

Свидетельство о регистрации СМИ:
ПИ № ФС77-84858
от 21 марта 2023 г. выдано
Федеральной службой по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых
коммуникаций (Роскомнадзор)

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 10.06.2023
Подписано к печати 22.06.2023
Опубликовано 27.06.2023

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 № 2. 1–136.

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

«НИИ Общей патологии и патофизиологии»
Общество патофизиологов

ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

Ежеквартальный рецензируемый научно-практический журнал
Основан в 1957 г.

Том 67 № 2 · 2023

Апрель–Июнь

Главный редактор:

А.М. Дыгай, акад. РАН, д.м.н., проф., НИИОПП, Москва

Зам. главного редактора:

И.С. Гуцин, 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
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
М.В. Осиков, д.м.н., проф., ЮУГМУ, Челябинск
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

Certificate of registration MASS MEDIA: PI NO. F577-84858 dated March 21, 2023, issued by Federal Service for Supervision in the sphere of communications, information technology and mass Federal Service for Supervision in the Sphere of Telecom and Information Technologies and Mass Communications (Roskomnadzor)

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 10.06.2023
Signed for publication on 22.06.2023
Published on 27.06.2023

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 2. 1-136.

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 Society of Pathophysiologists

With the support of the Research Institute of General Pathology and Pathophysiology

PATOLOGICHESKAYA FIZIOLOGIYA I EKSPERIMENTAL'NAYA TERAPIYA

Pathological physiology and experimental therapy

Quarterly reviewed science and practical journal

Published since 1957

Vol. 67 № 2 · 2023

April–June

Editor-in-chief:

A.M. Dygay, Acad. RAS, DSc, Prof., Inst. of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

Deputy chief editors:

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

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

M.V. Osikov, DSc, Prof., South Ural State Medical Univ.

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

- Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф.** Старение по-разному влияет на функциональную активность и экспрессию генов классических калиевых каналов внутреннего выпрямления KIR2.1 и KIR2.4 АТФ-чувствительных K_{ATP} каналов в сосудах и сердце крыс-самцов 5
- Сергеева Е.А., Метелкин А.А., Соколовская А.А.** Исследование экспрессии циклинов клеточного цикла в мегакариобластной клеточной линии человека, при воздействии моделированной микрогравитации 17
- Лукина С.С., Пронина И.В., Бурдённый А.М., Филиппова Е.А., Казубская Т.П., Кушлинский Н.Е., Брага Э.А., Логинов В.И.** Аберрантная экспрессия группы длинных некодирующих РНК при раке яичников 26
- Осиков М.В., Антонов В.Н., Зотов С.О., Чулков В.С.** Роль полиморфизма генов *F2*, *F5*, *FGB* и *PAI-1* в изменении гемостаза у больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких 33
- Смоляков Ю.Н., Кузник Б.И., Лукьянов С.А., Шаповалов К.Г.** Оценка эффективности иммунокорректирующей терапии при среднетяжелом и тяжелом течении COVID-19 42
- Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Цорин И.Б., Крыжановский С.А., Середенин С.Б.** Сравнительное изучение антиаритмической активности анксиолитиков – производных бензодиазепаина и бензимидазола на модели электрической фибрилляции желудочков сердца .. 52
- Чепелев С.Н., Висмонт Ф.И., Губкин С.В.** Участие L-лактата в реализации кардиопротекторного эффекта дистантного ишемического посткондиционирования у молодых и старых крыс 58
- Котиева И.М., Франциянц Е.М., Гулян М.В., Шлык С.В., Дроботья Н.В., Котиева Е.М., Антонян Б.Г., Додохова М.А.** Изменение соотношения свободных факторов неогемангио- и неолимфангиогенеза как патогенетический механизм суперагрессии меланомы v_{16}/f_{10} при моделировании хронической нейропатической боли 65
- Михайличенко М.И., Физгурский С.А., Шаповалов К.Г., Мудров В.А., Михайличенко Ю.В.** Патогенетическое значение миодеструкции в нарушении микроциркуляции при отморожениях 71
- Лупанова И.А., Мизина П.Г., Ферубко Е.В., Мясникова С.Б.** Изучение фармакологической активности экстрактов из суспензионных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой 77
- Слаутин В.Н., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Базарный В.В., Валамина И.Е.** Антифибротическое действие Фукоксантина на модели тетрахлорметан-индуцированного фиброза печени 86

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F.** Aging has different effects on the functional activity and gene expression of classical inward-rectifying potassium channels Kir2.1 and Kir2.4 and ATP-sensitive K_{ATP} channels in blood vessels and heart of male rats
- Sergeeva E.A., Metelkin A.A., Sokolovskaya A.A.** Expression of cell cycle cyclins in human megakaryoblast cell line exposed to simulated microgravity
- Lukina S.S., Pronina I.V., Burdennyu A.M., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., Kushlinskii N.E., Braga E.A., Loginov V.I.** Aberrant expression of a long non-coding RNAs group in ovarian cancer
- Osikov M.V., Antonov V.N., Zotov S.O., Chulkov V.S.** Role of F2, F5, FGB, and PAI-1 gene polymorphisms in changes of hemostasis in patients with COVID-19-associated lung injury
- Smolyakov Yu.N., Kuznik B.I., Lukyanov S.A., Shapovalov K.G.** Assessment of the effectiveness of immunocorrective therapy in moderate and severe COVID-19
- Stolyaruck V.N., Vititnova M.B., Tsorin I.B., Kryzhanovskiy S.A., Seredenin S.B.** A comparative study of the antiarrhythmic activity of anxiolytics, benzodiazepine and benzimidazole derivatives in a model of electrical ventricular fibrillation
- Chepelev S.N., Vismont F.I., Goubkin S.V.** Participation of L-lactate in the cardioprotective effect of remote ischemic postconditioning in young and old rats
- Kotieva I.M., Franzyants E.M., Gulyan M.V., Shlyk S.V., Drobotya N.V., Kotieva E.M., Antonyan B.G., Dodokhova M.A.** Change in the ratio of free factors of neohemangio- and neolymphangiogenesis as a pathogenetic mechanism for melanoma B16/F10 superaggression in a model of chronic neuropathic pain
- Mikhailichenko M.I., Figsurski S.A., Shapovalov K.G., Mudrov V.A., Mikhailichenko Yu.V.** Pathogenetic significance of myodestruction in microcirculatory disorders in frostbites
- Lupanova I.A., Mizina P.G., Ferubko E.V., Mясnikova S.B.** Pharmacological activity of Panax ginseng and Sedum roseum cell culture extracts
- Slautin V.N., Grebnev D.Yu., Maklakova I.Yu., Bazarniy V.V., Valamina I.E.** Antifibrotic effect of fucoxanthin in tetrachloromethane-induced hepatic fibrosis

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Изможерова Н.В., Попов А.А., Антропова И.П., Кадников Л.И., Испавский В.Е., Шамбатов М.А., Браженко Г.Г., Салов Д.В.** Роль полиморфизма гена *T1565C*, кодирующего интегрин бета-3 в развитии тромботических событий и его влияние на эффективность антитромбоцитарной терапии 94
- Галимова С.Ш., Литвицкий П.Ф., Галимова Э.Ф., Мочалов К.С., Галимов Ш.Н.** Молекулярные аспекты патогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом 106
- Пальцын А.А., Гусева М.Н., Свиридкина Н.Б.** Интеллект в старости 112

МЕТОДИКА

- Степанова О.И., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х., Помыткин И.А., Онищенко Н.А., Каркищенко В.Н.** Способ неинвазивного изучения тканевых нарушений при сахарном диабете 2 типа у мышей *db/db* с помощью лазерной доплеровской флоуметрии..... 118

ПАМЯТИ УЧЕНОГО

- Цыган В.Н., Мамаева С.А.** Жизненный путь и научные труды академика В.К. Кулагина 130

CONTENTS

REVIEWS

- Izmozherova N.V., Popov A.A., Antropova I.P., Kadnikov L.I., Is-pavsky V.E., Shambatov M.A., Brazhenko G.G., Salov D.V.** The role of the *T1565C* gene polymorphism encoding integrin beta 3 in the development of thrombotic events and its influence on the efficiency of anti-platelet therapy 94
- Galimova S.Sh., Litvitsky P.F., Galimova E.F., Mochalov K.S., Galimov Sh.N.** Molecular aspects of the pathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome 106
- Paltsyn A.A., Guseva M.N., Sviridkina N.B.** Intelligence in old age 112

METHODS

- Stepanova O.I., Klesov R.A., Semenov Kh. Kh., Pomytkin I.A., Onishchenko N.A., Karkischenko V.N.** A method for non-invasive studying tissue disorders in type 2 diabetes mellitus in *db/db* mice using laser Doppler flowmetry 118

IN MEMORY OF THE SCIENTIST

- Zigan V.N., Mamaeva S.A.** The life path and scientific works of Academician V.K. Kulagina 130

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616.092

Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф.

Старение по-разному влияет на функциональную активность и экспрессию генов классических калиевых каналов внутреннего выпрямления KIR2.1 и KIR2.4 и АТФ-чувствительных K_{ATP} каналов в сосудах и сердце крыс самцов

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

Старение и связанные с ним дисрегуляционные процессы в артериях и сердце являются ведущими предикторами развития сердечно-сосудистых заболеваний. Важную роль в регуляции сократимости сосудов и миокарда играют ионные каналы.

Цель исследования – изучение влияния возраста на функциональную активность и экспрессию генов классических калиевых каналов внутреннего выпрямления *Kir2.1* и *Kir2.4*, а также K_{ATP} каналов в аорте и сердце крыс.

Методика. Эксперименты проводили на крысах самцах Wistar в возрасте 3 и 18 мес. Силу сокращения грудного отдела аорты измеряли в изометрическом режиме, экспрессию генов оценивали при помощи ПЦР анализа.

Результаты. Установлено, что у крыс в возрасте 18 мес в аорте снижается функциональная активность *Kir2.1* и *Kir2.4* каналов, в то время как уровень экспрессии этих каналов остается неизменным. В стареющих сердцах, напротив, выявлен высокий уровень экспрессии генов *Kir2.1* и *Kir2.4* каналов. Показано, что K_{ATP} каналы не влияют на серотонин-индуцированное сокращение аорты молодых крыс (3 мес), но вносят существенный вклад в развитие гиперчувствительности старых сосудов к вазоконстрикторному действию серотонина. Так, блокада K_{ATP} каналов глибенкламидом приводила к статистически значимому смещению зависимости «концентрация-эффект» на серотонин вправо только в аорте возрастных крыс. Выявлено возрастное снижение экспрессии генов порообразующей *Kir6.2* и регуляторной *Sur2* субъединиц K_{ATP} канала в аорте и, напротив, значительное повышение в сердце крыс.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о ранних возрастных изменениях функциональной активности калиевых каналов внутреннего выпрямления *Kir2.1* и *Kir2.4*, а также K_{ATP} каналов в аорте крыс самцов, которые в процессе дальнейшего старения сосудов могут способствовать развитию гипертензии. Предполагается, что гиперэкспрессия *Kir2.4* и *Kir2.1* каналов в стареющем сердце может инициировать нарушения сократительной функции миокарда и возникновение аритмий в старости, в то время как высокий уровень экспрессии субъединиц K_{ATP} является показателем компенсаторно-адаптивных процессов, направленных на повышение устойчивости миокарда к гипоксии и стрессу.

Ключевые слова: старение; аорта; сердце; калиевые *Kir2.1* и *Kir2.4* и K_{ATP} каналы; сократимость; экспрессия генов; мРНК

Для цитирования: Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф. Старение по-разному влияет на функциональную активность и экспрессию генов классических калиевых каналов внутреннего выпрямления *Kir2.1* и *Kir2.4* и АТФ-чувствительных K_{ATP} каналов в сосудах и сердце крыс самцов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(2): 5-16. DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.5-16

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Кожевникова Л.М.; сбор и обработка материала – Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф.; подготовка иллюстративного материала – Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф.; статистическая обработка материала – Суханова И.Ф.; написание текста – Кожевникова Л.М.; редактирование – Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Кожевникова Любовь Михайловна, e-mail: lubovmih@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № FGfU-2022-0008.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 31.03.2023

Принята к печати 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F.

Aging has different effects on the functional activity and gene expression of classical inward-rectifying potassium channels Kir2.1 and Kir2.4 and ATP-sensitive K_{ATP} channels in blood vessels and heart of male rats

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

Aging and related dysregulatory processes in the arteries and heart are the leading predictors of cardiovascular diseases. Ion channels play an important role in the regulation of vascular and myocardial contractility.

The aim of the study was to investigate the effect of age on the functional activity and gene expression of classical inward-rectifying potassium channels Kir2.1 and Kir2.4, as well as K_{ATP} channels in the aorta and heart of rats.

Methods. Experiments were performed on Wistar male rats at 3 and 18 months of age. The force of thoracic aorta contractions was measured isometrically, and the gene expression was assessed by PCR analysis.

Results. In the aorta of 18-month-old rats, the functional activity of Kir2.1 and Kir2.4 channels was reduced while the expression of these channels remained unchanged. In the aging hearts, on the contrary, the expression level of Kir2.1 and Kir2.4 channel genes was high.

The K_{ATP} channels had no effect on serotonin-induced aortic contractions in young, 3-month-old rats, but contributed significantly to the development of hypersensitivity of aging blood vessels to serotonin-induced vasoconstriction. Thus, blockade of K_{ATP} channels with glibenclamide led to a significant shift of the concentration-effect curve of serotonin to the right only for the aorta from old rats. Age-related decreases in the gene expression of pore-forming Kir6.2 and regulatory Sur2 subunits of the K_{ATP} channel were observed in the aorta, and, *vice versa*, significant increases in their expression were observed in the rat heart.

Conclusion. The study results indicated early age-related changes in the functional activity of Kir 2.1 and Kir 2.4 inward-rectifying potassium channels, as well as of K_{ATP} channels in the aorta of male rat. During further vascular aging, these changes may contribute to the development of hypertension. It was suggested that Kir2.4 and Kir2.1 channel overexpression in the aging heart may initiate disorders of myocardial contractility and arrhythmias in older age. At the same time, a high level of K_{ATP} subunit expression indicates compensatory-adaptive processes aimed at increasing myocardial resistance to hypoxia and stress.

Keywords: aging; aorta; heart; potassium Kir2.1 and Kir2.4 and K_{ATP} channels; contractility; gene expression; mRNA.

For citation: Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F. Aging has different effects on the functional activity and gene expression of classical inward-rectifying potassium channels Kir2.1 and Kir2.4 and ATP-sensitive K_{ATP} channels in blood vessels and heart of male rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(2) 5-16. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.5-16

Author's contribution: concept and design of the study – Kozhevnikova L.M.; collection and processing of material – Sukhanova I.F.; preparation of illustrative material – Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F.; statistical processing – Sukhanova I.F.; text writing – Kozhevnikova L.M.; editing – Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Lyubov M. Kozhevnikova, Doctor of Medical Sciences, Major scientific researcher of the Laboratory of Chronic Inflammation and Microcirculation Institute of General Pathology and Pathophysiology Russian Academy of Sciences; Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia, e-mail: lubovmih@yandex.ru

Financing. The study was carried out as part of a state assignment № FGFU-2022-0008.

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

Information about the authors:

Kozhevnikova L.M., <https://orcid.org/0000-0002-1323-6472>

Sukhanova I.F., <https://orcid.org/0000-0002-1323-6472>

Received 31.03.2023

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

Введение

В настоящее время смертность от сердечно-сосудистых заболеваний составляет более 30% от общей смертности во всем мире. Эта ситуация будет ухудшаться по мере старения населения планеты. Старение является важным предиктором развития сердеч-

но-сосудистых заболеваний. Понимание механизмов, лежащих в основе старения сосудов и сердца, приобретает все большее социально-экономическое значение и является одним из важнейших биомедицинских приоритетов в современном обществе.

В основе возникновения сердечно-сосудистой патологии лежат нарушения механизмов регуляции тонуса артерий и сократительной активности кардиомиоцитов. На функцию сосудов и миокарда большое влияние оказывают многочисленные ионные каналы, расположенные на мембранах клеток и различных органелл. Индукция клеточного старения различными стрессорами приводит к увеличению внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) [1, 2]. Длительное повышение $[Ca^{2+}]_i$ вызывает дисфункцию митохондрий и окислительный стресс, что оказывает пагубное влияние на экспрессию генов и функцию ионных каналов [3]. Тем не менее, роли калиевых каналов в поддержании кальциевого гомеостаза в сосудах и миокарде при старении до сих пор не уделяется должного внимания. Практически не изучен вклад калиевых каналов в реализацию механизмов старения сосудов и миокарда, а полученные многочисленные данные носят противоречивый характер. В настоящей работе возрастные изменения функциональной активности калиевых каналов исследовали в аорте крыс, поскольку у пожилых людей, в отличие от молодых, артериальное давление в большей степени определяется жесткостью магистральных сосудов [4, 5]. Потеря эластичности аорты приводит к увеличению систолического давления и к нагрузке на левый желудочек сердца, что способствует развитию гипертонии, гипертрофии левого желудочка, ишемии и фиброзу сердца [6–8]. Физиологические эффекты старения магистральных сосудов, в том числе изменения их чувствительности по отношению к вазоактивным соединениям, и участие в этих процессах ионных каналов изучены недостаточно [9]. Основной ролью семейства калиевых каналов внутреннего выпрямления (Kir) является восстановление мембранного потенциала покоя при гиперполяризации за счёт проведения тока калия внутрь клетки. Клетки с большим количеством Kir-каналов сохраняют мембранный потенциал близким к равновесному потенциалу для ионов калия и не проявляют спонтанной электрической активности [10]. Каналы семейства Kir2.x конститутивно активны и демонстрируют сильную способность к входящему внутреннему выпрямлению [11, 12]. АТФ-чувствительные калиевые каналы (K_{ATP}) в отличие от классических Kir2.x каналов обладают слабыми свойствами внутреннего выпрямления [13]. Эти каналы участвуют в реализации эффектов вазоконстрикторных и вазодилататорных соединений, влияя таким образом на сократительные свойства сосудов и миокарда. Целью данной работы было изучение влияния старения на функциональную

активность и экспрессию классических Kir2.1, Kir2.4 и K_{ATP} калиевых каналов.

