевую соль глутаминовой кислоты: белое кристаллическое вещество, используемое в качестве усилителя вкуса или/и аромата в пищевых продуктах. В этой роли он особенно популярен в Китае. Сегодня нередко он маскирует присутствие некачественных компонентов пищи. Конечно, не аромат является причиной огромного научного интереса к глутамату. Причина в том, что глутамат — главный возбуждающий трансммиттер в мозге. Глутамат-рецептор экспрессируется на мембране нейронов и возбуждается фактором (глутаматом) внеклеточной жидкости. Поскольку во внеклеточном пространстве нет ферментов, способных расщеплять глутамат, низкие внеклеточные концентрации требуют поглощения клетками. Это поглощение катализируется семейством транспортных белков, расположенных на клеточной поверхности как астроцитов, так и нейронов. Глутамат является основным медиатором возбуждающих сигналов, пластичности нервной системы, включая элиминацию клеток. Он должен присутствовать в нужных концентрациях в нужных местах в нужное время и удаляться со скоростью, избав-

ляющей от перенасыщения. Из этого следует, что концентрация регулируется очень тонко и клетки должны иметь адекватную чувствительность к глутамату. Точнее, к нормальным концентрациям глутамата в мозге. Избыточная активация рецепторов глутамата, подобно повышению его концентрации, может губить нейроны — процесс, называемый эксайтотоксичностью [28].

Одна из главных проблем современной медицины — продление срока когнитивного и физического благополучия. Для развития теории и практического совершенствования связи движение-мышление важно определить оптимальное сочетание физических и когнитивных нагрузок. Прежде всего, для пожилых людей как группы риска. F. Gheysen и соавт. [29] провели анализ 41 публикации по данной теме, рассматривая влияние обособленных или сочетанных когнитивных и физических упражнений. Физические нагрузки улучшали когнитивные показатели пожилых людей, но слабее, чем при сочетании физических нагрузок с когнитивными. Когнитивные показатели при последовательном добавлении к когнитивным нагрузкам физических тренировок существенно не менялись. При синхронном проведении когнитивных и физических тренировок когнитивные показатели достоверно улучшались. Умеренные когнитивные нарушения у человека до старта тренировок не отменяли положительного действия когнитивных тренировок [30]. Врачи клиники Mayo исследовали 2060 когнитивно нормальных мужчин и женщин в возрасте ≥ 70 лет. Физическая активность с 50 лет до поступления в клинику определялась опросом. Физические нагрузки малой интенсивности до поступления в клинику обеспечивали лучшее сохранение памяти, сравнительно с физически пассивным поведением до клиники ($p=0.004$). Большая физическая активность в прошлом сочеталась со свободной, грамотной речью, заметной общей культурой, лучшим сохранением внимания.

Современные рекомендации [31] по продлению возраста физически и когнитивно благополучной старости предлагают в качестве программы-минимум 150 минут аэробной нагрузки умеренной интенсивности в неделю (по 30 мин 5 дней) или 60 минут еженедельных нагрузок высокой интенсивности (по 20 мин 3 дня). Как способ не только сохранения, но даже улучшения когнитивных/исполнительных функций авторы предлагают комплекс силовых (resistance) упражнений для верхних и нижних конечностей. С усилием 60–80% от личного максимума, частотой нагрузок 2 дня в неделю с максимально возможным для исполнителя числом повторений. Авторы подчеркивают, что для неподготовленных и слабых все указанные величины должны разумно снижаться.

Следует иметь в виду, что создание рекомендаций по образу жизни должно учитывать и быстрое сегодня изменение внешней среды влияющее даже на молодые, легче приспособляющиеся к изменениям (пластичные) организмы [32].

В заключение о высших возможностях и достижениях человека и человечества в синтезе движения и мышления. Высший результат соединения движения и мышления -- это музыка. Формально и в точном значении слова, она создается движением, но адресована мышлению и воспринимается им. Например – фортепиано. Невыразимые словами красота, изящество, оригинальность мысли, чувств в произведениях Рахманинова, Чайковского, Шопена, Моцарта, Листа создаются, как представляется слушателю, «невозможными» по скорости, точности, разнообразности, чувственности, трепетности движений пальцев исполнителя. Изобретением музыки и инструментов человек компенсировал недостаточную, как он понял после изобретения музыки, выразительность речи. Стал выражать то, что словами выразить нельзя. Роскошно обогатил то, что мы называем душой, – мир своих чувств, настроений, желаний возможностью сообщать это другим людям.

Литература

(п.п. 2–15; 17–23; 25–31 см. References)

1. Попыванова А.В., Корякина М.А., Помелова Е.Д., Илюкина Н.А., Агранович О.Е., Шестакова А.Н., Благовещенский Е.Д. Возможность повышения эффективности коррекции двигательных навыков и когнитивных функций с помощью неинвазивной стимуляции мозга. *Журнал ВНД*. 2022; 72(5): 3–42.
16. Пальцын А.А. Миокины. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2020; 64(1): 135–41. DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.135-141
24. Фефелова Ю.А., Мурашев Б.Ю. Влияние ограничения калорийности питания на процессы старения и развитие нейродегенеративных заболеваний. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(3): 166–76.
32. Панкова Н.Б. Повышение величины систолического артериального давления у подростков за период с 2004 по 2020 годы при регистрации в учебное время. *Патогенез*. 2022; 20(2): 45–54.

References

1. Popyanova A.V., Koryakina M.A., Pomelova E.D., Ilyukina N.A., Agranovich O.E., Shestakova A.N., et al. The possibility of improving the effectiveness of correction of motor skills and cognitive functions using non-invasive brain stimulation. *Zhurnal VND*. 2022; 72(5): 623–42.
2. Peila R., White L.R., Masaki K., Petrovitch H., Launer L.J. Reducing the risk of dementia: efficacy of long-term treatment of hypertension. *Stroke*. 2006; 37(5): 1165–70.
3. Minghui Quan, Pengcheng Xun, Cheng Chen, Ju Wen, Yiyu Wang et al. Walking pace and the risk of cognitive decline and dementia in

- elderly populations: a meta-analysis of prospective cohort studies. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2017; 72(2): 266–70.
4. Minghui Quan, Pengcheng Xun, Ru Wang, Ka He, Peijie Chen. Walking pace and the risk of stroke: a meta-analysis of prospective cohort studies. *J Sport Health Sci*. 2020; 9(6): 521–9.
5. Rosso A.L., Verghese J., Metti A.L., Boudreau R.M., Aizenstein H.J., Kritchevsky S., et al. Slowing gait and risk for cognitive impairment: The hippocampus as a shared neural substrate. *Neurology*. 2017; 89: 336–42.
6. Andrea L. Rosso, Andrea L. Metti, Kimberly Faulkner, Mark Redfern, Kristine Yaffe, Lenore Launer, et al. Complex walking tasks and risk for cognitive decline in high functioning older adults. *J Alzheimers Dis*. 2019; 71(s1): S65–S73.
7. Michal S. Beeri, Sue E. Leurgans, Osvaldo Delbono, David A. Bennett, Aron S. Buchman. Sarcopenia is associated with incident Alzheimer's dementia, mild cognitive impairment, and cognitive decline. *J Am Geriatr Soc*. 2021; 69(7): 1826–35.
8. Janina Krell-Roesch, Nathanael T. Feder, Rosebud O. Roberts, Michelle M. Mielke, Teresa J. Christianson et al. Leisure-time physical activity and the risk of incident dementia: the mayo clinic study of aging. *J Alzheimers Dis*. 2018; 63(1): 149–55.
9. Natan Feter, Samuel C Dumith, Emily C Smith, Larissa L da Cunha, Júlia Cassuriaga, Jayne S Leite et al. Physical activity attenuates the risk for dementia associated with aging in older adults with mild cognitive impairment. Findings from a population-based cohort study. *J Psychiatr Res*. 2021; Sep;141:1-8.
10. Chuyi Ma ,Miaoran Lin , Jiahui Gao , Shurui Xu , Li Huang , Jingfang Zhu et al. The impact of physical activity on blood inflammatory cytokines and neuroprotective factors in individuals with mild cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis of randomized-controlled trials. *Aging Clin Exp Res*. 2022; Jul;34(7):1471-1484.
11. Feter N., Dumith S.C., Smith E.C., da Cunha L.L., Cassuriaga J., Leite J.S., et al. Physical activity attenuates the risk for dementia associated with aging in older adults with mild cognitive impairment. Findings from a population-based cohort study. *J. Psychiatr. Res*. 2021; 141: 1–8.
12. Erickson K.I., Voss M.W., Prakash R.S., Basak C., Szabo A., Chaddock L., et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; 108: 3017–22.
13. Rongtao Jiang, Margaret L. Westwater, Stephanie Noble, Matthew Rosenblatt, Wei Dai, Shile Qi et al. Associations between grip strength, brain structure, and mental health in > 40,000 participants from the UK Biobank. *BMC Med*. 2022; 20: 286.
14. Irene Esteban Cornejo, Frederick K. Ho, Fanny Petermann Rocha, Donald M. Lyall, David Martinez Gomez, Verónica Cabanas Sánchez et al. Handgrip strength and all-cause dementia incidence and mortality: findings from the UK Biobank prospective cohort study. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2022; 13(3): 1514–25.
15. Pedersen B.K., Saltin B. Exercise's medicine – evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports*. 2015; 25 Suppl. 3: 1–72.
16. Paltsyn A.A. Myokines. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2020; 64(1): 135–41. DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.135-141
17. Matthews V.B., Astrom M.B., Chan M.H., Bruce C.R., Krabbe K.S., Prelovsek O. et al. Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia*. 2009; 52 1409–14183522.

18. Clow C., Jasmin B.J. Brain-derived neurotrophic factor regulates satellite cell differentiation and skeletal muscle regeneration. *Mol. Biol. Cell.* 2010; 21: 2182–90.
19. Benarroch E.E. Brain-derived neurotrophic factor: Regulation, effects, and potential clinical relevance. *Neurology.* 2015; 84: 1693–704.
20. Hakansson K., Ledreux A., Daffner K., Terjestam Y., Bergman P., Carlsson R., et al. BDNF Responses in healthy older persons to 35 minutes of physical exercise, cognitive training, and mindfulness: associations with working memory function. *J Alzheimers Dis.* 2017; 55(2): 645–65.
21. Erickson K.I., Voss M.W., Prakash R.S., Basak C., Szabo A., Chaddock L., et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108; **3017–227**.
22. Müller P., Rehfeld K., Schmicker M., Hökelmann A., Dordevic M., Lessmann V., et al. Evolution of neuroplasticity in response to physical activity in old age: the case for dancing. *Front Aging Neurosci.* 2017; Mar14; 9: 56.
23. Douka S., Zilidou V.I., Lilou O., Manou V. Traditional dance improves the physical fitness and well-being of the elderly. *Front Aging Neurosci.* 2019; Apr5; 11:75.
24. Fefelova Yu.A., Murashev B.Yu. The effect of calorie restriction on the aging process and the development of neurodegenerative diseases. *Patologicheskaya fiziologiya I eksperimentalnaya terapiya.* 2022; 66(3): 166–76.
25. Duck-chul Lee, Enrique G Artero, Xuemei Sui and Steven N Blair. Mortality trends in the general population: the importance of cardiorespiratory fitness. *J Psychopharmacol.* 2010 Nov; 24(4 suppl.): 27–35.
26. Autumn B. Hostetter & Martha W. Alibali. Gesture as simulated action: Revisiting the framework. *Psychonomic Bulletin & Review.* 2019; vol. 26: 721–52.
27. Zhou Y., Danbolt N.C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm (Vienna).* 2014; 121(8): 799–817.
28. Hertz L. The glutamate-glutamine (GABA) cycle: importance of late postnatal development and potential reciprocal interactions between biosynthesis and degradation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013; 4: 59.
29. Freja Gheysen, Louise Poppe, Ann De Smet, Stephan Swinnen, Greet Cardon, Ilse De Bourdeaudhuij, et al. Physical activity to improve cognition in older adults: can physical activity programs enriched with cognitive challenges enhance the effects? A systematic review and meta-analysis. *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2018; 15: 63.
30. Janina Krell-Roesch, Jeremy A. Syrjanen, Jelena Bezold, Sandra Trautwein, Bettina Barisch-Fritz, Klaus Boes, et al. Physical activity and trajectory of cognitive change in older persons: mayo clinic study of aging. *J. Alzheimers Dis.* 2021; 79(1): 377–88.
31. Neva J. Kirk-Sanchez1, Ellen L. McGough. Physical exercise and cognitive performance in the elderly: current perspectives. *Clin Interv Aging.* 2014; 9: 51–62.
32. Pankova N.B. Increase in systolic blood pressure in adolescents for the period from 2004 to 2020 when registering during school hours. *Pathogenez.* 2022; 20(2): 45–54.

Сведения об авторах:

Пальцын Александр Александрович, доктор биол. наук, проф., лауреат Государственной премии СССР, гл. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП; проф. каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО;
Свиридкина Надежда Борисовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП.

© Евдокимова Н.В., Черненко Т.В., 2023

УДК 616-092

Евдокимова Н.В., Черненко Т.В.

Умеренные бактериофаги – тайное оружие бактерий или их ахиллесова пята?

ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» ДЗ г. Москвы,
129090, Москва, Россия, Большая Сухаревская площадь, д. 3

В последние десятилетия наблюдается возрождение активного интереса к фаговой терапии, связанный во многом с ограниченными возможностями антибиотикотерапии, а также с появлением данных о иммуномодулирующем действии фагов при их непосредственном взаимодействии с клетками иммунной системы человека. Изучение микробиома кишечника показало невероятное видовое богатство умеренных бактериофагов и их важную роль в регулировании численности и метаболической активности микробиомов человека. Особый интерес вызывает применение управляемой индукции (активации) профагов для лечения воспалительных заболеваний, вызванных бактериями. В настоящее время научная база для внедрения этого подхода в лечебную практику разработана слабо. Остаются опасения относительно неконтролируемого переноса генов патогенности и антибиотикорезистентности. Однако перспективы использования регуляторных возможностей умеренных бактериофагов для лечения хронических воспалительных заболеваний или дисбиотических нарушений в организме человека представляются реальными уже сейчас, особенно с учетом возможностей молекулярно-генетического модифицирования умеренных фагов.