Методика

Эксперименты выполнены на самцах крыс породы Вистар. Содержание лабораторных животных и эксперименты проводили в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals», Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в эксперименте, и требованиями Директивы Совета ЕС «О сближении законов, постановлений и административных положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментов и других научных целей» (86/609/ЕЕС), национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», а также в соответствии с разрешением Этического комитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (протокол № 1а от 02.10. 2020).

Физиологические методы исследования. Исследования проводили на фрагментах грудного отдела аорты крыс самцов в возрасте 3 и 18 мес. В изометрическом режиме оценивали изменения сократимости колец аорты в ответ на воздействие вазоактивных соединений в присутствии и в отсутствие блокаторов калиевых каналов. Включенные в исследование животные были распределены на 2 группы: 1-я группа – самцы в возрасте 3 мес (молодые, $n = 21$); 2-я группа – самцы в возрасте 18 мес (возрастные, возраст крыс 18 мес приблизительно соответствует 45–50 человеческим годам, $n = 21$).

Анестезированных крыс (25% раствор уретана, 4 мл/кг) декапитировали, извлекали грудной отдел аорты и помещали в охлажденный до $+4^\circ\text{C}$ раствор Кребса-Хенселейта, Состав раствора Кребса-Хенселейта в мМ: NaCl – 121; KCl – 4,69; KH_2PO_4 – 1.1; NaHCO_3 – 23,8; MgSO_4 – 1,6; CaCl_2 – 1.6; ЭДТА – 0,032; D-глюкоза – 8. Фрагменты аорты очищали от жировой и соединительной тканей и нарезали на кольца шириной 1,5 – 2,2 мм, которые крепили на держателях, помещенных в раствор Кребса-Хенселейта, аэрируемый карбогеном (5% CO_2 в O_2), в волоконном четырехканальном миографе (Danish Myo Technology, модель Multi Myograph System – 620M). После достижения в камерах миографа температуры раствора $37,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ фрагменты аорты растягивали радиально до оптимального диаметра просвета, соответствующего 90% пассивного диаметра сосуда при 100 мм Нг. После процедуры растяжения и последующего периода стабилизации в течение 40 мин жизнеспособ-

ность сосудов проверяли с помощью 0,1 мкМ норадреналина – агониста адренорецепторов (Sigma, США). Сохранность эндотелия тестировали с помощью агониста мускариновых рецепторов 10 мкМ карбахола (Sigma). После процедуры стандартизации сосудов приступали к измерению силы сокращения колец аорты в ответ на воздействие вазоактивных соединений.

Объектами исследований были представители семейства калиевых каналов внутреннего выпрямления: классические Kir2.1 и Kir2.4, а также АТР-чувствительные ($K_{\text{АТР}}$) каналы. В экспериментах на изолированных сосудах использовали эндогенные вазоконстрикторы – норадреналин и серотонин, ингибиторы калиевых каналов: глибенкламид ($K_{\text{АТР}}$ -каналов) и BaCl₂ (Kir2-каналов) (Sigma). Для оценки вклада калиевых каналов в реализацию релаксации сосудов, индуцированной серотониновыми рецепторами 5HT_{1D}-типа применяли агонист этих рецепторов L-694.247 (Tocris, Англия).

Обработка результатов физиологических экспериментов. Результаты обрабатывали в Microsoft Excel с использованием количественных данных силы сокращения сосудов (мН), экспортированных из программного обеспечения миографа (LabChartPro). *Статистический анализ* проводили с использованием программного обеспечения Graph Pad Prism 8 (GraphPad Software Inc., США). Для сравнения средних значений и статистических различий между группами использовали дисперсионный анализ (ANOVA). Данные в тексте представлены в виде средних значений и ошибки среднего. Расхождения считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

Молекулярно-биологические методы исследования.

В тканях аорты и миокарда оценивали экспрессию калиевых каналов внутреннего выпрямления Kir2.1, Kir2.4, а также порообразующей Kir6.2 и регуляторной Sur2 субъединиц $K_{\text{АТР}}$ канала.

Выделение РНК. Извлеченные из организма животных фрагменты сердца и аорты отмывали от крови в охлажденном физиологическом растворе натрия хлорида (0 – 4 °С), помещали в раствор RNAlater (США, Ambion) и хранили до выделения РНК при температуре –20 °С. Ткани измельчали в жидком азоте. Экстракцию РНК проводили с использованием набора GeneJET™ (ThermoFisher Scientific Inc., США) согласно протоколу производителя. Выделенную тотальную РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific Inc., США) для предотвращения загрязнения геномной ДНК. Концентрацию тотальной РНК определяли количественно на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Для проведения реакции обратной транскрипции с использо-

ванием набора Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США) брали 1 мкг РНК. Реакцию проводили в соответствии с инструкцией производителя, используя случайные гексамерные праймеры.

Количественную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием набора qPCRMix-NS («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя праймеров. Праймеры для реакции были подобраны, синтезированы и валидированы ООО «ДНК-Синтез» (Россия) (**табл.**) Количественную ПЦР проводили в амплификаторе CFX96 Cycler-RealTime PCR Detection System (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, США) в 96-луночной планшете, в объеме 20 мкл, используя 1 мкл кДНК. Все эксперименты включали отрицательный контроль. Реакцию проводили при следующих условиях: начальная денатурация (инициация фермента) – 3 мин при 95 °С, далее 40 циклов (денатурация – 15 с при 95 °С, отжиг / элонгация – 1 мин при 60 °С). Для нормализации уровней экспрессии генов использовали β-актин. Различия в экспрессии целевого гена оценивали по изменению соотношения уровней мРНК гена/мРНК β-актина. Отрицательные контроли были поставлены в соответствии с общепринятыми стандартами для отрицательных контролей при проведении количественной ПЦР. Реакцию проводили без фрагментов кДНК, чтобы исключить контаминацию реагентов, и с образцом тотальной РНК, чтобы исключить контаминацию кДНК геномной ДНК.

Статистический анализ результатов количественной ПЦР. Результаты обрабатывали в Microsoft Excel с использованием алгоритма 2^{-ΔΔC_t}. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Graph Pad Prism 8. Для сравнения средних значений и статистических различий между двумя группами использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Расхождения считались значимыми при $p < 0,05$. Данные в тексте представлены в виде средних значений и ошибки среднего.

Результаты и обсуждение

Возрастные изменения функциональной активности и экспрессии АТФ-чувствительных калиевых каналов в аорте и сердце крыс самцов (КАТР).

Аорта. Ранее нами было установлено, что с возрастом значительно возрастает чувствительность сосудов к вазоконстрикторному действию серотонина (5HT) [14]. В настоящем исследовании мы попыта-

лись выяснить, какую роль в возникновении возрастной гиперреактивности сосудов по отношению к 5HT играют калиевые каналы внутреннего выпрямления. Для этого была оценена реакция изолированных колец аорты на воздействие 5HT в присутствии и в отсутствие селективного блокатора K_{ATP} каналов глибенкламида или $BaCl_2$ – блокатора классических Kir2-каналов.

Установлено, что предварительная инкубация изолированных колец аорты с блокатором K_{ATP} каналов глибенкламидом в концентрации 3 мкМ в течение 30 мин не влияла на базальный тонус сосудов молодых (3 мес) и возрастных (18 мес) крыс самцов. Влияние глибенкламида на сократительную реакцию аорты на воздействие 5HT проявлялось в сдвиге зависимости «концентрация-эффект» вправо только в группе старых крыс (рис. 1). Глибенкламид не оказывал существенного влияния на 5HT-индуцированную сократительную реакцию колец аорты молодых самцов. Следует отметить, что сократительная реакция сосудов старых крыс на воздействие различных концентраций 5HT намного превышала ответ аорты молодых крыс, как в отсутствие, так и в присутствии глибенкламида (рис. 1).

В аорте старых крыс выявлено значительное снижение содержания мРНК порообразующей Kir6.2 и регуляторной Sur2 субъединиц K_{ATP} канала по сравнению с аналогичными показателями в сосудах молодых крыс (рис. 2).

Судя по результатам исследования, K_{ATP} каналы не принимают участия в регуляции сократительных ответов на серотонин у половозрелых крыс в возрасте 3 месяцев, но вносят существенный вклад в механизмы 5HT-индуцированного сокращения аорты возрастных (18 мес) крыс.

Следует отметить, что до сих пор нет полного представления о характере влияния гипертонии на экспрессию и функцию K_{ATP} -каналов, как и их роли в формировании гипертензивного состояния. В ряде исследований на моделях гипертонии показано, что функция канала K_{ATP} либо не изменена, либо, напротив, усилена. Так, в сосудах спонтанно гипертензивных (SHR)

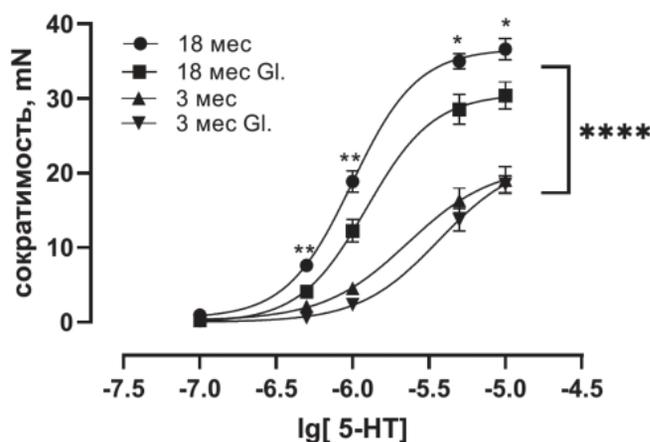


Рис. 1. Зависимости «доза-эффект» в ответ на возрастающие концентрации серотонина для аорты крыс в возрасте 3 и 18 мес в присутствии блокатора K_{ATP} глибенкламида (3 мкМ). * $p < 0,05$. ** $p < 0,05$ – сравнение зависимостей «концентрация-эффект» между группами крыс в возрасте 18 мес в присутствии и в отсутствие блокатора K_{ATP} . **** $p < 0,0001$ по сравнению с молодыми крысами.

Fig. 1. Dose-effect relationships in response to increasing serotonin concentrations for rat aorta at 3 and 18 months of age in the presence of the K_{ATP} blocker glibenclamide (3 μM). * $p < 0.05$. ** $p < 0.05$ – comparison of concentration-effect relationships between groups of rats at 18 months of age in the presence and absence of K_{ATP} blocker. **** $p < 0.0001$ compared with young rats.

Последовательности праймеров, используемых в работе

Primer sequences used in the study

Ген Gene	Прямой праймер Forward primer	Обратный праймер Reverse primer	Праймер с флуоресцентным зондом Primer with fluorescent probe
<i>Actb</i>	CTGACAGGATGCAGAAG-GAG	GATAGAGCCACCAATCCAC	FAM-CAAGATCATTGCTCCTCCT-GAGC-BHQ1
<i>Kir6.2</i> (<i>Kcnj11</i>)	CAATGTGCCCTGCGTCAC	GCCGAAACCAATGGTCA	FAM-CCACTCCTTTTCGTCTGCTTCC-BHQ1
<i>Sur2</i> (<i>Abcc9</i>)	CTCAATCGGTTTTCTGCTGA	GACAGGCAGAGCAGGGTA	FAM-CATCGACCAACATATCCCTC-CGACC-BHQ1
<i>Kir2.1</i> (<i>Kcnj2</i>)	GCTGCCTTCTCTTCTCCA	GATTGACTGGAATACCACCATG	FAM-CCAGACAACCATCGGCTATG-GTTTC-BHQ1
<i>Kir2.4</i> (<i>Kcnj14</i>)	CCGAAGTCACCTGGTGGAG	GTCAAACCAACATCCACATCC	FAM-CAGCCCCGTGTGACCCAG-BHQ1

крыс обнаружено значительное снижение содержания мРНК и белка для субъединиц канала – Kir6.1 и SUR2B, но при этом не отмечалось снижения токов ионов K_{ATP} -каналам [15]. Имеются данные и о снижении токов через K_{ATP} -каналы в артериях SHR крыс [16]. В литературе имеется ограниченная информация и о влиянии старения на экспрессию и функцию сосудистых K_{ATP} -каналов. Обнаружено, что в ГМК экспрессия субъединиц K_{ATP} Kir6.1 и рецептора сульфонилмочевины (SUR2) снижалась в большей степени у 49-недельных SHR крыс, чем у 16-недельных SHR. Кроме того, кольца аорты 49-недельных SHR показали более низкую реактивность по отношению к активатору K_{ATP} -каналов диазоксиду, чем 16-недельные SHR [17]. Это исследование предполагает, что с возрастом функциональная активность K_{ATP} -каналов значительно снижается при гипертонии и это, главным образом, обусловлено дополнительным возраст-ассоциированным подавлением экспрессии Kir6.1 и Sur2B субъединиц канала. Показано значительное снижение вызванной агонистами K_{ATP} -каналов величины релаксации аорты крыс с DOCA-солевой гипертонией и с гипертонией, индуцированной L-NAME, брыжеечных артерий мышей с эссенциальной гипертонией [18]. В артериях мышей с эссенциальной гипертонией снижены экспрессия Kir6.1 и Sur2B и токи по каналам K_{ATP} [19].

Таким образом, нами впервые установлено, что K_{ATP} каналы не принимают участия в регуляции сократительного ответов на воздействие серотонина у молодых половозрелых крыс, но вносят существенный вклад в механизмы 5HT-индуцированного сокращения аор-

ты возрастных (18 мес) крыс. С учетом полученных результатов и данных литературы логично предположить, что вызванное старением снижение функциональной активности и экспрессии Kir6.1 и SUR2 субъединиц K_{ATP} -каналов в сосудах приводит к подавлению токов K^+ по каналам и как следствие к усилению индуцированной вазоконстрикции. Вместе с тем, исходя из этого предположения, блокатор этих каналов глибенкламид не должен приводит к снижению вазоконстрикторной реакции на воздействие 5HT, которое было выявлено в наших экспериментах на изолированных фрагментах аорты старых самцов (рис. 1). Не исключено, что в старости в ГМК сосудов изменяются не только свойства, но и фармакология K_{ATP} -каналов, что может повлиять на их чувствительность к глибенкламиду и кардинально изменить его конечный эффект. Полученные данные косвенно свидетельствуют о причастности K_{ATP} каналов к формированию тонких механизмов развития гипертонии в старости, хотя пока нет четкого понимания, какие конкретные процессы лежат в их основе.

Сердце. Как показано на рис. 3, в процессе старения во всех отделах сердца крыс возрастает экспрессия генов порообразующей Kir6.2 и регуляторной Sur2 субъединиц K_{ATP} канала. Об этом свидетельствует увеличение уровня мРНК Kir6.2 в 1,8, 1,7 и 1,5 раз, а мРНК Sur2 – в 1,4, 1,4 и 1,9 раз соответственно в левом желудочке, левом и правом предсердиях по сравнению с аналогичными значениями у молодых животных.

Мы полагаем, что высокий уровень экспрессии генов порообразующей Kir6.2 и регуляторной Sur2 субъединиц K_{ATP} канала в стареющем сердце является показателем компенсаторно-адаптивных процессов, направленных на сохранение нормального функционирования кардиомиоцитов и защиту от возрастной гипертрофии миокарда.

Это предположение согласуется с данными литературы о кардиопротекторной роли K_{ATP} каналов. В экспериментах на трансгенных мышах, показано, что увеличение экспрессии SUR2A препятствует снижению физической выносливости и повышению восприимчивости сердца к метаболическому стрессу в старости [20]. Известно, что K_{ATP} -каналы в желудочке и предсердиях отвечают за важные функции, включая обеспечение устойчивости к физическим нагрузкам и стрессу [13, 21]. В основе кардиопротекторного действия желудочковых и предсердных K_{ATP} -каналов лежит защита кардиомиоцитов от перегрузки Ca^{2+} и сохранение функции митохондрий [13, 22]. Важная роль в регуляции K_{ATP} -каналов в кардиомиоцитах отводится сАМР-ЕРАС-опосредованной сигнализации, а также протеинкиназе С (PKC), которая совместно АМРК

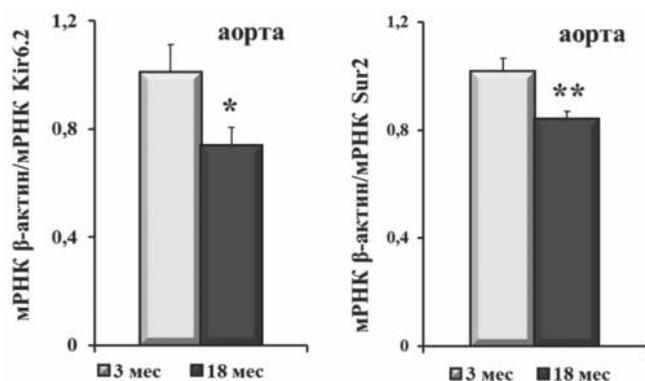


Рис. 2. Относительное содержание мРНК порообразующей Kir6.2 и регуляторной Sur2 субъединиц K_{ATP} канала в аорте крыс самцов в возрасте 3 и 18 мес * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ по сравнению с крысами в возрасте 3 мес.

Fig. 2. Relative mRNA content of the pore-forming Kir6.2 and regulatory Sur2 subunits of the K_{ATP} channel in the aorta of male rats at 3 and 18 months of age. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ compared to rats at 3 months of age

(AMP activated protein kinase) и p38 активирует сердечные K_{ATP} -каналы [21, 23]. Активация K_{ATP} с помощью РКС или метаболических нарушений, таких как ишемия и/или гипоксия, приводит к сокращению продолжительности потенциала действия, уменьшению притока Ca^{2+} и снижению сократительной активности, что предотвращает перегрузку Ca^{2+} и сохранение уровня АТФ. В многочисленных экспериментах на разных видах животных также показано, что соединения, открывающие КАТР-каналы (КСО), оказывают выраженный антиишемический эффект [13, 20, 24].

Возрастные изменения функциональной активности и экспрессии калиевых каналов внутреннего выпрямления Kir2.1 и Kir2.4 в аорте и сердце крыс самцов.

Аорта. Установлено, что предварительная инкубация колец грудного отдела аорты с блокатором Kir2-каналов $BaCl_2$ (100 мкМ) приводила к статистически значимому повышению базального тонуса сосудов,

как молодых, так и пожилых крыс (рис. 4, А, Б). Однако у молодых крыс увеличение базального тонуса под влиянием $BaCl_2$ было значительно выше, чем у крыс в возрасте 18 месяцев. В присутствии блокатора Kir2 каналов происходило смещение кривой зависимости «концентрация-эффект» влево и увеличение площади под кривой сократительного ответа в большей степени у молодых, чем у старых крыс (рис. 2, А-В). Следовательно, с возрастом в аорте крыс происходит снижение функциональной активности Kir2-каналов, при этом уровень экспрессии генов Kir2.1 и Kir2.4 каналов не изменяется (рис. 2, Г).

Функциональная активность Kir2 – каналов регулируется целым комплексом сигнальных систем и различных ионных каналов [1, 10]. Вазоконстрикторы, действующие через GqPCR, активируют сигнальный каскад PLC β -DAG-РКС, что приводит к ингибированию Kir каналов ГМК сосудов, способствуя, таким

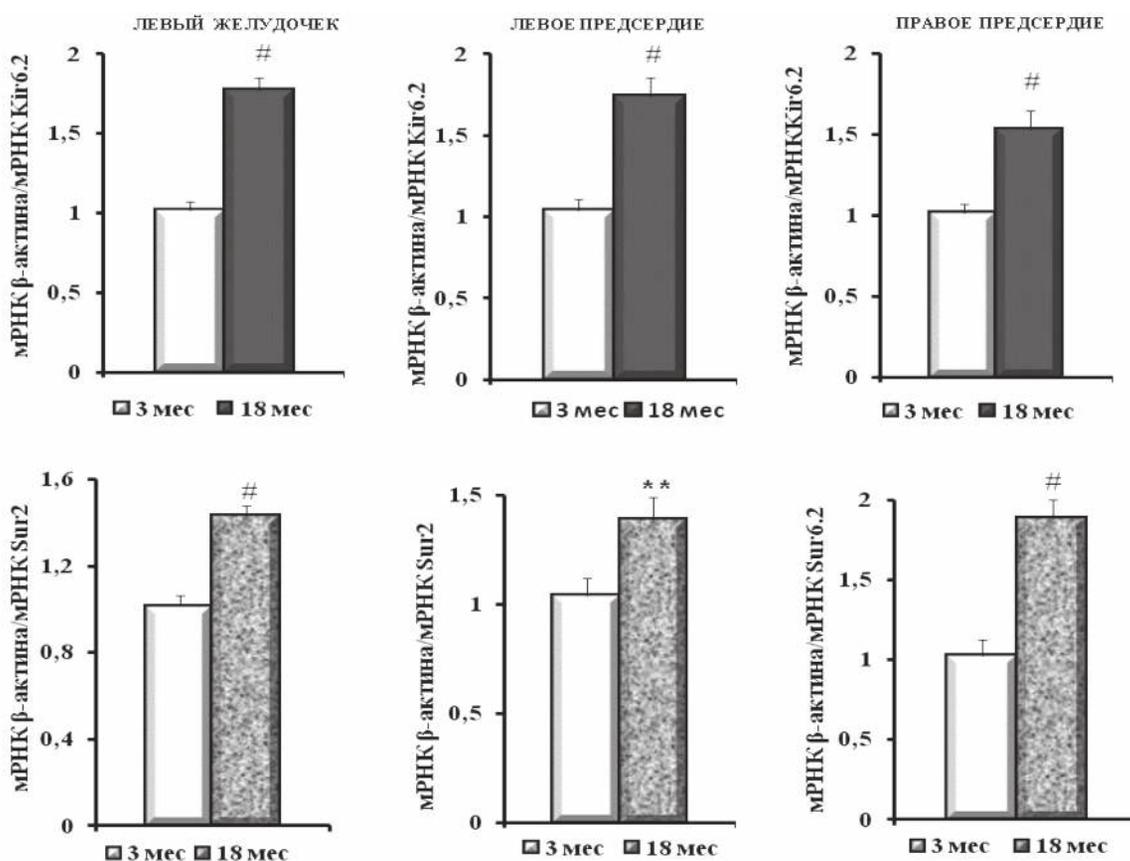


Рис. 3. Относительное содержание мРНК порообразующей Kir6.2 и регуляторной Sur2 субъединиц K_{ATP} канала в левом желудочке и предсердиях крыс самцов в возрасте 3 и 18 мес. ** $p < 0,01$; # $p < 0,0001$ по сравнению с крысами в возрасте 3 мес.

Fig. 3. Relative mRNA content of poroforming Kir6.2 and regulatory Sur2 subunits of the K_{ATP} channel in the left ventricle and atria of male rats at 3 and 18 months of age. ** $p < 0.01$; # $p < 0.0001$ compared with rats at 3 months of age.

образом, вазоконстрикторной деполяризации ГМК. Было показано, что Src-тирозинкиназы, независимо от PKC, также оказывают ингибирующее действие на Kir2 каналы [1]. Полагают, что возрастная гиперчувствительность сосудов к серотонину обусловлена увеличением активности тирозиновых Src-киназ [25–27]. Ингибирование нативного тока I (K1) α1-адренорецепторами также осуществляется при участии Src-киназ [28]. С учетом данных литературы можно полагать, что снижение функциональной активности Kir2 кана-

лов в старости обусловлено повышением активности Src киназ. Этот механизм может лежать в основе повышения чувствительности сосудов к вазоконстрикторным соединениям.

Вклад каналов внутреннего выпрямления Kir2- и K_{ATP} в 5HT1DR-индуцированную вазорелаксацию. Вазодилататоры, действующие через GsPCR/AC/cAMP/PKA или NO/sGC/cGMP/PKG сигнальные пути, вызывают активацию Kir каналов. Однако следует также отметить, что основным стимулом для активации Kir ка-

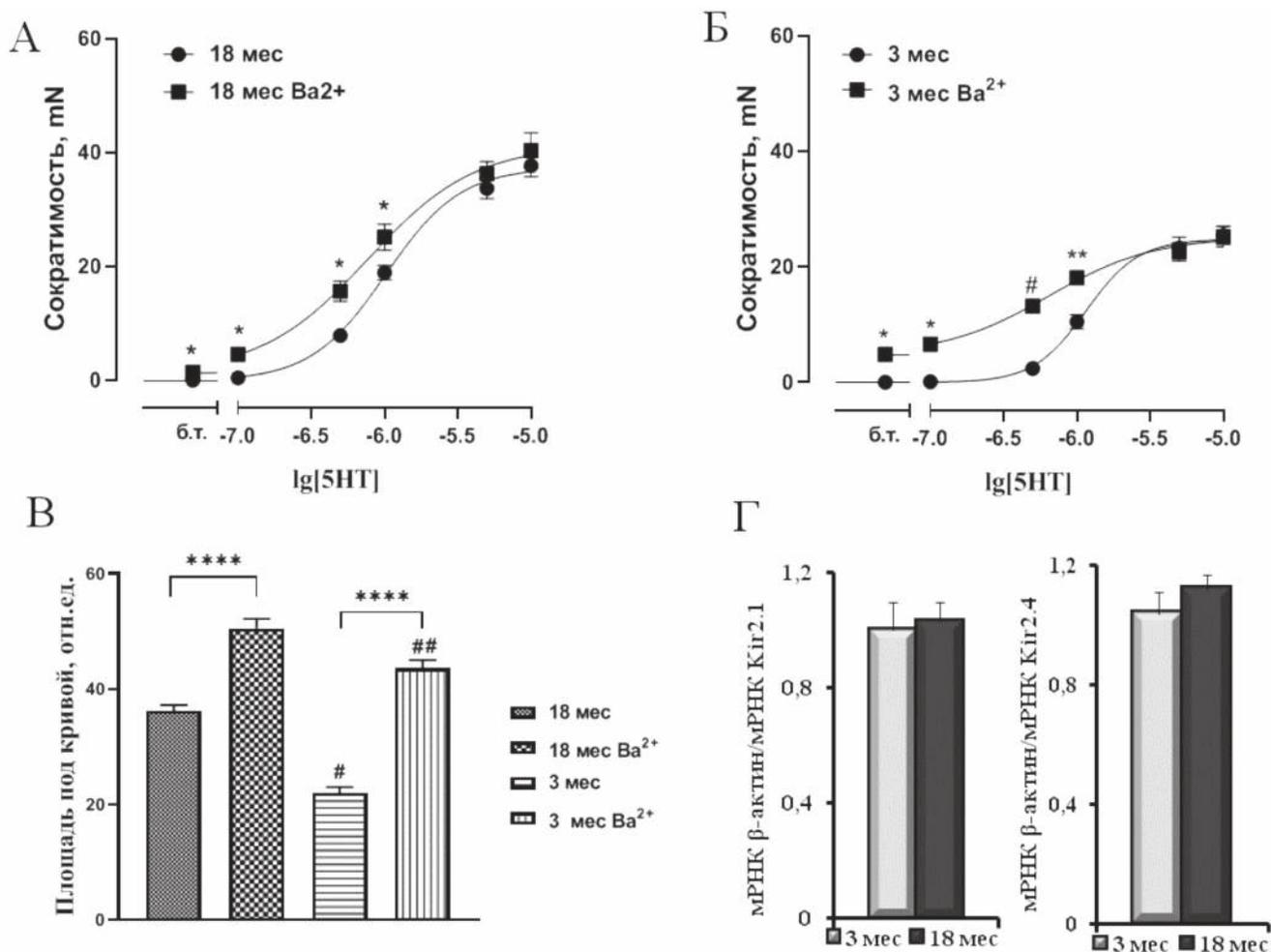


Рис. 4. Влияние блокатора Kir2 каналов BaCl₂ (100 мкМ) на базальный тонус, сократительные ответы аорты крыс разного возраста и уровень экспрессии генов Kir2.1 и Kir2.4. А, Б: зависимости «концентрация-эффект» на серотонин для аорты крыс в возрасте 18 и 3 мес в отсутствие (контроль) или в присутствии BaCl₂. * p < 0,05, ** p < 0,0025, # p < 0,0001 по сравнению с контролем. В: относительное изменение площади под кривой зависимости «концентрация-эффект». * p < 0,05, ** p < 0,0025, # p < 0,0001 по сравнению с крысами в возрасте 18 мес, ## p < 0,006 по сравнению с крысами 18 мес в присутствии бария, **** p < 0,0001 по сравнению с контролем. Г: возрастные изменения уровней экспрессии мРНК генов Kir2.1 и Kir2.4.

Fig. 4. Effect of Kir2 channel blocker BaCl₂ (100 μM) on basal tone, aortic contractile responses of rats of different ages and expression levels of Kir2.1 and Kir2.4 genes. A, B: concentration-effect relationships on serotonin for aorta of rats aged 18 and 3 months in absence (control) or in presence of BaCl₂. * p < 0.05, ** p < 0.0025, # p < 0.0001 versus control. B: relative change in area under the concentration-effect curve. * p < 0.05, ** p < 0.0025, # p < 0.0001 compared to rats aged 18 months, ## p < 0.006 compared to rats 18 months in the presence of barium, **** p < 0.0001 compared to control. Г: age-related changes in Kir2.1 and Kir2.4 gene mRNA expression levels.

налов в ГМК является гиперполяризация, вызванная активацией других K^+ -каналов или закрытием каналов, проводящих Na^+ , Ca^{2+} или Cl^- и/или увеличением внеклеточной концентрации K^+ [29–31].

Вазоконстрикторная реакция на воздействие 5НТ реализуется, главным образом, через рецепторы 5НТ2А-типа. Ранее нами было показано, что активация рецепторов 5НТ1D-типа приводит к релаксации предсокращенных норадреналином или эндотелином-1 сосудов [32]. В экспериментах на кольцах аорты молодых крыс было исследовано участие Kir2- и K_{ATP} каналов в реализации релаксирующего действия 5НТ1D-рецепторов.

Установлено, что инкубация колец аорты молодых крыс-самцов с блокаторами калиевых каналов глибенкламидом или хлоридом бария не повлияла на силу сокращения в ответ на воздействие норадреналина в концентрации 10^{-7} М. После выхода кривой сократительного ответа на плато, на сосуды воздействовали агонистом 5НТ1DR – L-694.247. Добавление к предсокращенным сосудам L-694.247 приводило практически к полному их расслаблению (на 85 и 95%) (рис. 5). В присутствии блокатора КАТР глибенкламида величина релаксации изолированных колец аорты уменьшилась в 1,5 раза (55% вместо 85% в контроле, $p < 0.05$), а блокатора Kir2-каналов $BaCl_2$ – в 4,5 раза (21% вместо 95% в контроле, $p < 0.0001$) (рис. 5). Полученные результаты свидетельствуют о большей вовлеченности Kir2-каналов в механизм действия сосудорасширяющих средств по сравнению с K_{ATP} каналами в сосудах молодых крыс. Судя по представленным выше данным, в отличие от K_{ATP} каналов при старении модулирующая роль Kir2-каналов в регуляции сократимости магистральных сосудов не изменяется. В дальнейшем важно выяснить, каким образом будет изменяться реакция старых сосудов на воздействие агониста 5НТ1D-рецепторов – L-694.247 в присутствии глибенкламида, что позволит получить дополнительное подтверждение причастности K_{ATP} каналов к механизмам формирования гиперреактивности магистральных сосудов к вазоконстрикторному действию серотонина в старости.

Сердце. В стареющем сердце крыс-самцов, в отличие от сосудов, выявлены значительные изменения на уровне экспрессии генов *Kir2.1* и *Kir2.4* каналов. Как показано на рис. 6, по сравнению с молодыми животными в старости увеличивается содержание мРНК *Kir2.1* и мРНК *Kir2.4* каналов в 1,8 и в 5,7 раза в левом желудочке, и в 1,4 и 1,6 раза – в левом предсердии. В процессе старения в правом предсердии уровень мРНК *Kir2.1* остается неизменным, но наблюда-

ется более чем двукратное увеличение экспрессии гена *Kir2.4* каналов (рис. 6). Обращает на себя внимание впервые установленный феномен гиперэкспрессии Kir2.4 каналов в левом желудочке и предсердиях пожилых крыс. Каков биологический смысл столь высокого роста уровня экспрессии генов *Kir2.1* и особенно *Kir2.4* в стареющих сердцах, пока непонятно.

Калиевые каналы внутреннего выпрямления Kir2 являются важными участниками, опосредующими процессы реполяризации мембран и поддержания стабильности потенциала покоя в кардиомиоцитах. Данные процессы представляют собой важнейшую часть сбалансированной сердечной возбудимости. То есть основной ролью Kir каналов является восстановление мембранного потенциала покоя при гиперполяризации за счёт проведения слабого тока калия внутрь клетки. Любые изменения функций этих каналов или мутации «с приобретением или потерей функции», в частности в гене *KCNJ2*, кодирующем Kir2.1, вызывают синдромы внезапной сердечной смерти. Считается, что потеря или изменение калиевого тока внутреннего выпрямления по Kir2 каналам (Inward rectifier potassium current,

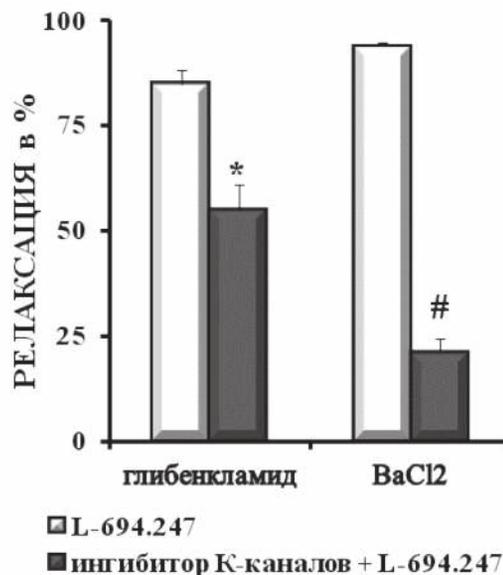


Рис. 5. Величина релаксации предсокращенных норадреналином (10^{-7} М) колец аорты молодых крыс на воздействие агониста 5НТ1D-рецепторов L-694.247 ($2 \cdot 10^{-5}$ М) в отсутствие и в присутствии блокаторов K_{ATP} и Kir2 каналов соответственно глибенкламида ($3 \cdot 10^{-6}$ М) и $BaCl_2$ (10^{-4} М). * $p < 0,05$ и # $p < 0,0001$ по сравнению с контролем.