Ключевые слова: умеренные бактериофаги; активация профагов; генно-модифицированные фаги; регуляция микробиомов; лечение воспалительных заболеваний; дисбиотические нарушения

Для цитирования: Евдокимова Н.В., Черненко Т.В. Умеренные бактериофаги – тайное оружие бактерий или их ахиллесова пята? *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(1): 117-123.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.117-123

Участие авторов: Евдокимова Н.В. – концепция, участие в организации процесса, написание текста статьи; Черненко Т.В. – корректура и редактирование. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: *Евдокимова Наталья Витальевна*, e-mail: env1111@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.06.2022

Принята к печати 26.01.2023

Опубликована 17.03.2023

Yevdokimova N.V., Chernenkaya T.V.

Moderate bacteriophages: the secret weapon of bacteria or their Achilles heel?

Sklifosovsky Research institute of Emergency Medicine,
3 Bolshaya Sukharevskaya Square, Moscow, 129090, Russian Federation

In recent decades, active interest in phage therapy has revived, largely due to the limited possibilities of antibiotic therapy, as well as due to the emergence of data on the immunomodulatory effect of phages resulting from their direct interaction with human immune cells. Studying the intestinal microbiome has shown an incredible species richness of moderate bacteriophages and their important role in regulating the abundance and metabolic activity of human microbiomes. Of particular interest is the use of controlled induction (activation) of profages for the treatment of inflammatory diseases caused by bacteria. Currently, the scientific basis for implementing this approach into medical practice is poorly developed, and concerns remain about uncontrolled transfer of pathogenicity and antibiotic resistance genes. However, the prospects of using the regulatory capabilities of moderate bacteriophages for the treatment of chronic inflammatory diseases or dysbiotic disorders in the human body seem real, especially taking into account the possibilities of molecular genetic modification of moderate phages.

Keywords: moderate bacteriophages, activation of profages, genetically modified phages, regulation of microbiomes, treatment of inflammatory diseases or dysbiotic disorders

For citation: Yevdokimova N.V., Chernenkaya T.V. Moderate bacteriophages – the secret weapon of bacteria or their Achilles heel? *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(1): 117-123. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.117-123

Author's contribution: Yevdokimova N.V. – participation in the organization of the process, writing the text; Chernenkaya T.V. – correction and editing the text of the article approval. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors

For correspondence: *Natalya V. Yevdokimova*, Senior Researcher at the Laboratory of Clinical Microbiology, PhD, Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Public Healthcare Institution of Moscow Healthcare Department, 3 Bolshaya Sukharevskaya Square, Moscow 129090, Russian Federation, e-mail env1111@yandex.ru

Information about the authors:

Yevdokimova N.V., <https://orcid.org/0000-0001-7473-8727>

Chrenenkaya T.V., <https://orcid.org/0000-0002-6167-7117>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 16.06.2022

Accepted 26.01.2023

Published 17.03.2023

Введение

В настоящее время значительная часть медицинского сообщества продолжает скептически относиться к возможностям фаготерапии для лечения тяжелых бактериальных инфекций. Первоначальные вполне успешные попытки использования вирулентных бактериофагов для лечения ряда инфекционных заболеваний в первой четверти 20 века не нашли в дальнейшем своего активного продолжения, поскольку на историческую авансцену вышли антибиотики. О лечебном потенциале вирулентных бактериофагов вспомнили, когда стало очевидно, что всеисильность антибиотиков была несколько переоценена, поскольку рост числа резистентных штаммов бактерий начал опережать число вводимых в практику антибактериальных препаратов. Фаги распространены в природе повсеместно, их выделение и адаптация требует гораздо меньше времени и финансовых затрат, чем разработка и внедрение новых антибиотиков. В России, ряде стран Европы и в США вирулентные бактериофаги (монопрепараты и коктейли) включены в медицинские протоколы лечения некоторых видов воспалительной патологии и успешно применяются на практике. Умеренные бактериофаги, однако, так и остались в тени своих вирулентных собратьев. Много десятилетий они являются излюбленной моделью молекулярно-генетических исследований, но об их экологической роли в природных микробных сообществах, включая организм человека, до сих пор известно немного. Изучение микробиома кишечника человека показало, что невидимый мир умеренных бактериофагов невероятно богат по своему видовому разнообразию и динамичен по отклику на изменчивую окружающую среду. Нам кажется, что настало время более детального рассмотрения

вклада умеренных бактериофагов в эволюцию микробных популяций, в регуляцию численности микробных популяций, а также оценки перспектив практического использования знаний о биологии умеренных бактериофагов для лечения разных видов воспалительной патологии бактериальной природы.

Что такое умеренные бактериофаги. Для начала следует обозначить основные моменты, о которых уже можно говорить как об установленных и общепринятых. Что такое бактериофаги? Самый простой ответ – это вирусы бактерий, а потому инфицирование ими клеток бактерий приводит к синтезу новых вирусных частиц, которые затем разрушают клеточную стенку, что приводит к лизису клеток бактерий и их гибели. Так в простейшем виде выглядит литический цикл, который был впервые изучен у хвостатых бактериофагов порядка Caudovirales [1]. Фаги бывают вирулентными и умеренными. Вирулентными называют бактериофаги, способные развиваться исключительно в литическом цикле. Иногда вирулентные фаги называют литическими, но это название нельзя считать удачным, поскольку литический цикл есть и у умеренных бактериофагов. Если же фаговая частица способна перейти в состояние профага, при котором ДНК фага встраивается в геном бактериальной клетки (чаще всего в бактериальную хромосому) и не экспрессируется сразу (за счет синтеза белков-репрессоров, кодируемых самим фагом), а затем на протяжении ряда циклов реплицируется вместе с геномом клетки бактерий, то такой вариант развития событий называется лизогенией, а фаг, способный сочетать литический и лизогенный цикл развития – умеренным. Путем индукции (активации) происходит переход умеренного фага от лизогенно-

го к литическому циклу — синтезу вирусных частиц и гибели клеток бактерий. Как показывают результаты исследований генома микробной клетки, не менее половины штаммов бактерий содержат умеренные бактериофаги [2, 3], и у представителей микрофлоры человека, согласно современным данным, профаговые «вставки» также обнаруживаются по крайней мере у 40–50 % изученных видов бактерий [3–5]. Как показали исследования бактериофагов бактерий, обитающих в природных местообитаниях, большинство вирулентных фагов, которые ранее считались таковыми, оказались не вполне «настоящими» — они представляют собой индуцированную форму умеренных бактериофагов [1]. Какие факторы способствуют переключению с литического пути на лизогенный в тех или иных обстоятельствах пока изучено недостаточно, но чрезвычайно важная экологическая роль умеренных бактериофагов в регулировании численности популяций бактерий в природных местообитаниях в настоящее время признается большинством исследователей [1–6]. Умеренные фаги участвуют в эволюции микробных популяций, ускоряя горизонтальный (в ходе трансдукции) и вертикальный перенос генов, способствуя выживанию популяции в меняющихся условиях окружающей среды [7, 8]. Совместное «сосуществование» умеренного фага в виде профага и клеток бактерий (хозяина) можно рассматривать на определенном этапе жизненного цикла как вариант кооперации, когда каждый участник союза получает несомненную выгоду. Умеренный фаг преумножает число своих копий в ходе репликации хозяйской ДНК, почти ничего (в энергетическом смысле) не вкладывая в этот процесс, а клетки бактерий приобретают ряд полезных с точки зрения выживаемости черт. Часть генов профага на определенном этапе жизненного цикла проявляют активность и экспрессируются в бактериальной клетке, что приводит к изменению ее физиологических и биохимических свойств (синтез новых ферментов, токсинов, капсульных белков, генов антибиотикорезистентности и т.д.). Такая модификация получила название «лизогенной конверсии». Иными словами, присутствие умеренного фага в бактериальной клетке нередко является не только способом выживания бактериофага в неблагоприятных условиях, но и вариантом взаимовыгодного сотрудничества, при котором бактериальная клетка тоже повышает свои шансы выживать и размножаться, в том числе, и в организме человека [1–3].

Необходимо отметить высокую вариабельность профаговых «вставок» в клетках разных видов бактерий, как в количественном, так и в качественном отношении. По самым скромным прикидкам их число

может колебаться в диапазоне от единиц до нескольких десятков и даже более [9]. Какие же факторы увеличивают вероятность обнаружения полноценно функционирующего профага, способного к индукции и образованию новых частиц фага в геноме бактериальной клетки? На данный момент показано, что среди структурных ограничений можно говорить о размере бактериального генома — он не должен быть слишком маленьким, поскольку для активации профага необходима полноценно работающая рестрикционная система, а это предполагает наличие генов рестрикции и сопряженных с ними регуляторных генов, что сразу накладывает ограничения «снизу» на размер генома [3, 10]. Это правило особенно актуально при небольших размерах бактериальных геномов (меньше, чем 6 Mb). Также установлено, что немаловажным фактором является размер самой бактериальной клетки — он должен быть меньше некоторого порогового значения, поскольку для запуска активации важна концентрация определенных медиаторов в момент, когда биосинтетические ресурсы клетки весьма ограничены, и значительно повысить внутриклеточную концентрацию этих регуляторов практически невозможно [3]. Результаты исследований, посвященных изучению поведения микробных популяций в их естественной среде обитания (морские и пресные водоемы, почва), показали, что число лизогенных штаммов бактерий значительно варьирует в зависимости от условий окружающей среды обитания. Обнаружено, что доля лизогенных штаммов возрастает в условиях низкой плотности микробной популяции, при голодании и при неблагоприятной для роста температуре [11–13]. Складывается впечатление, что доля лизогенных клеток бактерий возрастает за счет их большей «выживаемости» при неблагоприятных условиях среды обитания.

Молекулярные механизмы, регулирующие разные этапы жизненного цикла умеренных фагов, такие как инфицирование, лизогенизация, индукция (активация), потеря профага или его структурная трансформация в результате работы систем рестрикции-модификации сложны и пока изучены недостаточно [3]. Открытие CRISPR-Cas системы бактерий (англ. «clustered regularly interspaced short palindromic repeats», «CRISPR associated protein») и ее участия в поддержании антифаговой защиты слегка приоткрыла некоторые тайны молекулярной регуляции «профагового сообщества» [14]. CRISPR-Cas системы содержат последовательности прямых, почти палиндромных повторов, перемежающихся со спейсерами — последовательностями нуклеотидов, фактически представляющих собой слегка измененные копии ДНК фагов или плазм

мид, с которыми бактериальная клетка встречалась на протяжении своей жизни. Эта система вместе с рестрикционной системой участвует в противофаговой защите клеток бактерий. Однако ее взаимоотношения с фагами и другими чужеродными ДНК носит соревновательный характер, в результате чего фаги вырабатывают способность уклоняться от атак CRISPR-Cas системы, что в итоге приводит к коэволюции всех участников состязания.

О наличии тонкой и сложной системы регуляции процессов активации профагов свидетельствует и ее тесная связь с так называемой SOS-системой бактерий, которая включается при ингибировании репликации или повреждении ДНК [15–17]. SOS-система была открыта в 1975 году у кишечной палочки, и без лишнего мудрствования названа так же, как и международный сигнал бедствия в радиотелеграфной связи. Любая стрессовая ситуация, приводящая к торможению процессов роста (введение высоких доз антибиотиков или антисептиков, УФ-излучение и т.д.) приводит к включению данной системы, наиболее узким местом которой являются ошибки в работе ДНК-полимераз приводящие к возникновению мутаций, а следовательно, и к адаптивным изменениям в микробной популяции. Показано, что SOS-система может быть напрямую связана с появлением мутаций, вызывающих индукцию профагов и развитие устойчивости к антибиотикам [17].

Индукция умеренных бактериофагов. С практической точки зрения, то есть с точки зрения возможности использования потенциала умеренных бактериофагов для подавления роста возбудителей воспалительных заболеваний человека, особого рассмотрения заслуживает индукция (активация) умеренных фагов. Это энергоемкий процесс, который запускается только при создании стрессовой ситуации, приводящей к повреждению бактериальной ДНК и включению системы SOS-репарации бактериальной клетки, причем на запуск синтеза стартовых белков в ходе индукции уходит всего 30-40 мин [1]. Примерами таких воздействий, как мы уже говорили, могут служить УФ-облучение, введение сублетальных доз антибиотиков, миномицина С [1]. Казалось бы, список индукторов указывает на то, что активация умеренных фагов является весьма редким событием. Однако недавние работы показали, что это не так. Были получены убедительные доказательства существования активации умеренных фагов в микробиоме кишечника человека [18–21]. Среди факторов активации особую роль, помимо антибактериальных препаратов, играют и такие, как характер поступающих питательных субстратов, синтез специ-

фических микробных метаболитов, наличие хронических воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Интересно, что исследование функционирования QS-system бактерий показало ее несомненное участие, как в антифаговой защите клеток бактерий, так и в регулировании процесса активации умеренных бактериофагов [21]. Напомним, что QS-system представляет собой сигнальную систему межклеточного общения внутри популяций бактерий, воздействие на которую позволяет коренным образом изменить поведение микробных популяций, например, лишить их возможности синтезировать токсины или гемолизины. Иными словами, умеренные бактериофаги включены в работу практически всех систем клеток бактерий, оказывая прямое или опосредованное действие на регуляцию роста, синтез факторов патогенности, межклеточное взаимодействие внутри микробной популяции и т.д. Такая многофункциональность позволяет предполагать возможность осуществления управляемой индукции умеренных бактериофагов для снижения числа клеток возбудителей тяжелых инфекционно-воспалительных заболеваний, поскольку любая сложная система (и чем система сложнее, тем вероятность выше) всегда имеет свое узкое место, свою «ахиллесову пята».

Обоюдоострое оружие. Мы намеренно нарисовали картину индукции умеренных бактериофагов крупными мазками для того, чтобы не увязнуть в множестве молекулярных и иных деталей. Но некоторые из этих деталей являются основанием для настороженного отношения к идее использования индукции умеренных бактериофагов для регуляции численности возбудителей инфекционных осложнений человека. Так, было показано, что в процессе измененной индукции, не приводящей к синтезу полноценных фаговых частиц, возможна экспрессия ряда генов патогенности, ответственных, например, за синтез штаммами EHEC (энтерогеморрагические кишечные палочки) Shiga-токсина, что приводит к усилению воспалительных процессов в толстой кишке и летальным исходам [22]. При воспалительных заболеваниях тонкой и толстой кишки (язвенный колит, болезнь Крона), как показали метагеномные исследования, наблюдается резкий сдвиг от нормальной микрофлоры к патологической, который сопровождается резким возрастанием числа фаговых частиц, при этом спектр фагов сильно отличается от того, который выявляют у здоровых организмов [18, 20, 22–24]. Результаты исследований показывают, что у здоровых организмов (модельные животные и люди) фаговое сообщество кишечника имело упорядоченную и стабильную структуру, тогда как

у больных наблюдался «стохастический фаговый дисбиоз» (интересен сам факт введения в научную литературу понятия «вирионного (фагового) дисбиоза»). Эти данные позволяют предположить, что при развитии разных видов воспалительной патологии наблюдалось интенсивное отмирание лизогенных популяций, которые составляли нормальную микрофлору кишечника. Иными словами, нарушение гомеостаза в микробиоме кишечника, наблюдаемое при воспалительных заболеваниях, является результатом катастрофических нарушений в системе «бактериальные клетки-профаги». Высвобождение большого числа фаговых частиц приводит не только к снижению числа клеток нормобионтов (представителей нормальной микрофлоры), но и к тому, что часть фагов преодолевает слой эпителиальных клеток кишечника, проникает в кровь и другие системы и органы, формируя таким образом параллельные потоки бактериальных клеток, их фрагментов и фаговых частиц, составляющие так называемую микробную кишечную транслокацию.