Fig. 5. Magnitude of relaxation of preconditioned norepinephrine (10^{-7} M) aortic rings in young rats by the 5НТ1D-receptor agonist L-694.247 ($2 \cdot 10^{-5}$ M) in the absence and in the presence of KATP and Kir2 channel blockers glibenclamide ($3 \cdot 10^{-6}$ M) and $BaCl_2$ (10^{-4} M) respectively. * $p < 0.05$ and # $p < 0.0001$ compared to control.

IK1) является основным фактором, способствующим аритмогенезу у людей с сердечной недостаточностью [33, 34]. Экспериментально было показано, что усиление функции гена *KCNJ2* (*Kir2.1*) резко сокращает потенциал действия и, следовательно, предсердный и желудочковый рефрактерный период. Компьютерное моделирование продемонстрировало, что усиление функции *Kir2.1* канала обеспечивает инициацию и стабилизацию «роторов» фибрилляции [35].

Показано, что при дилатационной кардиомиопатии в желудочках уровни экспрессии значительно повышались для *Kir2.1* и *Kir2.3*, в меньшей степени – для *Kir2.4* каналов, но подавлялись для *Kir2.2* [10]. В модельных экспериментах на ооцитах *Xenopus* было показано, что *Kir2.4* ассоциирован с *Kir2.1* каналом. Гетеромерные каналы *Kir2.1-Kir2.4* проводят устойчивые токи внутреннего выпрямления. Они обладают повышенной чувствительностью к блокирующему действию Ba^{2+} и отлича-

ются свойствами от гомомерных каналов [36]. Однако до сих пор не оценено физиологического значения гетеромультимеризации *Kir2.4-Kir2.1* каналов.

С учетом данных литературы, можно предположить, что высокий уровень экспрессии генов *Kir2.4* и *Kir2.1* каналов в сердце возрастных крыс может негативно повлиять на калиевый ток внутреннего выпрямления I(K1), инициировать нарушения сократительной функции миокарда и способствовать развитию аритмий в старости.

Заключение

Таким образом, у крыс в возрасте 18 мес в аорте снижается функциональная активность *Kir2.1* и *Kir2.4* каналов, в то время как уровень экспрессии этих каналов остается неизменным. Предположено, что снижение функциональной активности *Kir2* каналов является ранним проявлением старения сосу-

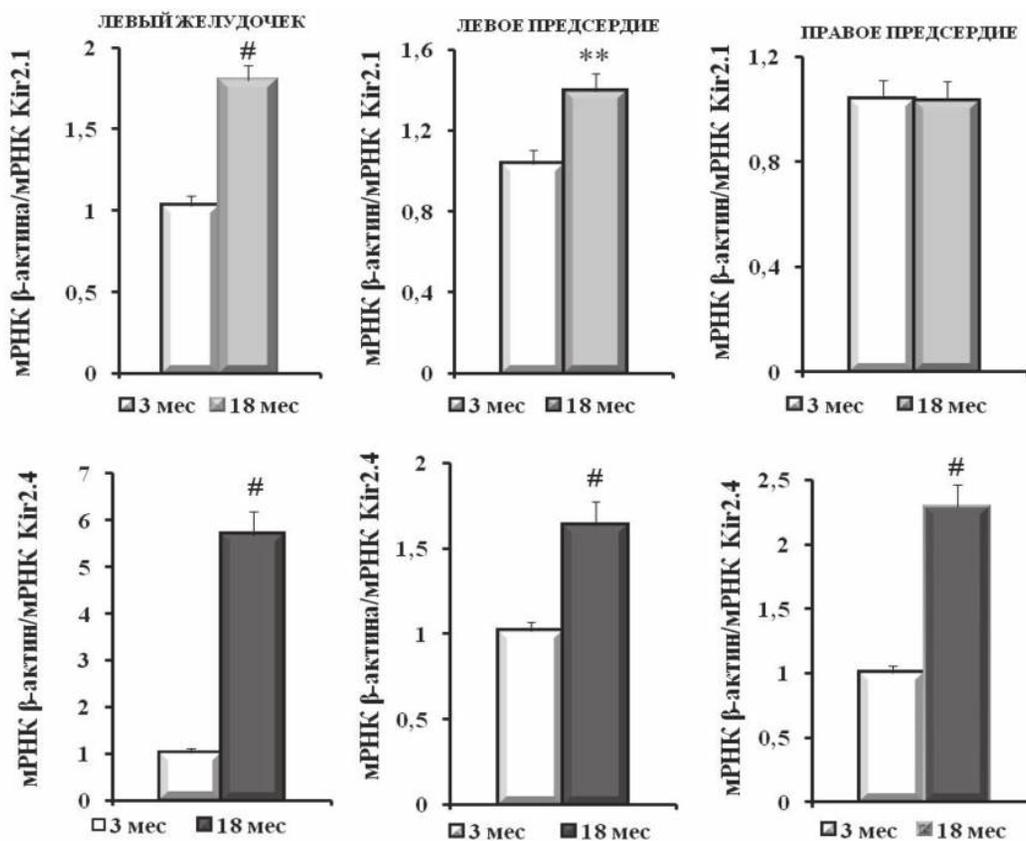


Рис. 6. Изменения уровня мРНК *Kir2.1* и *Kir2.4* каналов в левом желудочке и предсердиях сердца крыс самцов в возрасте 3 и 18 мес. ** $p < 0,01$; # $p < 0,0001$ по сравнению с крысами в возрасте 3 мес.

Fig. 6. Changes in *Kir2.1* and *Kir2.4* channel mRNA levels in the left ventricle and atria of male rats heart at 3 and 18 months of age. ** $p < 0.01$; # $p < 0.0001$ compared with rats at 3 months of age.

References

дов, которое может усугубляться по мере увеличения продолжительности жизни и способствовать в дальнейшем развитию гипертензии. В стареющих сердцах, напротив, выявлен высокий уровень экспрессии генов *Kir2.1* и *Kir2.4* каналов. Гиперэкспрессия *Kir2.4* и *Kir2.1* каналов может инициировать нарушения сократительной функции миокарда и способствовать развитию аритмий в старости. Впервые установлено, что K_{ATP} каналы не принимают участия в регуляции сократительных ответов аорты молодых крыс (3 мес), но вносят существенный вклад в механизм развития гиперчувствительности старых сосудов по отношению к вазоконстрикторному действию серотонина. Предполагается, что повышение экспрессии генов порообразующей *Kir6.2* и регуляторной *Sur2* субъединиц K_{ATP} канала в сердце возрастных крыс является компенсаторно-адаптивным механизмом, направленным на повышение устойчивости миокарда к гипоксии и стрессу. Полученные результаты свидетельствуют о сложных процессах изменения функциональной активности и экспрессии калиевых каналов внутреннего выпрямления, происходящих в процессе старения сосудов и миокарда, которые могут быть проявлением, как защитных механизмов, так и выступать в качестве факторов риска развития возрастной сердечно-сосудистой патологии.

Литература

(п.п. 1; 3-13; 15-24; 26-31; 33-36 см. References)

2. Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф., Семенова Н.П., Крыжановский С.А. Половые различия возрастных изменений экспрессии рианодинных RYR2 и инозитол-1,4,5-трифосфатных IP3R1,2,3 рецепторов и их модуляторов CAM и EPAC в аорте и миокарде крыс. *Биологические мембраны*. 2020; 37(6): 453-65. doi: 10.31857/S0233475520050084
14. Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф., Цорин И.Б., Вититнова М.Б., Крыжановский С.А. Влияние социально-изоляционного стресса на возрастные изменения функциональной активности и экспрессии рецепторов эндогенных вазоконстрикторов в аорте крысы. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2020; 170(10): 409-14 doi: 10.47056/0365-9615-2020-170-10-409-414
25. Кожевникова Л.М., Московцев А.А., Меситов М.В. Влияние ингибиторов Rho- и тирозиновой C-Src-киназ на серотонининдуцированное сокращение аорты и брызжеечной артерии крысы. *Известия Российской академии наук. Серия биологическая*. 2014; 5: 500-9. doi: 10.7868/S0002332914050063
32. Кожевникова Л.М., Давыдова А.Г., Авдонин П.В. Демполяризация плазматической мембраны и активация рецепторов эндогенных вазоконстрикторов как возможные механизмы усиления вазоконстрикторного ответа на действие серотонина при травматическом шоке у крыс *Известия Российской академии наук. Серия биологическая*. 2009; (3): 343-57.

1. Tykocki N.R., Boerman E.M., Jackson W.F. Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Compr Physiol*. 2017; 7(2): 485–581. doi: 10.1002/cphy.c160011
2. Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F., Semenova N.P., Kryzhanovskii S.A. Sex differences in age-related changes in the expression of ryanodine receptors RyR2 and Inositol-1,4,5-Trisphosphate receptors IP3R1,2,3 and of their modulators CaM and epac in rat aorta and myocardium. *Biologicheskiye membrany*. 2020; 37(6): 453–65. (in Russian). doi: 10.31857/S0233475520050084
3. Harraz O.F., Jensen L.J. Vascular calcium signalling and ageing. *J Physiol*. 2021; 599(24): 5361–77. doi:10.1113/JP280950
4. Lakatta E.G. So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2015; 83: 1–13. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.04.005
5. Vatner S.F., Zhang J., Vyzas C., Mishra K., Graham R.M., Vatner D.E. Vascular stiffness in aging and disease. *Front. Physiol*. 2021; 12: 762437. doi: 10.3389/fphys.2021.762437
6. De Munck D.G., Leloup A.J.A., De Meyer G.R.Y., Martinet W., Franssen P. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells increases passive stiffness of the mouse aortic vessel wall. *Pflugers Arch*. 2020; 472(8): 1031–40. doi: 10.1007/s00424-020-02408-y
7. Donato A.J., Machin D.R., Lesniewski L.A. Mechanisms of dysfunction in the aging vasculature and role in age-related disease. *Circ Res*. 2018; 123(7): 825–48. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312563
8. Mazzaro L., Almasi S.J., Shandas R., Seals D.R., Gates P.E. Aortic input impedance increases with age in healthy men and women. *Hypertension*. 2005; 45(6): 1101–06. doi: 10.1161/01.HYP.0000164579.73656.c4
9. Lacolley P., Regnault V., Avolio A.P. Smooth muscle cell and arterial aging: basic and clinical aspects. *Cardiovas. Res*. 2018; 114(4): 513–28. doi: 10.1093/cvr/cvy009.
10. Hibino H., Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Findlay I., Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*. 2010; 90(1): 291–366. doi: 10.1152/physrev.00021.2009
11. Guo Y., Waldron G.J., Murrell-Lagnado R. A role for the middle C terminus of G-protein-activated inward rectifier potassium channels in regulating gating. *J Biol Chem*. 2002; 277(50): 48289–94. doi: 10.1074/jbc.M207987200
12. Schram G., Melnyk P., Pourrier M., Wang Z., Nattel S. Kir2.4 and Kir2.1 K(+) channel subunits co-assemble: a potential new contributor to inward rectifier current heterogeneity. *J Physiol*. 2002; 544(2): 337–49. doi: 10.1113/jphysiol.2002.026047
13. Foster M.N., Coetzee W.A. KATP channels in the cardiovascular system. *Physiol Rev*. 2016; 96(1): 177–252. doi: 10.1152/physrev.00003.2015
14. Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F., Tsorin I.B., Vititnova M.B., Kryzhanovskii S.A. Influence of Social Isolation Stress on age-related changes in functional activity and expression of receptors of endogenous vasoconstrictors in rat aorta. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*. 2020; 170(10): 409–14. (in Russian). doi: 10.47056/0365-9615-2020-170-10-409-414
15. Blanco-Rivero J., Gamallo C., Aras-López R., Cobeño L., Cogolludo A., Pérez-Vizcaino F., et al. Decreased expression of aortic KIR6.1 and SUR2B in hypertension does not correlate with changes in the functional role of K(ATP) channels. *Eur J Pharmacol*. 2008; 587(1–3): 204–8. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.03.039

16. Ohya Y., Setoguchi M., Fujii K., Nagao T., Abe I., Fujishima M. Impaired action of levromakalim on ATP-sensitive K⁺ channels in mesenteric artery cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1996; 27(6): 1234–9. doi: 10.1161/01.hyp.27.6.1234
17. Liu X., Duan P., Hu X., Li R., Zhu Q. Altered KATP channel subunits expression and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats with age. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2016; 68(2): 143–9. doi: 10.1097/FJC.0000000000000394.
18. Ghosh M., Hanna S.T., Wang R., McNeill J.R. Altered vascular reactivity and KATP channel currents in vascular smooth muscle cells from deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004; 44(5): 525–31. doi: 10.1097/00005344-200411000-00003
19. Tajada S., Ciudad P., Moreno-Domínguez A., Pérez-García M.T., López-López J.R. High blood pressure associates with the remodelling of inward rectifier K⁺ channels in mice mesenteric vascular smooth muscle cells. *J Physiol*. 2012; 590(23): 6075–91. doi: 10.1113/jphysiol.2012.236190
20. Sudhir R., Sukhodub A., Du Q., Jovanovic ' S., Jovanovic ' A. Ageing-induced decline in physical endurance in mice is associated with decrease in cardiac SUR2A and increase in cardiac susceptibility to metabolic stress: therapeutic prospects for up-regulation of SUR2A. *Biogerontology*. 2011; 12: 147–55. doi 10.1007/s10522-010-9306-3
21. Mahdi H., Jovanović A. SUR2A as a base for cardioprotective therapeutic strategies. *Molecular Biology Reports*. 2022; 49(7): 6717–23. doi: 10.1007/s11033-022-07281-9
22. Tinker A., Aziz Q., Thomas A. The role of ATP-sensitive potassium channels in cellular function and protection in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol*. 2014; 171(1): 12–23. doi: 10.1111/bph.12407
23. van Bever L., Poitry S., Faure C., Norman R.I., Roatti A., Baertschi A.J. Pore loop-mutated rat KIR6.1 and KIR6.2 suppress KATP current in rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287(2): H850–59. doi: 10.1152/ajpheart.00054.2004
24. Raveaud S., Verdetti J., Faury G. Nicorandil protects ATP-sensitive potassium channels against oxidation-induced dysfunction in cardiomyocytes of aging rats. *Biogerontology*. 2009; 10: 537–47. doi 10.1007/s10522-008-9196-9
25. Kozhevnikova L.M., Moskovtsev A.A., Mesitov M.V. The effects of the inhibitors of Rho- and tyrosine c-src-kinases on serotonin-induced constrictions of the aorta and mesenteric artery in rats. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny*. 2014; 5: 500–9. (in Russian). doi: 10.7868/S0002332914050063
26. Matsumoto T., Kobayashi T., Ishida K., Taguchi K., Kamata K. Enhancement of mesenteric artery contraction to 5-HT depends on Rho kinase and Src kinase pathways in the ob/ob mouse model of type 2 diabetes. *British Journal of Pharmacology*. 2010; 160: 1092–104. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00753.x
27. Chang F., Flavahan S., Flavahan N.A. Impaired activity of adherens junctions contributes to endothelial dilator dysfunction in ageing rat arteries. *J Physiol*. 2017; 595(15): 5143–58. doi: 10.1113/JP274189
28. Zitron E., Günth M., Scherer D., Kiesecker C., Kulzer M., Bloehs R., et al. Kir2.x inward rectifier potassium channels are differentially regulated by adrenergic alpha1A receptors. *J Mol Cell Cardiol*. 2008; 44(1): 84–94. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.10.008
29. Smith P.D., Brett S.E., Luykenaar K.D., Sandow S.L., Marrelli S.P., Vigmond E.J., et al. KIR channels function as electrical amplifiers in rat vascular smooth muscle. *J Physiol*. 2008; 586(4): 1147–60. doi: 10.1113/jphysiol.2007.145474
30. Longden T.A., Nelson M.T. Vascular inward rectifier K⁺ channels as external K⁺ sensors in the control of cerebral blood flow. *Microcirculation*. 2015; 22(3): 183–96. doi: 10.1111/micc.12190
31. Sonkusare S.K., Dalsgaard T., Bonev A.D., Nelson M.T. Inward rectifier potassium (Kir2.1) channels as end-stage boosters of endothelium-dependent vasodilators. *J Physiol*. 2016; 594(12): 3271–85. doi: 10.1113/JP271652
32. Kozhevnikova L.M., Avdonin P.V., Davydova A.G. Plasma Membrane depolarization and activation of receptors for endogenous vasoconstrictors as possible mechanisms of potentiation of vasoconstrictive response to serotonin in traumatic shock in rats. *Izvestiya Rossiyskoy akademii nauk. Seriya biologicheskaya*. 2009; 3: 343–57. (in Russian)
33. Dharmoon A.S., Pandit S.V., Sarmast F., Parisian K.R., Gupta P., Li Y., et al. Unique Kir2.x properties determine regional and species differences in the cardiac inward rectifier K⁺ current. *Circ Res*. 2004; 94(10): 1332–39. doi: 10.1161/01.RES.0000128408.66946.67
34. Reilly L., Eckhardt L.L. Cardiac potassium inward rectifier Kir2: Review of structure, regulation, pharmacology, and arrhythmogenesis. *Heart Rhythm*. 2021; 18(8): 1423–34. doi: 10.1016/j.hrthm.2021.04.008
35. Noujaim S.F., Pandit S.V., Berenfeld O., Vikstrom K., Cerrone M., Mironov S., et al. Up-regulation of the inward rectifier K⁺ current (I_{K1}) in the mouse heart accelerates and stabilizes rotors. *J Physiol*. 2007; 578(Pt1): 315–26. doi: 10.1113/jphysiol.2006.121475
36. Schram G., Melnyk P., Pourrier M., Wang Z., Nattel S. Kir2.4 and Kir2.1 K(+) channel subunits co-assemble: a potential new contributor to inward rectifier current heterogeneity. *J Physiol*. 2002; 544(2): 337–49. doi: 10.1113/jphysiol.2002.026047

Сведения об авторах:

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

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

© Коллектив авторов, 2023

УДК 612.285.1

Сергеева Е.А., Метелкин А.А., Соколовская А.А.

Исследование экспрессии циклинов клеточного цикла в мегакариобластной клеточной линии человека при воздействии моделированной микрогравитации

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

Актуальность. Исследования, выполненные в невесомости, показали, что космический полет вызывает серьезные физиологические изменения в живом организме. В клетках млекопитающих микрогравитация способна индуцировать и модулировать протекание таких ключевых процессов, как апоптоз, пролиферация, миграция и адгезия. Несмотря на возросший интерес к космической биологии и медицине, исследования клеточного цикла в условиях микрогравитации остаются спорными.

Цель исследования – изучение экспрессии циклинов клеточного цикла клеток мегакариобластного лейкоза человека при воздействии моделированной микрогравитации.

Методика. Для экспериментов клетки мегакариобластного лейкоза человека (MEG-01) высевали в культуральные флаконы. Условия микрогравитации моделировали с использованием прибора случайного позиционирования (RPM – Random Positioning Machine). Клетки размещали в центре платформы прибора случайного позиционирования (группы RPM) и сравнивали со статической контрольной группой (1g). Анализ экспрессии циклинов клеточного цикла проводили методом вестерн блота и на проточном цитофлуориметре.

Результаты. Результаты исследований показывают, что под воздействием микрогравитации клетки мегакариобластного лейкоза человека MEG-01 демонстрируют сопоставимые уровни экспрессии циклина D и E при сравнении с контрольной группой. Однако, уровни циклинов A и B повышались в течение первых 96 ч. В дальнейшем, количество этих циклинов снижалось к 168 ч в сравнении с предыдущей временной точкой и контрольной группой.

Заключение. Таким образом, на основе полученных данных можно сделать заключение, что клетки MEG-01, подверженные RPM-моделированной микрогравитации успешно входят в клеточный цикл и завершают синтетическую фазу, но останавливаются в фазе G2 и не способны завершить митоз. Однако в более поздние сроки (168 ч) клетки MEG-01 успешно адаптируются к условиям невесомости. Результаты согласуются с экспериментальными данными, полученными при исследовании различных типов клеток при различных способах моделирования микрогравитации. Дальнейшие исследования влияния гравитации на клеточные реакции мегакариоцитов помогут понять патогенез заболеваний человека, приобретенных в экстремальных условиях.

Ключевые слова: микрогравитация; мегакариоциты; клеточный цикл; циклины

Для цитирования: Сергеева Е.А., Метелкин А.А., Соколовская А.А. Исследование экспрессии циклинов клеточного цикла в мегакариобластной клеточной линии человека при воздействии моделированной микрогравитации. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(2): 17-25.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.17-25

Участие авторов: обработка материала, проведение исследования, написание и подготовка иллюстративного материала – Сергеева Е.А.; концепция и дизайн исследования, редактирование статьи – Соколовская А.А.; проведение исследования по экспрессии – Сергеева Е.А.; статистическая обработка результатов – Метелкин А.А.; сбор и описание материала – Сергеева Е.А., Метелкин А.А.; общее руководство исследованием – Соколовская А.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: *Сергеева Екатерина Андреевна*, e-mail: katya96korn@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена за счет средств государственного задания №0520-2019-0025.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.05.2022

Принята к печати 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Sergeeva E.A., Metelkin A.A., Sokolovskaya A.A.

Expression of cell cycle cyclins in human megakaryoblast cell line exposed to simulated microgravityInstitute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltiyskaya St. 8, Moscow, 125315, Russian Federation

Background. Studies of weightlessness have shown that space flight causes serious physiological changes in a body. In mammalian cells, microgravity is able to induce and modulate key processes such as apoptosis, proliferation, migration, and adhesion. Despite growing interest to space biology and medicine, reports of cell cycle in microgravity remain controversial.

Aim. This paper analyzes the expression of cell cycle cyclins in human megakaryoblastic leukemia cells exposed to simulated microgravity.

Methods. Human megakaryoblastic leukemia (MEG-01) cells were seeded in culture flasks. Microgravity conditions were simulated using a Random Positioning Machine (RPM). Cells were placed at the center of the platform of the RPM (RPM group) and compared with a static control group (1 g). Cell cycle cyclin expression was analyzed by Western blotting and with a flow cytometer.

Results. In the conditions of microgravity, MEG-01 showed comparable expression levels of cyclins E and D vs. the control group. However, concentrations of cyclins A and B increased during the first 96 h. Subsequently, concentrations of these cyclins decreased by 168 h compared to the previous time point and the control group.

Conclusion. This study allowed a conclusion that MEG-01 cells exposed to RPM-modeled microgravity start proliferating and successfully finish the synthetic phase but stop in the G2 phase being unable to complete mitosis. However, at a later time (168 h), MEG-01 cells successfully adapt to the weightlessness conditions. In addition, the results are also consistent with reports of experiments on various cells under different conditions of simulated microgravity. Further studies of the effect of gravity on responses of megakaryocytes will provide insight into pathophysiology of human diseases acquired in extreme conditions.

Keywords: microgravity; megakaryocytes; cell cycle; cyclins

For citation: Sergeeva E.A., Metelkin A.A., Sokolovskaya A.A. Expression of cell cycle cyclins in human megakaryoblast cell line exposed to simulated microgravity. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(2) 17-25. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.17-25

Author's contributions: material processing, research, writing, and preparation of illustrative material – Sergeeva E.A.; concept and design of the study, article editing – Sokolovskaya A.A.; performing the expression study: Sergeeva E.A.; statistical processing of the results – Metelkin A.A.; material collection and description – Sergeeva E.A.; Metelkin A.A.; general management of the study – Sokolovskaya A.A. All authors approved the final version of the manuscript and are responsible for the integrity of all parts of the article.

For correspondence: *Sergeeva Ekaterina Andreevna*, e-mail: katya96korn@mail.ru

Information about the authors:Sergeeva E.A., <https://orcid.org/0000-0003-4690-6900>Sokolovskaya A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0112-2734>Metelkin A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8018-4978>

Financing. The work was supported by the State Assignment # 0520-2019-0025.

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

Received 15.05.2022

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

Введение

Космические путешествия являются важной частью человеческой культуры и нашей потребности исследовать неизвестное. Однако космонавты часто страдают от ряда проблем со здоровьем, связанных с воздействием микрогравитации не только на системном, но и на клеточном уровне [1–5].

Исследование физиологических и патологических процессов в экстремальных условиях дает возможность понять состояние организма. Влияние микрогравитации на основные функции клеток изучалось в различных модельных системах во время и после косми-

ческого полета [6–8]. В последнее время было зарегистрировано несколько случаев тромбоцитопении (уменьшение количества тромбоцитов) у космонавтов после космических полетов из-за снижения образования тромбоцитов, хотя причина этого снижения остается неизвестной [9].

Ограниченный доступ к космическому полету стимулирует создание альтернативных методов моделирования условий микрогравитации на Земле. Такие различные устройства и комплексы, воспроизводящие эффекты невесомости, более доступны для исследования

биологических эффектов клеток при изменении гравитации [10]. Несмотря на разные принципы работы наземных устройств, они значительно увеличили потенциал исследований в области моделирования условий космического пространства по сравнению с экспериментами в реальном космосе [11, 12].

Условия, подобные микрогравитации, можно создавать с помощью различного оборудования: биореактора с вращающейся стенкой, клиностата, RPM (Random Positioning Machine) и магнитной левитации [13]. RPM-моделированная микрогравитация была создана как надежный инструмент для поддержки наземных исследований влияния микрогравитации на организм. RPM вращается со случайной скоростью и направлением вокруг трех осей, тем самым усредняя суммарный вектор гравитации, испытываемый клетками, до значений ниже 0,003g [14].

Моделированная микрогравитация может оказывать влияние на пролиферацию и апоптоз в различных клетках. RPM-моделирование используется для изучения влияния микрогравитации на жизнедеятельность клеток в физиологических состояниях (эндотелий сосудов, стволовые клетки) и при различных патологических процессах: гематологических заболеваниях (клетки крови при лейкемии), клетки злокачественной глиомы, рака щитовидной железы [15–19]. Апоптоз в условиях микрогравитации наблюдали в глиальных [20] и эндотелиальных клетках [21], раковых клетках щитовидной железы [22] и лейкозных клетках Jurkat в космосе [7]. На разных моделях микрогравитации показано влияние на цитоскелет и форму эндотелиальных клеток [23, 24], гепатоцитов [25] и фибробластов [26]. Моделирование условий микрогравитации приводит также к изменениям морфологических структур, цитоскелета и функции эмбриоидного тела [27].

Несколько сообщений продемонстрировали, что имитация микрогравитации с использованием ротационной системы суспензионных культур (RCCS) влияет на пролиферацию и дифференцировку клеток связанных с гемопоэзом [28], и значительно ингибирует пролиферацию миеломоноцитарных клеток U937 [29] и клеток миелоидной лейкемии K562 [30, 31].

Ключевыми компонентами механизма прогрессии клеточного цикла являются – циклины. Известно, что фазы клеточного цикла регулируются циклинами: фаза G1 циклинами D1, D2 и D3, S-фаза – циклинами A и E, фазы G2/M – циклинами B1 и B2. Циклин D в комплексе с циклин-зависимыми киназами CDK4 и CDK6 способствует прогрессии клеточного цикла и переходу из G1 в S-фазу, экспрессия циклина B1 ассоциирована с переходом к митозу [32, 33].

Роль циклинов в прогрессии клеточного цикла в условиях микрогравитации наименее изучена. Влияние микрогравитации на клеточные реакции и физиологические эффекты мегакариоцитов еще не были объектом исследования. Это первая попытка изучения влияния микрогравитации на клеточный цикл клеточной линии мегакариобластного лейкоза человека MEG-01.

Цель работы – исследование экспрессии циклинов клеточного цикла мегакариоцитарной клеточной линии человека при воздействии моделированной микрогравитации.

Методика

Культура клеток. Линия клеток мегакариобластного лейкоза человека MEG-01 была получена из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ, Брауншвейг, Германия). Клетки поддерживали в культуральной среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС) (Южная Америка, Jiangsu Haoke Bio-engineering Co., Ltd) и 10 мкг/мл гентамицина (Life Technologies, США) в инкубаторе при 37 °C в 5% CO₂ (Sanyo, Япония). Клетки выращивали в культуральных флаконах объемом 75 см³ (Corning, США) и поддерживали в логарифмической фазе рутинным пассированием каждые 2–3 сут. Для экспериментов экспоненциально растущие клетки MEG-01 собирали и ресуспендировали в свежей культуральной среде.

Прибор случайного позиционирования. Условия микрогравитации моделировали при помощи прибора случайного позиционирования (RPM – Random Positioning Machine) (Dutch Space, Компания Astrium EADS, Лейден, Нидерланды). Для начала эксперимента клетки MEG-01 с плотностью 2×10^6 клеток/мл высевали в культуральные флаконы. Пузырьки воздуха удаляли, чтобы уменьшить турбулентность и силы сдвига. Культуральные флаконы (группы RPM) размещали в центре платформы, которая вращалась со скоростью 60°/с. RPM помещали в инкубатор для культивирования при 37 °C с 5% CO₂. Культуральные флаконы группы статического контроля (1g контроль) помещали в том же инкубаторе, что и группы RPM, при 37 °C.

Анализ жизнеспособности клеток. В начале каждого эксперимента и после инкубации в течение указанных периодов времени (24 ч, 72 ч, 96 ч и 168 ч) жизнеспособность клеток оценивали по отсутствию в них витального красителя (трипановый синий, invitrogen, США). Аликвоту суспензии (20 мкл) из каждого образца смешивали с трипановым синим в равных количе-

ствах в пробирке, затем каплю клеточной суспензии из пробирки переносили на предметное стекло для анализа на автоматическом счетчике клеток (Countess™, Invitrogen, США).

Проточно-цитофлуориметрический анализ экспрессии циклинов клеточного цикла. После различных условий микрогравитации (24 ч, 72 ч, 96 ч и 168 ч) образцы клеток отмывали буфером ФСБ (фосфатно-солевой буфер), фиксировали с помощью 75% этанола для определения циклина В, циклина А, циклина Е и 100% метанола для циклина D и хранили при -20°C не менее 12–18 ч до окрашивания.

Для анализа клетки отмывали буфером ФСБ, пермебиализировали 0,25% Triton X-100 в течение 5 мин при $+4^{\circ}\text{C}$ и инкубировали с антителами к циклинам 30 мин при комнатной температуре в темноте. Все антитела к циклинам А, В, Е, D (BD Biosciences США) использовали в разведении 1: 1000 согласно протоколу.

Антитела к иммуноглобулину G1 (IgG1), меченые FITC использовали в качестве изотипического контроля для исключения флуоресцентного фонового шума.

Все образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, укомплектованном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм), с использованием программного обеспечения CELLQuest (Becton Dickinson, США). На цитограмме устанавливали соответствующее окно дискриминации (гейт), в котором на основании прямого FSC и SSC вырезали основной пул клеток с целью удаления мелких (дебрис) и крупных (агрегаты) частиц. Интенсивность флуоресценции оценивалась с учетом анализа гистограмм. На гистограммах по оси X отображена интенсивность флуоресценции, по оси Y – число событий (число клеток). Для каждого экспериментального образца было зарегистрировано не менее 15 000 событий. Результаты выражали как среднюю интенсивность флуоресценции (MEAN).

Анализ методом Вестерн-блота. Образцы клеток собирали, дважды промывали и лизировали в буфере для радиоиммунопреципитации (50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, 0,5% дезоксихолевая кислота натрия, 1% нонилфеноксиполиэтоксилэтанол (NP-40), 0,1% (масса/объем) додецилсульфата натрия (SDS), pH: 7,4). Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США). Затем 35 мкг общего белка на образец использовали для электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия 12% и полусухого переноса на мембрану из поливинилидендифторида 0,45 мкм (Immobilon-P Transfer Membran; Millipore, Берлингтон, США). Мембра-

ны блокировали 5% молоком (Bio-Rad Laboratories, США) в буфере ТБСТ (Трис буфер с Твин-20) при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем обрабатывали в течение ночи при 4°C рабочими разведениями соответствующих первичных антител в присутствии 5% молока с 0,06% азидата натрия (NaN_3) в буфере ТБСТ.

Мембраны были обработаны мышинными моноклональными антителами против циклинов А, В, Е, D (все антитела использовали в разведении 1: 1000; BD Biosciences, США).

После инкубации с первичными антителами мембраны промывали буфером ТБСТ по 10 мин, 4 раза после чего инкубировали со вторичными антителами (иммуноглобулин G конъюгированный пероксидазой) в разведении 1: 1000 (Thermo Fisher Scientific, США) при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 1 ч с последующей промывкой в ТБСТ 4 раза по 10 мин.

Обнаружение белковых полос осуществлялось с использованием станции изображения Odyssey® XF Imaging System – LI-COR Biosciences – США и набора для обнаружения вестерн-блоттинга Amersham ECL (GE Healthcare, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Моноклональные антитела против белка актина Ab-5 (разведение 1: 1000; BD Biosciences, Франклин-Лейкс, США) использовали в качестве контроля загрузки.

Статистический анализ. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение из 3 независимых экспериментов. Результаты выражали как среднюю интенсивность флуоресценции (MEAN). Выборка соответствует нормальному распределению, что было оценено с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Различия между группами оценивали с помощью параметрического t-критерия Стьюдента. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

Тромбоциты представляют собой фрагменты цитоплазмы мегакариоцитов, окруженные мембраной [34–36]. По своим морфологическим свойствам мегакариоциты представляют собой крупные клетки (50–60 мкм) с огромным ядром, большими цитоплазматическими вакуолями и цитоплазматическими выпячиваниями. Ядерно-цитоплазматическое соотношение в мегакариоцитах обычно в пользу цитоплазмы: последняя, занимает нередко все поле зрения микроскопа. Наряду с целыми, хорошо сохранившимися клетками встречаются разрушенные клетки, отдельные ядра или их фрагменты [37].

В качестве модельных клеток нами была выбрана линия мегакариобластных клеток (MEG-01) [38]. В качестве моделирования условий микрогравитации был выбран прибор RPM, который валидирован и широко используется в различных лабораториях разных стран [12, 31, 39].

Анализ данных проточной цитометрии показал изменения экспрессии всех циклинов в мегакариобластных клетках MEG-01.

На **рис. 1 (а–г)** слева на графике показана экспрессия циклинов в виде гистограмм. Справа на **рис. 1 (д–з)** представлены графики с средним значением соответственно в контрольной (1g) группе и группе RPM-моделированной микрогравитации при различных временных интервалах. Наиболее выраженные изменения по сравнению с контрольной группой происходят на 96 ч в условиях RPM-моделированной микрогравитации (**рис. 1**).