Имеются неопровержимые свидетельства того, что в макроорганизме происходит непосредственное взаимодействие фагов с клетками иммунной системы (дендритные клетки, В-лимфоциты, моноциты), что приводит к индукции синтеза хемокинов, интерферона-гамма, интерлейкина-12 [24, 25]. Однако далеко не все фаги вызывают подстегивание провоспалительного ответа макроорганизма и усиление клинических проявлений колита. Таким негативным свойством обладают, например, T4 фаги, часто обнаруживаемые в клетках кишечной палочки [26]. Напротив, имеется множество свидетельств протективных свойств профагов, которые включаются в борьбу с патобионтами (несвойственными здоровому микробному сообществу микроорганизмами), обеспечивая таким образом поддержание гомеостаза в микробиоме кишечника [27]. Интересно, что на поверхности фаговых частиц обнаружены Ig-подобные локусы (сайты), которые прочно связывают их с полисахаридным матриксом биопленок, за счет чего чувствительные к фагам клетки бактерий способны избегать прямого контакта и длительно сосуществовать с фагами в условиях стабильной окружающей среды [26, 27].

Достижения последних лет. Исследования биологии и экологических аспектов умеренных бактериофагов в последние годы переживает поистине бум. Изучение микробиома кишечника человека привело к открытию невероятного параллельного мира бактериофагов, названного фагомом. Были открыты новые виды фагов, относящихся к семействам Si-

phoviridae, Myoviridae, Podoviridae и crAss-подобных вирусов, которые инфицируют клетки бактерий практически всех таксономических фил (групп классов) – Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Verrucomicrobia and Proteobacteria [28]. Часть из этих фагов уже удалось культивировать и подробно изучить.

Интересные результаты были получены при изучении так называемых «cryptic prophages» (молчащих фагов), которые потеряли способность к индукции. Они осуществляют не только иммунную функцию, являясь компонентами CRISPR-Cas систем бактерий, но и регулируют процесс перехода бактериальных клеток в состояние покоя, что открывает новые возможности в подавлении метаболической активности клеток микробных популяций [29].

Результаты пока еще единичных работ показывают реальную возможность получения сконструированных умеренных бактериофагов, которые способны «скорректировать» ряд нежелательных свойств патогенов, например, заблокировать синтез токсинов, или восстановить чувствительность к антибиотикам [30]. Так, модифицированный λ -фаг был внедрен в клетки *Escherichia coli*, что привело к потере способности клеток бактерий синтезировать Shiga-токсин, причем полученный искусственный профаг показал высокую эффективность и стабильность в кишечнике [31]. Исследования применения комбинированной антибиотико-фаговой терапии показали реальную возможность снижения МПК антибактериальных препаратов [32]. В качестве фагового компонента использовали вирулентные фаги.

SARS-CoV-2 инфекция и умеренные фаги. Исследования виroma кишечника пациентов с SARS-CoV-2 инфекцией показали значительные различия в структуре ДНК- и РНК-содержащих вирусов у больных и здоровых людей [33]. Полная конструктивная перестройка виroma кишечника, вызванная SARS-CoV-2 инфекцией, длительно сохранялась (по крайней мере, в течение месяца), при этом и клинические проявления воспалительных постковидных осложнений в кишечнике людей также сохранялись даже после выписки из клиники. Обнаружено, что у пациентов с тяжелым течением ковидной инфекции видовое разнообразие умеренных фагов резко снижалось, при этом, как показал метагеномный анализ, возрастала доля генов, кодирующих факторы патогенности, особенно у штаммов *E. coli*. У пожилых пациентов видовое разнообразие фагов было значительно ниже, чем у более молодых, что, возможно, является одним из факторов, способствующих более тяжелому течению инфекции. Предполагается протективная роль умеренных бактериофагов и их

вклад в поддержание гомеостаза кишечного микробиома и в регулирование провоспалительного каскада.

Заключение

Опыт многолетнего применения вирулентных бактериофагов доказал их несомненную клиническую эффективность (при должном подборе препаратов) и безопасность. Есть основания полагать, что совместное применение вирулентных фагов и антибиотиков позволит преодолеть антибиотикорезистентность бактерий, которая представляет собой глобальную общемировую проблему. Лечебный потенциал умеренных бактериофагов предстоит еще только исследовать. Научная база для использования управляемой индукции (активации) умеренных бактериофагов в лечебных целях пока еще слабо разработана. Во-первых, нам чрезвычайно мало известно о функциях большинства генов профагов, не говоря уже о механизмах регуляции работы этих генов (как генетических, так и эпигенетических). Во-вторых, наблюдаемые эффекты активации большинства профагов в условиях многофакторных модельных экспериментов всегда содержат неконтролируемые параметры, что пока дает мало оснований для получения запрограммированного лечебного эффекта. В-третьих, мы слишком мало знаем о молекулярных механизмах, лежащих в основе трансдукции (специализированной и генерализованной трансдукции, ауто-трансдукции), чтобы гарантировать полное отсутствие риска передачи генетических детерминант антибиотикорезистентности или факторов патогенности от патогенной флоры к нормобионтам в результате индукции профагов.

Однако большинство исследователей фагов с оптимизмом смотрят на перспективы применения их в практической медицине. Этот оптимизм базируется, в том числе, и на принципиальной возможности создания биоинженерно-модифицированных фагов. Вполне реальным кажется использование регулируемой активности умеренных бактериофагов для лечения хронических, трудно поддающихся антибиотикотерапии воспалительных инфекционных заболеваний (для подбора индивидуальной схемы лечения, адаптации или генной модификации бактериофагов требуется время, которое в будущем, по-видимому, удастся сократить). Возможности управляемой индукции умеренных бактериофагов кажутся весьма перспективными и для лечения тяжелых дисбиотических нарушений микробиома кишечника, которые нередко возникают после интенсивной и длительной антибиотикотерапии. При ближайшем рассмотрении становится очевидным, что идеи регулируемой активации умерен-

ных фагов очень логично и гармонично вписываются в активно продвигаемую в последнее время концепцию персонализированной медицины.

Литература

(п.п. 2–32 см. References)

1. Летаров А.В. *Современные концепции биологии бактериофагов*. М.: ДеЛи, 2020.

References

1. Letarov A.V. *Modern concepts of bacteriophage biology. [Sovremennye kontseptsii biologii bakteriofagov]*. Moscow; TD DeLi; 2020. (in Russian)
2. Howard-Varona C., Hargreaves K.R., Abedon S.T., Sullivan M.B. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J.* 2017; 11(7): 1511–20.
3. Touchon M., Bernheim A., Rocha Eduardo P.C. Genetic and life-history traits associated with the distribution of prophages in bacteria. *ISME J.* 2016; 10(11): 2744–54.
4. Khan A., Wahl L.M. Quantifying the forces that maintain prophages in bacterial genomes. *Theor. Popul. Biol.* 2019; 133: 168–79.
5. Kim M.S., Bae J.W. Lysogeny is prevalent and widely distributed in the murine gut microbiota. *ISME J.* 2018; 12(4): 1127–41.
6. Knowles B., Bailey B., Boling L., Breitbart M., Cobián-Güemes A., Del Campo J., et al. Variability and host density independence in inductions-based estimates of environmental lysogeny. *F. Nat. Microbiol.* 2017; 2: 17064.
7. Bobay L.M., Rocha E.P., Touchon M. The adaptation of temperate bacteriophages to their host genomes. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30(4): 737–51.
8. Modi S.R., Lee H.H., Spina C.S., Collins J.J. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature.* 2013; 499(7457): 219–22.
9. Roux S., Hallam S.J., Woyke T., Sullivan M.B. Viral dark matter and virus-host interactions resolved from publicly available microbial genomes. *Elife.* 2015; 4: e08490.
10. Oliveira P.H., Touchon M., Rocha E.P. The interplay of restriction-modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts. *Nucleic. Acids Res.* 2014; 42(16): 10618–31.
11. Ghosh D., Roy K., Williamson K.E., White D.C., Wommack K.E., Sublette K.L., et al. Prevalence of lysogeny among soil bacteria and presence of 16S rRNA and trzN genes in viral-community DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74(2): 495–502.
12. Pradeep Ram A.S., Sime-Ngando T. Resources drive trade-off between viral lifestyles in the plankton: evidence from freshwater microbial microcosms. *Environ. Microbiol.* 2010; 12(2): 467–79.
13. Shan J., Korbsrisate S., Withatanung P., Adler N.L., Clokie M.R., Galyov E.E. Temperature dependent bacteriophages of a tropical bacterial pathogen. *Front. Microbiol.* 2014; 5: 599.
14. Labrie S.J., Samson J.E., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8(5): 317–27.
15. Waldor M.K., Friedman D.I. Phage regulatory circuits and virulence gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* 2005; 8(4): 459–65.
16. Wang X., Kim Y., Ma Q., Hong S.H., Pokusaeva K., Sturino J.M., et al. Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nat Commun.* 2010; 1: 147.

17. Cirz R.T., Chin J.K., Andes D.R., de Crécy-Lagard V., Craig W.A., Romesberg F.E. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol.* 2005; 3(6): e176.
18. Minot S., Sinha R., Chen J., Li H., Keilbaugh S.A., Wu G.D., et al. The human gut virome: Inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res.* 2011; 21(10): 1616–25.
19. Reyes A., Wu M., McNulty N.P., Rohwer F.L., Gordon JI. Gnotobiotic mouse model of phage-bacterial host dynamics in the human gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(50): 20236–41.
20. Manrique P., Bolduc B., Walk S.T., van der Oost J., de Vos W.M., Young M.J. Healthy human gut phageome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016; 113(37): 10400–5.
21. Tan D., Hansen M.F., de Carvalho L.N., Roder H.L., Burmolle M., Middelboe M., et al. High cell densities favor lysogeny: induction of an H2O prophage is repressed by quorum sensing and enhances biofilm formation in *Vibrio anguillarum*. *ISME J.* 2020; 14(7): 1731–42.
22. Balasubramanian S., Osburne M.S., Brinjones H., Tai A.K., Leong J.M. Prophage induction, but not production of phage particles, is required for lethal disease in a microbiome-replete murine model of enterohemorrhagic *E. coli* infection. *PLoS Pathog.* 2019; 15(1): e1007494.
23. Duerkop B.A., Kleiner M., Paez-Espino D., Zhu W., Bushnell B., Hassell B., et al. Murine colitis reveals a disease-associated bacteriophage community. *Nat. Microbiol.* 2018; 3(9): 1023–31.
24. Seo S.U., Kweon, M.N. Virome-host interactions in intestinal health and disease. *Curr. Opin. Virol.* 2019; 37: 63–71.
25. Federici S., Nobs S.P., Elinav E. Phages and their potential to modulate the microbiome and immunity. *Cell. Mol. Immunol.* 2020; 18(4): 889–904.
26. Gogokhia L., Buhrke K., Bell R., Hoffman B., Brown D.G., Hanke-Gogokhia C., et al. Expansion of bacteriophages is linked to aggravated intestinal inflammation and colitis. *Cell. Host. Microbe.* 2019; 25(2): 285–99. e8.
27. Lourenço M., Chaffringeon L., Lamy-Besnier Q., Pédrón T., Campagne P., Eberl C., et al. The spatial heterogeneity of the gut limits predation and fosters coexistence of bacteria and bacteriophages. *Cell. Host. Microbe.* 2020; 28(3): 390–401.e5.
28. Sausset R., Petit M.A., Gaboriau-Routhiau V., De Paepe M. New insights into intestinal phages. *Mucosal. Immunol.* 2020; 13(2): 205–15.
29. Wang X., Wood T.K. Cryptic prophages as targets for drug development. *Drug Resist. Update.* 2016; 27: 30–8.
30. Hsu B.B., Way J.C., Silver P.A. Stable neutralization of virulent bacteria using temperate phage in the mammalian gut. *mSystems.* 2020; 5(1): e00013–20.
31. Hu J., Ye H., Wang S., Wang J., Han D. Prophage Activation in the Intestine: Insights into Functions and Possible Applications. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 785634.
32. Manohar P., Madurantakam Royam M., Loh B., Bozdogan B., Nachimuthu R., Leptihn S. Synergistic Effects of Phage–Antibiotic Combinations against *Citrobacter amalonaticus*. *ACS Infect. Dis.* 2022; 8(1): 59–65.
33. Zuo T., Liu Q., Zhang F., Yeoh Y.K., Wan Y., Zhan H., et al. Temporal landscape of human gut RNA and DNA virome in SARS-CoV-2 infection and severity. *Microbiome.* 2021; 9(1): 91.

Сведения об авторах:

Евдокимова Наталья Витальевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. клинической микробиологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского»;

Черенькая Татьяна Витальевна, канд. мед. наук, зав. лаб. клинической микробиологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского».

МЕТОДИКА

© Коллектив авторов, 2022

УДК 616-092.9

Никитин П.В.^{1,2}, Мусина Г.Р.², Полозов В.Н.², Красновский В.М.², Николаев В.Н.²

Внутриопухолевая гетерогенность менингиом в плоскости метиляционного профайлинга

¹ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» ФМБА,
117513, Москва, Россия;

²Сколковский институт науки и технологий (Сколтех),
121205, Москва, Россия

Введение. В последнее время все большую популярность приобретает выявление классов метилирования (МК) менингиом, позволяющее существенно повысить точность прогноза выживаемости пациентов. **Цель работы** – сравнительный анализ наиболее перспективных методов молекулярного исследования тканей.

Методика. В данной работе сравнивали 2 перспективных диагностических подхода: выявление глобального профиля метилирования генома и выделение типов кластеров (ТК) клеток менингиом по их потенциальной диагностической значимости. Оценивали также фундаментальные факторы корреляции двух методов. Выделение ТК базируется на характеристике функциональных свойств клеток с помощью маркерных молекулярных факторов, демонстрирующих степень активации пролиферативных и метаболических процессов. С технической точки зрения подход включал в себя получение полноформатных изображений иммуногистохимических препаратов, их многоступенчатую медианную фильтрацию и особые режимы маскирования, а также дальнейшее создание многослойных комплексных изображений с максимально точным координатным сопоставлением. Все полученные результаты по активности экспрессии данных молекулярных факторов были использованы для проведения кластерного анализа с выделением клеточных кластеров в опухолях и дальнейшей вторичной кластеризации их в 8 ТК.

Результаты. Показано, что в целом наблюдается однонаправленное прогрессирование свойств злокачественности опухоли и степени ее биологической агрессивности как при выявлении состава МК, так и содержания ТК. В то же время, по своей прогностической ценности подход с выявлением ТК в менингиомах превзошел подход с определением МК для новообразования. Наиболее действенной с прогностических позиций оказалась комбинация данных подходов.

Заключение. Разработанный нами подход по функциональному профилированию клеток менингиом с разделением на ТК представляется чрезвычайно перспективным, способным раздвинуть диагностические границы. Дальнейшее развитие подобных комплексных подходов с включением других молекулярных методов позволит достичь принципиально нового качества диагностического процесса.

Ключевые слова: менингиомы; внутриопухолевая гетерогенность; диагностика; метилирование

Для цитирования: Никитин П.В., Мусина Г.Р., Полозов В.Н., Красновский В.М., Николаев В.Н. Внутриопухолевая гетерогенность менингиом в плоскости метиляционного профайлинга. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(1): 124-132.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.124-132

Для корреспонденции: Никитин Павел Владимирович, e-mail: nikitinpaulv@yandex.com

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Никитин П.В., Мусина Г.Р.; сбор и обработка материала – Никитин П.В., Мусина Г.Р., Полозов В.Н., Красновский В.М., Николаев В.Н.; подготовка иллюстративного материала – Никитин П.В., Мусина Г.Р.; статистическая обработка материала – Никитин П.В., Мусина Г.Р., Полозов В.Н., Красновский В.М., Николаев В.Н.; написание текста – Никитин П.В., Мусина Г.Р.; редактирование – Никитин П.В., Мусина Г.Р. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи — все соавторы.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-29-01214 мк.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 24.05.2022

Принята к печати 26.01.2023

Опубликована 17.03.2023

Nikitin P.V.¹, Musina G.R.¹, Polozov V.N.¹, Krasnovsky V.M.¹, Nikolaev V.N.¹**Intratumoral heterogeneity of meningioma with respect of the methylation profiling**¹ Federal Center for Brain and Neurotechnologies,
Moscow, 117513, Russian Federation;² Skolkovo Institute of Science and Technology (Skoltech),
Moscow, Russian Federation

Introduction. Despite a relatively favorable prognosis of meningiomas, this nosological group remains a serious diagnostic challenge, largely due to the shortage of accurate diagnostic methods. Identification of methylation classes (MC) of meningiomas is becoming increasingly popular, since it can improve the prognostic accuracy. The **aim** of this study was to compare most promising methods for tissue molecular analysis.

Methods. This article focuses on comparing two promising diagnostic approaches, namely, global genome methylation profiling and identification of cluster types (CT) of meningioma cells based on their potential diagnostic significance. Also, basic correlation factors of these two methods were assessed. The identification of CT is based on characterizing cell functional features by the marker molecular factors that indicate the activation of proliferative and metabolic processes. Technically, our approach included obtaining full-format scans of immunohistochemical slides, their stepwise median filtration, and specific masking regimes followed by creation of complex multilayer images with maximally precise coordinate correlation. All data on the expression activity of the molecular factors were used for a cluster analysis to identify tumor cell clusters for their subsequent secondary clusterization into 8 CTs.

Results. The study showed unidirectional progression of the tumor malignancy and biological aggressiveness based on identification of the MC composition or the TC content. At the same time, for meningiomas, the TC approach was superior to the MC approach by its prognostic value. A combination of these methods provided the most effective prognosis.

Conclusion. The meningioma cell functional profiling with cluster identification is very promising as it can expand the diagnostic frontier. Further development of such comprehensive approaches that include other molecular methods will provide critically new quality of the diagnostic process.

Keywords: meningiomas; intratumoral heterogeneity; diagnostics; methylation

For citation: Nikitin P.V., Musina G.R., Polozov V.N., Krasnovsky V.M., Nikolaev V.N. Meningiomas heterogeneity intratumoral in the plane of methylation profiling. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(1): 124-132. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.124-132

Author's contribution: concept and design – Nikitin P.V., Musina G.R.; material collection and processing – Nikitin P.V., Musina G.R., Polozov V.N., Krasnovsky V.M., Nikolaev V.N.; preparation of illustrative material – Nikitin P.V., Musina G.R.; statistical processing of the material – Nikitin P.V., Musina G.R., Polozov V.N., Krasnovsky V.M., Nikolaev V.N.; text writing – Nikitin P.V., Musina G.R.; editing – Nikitin P.V., Musina G.R. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Pavel V. Nikitin, PhD, Laboratory head, Molecular cellular pathology lab; 4-2, Bolshoy Bldg., Moscow, 128428, Russian Federation, e-mail: nikitinpaulv@yandex.com

Information about the authors:Nikitin P.V., <https://orcid.org/0000-0003-3223-4584>**Financing.** The study was supported by Russian Foundation for Basic Research, grant № 19-29-01214 mc.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 24.05.2022

Accepted 26.01.2023

Published 17.03.2023

Введение

Менингиомы составляют группу новообразований мозговых оболочек, наиболее часто встречающуюся среди всех опухолей головного мозга. Несмотря на доброкачественное в большинстве случаев течение менингиом, нередко наблюдается рецидивное течение онкологического процесса. Потенциальной возможностью фундаментального дискурса в сфере диагностики и лечения новообразований различной локализации является рассмотрение вопросов внутриопухолевой гетерогенности. В частности, решение данного комплекса во-

просов позволяет сортировать всю многоликую массу клеток новообразований на группы в соответствии с их молекулярными, функциональными и патогенетическими свойствами, выстраивая проекции данных клеточных групп на клиническую плоскость [3–6].

Подобный современный подход наша группа реализовала для менингиом. В рамках данного подхода мы разработали многоуровневую комплексную систему обработки и анализа данных визуализации протеомного и транскриптомного профиля менингиом, включаю-

шую в себя получение полноформатных изображений иммуногистохимических препаратов, их многоступенчатую медианную фильтрацию и особые режимы маскирования, а также дальнейшее создание многослойных комплексных изображений с максимально точным координатным сопоставлением [7, 8]. Представленная многоуровневая аналитическая модель применялась для изучения активности экспрессии в менингиомах пролиферативного маркера Ki-67, каспазы 9 (Cas9), каспазы 3 (Cas3), сукцинил-КоА-синтетазы (СКоАС), HIF-1 α с целью характеристики функционального состояния клеток и их кластеризации. Все полученные данные по активности экспрессии данных молекулярных факторов были использованы для проведения кластерного анализа с выделением клеточных кластеров в опухолях и дальнейшей вторичной кластеризации их в 8 типов кластеров (ТК). Мы выявили характерные комбинации типов кластеров для каждого гистологического типа менингиомы. Мы также показали, что отдельные ТК значимо повышают риск развития рецидивов и малигнизации для менингиом grade 1.

Далее во всех ТК опухолевых клеток были подробно исследованы молекулярные свойства в отношении активности экспрессии протоонкогенов и антионкогенов *SMO*, *Akt1*, *PDGFR*, *EGFR* и *CDKN2A*. В результате было выявлено, что все ТК статистически значимо различаются по активности экспрессии данных генов. В то же время существуют типичные комбинации генов по активности их экспрессии, в рамках которых при переходе от одного ТК к другому изменяются ведущие драйверные гены и вспомогательные генетические элементы. Более того, мы выяснили, что активность экспрессии некоторых генов в части ТК, равно как и доля части ТК в клеточной массе взаимосвязаны с прогнозом не только безрецидивной, но и общей выживаемости пациентов.

Также мы рассмотрели особую популяцию клеток в составе менингиом — клетки со стволовыми свойствами, или опухолевые стволовые клетки (ОСК), маркером которых служит CD 133. Мы впервые изучили экспрессию данного маркера и впервые показали наличие популяции клеток со стволовыми свойствами в менингиомах различной степени злокачественности и охарактеризовали их распределение в зависимости от гистологической разновидности опухоли. Наша группа показала наличие в менингиомах одновременно двух типов ОСК — эпителиальных ОСК (ЭОСК) и мезенхимальных ОСК (МОСК). При этом мы выяснили, что существует как минимум 3 различных подтипа МОСК и 2 подтипа ЭОСК, каждый из которых может играть роль драйверной клеточной популяции. При том, характер драйверной клеточной популяции

непосредственно влияет на степень биологической агрессивности менингиомы и ее свойства, что транслируется и в клиническую плоскость, поскольку молекулярные свойства различных подтипов ОСК также непосредственно взаимосвязаны с прогнозом общей и безрецидивной выживаемости пациентов [7, 8].

Тем не менее, существует немало направлений, по которым ТК недостаточно хорошо охарактеризованы, в частности, в важном вопросе глобального метилиционного профилирования. Данный молекулярный подход представляет собой крайне перспективное направление не только в решении вопросов практического характера, но также в рассмотрении проблем фундаментального свойства. В частности, было показано наличие шести различных клинически значимых классов метилирования, связанных с типичными мутационными и цитогенетическими событиями, а также с паттернами экспрессии различных генов [9, 10]. По сравнению с классификацией ВОЗ классификация по индивидуальным и комбинированным классам метилирования более точно выявляет пациентов с высоким риском прогрессирования заболевания в менингиомах grade 1 и пациентов с более низким риском рецидива среди менингиом grade 2. В рамках настоящей работы проведено изучение взаимосвязи ТК и ОСК с метилиционными классами менингиом и рассмотрено их совместное влияние на прогноз.

Методика

Для реализации данной научной работы в исследование включались пациенты, проходившие хирургическое лечение в ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» в 2014–2016 гг. Всего среди новообразований было представлено 32 менингиомы grade 1, 28 менингиом grade 2 и 24 менингиомы grade 3. Для включения в работу применялись критерии в виде первичного вмешательства по поводу данного новообразования, отсутствия других онкологических заболеваний, наличия достаточного качества материала новообразования. Все пациенты, включенные в исследование, подписывали добровольное информированное согласие, все научная работа проводилась в строгом соответствии с принципами “Надлежащей клинической практики” (GoodClinicalPractice).

Выделение различных ТК в менингиомах

Подробно процесс выделения различных ТК в менингиомах был описан в предыдущих работах [8]. Вначале готовились срезы менингиом толщиной 3 мкм и проводилась иммуногистохимическая реакция с моноклональными антителами против человеческого антигена Ki-67 (CONFIRM anti-Ki67, Roche-Ventana,

США), моноклональными антителами против человеческого антигена Cas9 (SAB3500405, Sigma-Aldrich, США), моноклональными антителами против человеческого антигена Cas3 (C7729, Sigma-Aldrich, США), моноклональными антителами против человеческого антигена сукцинил-КоА-синтетазы (SAB2700343, Sigma-Aldrich, США) и моноклональными антителами против человеческого антигена HIF-1 α (H6536, Sigma-Aldrich USA). Далее проводился первичный анализ изображений с использованием сканера Aperio 3T (Leica Biosystems, GmbH), в рамках которого полученные изображения для всех маркеров сопоставлялись между собой с максимальной точностью по координатным данным для получения сложных «многослойных» изображений с помощью программного обеспечения Aperio ImageScope (Leica Biosystems, GmbH), ImageJ (Национальный институт здравоохранения, США) и QuPath (Университет Эдинбурга, Великобритания). Далее с помощью технологий машинного обучения, нейросетевого анализа и технологий больших данных выделялись клетки и ядра клеток вместе с положительными метками для всех 5 исследованных маркеров, что служило основой для проведения кластерного анализа с применением технологий большого объема данных и программного обеспечения Matlab (The MathWorks, США) и SPSS Statistics 23 (IBM, США). Сначала на базе данных клеток выделялись группы клеток в виде клеточных кластеров. После этого, производился вторичный анализ изображений с применением полуавтоматических программных алгоритмов. На основе данных вторичного анализа изображений был проведен вторичный кластерный анализ, в результате которого выделенные клеточные кластеры различных пациентов были классифицированы в более крупные категории в виде ТК. Все взятые в исследование менингиомы были картированы по данным ТК с использованием подходов к кластеризованию, применявшихся в рамках предшествующей работы.

Профилирование метилирования генома менингиом

Кластеризация, проведенная с помощью обучения без учителя, была выполнена на основе евклидова расстояния и метода связи Уорда. Для кластеризации были выбраны зонды со стандартным отклонением более 0.2 по всем образцам. Зонды метилирования были переупорядочены путем иерархической кластеризации с использованием евклидова расстояния и полного сцепления.

Статистическая валидация

Для проведения статистического анализа применялось программное обеспечение Matlab и SPSS

Statistics 23.0. Кластерный анализ проводился по методу k-средних. Межгрупповые сравнения выполнялись с использованием U-критерия Манна–Уитни в случае ненормального распределения признака, t-критерия Стьюдента в случае нормального распределения признака. Характер распределения признаков определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Распределение времени выживания оценивали по методу Каплана и Мейера и сравнивали между группами с помощью логарифмического рангового критерия. Были рассчитаны отношения рисков, включая 95% доверительные интервалы, основанные на регрессионных моделях Кокса. Были рассчитаны кривые ошибок прогнозирования на основе оценки Бриера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Метиляционное профилирование когорты менингиом

Среди взятой в исследование когорты пациентов было выявлено, что большая часть в количестве 42.86% ($n=36$) относилась к метиляционному кластеру benign-2 (МК ben-2), в то время как на втором месте по количеству случаев находился кластер benign-1 (МК ben-1) с 28.57% ($n=24$). Далее по количеству случаев следовал кластер benign-3 (МК ben-3), на который приходилось 12.34% ($n=10$) пациентов, затем следовал кластер intermediate A (МК int-A) с 8.33% ($n=7$) случаев и кластер intermediate B (МК int-B) с 4.76% ($n=4$) случаев, в то время как на кластер malignant (МК mal) приходилось 3.57% ($n=3$). Рассмотрение соотношения кластеров со степенью злокачественности новообразований показало, что менингиомы grade 1 преимущественно содержат в своем составе кластеры МК ben-2, МК ben-1, МК ben-3 и МК int-A. В то же время менингиомы grade 2, содержат кластеры МК int-A и МК int-B, также менингиомы grade 3, в основном, содержат кластеры МК int-B и МК mal (рис. 1).