По результатам проточной цитометрии экспрессия циклина В в мегакариобластных клетках MEG-01 при RPM-моделированной микрогравитации также наиболее выражена была на 96 ч. Экспрессия циклина D в мегакариобластных клетках MEG-01 показывает, что клетки успешно вступают в фазу пролиферации, и число делящихся клеток не меньше, а то и больше по сравнению с контролем. Однако определенных тенденций к нарастанию или падению нет. Экспрессия циклина А демонстрирует нарастание в группе RPM в течение первых 4 сут, с последующим снижением, что, вместе с пиком циклина D может указывать на торможение клеточного цикла в фазе G2, до митоза. Падение уровня экспрессии циклинов А и D до уровня статической группы или ниже может говорить об адаптации клеток к новым условиям и успешному прохождению клеточного цикла. Экспрессия циклина Е в группе RPM в сравнении с контрольной группой, не особенно четко выражена, что может свидетельствовать об отсутствии препятствий к прохождению синтетической фазы клеточного цикла.

Данные, полученные методом вестерн блота, подтвердили, что основное изменение экспрессии циклинов клеток MEG-01 происходит через 96 ч, в условиях моделированной микрогравитации, по сравнению со статическим контролем. На **рис. 2, а** представлена экспрессия цитокинов в виде белковых полос и соответствующих графиков с отклонениями (**2, б**). Как видно из **рис. 2**, происходит нарастание экспрессии циклина А в группе RPM в течение первых 4 сут, с последующим снижением. Не выявлено существенных различий в экспрессии циклина Е между группой RPM и контрольной группой (1g).

Экспрессия циклина В в клетках MEG-01 наиболее выражена в группе RPM на 96 ч, как по результатам проточной цитометрии, так и по результатам вестерн блота.

Повышенная экспрессия циклина В, согласуется с увеличенным процентом клеток в фазе G2/М, поскольку циклин В достигает максимума при митозе, но должен разрушаться кальций-зависимым образом для перехода в анафазу [40].

Показано, что повышающая регуляция циклина В во время фазы G2/М отражает наблюдение о том, что опосредованная кальцием экспрессия генов подавляется в результате уменьшения гравитационной силы [41].

Результаты нескольких экспериментов, направленных на изучение клеточного цикла в условиях моделированной микрогравитации, были получены с использованием различных клеточных линий. Моделированная микрогравитация вызывала частичный арест фазы G1 в клетках феохромоцитомы крысы PC12 крысы [42]. Кроме того, как нормальные гладкомышечные клетки сосудов мыши, так и неопластические клетки рака молочной железы человека были индуцированы к частичной остановке в G2/М 1А (CDKN1A) при моделированной микрогравитации [43].

Как сообщается в одном исследовании, в клеточных линиях колоректального рака-DLD-1 и клеточной линии лимфобластного лейкоза MOLT4 в условиях микрогравитации наблюдали измененную морфологию клеток, снижение жизнеспособности клеток и аномальный профиль клеточного цикла в сравнении с их статическими контролями. Во время клеточного цикла в клетках DLD-1 обнаруживалась целая серия изменений – снижение жизнеспособности, способности образовывать колонии, признаки нарушения регуляции генов клеточного цикла, наличие онкогенов, маркеров прогрессирования рака и прогностических маркеров [44].

В другом исследовании клетки хронического миелоидного лейкоза (K562) культивировали в ротационной системе клеток НАСА [28]. Результаты показали, что микрогравитация, моделированная RCCS, может вызывать временное ингибирование пролиферации, но не приводит к апоптозу [29].

Одновременное воздействие на фибробласты человека моделированной микрогравитации и облучения приводило к большему количеству хромосомных aberrаций, чем в клетках, подвергшихся воздействию только радиации. Экспрессия генов, подавляющих клеточный цикл (*ABL1* и *CDKN1A*) уменьшалась, а генов (*CCNB1*, *CCND1*, *KPNA2*, *MCM4*, *MKI67* и *STMN1*), ответствен-

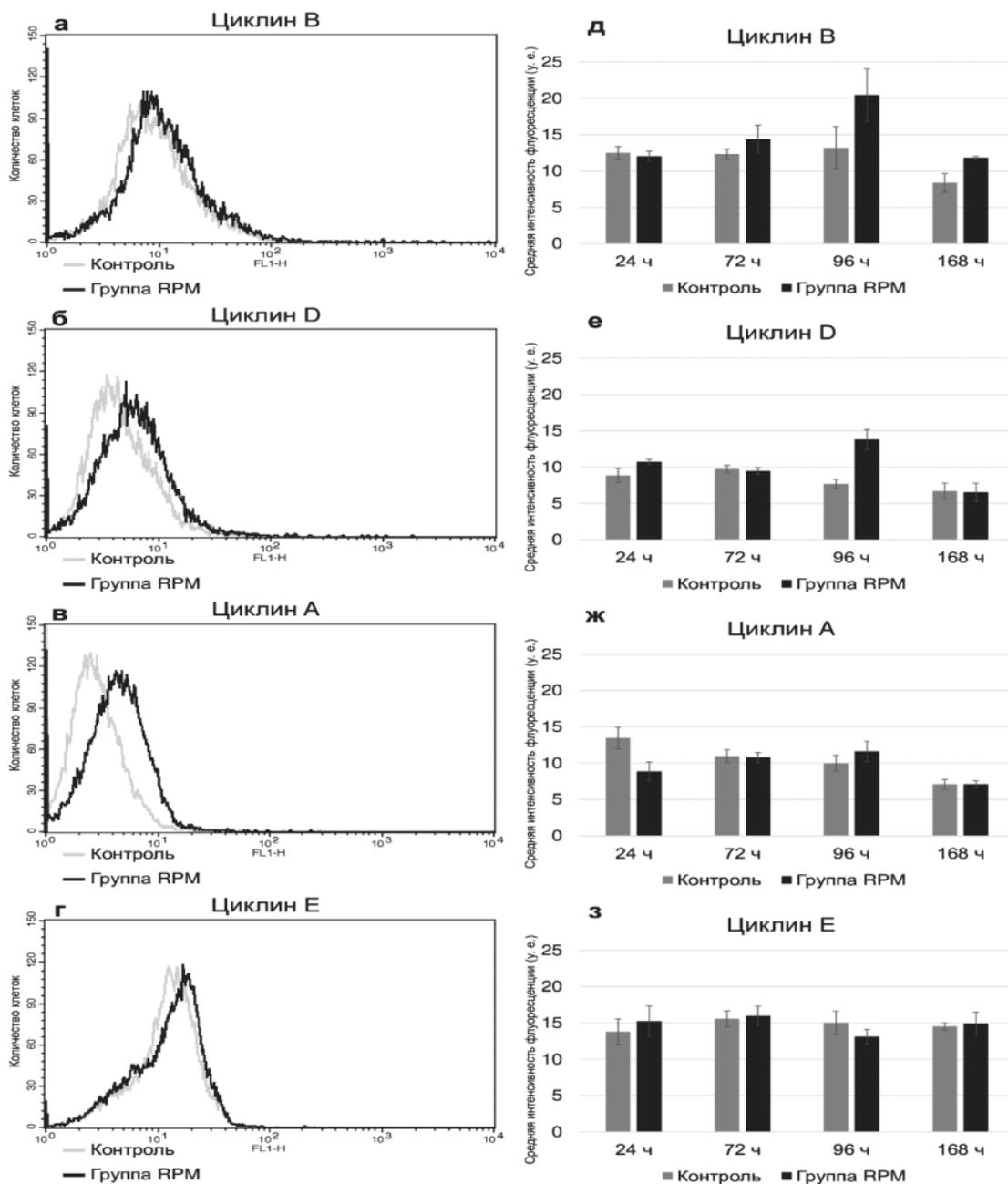


Рис. 1. Для моделирования эффекта микрогравитации использовалась машина случайного позиционирования (RPM). Продемонстрировано влияние эффектов RPM-моделированной микрогравитации на экспрессию циклинов в клетках MEG-01. В качестве контроля использовались флаконы с клетками в статическом положении (1g). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. Результаты выражены в виде репрезентативных гистограмм и графиков. Данные представлены как средние значения \pm стандартное отклонение. * $p < 0,05$ по сравнению со статическим контролем ($n = 3$).

Fig. 1. A random positioning machine (RPM) was used to simulate the effect of microgravity. Effects of RPM-simulated microgravity on the expression of cyclins in MEG-01 cells was demonstrated. The flasks with cells in a static position (1g) were used as controls. The analysis was performed on a FACSCalibur flow cytometer. Representative histograms and graphs demonstrate the results. Data are presented as mean \pm standard deviation. * $p < 0.05$ compared to static control ($n = 3$).

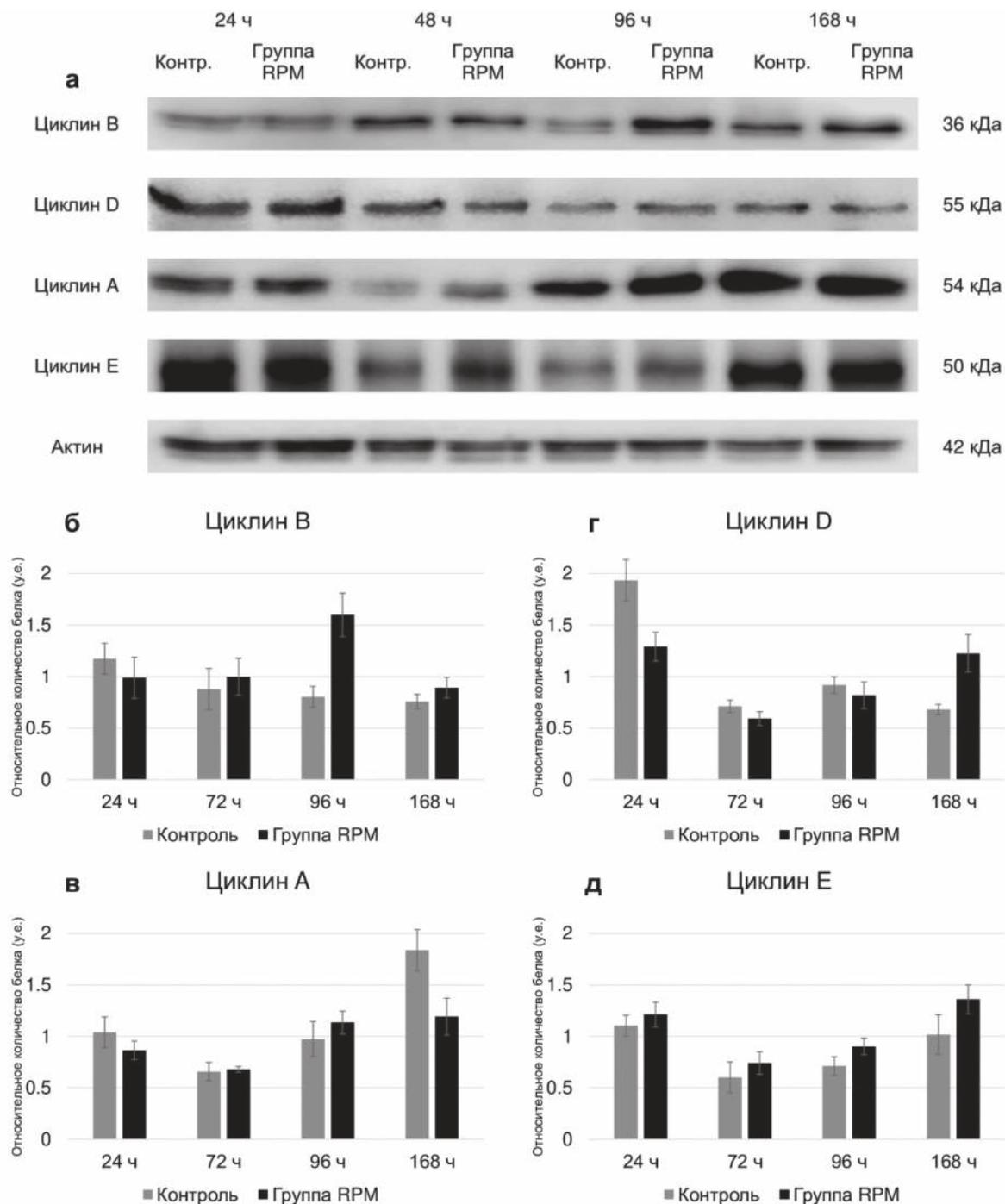


Рис. 2. Для моделирования эффекта микрогравитации использовалась машина случайного позиционирования (RPM). Продемонстрировано влияние эффектов RPM-моделированной микрогравитации на экспрессию циклинов в клетках MEG-01. В качестве контроля использовались флаконы с клетками в статическом положении (1g). Анализ проведен методом вестерн блота с помощью мышиных моноклональных антител против циклинов А, В, Е, D. Данные представлены как средние значения ± стандартное отклонение. * $p < 0,05$ по сравнению со статическим контролем ($n = 3$).

Fig. 2. A random positioning machine (RPM) was used to simulate the effect of microgravity. Effects of RPM-simulated microgravity on the expression of cyclins in MEG-01 cells was demonstrated. The flasks with cells in a static position (1g) were used as controls. The analysis was performed by Western blot using mouse monoclonal anti-cyclin A, B, E, D antibodies. Data are presented as mean ± standard deviation. * $p < 0.05$ compared to static control ($n = 3$).

ных за клеточный цикл, под действием микрогравитации увеличивались после облучения ионами углерода (C) [45].

Согласно полученным ранее нами результатам, моделированная микрогравитация нарушала развитие клеточного цикла MEG-01 клеток. Анализ пролиферации с помощью внутриклеточного маркера Ki-67 и проточной цитометрии показал снижение пролиферации клеток в группе RPM по сравнению с группой статического контроля через 72 ч [46].

В настоящей работе, мы исследовали экспрессию циклинов в клетках MEG-01 методом проточной цитометрии и вестерн блотом. Оба метода в совокупности демонстрируют, что основное изменение уровней экспрессии циклинов происходит в условиях моделированной микрогравитации через 96 ч. Так, уровень экспрессии циклина A демонстрирует нарастание в группе RPM в течение первых 4 сут, с последующим снижением, что, вместе с пиком циклина D может указывать на торможение клеточного цикла в фазе G2, до митоза.

Заключение

Таким образом, на основе полученных нами данных можно сделать вывод, что RPM-моделированная микрогравитация задерживает развитие клеточного цикла MEG-01 клеток при переходе в фазу G2/M через 96 ч. Однако через неделю клетки MEG-01 успешно адаптируются к условиям невесомости и экспрессия циклинов возвращается к уровню контрольных клеток. Кроме этого, полученные результаты согласуются с экспериментальными данными, полученными на различных клетках при условиях моделированной микрогравитации. Дальнейшие исследования влияния гравитации на клеточные реакции мегакариоцитов помогут понять патогенез заболеваний, приобретенных в экстремальных условиях.

Литература

(1-16; 18; 19-45 см. References)

17. Рудимов Е.Г., Погодина М.В., Буравкова Л.Б. Влияние моделируемой микрогравитации на секреторную активность культивируемых эндотелиальных клеток человека. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2014; 48: 30–5.
18. Гершович П. М., Гершович Ю. Г., Буравкова Л. Б. Роль мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга в адаптации клеток остеогенного дифферона к микрогравитации. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2010; 96(4): 406–18.

References

1. Grimm D. Simulated microgravity alters differentiation and increases apoptosis in human follicular thyroid carcinoma cells. *The FASEB Journal*. 2002; 1–7.