Соотношение профиля метилирования с ТК в первой группе

Традиционно к первой группе менингиом по профилю метилирования причисляют МК ben-1, МК ben-2, МК ben-3 и МК int-A кластеры новообразований. В МК ben-2 кластере преобладающее положение занимают ТК1 с $48.24 \pm 2.38\%$ и ТК2 с $34.44 \pm 2.54\%$ (рис. 2, а). В то же время в МК ben-1 наиболее часто встречаются ТК2 в $38.24 \pm 4.28\%$ клеток и ТК3 в $28.34 \pm 4.24\%$ клеток (рис. 2, б). Кроме того, в МК ben-3 наиболее часто выявляется ТК3 в $44.28 \pm 2.48\%$ случа-

ев и ТК4 в $32.42 \pm 2.32\%$ случаев (рис. 2, в). Также в МК int-A наиболее часто выявляется ТК4 в $46.28 \pm 4.42\%$ случаев и ТК5 в $34.48 \pm 4.26\%$ случаев (рис. 2, г).

Соотношение профиля метилирования с ТК во второй группе

Во вторую группу менигиом по профилю метилирования входят МК int-B и МК mal кластеры. Для МК int-B характерным является преобладание ТК5 с $38.18 \pm 2.28\%$ клеток и ТК6 с $35.52 \pm 4.81\%$ клеток (рис. 3, а). В то же время, МК mal характеризовался наличием преимущественно ТК7 в $34.62 \pm 4.18\%$ клеток и ТК8 в $32.28 \pm 4.48\%$ клеток (рис. 3, б). В целом, наблюдается характерное распределение ТК в зависимости от профиля метилирования менигиом, причем представленные результаты демонстрируют потенциальную применимость функциональ-

ного популяционного анализа для выявления соответствующего класса метилирования.

Создание комплексной прогностической модели

Далее проводилось рассмотрение предикторной ценности ТК по сравнению с предикторной ценностью профиля метилирования и классическими диагностическими критериями ВОЗ. В качестве предикторного параметра, непосредственно включающего свойства ТК, выступал кластерный коэффициент (k), который рассчитывался как сумма процентного содержания клеток ТК5 – ТК8 в материале. Было выявлено значимое превосходство ТК в отношении предсказания прогноза БРВ над критериями ВОЗ (тест Бриера, $p < 0.001$), также наблюдались значимые различия ($p = 0.028$) в поль-

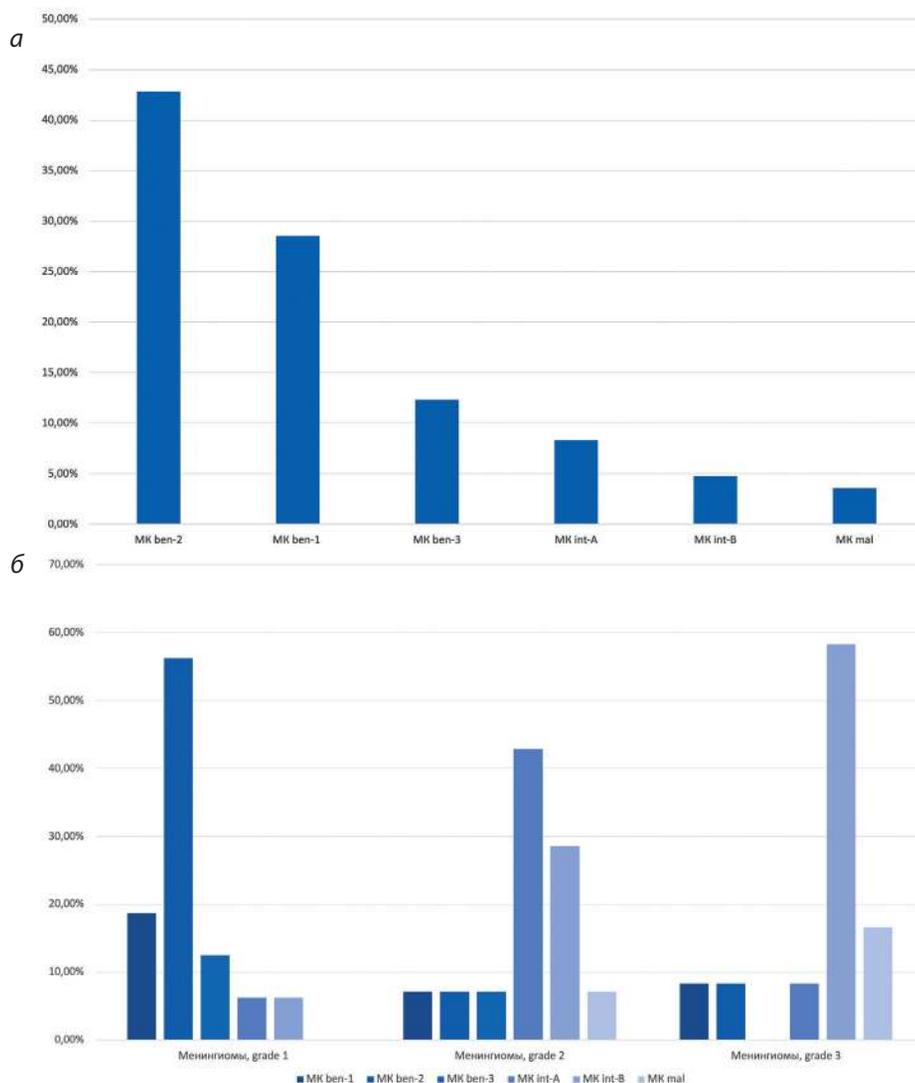


Рис. 1. а – распределение менигиом по кластерам метилирования. По оси абсцисс представлены соответствующие кластеры метилирования, по оси ординат продемонстрирован процент новообразований, входящих в данную группу в нашей работе; **б** – Соотношение кластеров метилирования менигиом с нозологическими группами по критериям ВОЗ. По оси абсцисс приведены соответствующие нозологические группы, внутри которых представлены встречающиеся в них кластеры метилирования, различающиеся по цвету, высота столбца демонстрирует процентное содержание данного кластера в соответствующей нозологической группе.

Fig. 1. a – Meningiomas distribution by methylation clusters. The abscissa shows the corresponding methylation clusters, the ordinate shows the percentage of neoplasms included in this group in our work; **b** – Correlation of methylation clusters of meningiomas with nosological groups according to WHO criteria. The corresponding nosological groups are shown along the abscissa axis, within which the methylation clusters occurring in them differ in color, the height of the column shows the percentage of this cluster in the corresponding nosological group.

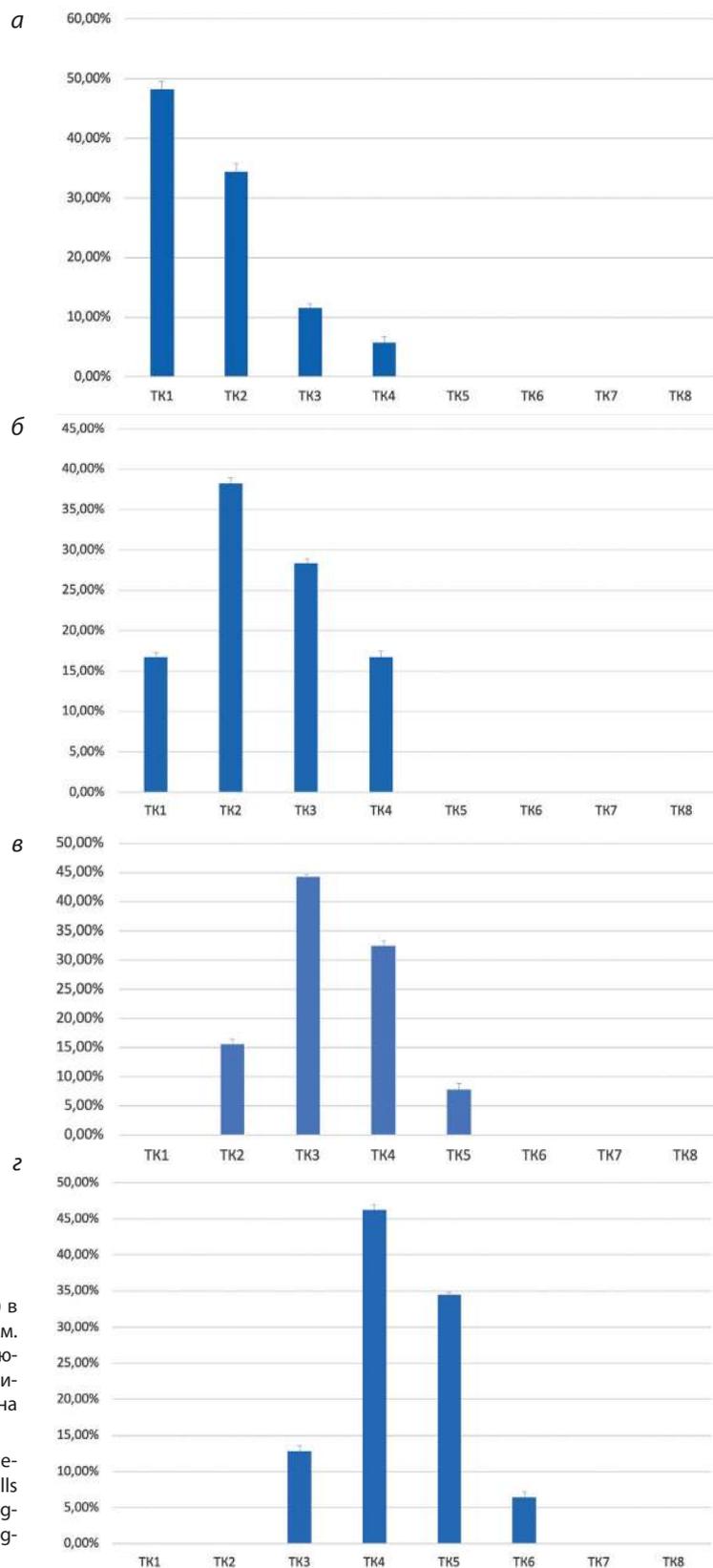


Рис. 2. Содержание клеток различных типов кластеров (TK) в доброкачественных классах метилирования (МК) менингиом. Последовательно приведено содержание клеток соответствующих ТК в процентах: на рисунке а – в МК ben-2 кластере, на рисунке б – в МК ben-1 кластере, на рисунке в – в МК ben-3 и на рисунке г – в МК int-A кластере.

Fig. 2. The content of cells of different types of clusters (TK) in benign methylation classes (MK) of meningiomas. The content of cells of the corresponding MCs in percent is shown sequentially in figure a – in MC ben-2 cluster, in figure б – in MC ben-1 cluster, in figure в – in MC ben-3, in figure г – in MC int-A cluster.

зу ТК в предсказании БРВ с профилированием статуса метилирования генома (рис. 4). Далее мы создали комбинированную предикторную модель, в рамках которой учитывались одновременно класс метилирования и преобладание тех или иных ТК в ткани новообразования. Данная модель показала наибольшую прогностическую ценность, превзойдя как просто модель с профилированием ТК (тест Бриера, $p=0.018$), так и модель с выявлением профиля метилирования, $p<0.001$ (рис. 4).

Обсуждение

Проблема поиска диагностических предикативов в случае менингиом достаточно серьезна. Современные рутинные методы в рамках патогистологических процедур в лучшем случае позволяют достичь точности в установлении прогноза на уровне критериев ВОЗ, не включающих в себя молекулярные факторы [11]. Между тем, мутационные события, а также не мутаци-

онные модификации активности генома посредством различных механизмов, в том числе эпигенетического порядка, таких как метилирование ДНК, по результатам исследований, играют огромную роль в возникновении и прогрессировании большинства новообразований [12]. Подобные фундаментальные предпосылки служат мощным базисом для многостороннего внедрения молекулярных диагностических критериев в большинство сфер онкологической клинической практики.

В то же время, менингиомы по-прежнему остаются мало затронутой нозологической группой в плане внедрения молекулярных подходов. Несмотря на то, что накоплено немало данных, демонстрирующих важнейшую роль многих молекулярных факторов в процессах канцерогенеза менингиом, массив подобных исследований носит преимущественно разрозненный, несистематизированный характер, что сильно затрудняет формирование стройного широко применимого в различ-

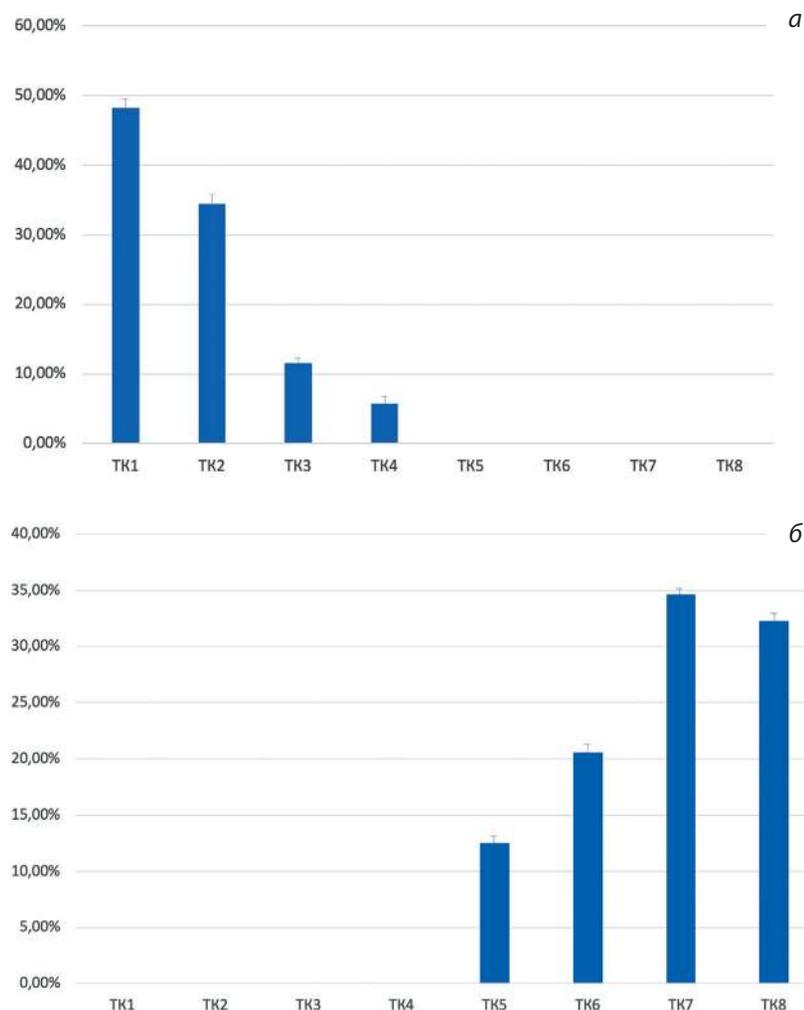


Рис. 3. Содержание клеток различных типов кластеров (ТК) в злокачественных классах метилирования (МК) менингиом.