2. Van Loon J.J.W.A. Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research. *Adv. Space*. 2007; 39: 1161–5.
3. Ullrich O., Huber K., Lang K. Signal transduction in cells of the immune system in microgravity. *Cell Communication and Signaling*. 2008; 6: 9.
4. Takeda M. Effects of simulated microgravity on proliferation and chemosensitivity in malignant glioma cells. *Neurosci. Lett*. 2009; 463: 54–9.
5. Buravkova L.B., Rudimov E.G., Andreeva E.R., Grigoriev A.I. The ICAM-1 expression level determines the susceptibility of human endothelial cells to simulated microgravity. *J Cell Biochem*. 2018; 119(3): 2875–85. doi: 10.1002/jcb.26465
6. Russomano T., Dalmarco G., Falcao P. The effects of hypergravity and microgravity on biomedical experiments. *Morgan & Claypool*, 2008.
7. Lewis M. The Cytoskeleton, apoptosis, and gene expression in T lymphocytes and other mammalian cells exposed to altered gravity. *Adv. Space Biol. Med*. 2002; (8): 77–128.
8. Corydon T.J., Kopp S., Wehland M., Braun M., Schutte A., Mayer T., Hulsing T., Oltmann H., Schmitz B., Hemmersbach R., Grimm D. Alterations of the cytoskeleton in human cells in space proved by life-cell imaging. *Sci. Rep*. 2016; 6: 20043.
9. Demontis G.C., Germani M.M., Caiani E. G., Barravecchia I., Passino C., Angeloni D. Human Pathophysiological Adaptations to the Space Environment. *Front. Physiol*. 2017; 02. doi:10.3389/fphys.2017.00547
10. Herranz R., Anken R., Boonstra J., Braun M., Christianen P.C., Geest J., et al. Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. *Astrobiology*. 2013; 13: 1–17.
11. Brungs S., Egli M., Wuest S.L. Facilities for Simulation of Microgravity in the ESA Ground-Based Facility Programme. *Microgravity Sci. Technol*. 2016.
12. Wuest S.L., Richard S., Kopp S., Grimm D., Egli M. Simulated Microgravity: Critical Review on the Use of Random Positioning Machines for Mammalian Cell Culture. *BioMed Research International*. 2015.
13. Borst A.G., Van Loon J.J.W.A. Technology and development for the random positioning machine, RPM. *Microgravity Sci. Technol*. 2009; 21: 1161–5.
14. Sihver, L. Physics and biophysics experiments needed for improved risk assessment in space. *Acta Astronaut*. 2008; 63: 886–98
15. Cuccarolo P., Barbieri F., Sancandi M. Differential behaviour of normal, transformed and Fanconi’s anemia lymphoblastoid cells to modeled microgravity. *J. Biomed. Sci*. 2010; 17: 63–72.
16. Becker J.L., Souza G.R. Using space-based investigations to inform cancer research on Earth. *Nature Reviews Cancer AOP*. 2013.
17. Rudimov E.G., Pogodina M.V. and Buravkova L.B. Effect of modeled microgravity on the secretory activity of cultivated human endothelium cells. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 2014; 48: 30–5.
18. Warnke E., Kopp S., Wehland M., et al. Thyroid cells exposed to simulated microgravity conditions – comparison of the fast rotating clinostat and the Random Positioning Machine. *Microgravity Sci. Technol*. 2015; 247–60.
19. Gershovich P.M., Gershovich Iu.G., Buravkova L.B. The role of multipotential mesenchymal stromal cells in adaptation of bone mar-

- row precursors osteogenic cell type to microgravity. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2010; Apr; 96(4): 406–18.
20. Uva B.M. Microgravity-induced apoptosis in cultured glial cells. *Eur. J. Histochem*. 2002; (46): 209–14.
 21. Infanger M. Induction of three dimensional assembly and increase in apoptosis of human endothelial cells by simulated microgravity: impact of vascular endothelial grow. *Apoptosis*. 2006; 11(5): 749.
 22. Infanger M., Kossmeih P., Shakibaei M., Bauer J., Kossmeihl-Zorn S., Cogoli A., et al. Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in papillary thyroid carcinoma cells. *Cell Tissue Res*. 2006; 324(2): 267–77.
 23. Janmaleki M., Pachenari M., Seyedpour S.M., R. Shahghadami & A. Sanati-Nezhad. Impact of simulated microgravity on cytoskeleton and viscoelastic properties of endothelial cell. *Sci. Rep*. 2016; (6), Article number: 32418
 24. Grimm D., Infanger M., Westphal K., Ulbrich C., Pietsch J., Kossmeihl S., et al. A delayed type of three-dimensional growth of human endothelial cells under simulated weightlessness. *Tissue Eng*. 2009; 15(8): 2267–75.
 25. Hansen L.K., Mooney D.J., Vacanti J.P., Ingber D.E. Integrin binding and cell spreading on extracellular matrix act at different points in the cell cycle to promote hepatocyte growth. *Mol. Biol. Cell*. 1994; 9: 967–75.
 26. Beck M., Tabury K., Moreels M., Jacquet P., Van Oostveldt P., De Vos W.H., et al. Simulated microgravity decreases apoptosis in fetal fibroblasts. *Int. J. Mol. Med*. 2012; 30(2): 309–13.
 27. Buravkov S.V., Chernikov V. P., Konstantinova N. A., Buravkova L. B. Influence of clinorotation on embryoid bodies morphology. *Cell and Tissue Biology*. 2009; 3(6): 532–7.
 28. Plett P.A., Frankovitz S.M., Abonour R., Orschell-Traycoff C.M. Proliferation of human hematopoietic bone marrow cells in simulated microgravity. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim*. 2001; 37: 73–8.
 29. Zong-Chun Yi , Bing Xia, Ming Xue, Guang-Yao Zhang, Hong Wang, Hui-Min Zhou, Yan Sun, Feng-Yuan Zhuang. Simulated microgravity inhibits the proliferation of K562 erythroleukemia cells but does not result in apoptosis. *Advances in Space Research*. 2009; doi:org/10.1016/j.asr.2009.04.006
 30. Ravid K., Lu J., Zimmet J.M., Jones M.R.J. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *Cell. Physiol*. 2002; 190(1): 7–20.
 31. Maier J.A. Impact of simulated microgravity on cell cycle control and cytokine release by U937 cells. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol*. 2006; 19: 279–86.
 32. Lim S., Kaldis P. Cdks, cyclins and CKLs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*. 2013; 140 (15): 3079–93.
 33. Jianfeng Pan, Fangzheng Shang, Rong Ma, Youjun Rong, Yanjun Zhang. Advances of the regulatory mechanism of cyclin, cyclin-dependent kinases and related kinase inhibitors in cell cycle progression. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2023 Apr 25; 39(4): 1525–47. doi: 10.13345/j.cjb.220478
 34. Deutsch V.R., Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *J. Haematol*. 2006; 134(5): 453–66.
 35. Machlus K.R., Italiano E.J.R., The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J. Cell Biol*. 2013; 201(6): 785–96. doi:10.1083/jcb.201304054
 36. Italiano J.E.R., Hartwig J.H. *Megakaryocytes development and platelet formation*. Platelets, 3th edition, Elsevier. 2013; 27–49.
 37. Michinori Ogura, Yasuo Morishima, Ryuzo Ohno, Yukio Kato, Norio Hirabayashi, Hiroshi Nagura, et al. Establishment of a Novel Human Megakaryoblastic Leukemia Cell Line, MEG-01, With Positive Philadelphia Chromosome. 1985; 1 December, 66(6): 1384–92. doi: 10.1182/blood.V66.6.1384.1384
 38. Kim Y.J., et al. Time-averaged simulated microgravity (taSMG) inhibits proliferation of lymphoma cells, L-540 and HDLM-2, using a 3D clinostat. *BioMed Eng On Line*. 2017; 2–12.
 39. Egli M., Wuest S.L., Richard S., Reinhard Furrer. Novel Microgravity Simulator Applicable for Three-Dimensional Cell Culturing. *October Microgravity Science and Technology*. 2014; 26(2): doi:10.1007/s12217-014-9964-2
 40. Santella L., Ercolano E., Nusco G.A. The cell cycle: a new entry in the field of Ca²⁺ signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2005; Nov; 62(21): 2405–13. PMID:16003492
 41. Echard A., O'Farrell P.H. The degradation of two mitotic cyclins contributes to the timing of cytokinesis. *Curr Biol*. 2003; 13: 373–83. PMID:12620185; doi: 10.1016/S0960-9822(03)00127-1
 42. Wang J., Zhang J., Bai S., Wang G., Mu L., Sun B., et al. Simulated microgravity promotes cellular senescence via oxidant stress in rat PC12 cells. *Neurochem. Int*. 2009; 55: 710–6.
 43. Coinu R., Chiaviello A., Galleri G., Franconi F., Crescenzi E., Palumbo, G. Exposure to modeled microgravity induces metabolic idleness in malignant human MCF-7 and normal murine VSMC cells. *FEBS Lett*. 2006; 580: 2465–70.
 44. Prasanna Vidyasekar, Pavithra Shyamsunder, Rajpranap Arun, Rajalakshmi Santhakumar, Nand Kishore Kapadia, Ravi Kumar, et al. Genome Wide expression profiling of cancer cell lines cultured in microgravity reveals significant dysregulation of cell cycle and MicroRNA gene networks. *Plos One*. 2015. doi:10.1371/journal.pone.0135958
 45. Hiroko Ikeda, Masafumi Muratani, Jun Hidema, Megumi Hada, Keigi Fujiwara, Hikaru Souda, et al. Expression profile of cell cycle-related genes in human fibroblasts exposed simultaneously to radiation and simulated microgravity. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(19): 4791. doi: 10.3390/ijms20194791
 46. Sokolovskaya A.A., Korneeva E.A., Virus E.D., Kolesov D.V., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A. Inhibition of cell cycle progression, induction of apoptosis, and changes in surface markers of MEG-01 megakaryoblastic cells exposed to a random positioning machine. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; doi:org/10.3390/ijms21030855

Сведения об авторах:

Сергеева Екатерина Андреевна, мл. науч. сотр., отдел молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Метелкин Аркадий Андреевич, мл. науч. сотр., отдел молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

Соколовская Алиса Анатольевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., отдел молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП.

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092+575:599

Лукина С.С.¹, Пронина И.В.¹, Бурденный А.М.^{1,2}, Филиппова Е.А.¹, Казубская Т.П.³, Кушлинский Н.Е.³, Брага Э.А.^{1,4}, Логинов В.И.^{1,4}

Аберрантная экспрессия группы длинных некодирующих РНК при раке яичников

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

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

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Россия, Каширское шоссе, д. 23;

⁴ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова», 115522, Москва, Россия, ул. Москворечье, д. 1

Актуальность. Рак яичников (РЯ) представляет собой группу агрессивных гетерогенных злокачественных опухолей, характеризующихся быстрой прогрессией, низким диагностическим потенциалом, высокой частотой неблагоприятных исходов и высоким потенциалом метастазирования. В последнее время все большую актуальность приобретают исследования длинных некодирующих РНК (днРНК, lncRNAs), которые не обладают способностью кодировать белки. Для днРНК характерна высокая тканеспецифичность экспрессии, они участвуют в регуляции различных сигнальных путей в клетках, демонстрируя большой прогностический потенциал при онкозаболеваниях.

Цель исследования – выявление аберрантно экспрессируемых длинных некодирующих РНК в образцах опухолей больших РЯ и связи уровней экспрессии с патофизиологическими характеристиками опухолей.

Методика. Образцы опухолей РЯ собраны и клинически охарактеризованы в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». Высокомолекулярную РНК выделяли из ткани стандартным методом. Анализ уровня экспрессии днРНК HOTAIR, MALAT1 и TINCR проводился с использованием ПЦП в реальном времени готовой реакционной смесью qPCRmix-HS SYBR («Евроген»). Статистический анализ уровней экспрессии выполнен в программной среде R с применением непараметрического U теста Манна–Уитни. Корреляционный анализ выполняли с использованием метода ранговой корреляции Спирмена и рассчитывали уровень его значимости. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Дополнительно были проанализированы данные по экспрессии днРНК при РЯ по базе данных GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>).

Результаты. Анализ уровня экспрессии днРНК показал значимое ($p \leq 0.05$) снижение уровня экспрессии днРНК HOTAIR, MALAT1. При анализе образцов с учётом патофизиологических характеристик опухоли было показано, что снижение уровня экспрессии HOTAIR ассоциировано с III/IV стадией опухолевого процесса. Для днРНК MALAT1 и TINCR показана значимая корреляция низкого уровня экспрессии с развитием эндометриоидного подтипа РЯ.

Заключение. Представленные данные способствуют более глубокому пониманию механизмов развития РЯ и могут быть использованы при диагностике, прогнозе и выборе тактики лечения данной патологии.

Ключевые слова: длинные некодирующие РНК; экспрессия; рак яичников

Для цитирования: Лукина С.С., Пронина И.В., Бурденный А.М., Филиппова Е.А., Казубская Т.П., Кушлинский Н.Е., Брага Э.А., Логинов В.И. Аберрантная экспрессия группы длинных некодирующих РНК при раке яичников. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(2): 26-32.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.26-32

Участие авторов: Лукина С.С., Пронина И.В. – ответственные за экспериментальные данные; Бурденный А.М. – концепция и структура статьи; Лукина С.С., Филиппова Е.А. – статистическая обработка полученных данных; Логинов В.И. – биоинформационный, подготовка иллюстративного материала; Казубская Т.П., Кушлинский Н.Е. – сбор клинических образцов; Брага Э.А. – организация работы в рамках гранта РФФ №20-15-00368, редактирование статьи. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Бурденный Алексей Михайлович, e-mail: burdennyu@gmail.com, Лукина Светлана Сергеевна, e-mail: sveta_sergeevna349@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 20-15-00368).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы благодарят сотрудников ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» за сбор и клинико-гистологическую характеристику образцов РЯ.

Поступила 16.05.2023

Принята к печати 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Lukina S.S.¹, Pronina I.V.¹, Burdenny A.M.^{1,2}, Filippova E.A.¹, Kazubskaya T.P.³, Kushlinskii N.E.³, Braga E.A.^{1,4}, Loginov V.I.^{1,4}

Aberrant expression of a long non-coding RNAs group in ovarian cancer

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltiyskaya st. 8, Moscow 125315, Russian Federation;

²Emanuel Institute for Biochemical Physics,
Kosygina st., 3, Moscow, 119334, Russian Federation;

³Blokhin National Medical Research Center of Oncology,
Kashirskoe sh. 23, Moscow, 115478, Russian Federation;

⁴Bochkov Research Centre for Medical Genetics,
Moskvoreche st. 1, Moscow, 115522, Russian Federation

Background. Ovarian cancer (OC) is a group of aggressive heterogeneous malignant tumors characterized by rapid progression, low diagnostic potential, high incidence of adverse outcomes, and high potential for metastasis. Recently, studies of long non-coding RNAs (lncRNAs), which, with rare exceptions, do not have the ability to encode proteins, have become increasingly important. lncRNAs are characterized by high tissue-specific expression and they are involved in the regulation of various signaling pathways in cells and demonstrate a great prognostic potential in cancer. **Aim.** Detection of aberrantly expressed long non-coding RNAs in tumor samples from OC patients and association of expression levels with pathophysiological characteristics of tumors.

Methods. Samples of OC tumors were collected and clinically characterized at the N.N. Blokhin Research Institute of Clinical Oncology. High molecular weight RNA was isolated from tissue by a standard method. Analysis of the expression levels of HOTAIR, MALAT1, and TINCR lncRNA was carried out using real-time PCR and a qPCRmix-HS SYBR ready-made reaction mixture (Evrogen). Statistical analysis of expression levels was performed in the R software environment using the nonparametric Mann-Whitney U test. Correlation analysis was performed using Spearman's rank correlation, and its significance level was calculated. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Additionally, expression levels of these lncRNAs in OC were analyzed using the GEPIA database (<http://gepia.cancer-pku.cn/>).

Results. The expression levels of the HOTAIR and MALAT1 lncRNA genes were significantly decreased ($p \leq 0.05$). Analysis of the samples with the account of the tumor pathophysiological characteristics showed that the decrease in the level of HOTAIR expression was associated with stage III/IV of the tumor process. For MALAT1 and TINCR lncRNAs, low expression levels significantly correlated with the development of the endometrioid subtype of OC.

Conclusion. The results of the study allow a better insight into the mechanisms of OC development and can be used for diagnosis, prognosis and selection of therapeutic tactics in this pathology.

Keywords: long non-coding RNA; expression; ovarian cancer

For citation: Lukina S.S., Pronina I.V., Burdenny A.M., Filippova E.A., Kazubskaya T.P., Kushlinskii N.E., Braga E.A., Loginov V.I. Aberrant expression of a long non-coding RNAs group in ovarian cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(2): 26-32. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.26-32

Author's contribution: Lukina S.S., Pronina I.V. – processing of material, conducting research; Burdenny A.M. – concept and design of research; Lukina S.S., Filippova E.A. – statistical processing of the result; Loginov V.I. – bioinformatical analysis and preparation of illustrative material; Kazubskaya T.P., Kushlinskii N.E. – collection and the description of the material, Braga E.A. – general guidance of the study in frame of RSF grant №20-15-00368, editing of the article. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Alexey Mikhailovich Burdenny*, e-mail: burdenny@gmail.com; *Svetlana Sergeevna Lukina*, e-mail: sveta_sergeevna349@mail.ru

Information about the authors:

Lukina S.S., <https://orcid.org/0000-0001-6246-2444>

Pronina I.V., <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>

Burdenny A.M., <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>

Filippova E.A., <https://orcid.org/0000-0001-7172-0433>

Kazubskaya T.P., <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>

Kushlinskii N.E., <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>

Braga E.A., <https://orcid.org/0000-0001-5188-4094>

Loginov V.I., <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>

Financing. This work was supported by the Russian Science Foundation (grant no. 20-15-00368).

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

Acknowledgments. The authors thank the staff of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology for collecting and clinical and histological characterization of OC samples.

Received 16.05.2023

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

Введение

Злокачественные виды опухолей у женщин, включая рак молочной железы, яичников, матки, влагалища, шейки матки и вульвы, относятся к числу основных угроз современной жизни. Рак яичников (РЯ) представляет собой группу агрессивных гетерогенных злокачественных опухолей эпителиального генеза [1]. Симптомы РЯ могут быть неспецифическими (вздутие живота, боли в области таза, боли в спине, потеря веса и изменения в работе кишечника) и часто не проявляются до тех пор, пока рак не прогрессирует [2]. По последним данным было выявлено более 300 тыс новых случаев заболевания РЯ в мире, и по статистике он занимает 1-е место по смертности среди онкогинекологических заболеваний [3]. Факторами риска развития РЯ являются генетические факторы, этническое происхождение, ранний возраст менархе, позднее наступление менопаузы, общее количество менструальных циклов, отсутствие беременности или низкий паритет, отсутствие грудного вскармливания, отсутствие адекватной физической нагрузки и сбалансированной диеты [4–7]. Современными клиническими методами лечения больных РЯ в основном является комбинация хирургического вмешательства наряду с химиотерапией [8].

Одна из причин, по которой РЯ так трудно поддается лечению, заключается в его сложной биологии. Развитие и прогрессирование РЯ связано с сочетанием генетических и эпигенетических изменений. Генетические мутации, такие как мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, связаны с повышенным риском развития РЯ [9]. К эпигенетическим механизмам относятся модификации ДНК и гистонов, которые могут влиять на экспрессию генов, а также воздействие длинных некодирующих РНК (днРНК) [10].