Последовательно приведено содержание клеток соответствующих СТ в процентах на рисунке а – в МК int-B кластере, на рисунке б – в МК mal кластере.

Fig. 3. The content of cells of different types of clusters (CT) in malignant methylation classes (MC) of meningiomas. The content of cells of the corresponding MCs in percent is shown sequentially in figure a – in the MC int-B cluster, in figure b – in the MC mal cluster.

ных клинических сценариях диагностического подхода [12]. Важной работой, попытавшейся одной из первых решить поставленную задачу, стало исследование профилей глобального метилирования геномов клеток менингиом, позволившее не только дифференцировать менингиомы по нозологическим группам, рекомендованным критериями ВОЗ, но также превзойти данные критерии по степени прогностической ценности [10].

Тем не менее подобный подход, рассматривающий картину молекулярных модификаций только в разрезе межопухолевой молекулярной гетерогенности, позволяет лишь поверхностно судить о функциональных свойствах, дающих начало характеру биологического поведения менингиом. По сути, через особенности ландшафта глобального профиля метилирования только угадываются те ключевые патогенетические механизмы, которые непосредственно определяют процессы рецидивирования и малигнизации менингиомы. Для глубокого и всеобъемлющего взгляда на функциональный репертуар опухолевых клеток во всем его разнообразии требуется совершенно иной научный срез, проходящий по плоскости внутриопухолевой гетерогенности. С помощью предложенного нами метода стало возможным проведение комплексной оценки функциональных свойств менингиом на внутриопухолевом уровне с выделением клеточных кластеров, которые дифференцируются по функциональному признаку. Благодаря подобному типированию удалось не только выяснить немало новых подробностей от-

носительно фундаментальных механизмов прогрессирования менингиом, но также создать более эффективный диагностический подход, позволяющий точнее картировать нозологическую принадлежность менингиом и выявлять потенциальный прогноз ОБ и БРВ.

В настоящей работе мы выявили четкую взаимосвязь между ТК и профилем метилирования генома менингиом. Выяснилось, что для каждого профиля метилирования характерен свой ведущий драйверный кластер, определяющий особенности того или иного подтипа менингиом. Более того, при сравнении прогностической ценности двух подходов друг с другом, а также с диагностическими критериями ВОЗ, было показано очевидное превосходство выявления ТК над всеми конкурентами. Тем не менее, комбинирование профиля метилирования и определения качественного и количественного состава ТК позволяет добиться ещё большей прогностической ценности, выступая в качестве приоритетного варианта для диагностики.

Заключение

В целом, разработанный нами подход по функциональному профилированию клеток менингиом с разделением на ТК представляется крайне перспективным новшеством, способным расширить диагностические границы. Предоставляя несомненно ценные данные о механизмах прогрессирования менингиом, выявление качественного и количественного состава

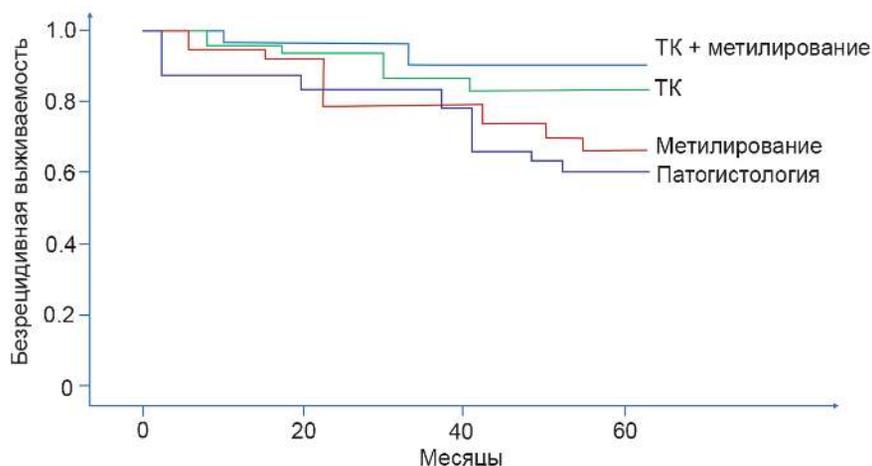


Рис. 4. Сравнение безрецидивной выживаемости пациентов с менингиомой в различных диагностических группах с помощью метода Каплан-Майер. На данном рисунке приведены кривые для пациентов с благоприятным прогнозом согласно классическим патогистологическим критериям ВОЗ, то есть группа патогистология, профилю глобального метилирования клеток, группа метилирования, типам кластеров (ТК) клеток менингиомы, группа ТК, а также комбинированным параметрам, включающим в себя ТК и профиль глобального метилирования клеток, группа ТК и метилирование.

Fig. 4. Patients recurrence-free survival comparison with meningioma in different diagnostic groups using the Kaplan-Meier method. This figure shows curves for patients with a favorable prognosis according to the classic WHO histopathological criteria, i.e., pathohistology group, global cell methylation profile, methylation group, meningioma cell cluster types (CT), CT group, as well as combined parameters including CT and global cell methylation profile, CT group and methylation.

ТК позволяет существенно повысить точность определения прогноза для пациентов. При этом применение комплексного подхода, включающего в себя другой важный метод функциональной оценки состояния опухолевых клеток в виде профилирования статуса метилирования в сочетании с предложенным нами диагностическим инструментом позволяет получить наибольшую прогностическую ценность. Дальнейшее развитие подобных комплексных подходов с потенциальным включением других перспективных молекулярных методов выявления тонких характеристик функционального статуса клеток позволит достичь принципиально нового качества диагностического процесса.

Литература

(п.п. 1-6; 9-12 см. References)

7. Никитин П.В., Галстян С.А., Мусина Г.Р., Зубова И.В., Хохлова Е.А. Распределение клеточных кластеров в различных гистологических подтипах менингиом. *Современные проблемы науки и образования*. 2020; 2. doi: 10.17513/spno.29683
8. Никитин П.В., Мусина Г.Р., Галстян С.А., Зубова И.В., Хохлова Е.А. Молекулярные свойства различных типов клеточных кластеров в менингиомах и их влияние на прогноз пациентов. *Современные проблемы науки и образования*. 2021, 5. doi: 10.17513/spno.31068

References

1. Birzu C., Peyre M., Sahn F. Molecular alterations in meningioma: prognostic and therapeutic perspectives. *Curr Opin Oncol*. 2020; 32: 613-22. doi: 10.1097/CCO.0000000000000687
2. Buerki R.A., Horbinski C.M., Kruser T., Horowitz P.M., James C.D., Lukas R.V. An overview of meningiomas. *Future Oncol*. 2018; 14: 2161-77. doi: 10.2217/fon-2018-0006

3. Robert S.M., Vetsa S., Nadar A., Vasandani S., Youngblood M.W., Gorelick E., et al. The integrated multiomic diagnosis of sporadic meningiomas: a review of its clinical implications. *J Neurooncol*. 2022; 156: 205-14. doi: 10.1007/s11060-021-03874-9
4. Bi W.L., Zhang M., Wu W.W., Mei Y., Dunn I.F. Meningioma Genomics: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Applications. *Front Surg*. 2016; 3: 40. doi: 10.3389/fsurg.2016.00040
5. Yuzawa S., Nishihara H., Yamaguchi S., Mohri H., Wang L., Kimura T., et al. Tclinical impact of targeted amplicon sequencing for meningioma as a practical clinical-sequencing system. *Mod Pathol*. 2016; 29: 708-16. doi: 10.1038/modpathol.2016.81
6. Ma J., Hong Y., Chen W., Li D., Tian K., Wang K., et al. High Copy-Number Variation Burdens in Cranial Meningiomas From Patients With Diverse Clinical Phenotypes Characterized by Hot Genomic Structure Changes. *Front Oncol*. 2020; 10: 1382. doi: 10.3389/fonc.2020.01382
7. Nikitin P.V., Galstyan S.A., Musina G.R., Zubova I.V., Khokhlova E.A. Cell clusters distribution of in different histological subtypes of meningiomas. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2020; 2. (in Russian). doi: 10.17513/spno.29683
8. Nikitin P.V., Musina G.R., Galstyan S.A., Zubova I.V., Khokhlova E.A. Molecular properties of different types of cell clusters in meningiomas and their influence on the prognosis of patients. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2021; 5. (in Russian). doi: 10.17513/spno.31068
9. Gendreau J.L., Chow K.Kh., Sussman E.S., Iyer A., Pendharker A.V., Ho A.L. DNA methylation analysis for the treatment of meningiomas. *J Vis Surg*. 2017; 3: 178. doi: 10.21037/jovs.2017.11.01
10. Sahn F., Schrimpf D., Stichel D., Jones D.T.W., Hielscher T., Scheffzyk S., et al. DNA methylation-based classification and grading system for meningioma: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol*. 2017; 18: 682-94. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30155-9
11. Nowosielski M., Galldiks N., Iglseeder S., Kickingereeder P., von Deimling A., Bendszus M., et al. Diagnostic challenges in meningioma. *Neuro Oncol*. 2017; 19: 1588-98. doi: 10.1093/neuonc/nox101
12. Constância V., Nunes S.P., Henrique R., Jerónimo C. DNA Methylation-Based Testing in Liquid Biopsies as Detection and Prognostic Biomarkers for the Four Major Cancer Types. *Cells*. 2020; 9: 624. doi: 10.3390/cells9030624

Сведения об авторах:

Никитин Павел Владимирович, руководитель лаб., ФГБУ «ФЦ мозга и нейротехнологий» ФМБА, e-mail: nikitinpaulv@yandex.com;

Мусина Гузель Раилевна, науч. сотр., Сколтех, redseadog@gmail.com;

Полозов Валерий Николаевич, науч. сотр., Сколтех, valerypolozov@yahoo.com;

Красновский Владимир Михайлович, науч. сотр., Сколтех, karlssonwst@gmail.com;

Николаев Виктор Николаевич, мл. науч. сотр., Сколтех, Москва, Россия, nikolaevvin@bk.ru

Вопросы преподавания

© Коллектив авторов, 2023

УДК 378.146

Акулинин В.А., Авдеев Д.Б., Сергеева Е.Д., Барашкова С.А., Цускман И.Г., Шоронова А.Ю.

Адаптация «Анатомического атласа «Пирогов» и «Aperio ImageScore» – программного обеспечения для интерактивной сенсорной панели в учебном процессе

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

Цель – рассмотрение возможности и оценка практического значения использования программного обеспечения «Анатомический атлас «Пирогов» и «Aperio ImageScore» на интерактивной сенсорной панели в системе высшего медицинского образования для систематизации основополагающих медицинских сведений и современного анализа данных студентами в учебном процессе.

Методика. При исследовании функционала программ применялась совокупность сравнительного анализа, описательного и библиографического методов, а также компьютерной 3D визуализации, которая позволила досконально изучить преимущества указанных учебно-информационных систем. Было отсканировано также 76 гистологических препаратов из архива кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета и 42 препарата предоставленные ФГБОУ ВО «ВМА им. С.М. Кирова». Сканирование проводилось с помощью специального микроскоп-сканирующего оборудования «Leica Aperio CS2».

Результаты. «AperioImageScore» может использоваться как для групповых, так и для индивидуальных занятий, а также при самостоятельной работе обучающихся. Функция сравнительного анализа описания строения различных гистологических структур, масштабирование, возможность делать отметки и подписи на изучаемом изображении способствуют визуальному представлению и детальному изучению сложноорганизованных гистологических структур. Узкоспециализированное программное обеспечение «Анатомический атлас «Пирогов» обладает встроенной базой трёхмерных сцен для проведения цифрового препарирования, которое может также сопровождаться разворотом и детальным просмотром объекта в 3D пространстве наряду с послойным изучением анатомических систем и частей тела человека, долевого и внутриоргана макро- и микроскопического строения. Программа позволяет преподавателям самостоятельно моделировать тесты, соотносить вопросы с конкретными 3D-моделями, и подключать автоматизированную проверку выполненных заданий.

Заключение. Предложенные программы, дают возможность использовать более широкий диапазон визуализации при изучении материала, который в свою очередь представляется более систематизированным, лучше усваивается и легче анализируется обучающимися, а также заметно повышает интерес к содержанию дисциплины, что улучшает профессиональную подготовку будущего специалиста.

Ключевые слова: интерактивная сенсорная панель; программа; «Анатомический атлас «Пирогов»; «Aperio ImageScore»

Для цитирования: Акулинин В.А., Авдеев Д.Б., Сергеева Е.Д., Барашкова С.А., Цускман И.Г., Шоронова А.Ю. Адаптация «Анатомического атласа «Пирогов» и «Aperio ImageScore» – программного обеспечения для интерактивной сенсорной панели в учебном процессе. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(1): 133-140.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.133-140

Участие авторов. Все авторы публикации внесли значимый вклад в проведение аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, выразили согласие нести ответственность за все аспекты работы. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

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

Финансирование. Работа выполнена по инициативе авторов при поддержке ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.09.2022

Принята к печати 26.01.2023

Опубликована 17.03.2023

Akulinin V.A., Avdeev D.B., Sergeeva E.D., Barashkova S.A., Tsuskman I.G., Shoronova A.Yu.

Adaptation of the *Anatomical Atlas «Pirogov»* and *Aperio ImageScope* software for an interactive touch panel in the educational process

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

Aim. To consider the possibility and practical significance of using the *Anatomical Atlas «Pirogov»* and *Aperio ImageScope* software on an interactive touch panel in the higher medical education system for the systematization of basic medical information and current data analysis by medical university students.

Methods. When studying the functionality of the programs, a combination of comparative analysis, descriptive and bibliographic methods, and 3D computer visualization was used. This allowed us to thoroughly study the advantages of these educational and information systems. 76 histological preparations from the archive of the Department of Histology, Cytology and Embryology of the Omsk State Medical University and 42 preparations provided by the Kirov Military Medical Academy were scanned with a special microscope, Leica Aperio CS2.

Results. The *Aperio ImageScope* can be used for both group and individual classes or for independent work by students. The comparative analysis of various histological structures, scaling, and the option of making marks on the image, greatly contribute to the visual representation and the detailed study of complex histological structures. The highly specialized *Anatomical Atlas «Pirogov»* software has a built-in database of three-dimensional images for digital dissection. The dissection can also be accompanied by a 3D rotation and detailed viewing of the object, along with a layered study of the anatomical systems and parts of the human body, including lobular and intra-organ macro- and microscopic structure. Using this program, teachers can independently model tests, correlate questions with specific 3D models, and enable automated verification of completed tasks.

Conclusion. The proposed programs make it possible to use a wider range of visualization when studying the material. The study, in turn, becomes more systematic, and the material is more firmly remembered and easier to analyze by students. The programs also significantly increase the students' interest in the subject, and, as a result, improve their professional preparation of their future specialty.

Keywords: interactive touch panel; program; *Anatomical Atlas «Pirogov»*; *Aperio ImageScope*

For citation: Akulinin V.A., Avdeev D.B., Sergeeva E.D., Barashkova S.A., Tsuskman I.G., Shoronova A.Yu. The use of the software "Adaptation of the "Anatomical Atlas «Pirogov» and "Aperio ImageScope" – software for an interactive touch panel in the educational process. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(1): 133-140. (in Russian).
DOI: 10.25557/0031-2991.2023.01.133-140

Author's contribution: All authors of the publication made meaningful contributions to the analysis and preparation of the article, read and approved the final version of the article before publication, and agreed to be responsible for all aspects of the work. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Dmitry B. Avdeev*, candidate of veterinary science, e-mail: avdeev86@inbox.ru

Information about the authors:

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

Barashkova S.A., <https://orcid.org/0000-0002-7578-0625>

Sergeeva E.D., <https://orcid.org/0000-0002-6248-5838>

Tsuskman I.G., <https://orcid.org/0000-0003-3667-7905>

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

Shoronova A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-0936-3137>

Financing. The work was carried out on the initiative of the authors with the support of the Federal State Budgetary Educational Institution of OmSMU of the Ministry of Healthcare of Russian Federation.

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

Received 09.09.2022

Accepted 26.01.2023

Published 17.03.2023

Введение

На современном технологическом этапе возможность повышения качества педагогического процесса в высшем образовательном учреждении во многом определяется соответствующим выбором программных инструментов.

В связи с узкой спецификой преподаваемых дисциплин в медицинских вузах и альтернативой дорогостоящей разработки новых специализированных лицензионных программ, одним из средств является адаптация имеющихся разработок на рынке инфор-

мационных технологий к конкретным целям высшего образовательного процесса.

Внедрение современных образовательных интеграций и технологий в учебный процесс медицинских учреждений стали неотъемлемой частью для освоения информации и понимания глубин биологических процессов на базовых морфологических кафедрах: анатомия и топографическая анатомия, гистология и патологическая анатомия, физиология и патологическая физиология и другие [1–7].

Одной из главных проблем у обучающихся в традиционном учебном процессе является недостаточный уровень мотивации к запоминанию материала, освоению необходимых компетенций, а также недостаточная материальная и техническая оснащённость [8], что подталкивает преподавательское сообщество к совместному обсуждению насущных проблем и поиску эффективных решений, направленных на улучшение освоения материала у обучающихся.

Сложный и объёмный учебный материал, содержащий огромный пласт научных данных, теперь может быть комплексно объединён на базе современных образовательных программ, что способствует более быстрому усвоению информации студентами, за счёт удержания внимания на основе искреннего интереса и комплексного представления и восприятия всех взаимодействующих систем в организме как единое целое.

Посредством интерактивной сенсорной панели с диагональю 65 дюймов (разрешение 4K UHD) было решено внедрить и адаптировать обучающие программы «Анатомический атлас «Пирогов» и «Aperio ImageScore» под учебные цели, компетенции, рабочие программы, а также под научные направления кафедр, согласно всем государственным стандартам для подготовки будущих врачей [9].

Внедрение данных программ в образовательный процесс формирует большой педагогический междисциплинарный опыт, что открывает новые горизонты и взгляды на улучшение современного образовательного процесса в XXI веке.

Методика

Методы, применяемые для достижения поставленных целей и задач, в числе которых исследование функционала программ «Анатомический атлас «Пирогов» и «Aperio ImageScore», установленных на интерактивную сенсорную панель, были задействованы в том числе для усовершенствования организации учебного процесса на морфологических кафедрах с перспективой перехода на клинические кафедры. Совокупность

использования сравнительного анализа, описательного и библиографического методов, а также компьютерной 3D визуализации позволила досконально изучить преимущества указанных выше учебно-информационных систем.

Подготовительный этап работы включал в себя сканирование гистологических препаратов на специальном микроскоп-сканирующем оборудовании «Leica Aperio CS2» высококачественных цифровых слайдов для учебного процесса, а также ряда экземпляров препаратов для научного направления. Из архива кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Омского государственного медицинского университета было отсканировано 76 гистологических препаратов и 42 препарата были предоставлены ФГБОУ ВО Военно-медицинской академией им. С.М. Кирова.

Результаты и обсуждение

«Aperio ImageScore» – программное средство для просмотра и изучения строения тканей. Загружаемое программное обеспечение на интерактивную сенсорную панель для просмотра ImageScore даёт широкий ряд преимуществ. Быстрый доступ к чётким полноцветным цифровым гистологическим изображениям, для которых можно регулировать увеличение, панорамирование и масштабирование, сравнивать различные участки, комментировать интересующие области, выполнять анализ гистологических срезов в микро- и субмикроскопическом масштабе. Данная программа может быть использована как индивидуально обучающимся, так и при работе в группе, поэтому расширяется возможность самостоятельной работы обучающихся.

Удобство в использовании данного программного приложения появляется уже при бесплатном скачивании с сайта по данной ссылке: <https://www.leicabiosystems.com/digital-pathology/manage/aperio-imagescore/>. Затем необходимо выполнить установку программы под ваши параметры на интерактивную сенсорную панель, что занимает несколько минут.

По команде (File, OpenImage) может открываться для изучения как один гистологический препарат, так и несколько. Опция сравнительного анализа описания строения различных гистологических структур выбранных препаратов (Window, TileHorizontal или TileVertical) помогает студентам лучше осваивать и понимать материал, не путать между собой изучаемые микроскопические структуры, отмечать их особенности и различия (рис. 1).

Обучающимся при работе с изображениями также удобно пользоваться узконаправленной функци-

ей поворота расположения гистологических препаратов (Image, RotateImage – 0 Degrees), меняя таким образом угол обзора и просмотра (рис. 2).

Цифровое изображение можно масштабировать, а именно приближать или уменьшать (Zoom) изучаемые морфологические структуры тканей. Это, в свою очередь, даёт возможность визуально представить и разобрать сложную пространственно-временную и структурно-организационную систему, а также детально изучить конкретную интересующую область (рис. 3).

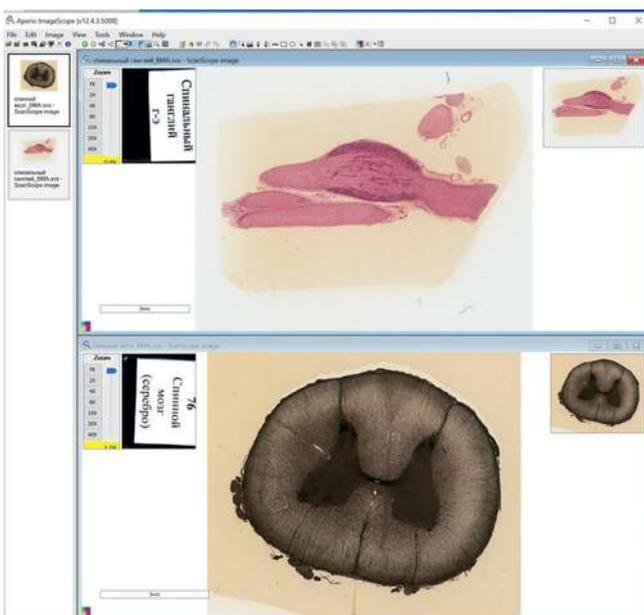


Рис. 1. Одновременное размещение группы микроскопических гистологических изображений на экране.

Fig. 1. Simultaneous placement of a group of microscopic histological images on the screen.

В «Aperio ImageScope» студенты могут самостоятельно указывать цифровые значения (нажать на значок решётка (CounterTool – F9)), делать отметки и подписи (нажать View, а затем Annotations – DetailedView) на гистологическом изучаемом изображении, что способствует лучшему запоминанию и усвоению материала. После нажатия на значок «глазок» все сделанные ранее подписи скрываются, а обучающиеся могут индивидуально провести проверку полученных знаний и таким образом подготовиться к промежуточному контролю. Нарисовать стрелку, форму, указывающую на интересующую область, как воспользовавшись программой «Aperio ImageScope», так и ограничиться только функционалом встроенной интерактивной сенсорной панели (рис. 4).

Именно в программе «AperioImageScope» возможно проведение морфометрического изучения объектов. Достаточно нажать на значок «линейка» (RulerTool – F4)), далее с помощью стилуса выбираем необходимые для измерения структуры, указывая поочередно начальную и конечную точки морфометрических показателей изучаемых структурных элементов (рис. 5).

Новое узкоспециализированное лицензионное программное обеспечение для учебного процесса «Анатомический атлас «Пирогов», установленное на интерактивную сенсорную панель, представляет собой интерактивный обучающий инструмент крайне эффективный при изучении дисциплин естественно-научного цикла, прежде всего, морфологических и не менее актуально в преподавании клинических дисциплин. Возможности использования данного продукта допускают выстраивание последовательности освоения учебного курса от первичного визуального ознакомления с анатомическим материалом и представления текстовых данных до контроля качества при-

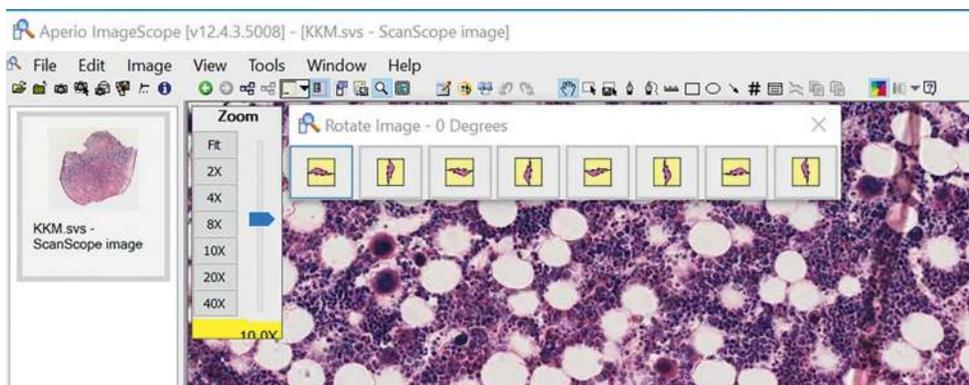


Рис. 2. Поворот гистологического изображения.

Fig. 2. Rotation of the histological image.

обретённых знаний в совокупности с автоматической обработкой результатов.

При помощи двух стилусов, входящих в комплект интерактивной сенсорной панели, проведение учебно-

го процесса цифрового препарирования может сопровождаться также разворотом и детальным просмотром объекта в 3D пространстве, что также включает в себя послойное изучение анатомии, систем и частей тела человека, долевого и внутриорганный макро- и микроскопического строения, моделирование анатомических срезов, получение информации об объекте на русском, английском и латинском языках (рис. 6).

Одновременное использование функции встроенной базы трёхмерных сцен в программе «Анатомический атлас «Пирогов» и штатной функции одновременного письма до 32-для Windows в интерактивной сенсорной панели открывает возможности как для изучения уже готового набора сцен по регионам, системам и органам чувств, так и предоставляет инструменты для построения собственных сцен по темам, которые соответствуют различным блокам системной образовательной цифровой интеграции (рис. 7).

Специальная программа EShare для Windows и Android, установленная на интерактивную сенсорную панель, помогает создать общую систему из мобильных устройств, подключённых к одной беспро-

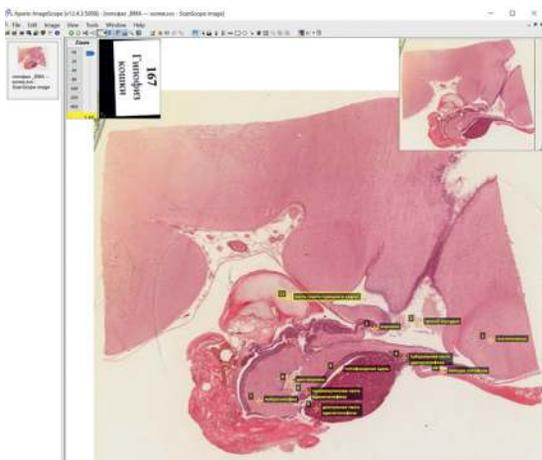


Рис. 3. Масштабирование гистологических изображений.

Fig. 3. Scaling histological images.

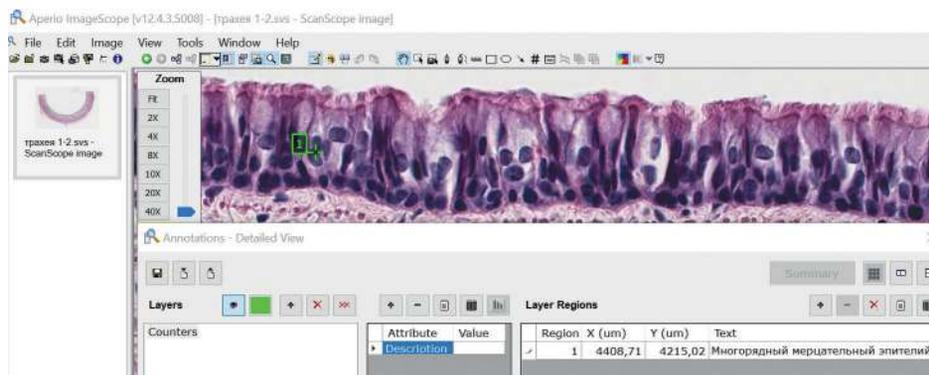


Рис. 4. Пример обозначения гистологической структуры.

Fig. 4. Example of a histological structure designation.

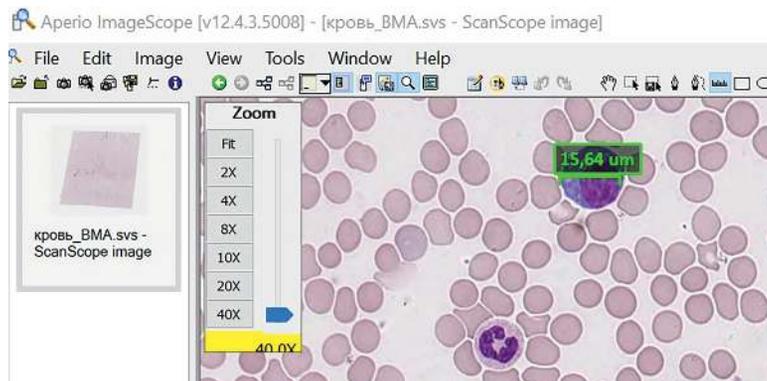


Рис. 5. Измерение размеров гистологической структуры.

Fig. 5. Measurement of the size of the histological structure.

водной сети, в которой обучающиеся делятся сценами, полученными в программе «Анатомический атлас «Пирогов». Совместный просмотр и обсуждение сцен, а также снимков с гистологических препаратов позволяет сравнивать между собой нормотипичные образцы, органы и патологию (рис. 8).

Преподаватели могут самостоятельно моделировать тесты, при этом любой сформулированный во-

прос и соответствующий ответ могут быть привязаны к 3D-модели, а автоматизированная проверка тестов позволяет освободить педагогов от рутинной работы, чтобы разобрать сложный в изучении морфологический материал. Немаловажным является возможность коллективного обсуждения тестовых вопросов, выводимых на интерактивную сенсорную панель.

При освоении обучающимися клинических дисциплин может быть удобно использование описанных выше программ совместно с образовательной платформой «Moodle» на интерактивной сенсорной панели. Одновременное задействование применяется для демонстрации двухмерных рисунков анатомических атласов, для анализа и контроля, а встроенные режимы, включающие норму и патологию, клиническую диагностику (компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, ультразвуковое исследование), выступают в качестве полезного визуального средства для обучения и погружения в специальность [10–12].

Размеры интерактивной сенсорной панели с диагональю: 165.1 см., шириной: 143.9 см, высотой: 80.94 см, позволяют преподавателю, находясь рядом с данной панелью в учебной комнате, без затруднений показывать, рисовать, делать отметки при помощи двух стилусов, создавать скриншоты (lightshot, или встроенная в систему интерактивной сенсорной панели функция скриншот), проводить контроль и пользоваться всеми опциями программ и панели, а присутствующие под любым углом получают чёткую цифровую картинку с информацией для анализа и визуализации (рис. 9).



Рис. 6. Цифровое препарирование двумя стилусами.

Fig. 6. Digital dissection with two styluses.

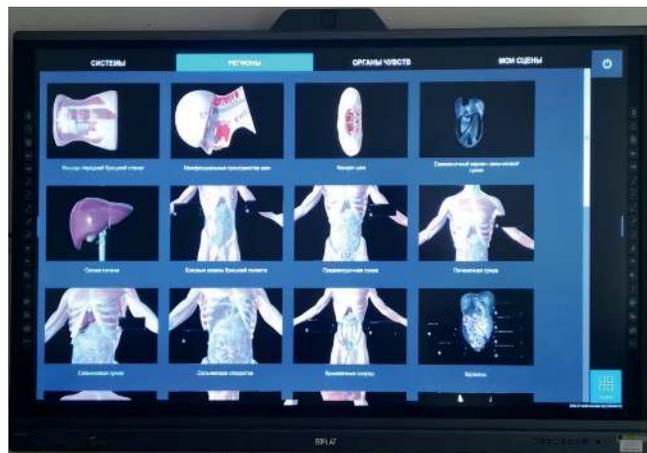


Рис. 7. Трёхмерные сцены «Анатомический атлас «Пирогов».

Fig. 7. Three-dimensional scenes "Anatomical atlas "Pirogov".

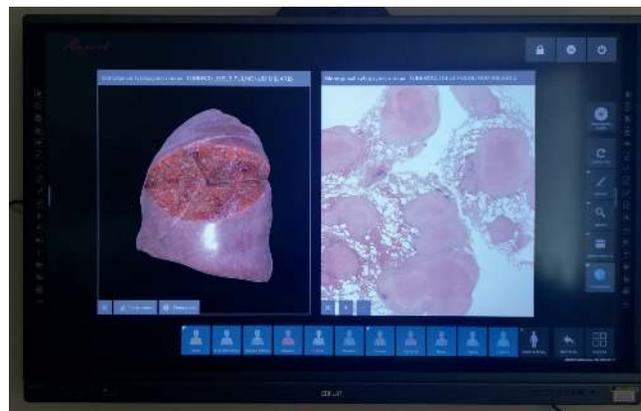


Рис. 8. Выбор макро- и микроскопической сцен на экране интерактивной панели.

Fig. 8. Selection of macro and microscopic scenes on the interactive panel screen.

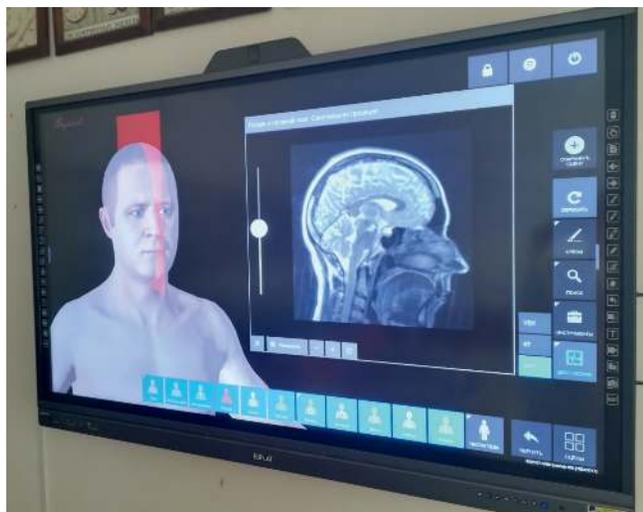


Рис. 9. Пример снимка магнитно-резонансной томографии.

Fig. 9. Example of magnetic resonance imaging.

Заключение

Опыт использования программ «Анатомический атлас «Пирогов» и «Aperio ImageScore» на интерактивных сенсорных панелях при реализации дисциплины Гистология, эмбриология, цитология у студентов, осваивающих программы Лечебное дело, Педиатрия, Медико-профилактическое дело, Стоматология в ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России показал возможность цифровой трансформации образовательного процесса при сохранении традиционных подходов к изучению морфологии.

Использование интерактивных сенсорных панелей на лекционных и семинарских занятиях позволяет повысить эффективность учебного процесса, улучшить качество преподавания благодаря использованию технологий, способных максимально вовлечь обучающихся в образовательную деятельность.

Универсальность предлагаемых мультимедийных средств обучения позволяет использовать внедрённые программные продукты и на клинических кафедрах, интегрируя сведения об анатомических и гистофизиологических характеристиках органов и их систем с клиническими проявлениями патологических состояний.

Выступая посредником между преподавателем и студентом, современный интерактивный продукт вовлекает и погружает последнего в более глубокое изучение базовых медицинских знаний, делает более привлекательными научные исследования. Широкий функционал программ помогает в развитии и укреплении у обучающихся навыков изучения, управле-

ния, анализа полученных данных, построении выводов и заключений.

Объективная оценка результативности опыта использования программ «Анатомический атлас «Пирогов» и «Aperio ImageScore» на интерактивных сенсорных панелях при реализации дисциплины Гистология, эмбриология, цитология может быть получена в рамках ежегодной внутренней оценки качества образовательной деятельности и подготовки обучающихся при проведении диагностических работ и оценивании обучающимися условий, содержания, организации и качества образовательного процесса в ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России.

Литература

(п.п. 4 – 6 см. Referensec)

1. Колсанов А.В., Иванова В.Д., Гелашвили О.А., Назарян А.К. Интерактивный анатомический стол «Пирогов» в образовательном процессе. *Оперативная хирургия и клиническая анатомия (Пироговский научный журнал)*. 2019; 3(1): 39-44. DOI 10.17116/orehirurg2019301139
2. Котельников Г.П., Колсанов А.В., Иванова В.Д. и др. Новые методологические подходы в анализе и синтезе морфологических данных (anatomia in silico). *Морфология*. 2017; 152(4): 74-8.
3. Воронин А.С. Виртуализация процесса преподавания морфологических дисциплин. *Аспирантские чтения – 2018: Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием*, Самара, 24 октября 2018 года. 2018; 184-5.
7. Павлов А.В., Филимонов В.И., Горшков М.Д. и др. Сравнительный анализ различных методов оценки мануальных навыков по эндоскопической хирургии в рамках организации полуфинала XXVII Всероссийской студенческой олимпиады по хирургии им. акад. М.И. Перельмана. *Виртуальные технологии в медицине*. 2018; 2(20): 28-9.
8. Шевлюк Н.Н., Стадников А.А., Блинова Е.В. Состояние, проблемы и перспективы использования цифровых информационных технологий в образовательном процессе на кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии медицинского вуза. *Медицинская наука и образование Урала*. 2022; 23 (1(109)): 196-9. – DOI 10.36361/1814-8999-2022-23-1-196-199
9. Акулинин В.А., Одинцова И.А., Макарьева Л.М., Коржук М.С. и др. Опыт работы со сканированными учебными гистологическими препаратами с использованием интерактивной панели. *Цитология*. 2022; 64(3); 270.
10. Колсанов А.В., Иванова В.Д., Назарян А.К. и др. Вариантная трёхмерная анатомия почечных артерий: клиническое применение. *Морфологические ведомости*. 2016; 24(4): 46-52.
11. Авдеев Д.Б., Барашкова С.А., Сергеева Е.Д. и др. Использование системы управления «Moodle» для организации текущего контроля и анализа освоения дисциплины «гистология, эмбриология, цитология». *Научное обозрение. Педагогические науки*. 2022; 1: 25-31.
12. Коровко И.А., Солкин А.А. Опыт онлайн-обучения на кафедре неврологии и нейрохирургии ВГМУ в период пандемии COVID-19. *Медицинское образование XXI века: информационные*

компьютерные технологии при подготовке медицинских кадров: Сборник материалов Международной научно-практической конференции, Витебск, 23 декабря 2021 года. 2021; 171-3.

References

- Kolsanov A.V., Ivanova V.D., Gelashvili O.A., Nazaryan A.K. A Pirogov interactive anatomical table in the educational process. *Operativnaya khirurgiya i klinicheskaya anatomiya (Pirogovskiy nauchnyy zhurnal)*. 2019; 3(1): 39-44. (in Russian). DOI 10.17116/operhirurg2019301139
- Kotelnikov G.P., Kolsanov A.V., Ivanova V. D., et al. New methodological approaches in the analysis and synthesis of morphological data (aratomia in silico). *Morphology*. 2017; 152(4): 74-8. (in Russian)
- Voronin A.S. Virtualization of the process of teaching morphological disciplines. [*Aspirantskie chteniya – 2018: Materialy vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem*]. 2018; 184-5. (in Russian)
- Staniszewski W. Virtual microscopy, data management and image analysis in Aperio ScanScope system. *Folia Histochem Cytobiol*. 2009; 47(4): 699-701. doi: 10.2478/v10042-009-0115-y. PMID: 20430741
- Janin A, Legrès L, Leboeuf C, Scaozec JY, Bertheau P. Les lames virtuelles en recherche expérimentale et en recherche clinique [Virtual slides in fundamental and clinical research]. *Med Sci (Paris)*. 2012 Nov;28 (11): 990-2. doi: 10.1051/medsci/20122811020. Epub 2012 Nov 12. PMID: 23171905.
- Marinaccio C, Ribatti D. A simple method of image analysis to estimate CAM vascularization by APERIO ImageScope software. *Int J Dev Biol*. 2015; 59(4-6): 217-9. doi: 10.1387/ijdb.150025dr. PMID: 26505255
- Pavlov A.V., Filimonov V.I., Gorshkov M.D., et al. Comparative analysis of various methods of assessment of manual skills in endoscopic surgery in the framework of the organization of the semi-final of the XXVII All-Russian Student Olympiad in Surgery named after academician M.I. Perelman. *Virtual'nye tekhnologii v meditsine*. 2018; 2(20): 28-29. (in Russian)
- Shevlyuk N.N., Stadnikov A.A., Blinova E.V. State, problems and prospects of using digital information technologies in the educational process at the department of histology, cytology and embryology of the medical university. *Meditsinskaya nauka i obrazovanie Urala*. 2022; 23(1(109)): 196-19. DOI 10.36361/1814-8999-2022-23-1-196-199 (in Russian)
- Akulinin V.A., Odintsova I.A., Makarieva L.M., Korzhuk M.S., et al. Experience working with scanned educational histological preparations using an interactive panel. *Tsitologiya*. 2022; 64(3): 270. (in Russian)
- Kolsanov A.V., Ivanova V.D., Nazaryan A.K., et al. Variant three-dimensional anatomy of the renal arteries: the clinical application. *Morphological newsletter*. 2016; 24(4): 46-52. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2016.24\(4\):46-52](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2016.24(4):46-52). (in Russian)
- Avdeev D.B., Barashkova S.A., Sergeeva E.D., et al. Using the “Moodle” management system to organize the current control and analysis of the discussion “histology, embryology, cytology”. *Scientific review. Pedagogical sciences*. 2022; 1: 25-31. (in Russian)
- Korovko I.A., Solkin A. A. Experience of online training at the Department of Neurology and Neurosurgery of VSMU during the COVID-19 pandemic. [*Meditsinskoe obrazovanie XXI veka: informatsionnye komp'yuternye tekhnologii pri podgotovke meditsinskikh kadrov: Sbornik materialov Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii*]. Vitebsk, 23 dekabrya 2021 goda. 2021; 171-3. EDN SUFWMO. (in Russian)

Сведения об авторах:

Акулинин Виктор Александрович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, e-mail: akulinin@omsk-osma.ru;

Авдеев Дмитрий Борисович, канд. вет. наук, доцент каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, e-mail: avdeev86@inbox.ru;

Сергеева Елена Дмитриевна, канд. мед. наук, доцент каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, e-mail: chisteld@mail.ru;

Барашкова Светлана Алексеевна, канд. мед. наук, доцент каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, e-mail: barsvet@gmail.com;

Цускман Ирина Геннадьевна, канд. вет. наук, доцент каф. гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, e-mail: ira.tsuskman@mail.ru;

Шоропова Анастасия Юрьевна, очный аспирант, ассистент каф. гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, e-mail: nastasya1994@mail.ru