днРНК – это молекулы РНК, которые не кодируют белки, и длина которых превышает 200 нуклеотидов [11]. Они участвуют в различных функциях в клетке, включая дозовую компенсацию, импринтинг, перестройку хроматина, модификацию гистонов, модификацию генов альтернативного сплайсинга, а также экспрессию генов [12]. Эти молекулы могут взаимодействовать с ДНК, мРНК, микроРНК, РНК-связывающими белками, и могут функционировать как в ядре, так и в цитоплазме [13]. днРНК могут действовать как молекулярные каркасы, объединяя множество белков и других РНК для образования функциональных комплексов, которые регулируют экспрессию генов. Они также могут действовать как приманки, связываясь с белками или молекулами РНК и мешая им выполнять свои нормальные функции. В некоторых случа-

ях днРНК могут даже выступать в качестве проводников, направляя белки в определенные области генома. При этом, разные днРНК могут выполнять функции как генов-супрессоров опухолей, так и онкогенов [10].

Аберрантная экспрессия днРНК наблюдалась при многих различных типах рака, в том числе и при РЯ, и было показано, что нарушение регуляции днРНК способствует развитию и прогрессированию рака [10]. Так, было показано, что днРНК *HOTAIR* способствует пролиферации раковых клеток путем подавления экспрессии генов-супрессоров опухоли [14], а экспрессия днРНК *TINCR* снижена при раке молочной железы, и ее гиперэкспрессия может подавлять рост и инвазию опухоли. Это указывает на его функцию супрессора опухоли [15]. Однако точные механизмы, с помощью которых днРНК *TINCR* вносит вклад в патогенез рака, еще до конца не изучены. Имеются единичные исследования показывающие, что эта днРНК может взаимодействовать с микроРНК, другими днРНК, факторами транскрипции и эпигенетическими регуляторами. [16]. Следует отметить, что результатов по экспрессии днРНК *TINCR* при РЯ в литературе не выявлено (PubMed, 28.03.2023, запрос: «*tin-cr ovarian cancer*»).

Цель работы – исследование экспрессии трех днРНК, выявление новых аберрантно экспрессируемых днРНК в злокачественных опухолях больных РЯ и их связи с патоморфологическими характеристиками опухолей.

Методика

Для анализа уровня экспрессии генов днРНК использовали 106 парных образцов опухолевой и условно нормальной ткани яичника от больных РЯ, проходивших обследование и лечение в НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Все опухоли были классифицированы в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза и гистологически верифицированы на основании критериев классификации ВОЗ [17]. Диагноз поставлен на основании гистологического заключения. Клинические данные больных приведены в **таблице**.

Для исследования брали образцы тканей РЯ больных, которые до операции не получали лучевую, химио- или гормонотерапию. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации [18]. Для отбора образцов с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70%) проводили дополнительный гистологический анализ микросрезов (3–5 мкм), окрашенных гематоксилином и эозином. Образцы тканей хранили

при -70°C . Замороженную в жидком азоте ткань измельчали с помощью гомогенизатора-диспергатора T10 basic ULTRA-TURRAX (IKA, Китай).

Высокомолекулярную РНК из парных образцов тканей РЯ (опухоль/прилежащая гистологически нормальная ткань яичников) выделяли с помощью реагента ExtractRNA #BC032 (Евроген, Россия). Качество и концентрацию РНК определяли по оптической плотности на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Перед использованием все образцы РНК обрабатывали ДНКазой, свободной от РНКазы. Обратную транскрипцию тотальной РНК проводили с помощью набора реактивов MMLV RT kit # SK021 (Евроген, Россия) и ПЦР-РВ проводили на амплификаторе Bio-Rad CFX96 с помощью готовых наборов qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Последовательности олигонуклеотидов и условия проведения ПЦР для днРНК HOTAIR, MALAT1, TINCR и референсного гена *B2M*. Данные анализировали с использованием относительной количественной оценки по методу $\Delta\Delta\text{Ct}$. Изменения уровня днРНК менее чем в 2 раза ($|\Delta\Delta\text{Ct}| \leq 2$) рассматривали как отсутствие изменений. Проводили 3 повторных ПЦР-анализа.

Статистический анализ уровней экспрессии выполнен в программной среде R. Для оценки значимости различий между исследуемыми группами применяли непараметрический U тест Манна–Уитни для независимых выборок. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Данные выражали в виде медианы (Me), нижнего (Q1) и верхнего (Q3) квартилей. Корреляционный анализ выполняли с использованием метода ранговой корреляции Спирмена и рассчитывали уровень его значимости. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

Дополнительно были проанализированы данные об экспрессии этих днРНК при РЯ по базе данных GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>).

Результаты и обсуждение

С использованием представительной выборки образцов РЯ (106 пар опухоль/норма) было изучено изменение уровня экспрессии 3 днРНК – HOTAIR, MALAT1, TINCR. Для днРНК HOTAIR, MALAT1 показано статистически значимое ($p < 0,0001$) снижение уровня их экспрессии (рис. 1, А). Для подтверждения полученного результата, нами был проведен биоинформатический анализ изменения уровня их экспрессии по базе данных GEPIA 2.0. В результате мы обнаружили, что уровень экспрессии HOTAIR, MALAT1, TINCR на выборке образцов РЯ (426 образцов опухолевой ткани и 88 образцов нормальной ткани) снижен

в образцах опухолевой ткани по сравнению с образцами нормы (рис. 1, Б).

Настоящая работа была направлена на поиск новых aberrантно экспрессируемых днРНК при РЯ с целью выявления закономерностей образования и прогрессии данного вида опухоли.

По результатам исследования, при РЯ было показано статистически значимое снижение уровня экспрессии днРНК HOTAIR, MALAT1 в образцах опухоли по сравнению с парной гистологически нормальной тканью яичников, что подтвердилось в ходе биоинформатического анализа экспрессии этих днРНК (согласно базе данных GEPIA 2.0).

На втором этапе исследования анализировали изменение уровня экспрессии для 3 днРНК в образцах первичных опухолей РЯ с учетом их патоморфологических особенностей (стадии опухолевого процесса,

Клинико-патоморфологические параметры больных. (может быть параметры опухоли у больных?)

Clinical and pathomorphological parameters of patients.

Клинико-гистологический параметр Clinical and histological parameters		Количество образцов Number of samples
Гистологический тип рака Histological type of cancer	Серозная карцинома Serous carcinoma	65
	Эндометриодная карцинома Endometrioid carcinoma	7
	Редкие формы рака Rare forms of cancer	34
Стадия опухолевого процесса Stage of the tumour process	Ранние стадии (I + II) Early stages (I + II)	50
	Поздние стадии (III + IV) Late stages (III + IV)	56
Степень дифференцировки Degree of differentiation	G1	17
	G2	17
	G3	32
	Нет	40
Размер первичной опухоли Size of primary tumour	T1	39
	T2	14
	T3	53
	T4	0
Лимфогенное метастазирование Lymphogenic metastasis	Есть Yes	30
	Нет No	76

размера опухоли, наличия или отсутствия лимфогенного метастазирования, степени дифференцировки, гистологического типа опухоли). Статистически значимых изменений уровня экспрессии днРНК HOTAIR, MALAT1 и TINCR в зависимости от размера опухоли, лимфогенного метастазирования и степени дифференцировки выявлено не было.

Нами показано дополнительное снижение уровня экспрессии днРНК HOTAIR (рис. 2, А) в образцах с тя-

желой (III-IV) стадией опухолевого процесса по сравнению с начальными стадиями на уровне тенденции ($p = 0.08$). Для MALAT1 и TINCR значимых изменений уровней экспрессии в образцах с тяжелой стадией опухоли не обнаружено.

Показано также изменение уровня экспрессии днРНК MALAT1 и TINCR (рис. 2, Б) в зависимости от гистологического типа опухоли. Так уровень экспрессии для днРНК TINCR значимо снижался при

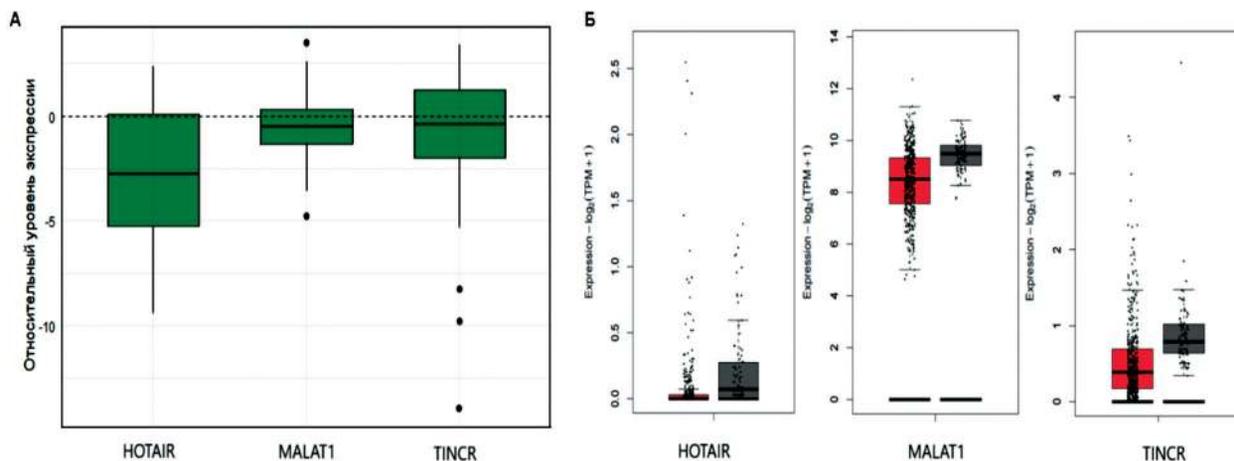


Рис. 1. Изменение уровня экспрессии днРНК HOTAIR, MALAT1, TINCR при РЯ. А – при анализе 106 парных образцов (порядок – во сколько раз); Б – согласно базе данных GEPIA 2.0; красный бокс-плот – опухолевые образцы, серый – нормальная ткань; ось ординат – уровень экспрессии $\log_2(TPM+1)$, где TPM – Transcript Count Per Million (количество транскриптов на миллион).

Fig. 1. Changes in expression levels of HOTAIR, MALAT1, TINCR dnRNA in RRNA. А – in analysis of 106 paired samples (order by how many times); B – according to GEPIA 2.0 database; red boxplot – tumour samples, grey – normal tissue; ordinate axis – expression level $\log_2(TPM+1)$, where TPM is Transcript Count Per Million.

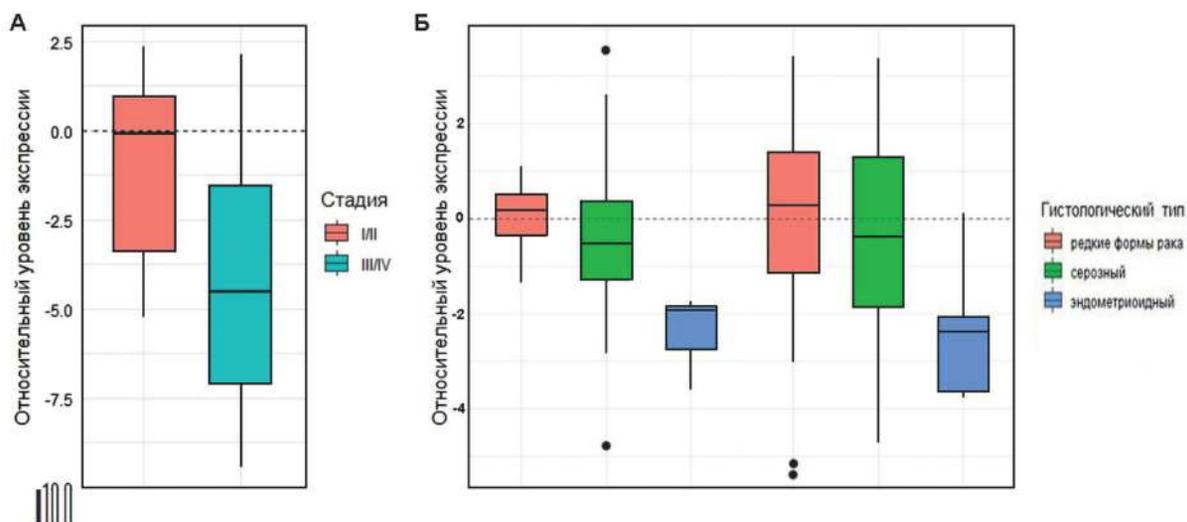


Рис. 2. Изменения уровня экспрессии днРНК HOTAIR, MALAT1 и TINCR в зависимости от: А – стадии онкологического процесса; Б – гистологического типа опухоли.

Fig. 2. Changes in dnRNA expression levels of HOTAIR, MALAT1 and TINCR depending on: А – stage of the cancer process; Б – histological type of tumour.

эндометриоидном типе опухоли относительно серозного типа ($p=0.002$) и при эндометриоидном типе относительно других редких форм опухоли ($p=0.002$). Для MALAT1 показано снижение уровня экспрессии на уровне тенденции ($p=0.07$) при эндометриоидном типе опухоли относительно серозного типа и относительно других редких форм опухоли. Для днРНК HOTAIR подобных закономерностей обнаружено не было.

Таким образом, сниженный уровень экспрессии HOTAIR на более тяжелых стадиях онкологического процесса, а также значимая корреляция низкого уровня экспрессии MALAT1 и TINCR с развитием эндометриоидного подтипа РЯ могут отражать связь данных днРНК с некоторыми клинико-гистологическими характеристиками опухолей и прогрессией заболевания.

При анализе ко-экспрессии 3 изученных днРНК методом корреляционного анализа по Спирмену была выявлена статистически значимо ко-экспрессируемая пара днРНК HOTAIR-TINCR ($r_s = 0.79, p = 0.001$). Полученные данные могут свидетельствовать о том, что обе днРНК могут участвовать в одном и том же процессе.

Результаты, полученные в нашей работе об изменении уровня экспрессии TINCR в эпителиальных опухолях яичников, согласуются с данными литературы, где схожие результаты были получены на других видах онкологии [15].

Статистически значимая ко-экспрессия днРНК HOTAIR-TINCR в опухолевых тканях РЯ указывает на их возможное участие в одном и том же биологическом процессе, протекающем в опухолевой клетке, например, в эпителиально-мезенхимальном переходе [14].

Заключение

В итоге, нами показано значимое ($p<0,0001$) снижение уровня экспрессии днРНК HOTAIR и MALAT1 в опухолях яичников, связь уровня экспрессии HOTAIR с более тяжелыми стадиями рака, и связь уровня днРНК MALAT1 и TINCR с развитием эндометриоидного подтипа РЯ. Нами также установлена статистически значимая ко-экспрессия днРНК HOTAIR и TINCR, на основании которой можно предполагать их участие в общих процессах, вовлеченных в развитие метастазирования.

Полученные результаты способствуют расширению представлений о роли длинных некодирующих РНК в онкогенезе. В частности, выявляют важную роль снижения экспрессии этих днРНК в развитии и прогрессии РЯ.

Дальнейшие исследования механизмов регуляции этих днРНК и их взаимодействий с другими молекулами, участвующими в развитии рака, несомненно, прольют

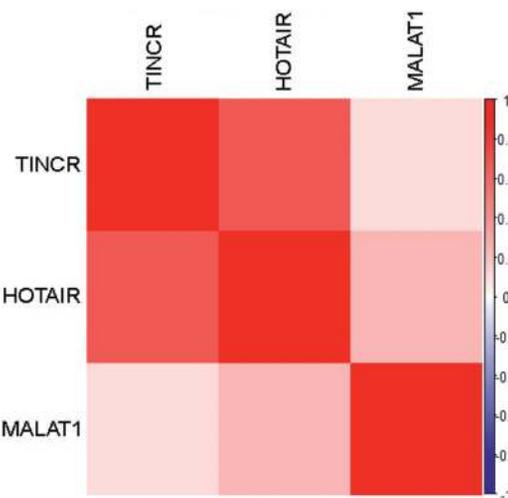


Рис. 3. Анализ ко-экспрессии (синие квадраты — отрицательная корреляция, красные квадраты — положительная корреляция, размер и яркость квадратов представляют степень корреляции).

Fig. 3. Co-expression analysis (blue squares represent negative correlation, red squares represent positive correlation, size and brightness of squares represent degree of correlation).

свет на сложную биологию рака яичников, а исследованные днРНК могут найти применение в разработке персонализированных подходов к диагностике, прогнозу и терапии больных РЯ.

Литература

(п.п. 1-9; 11-19 см. References)

- Лукина С.С., Бурденный А.М., Филиппова Е.А., Пронина И.В., Иванова Н.А., Казубская Т.П. и др. Роль длинных некодирующих РНК и ДНК-метилирования в патогенезе рака яичников. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2022; 66(4): 143-56. DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.143-156
- Пронина И.В., Филиппова Е.А., Бровкина О.И., Бурденный А.М., Казубская Т.П., Кушлинский Д.Н. и др. Группы длинных некодирующих РНК и микроРНК в регуляции уровня экспрессии ряда опухоль-ассоциированных генов при раке яичников. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2022; 174(9): 343-9. DOI 10.47056/0365-9615-2022-174-9

References

- Testa U., Petrucci E., Pasquini L., Castelli G., Pelosi E. Ovarian Cancers: Genetic Abnormalities, Tumor Heterogeneity and Progression, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. *Medicines (Basel)*. 2018; 5(1): 16. doi: 10.3390/medicines5010016
- Orr B, Edwards RP. Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2018 Dec; 32(6): 943-64. doi: 10.1016/j.hoc.2018.07.010
- Global Cancer Observatory (WHO International Agency for Research on Cancer)*. <https://gco.iarc.fr/>

4. Norquist B.M., Harrell M.I., Brady M.F., Walsh T., Lee M.K., Gulsuner S., et al. Inherited mutations in women with ovarian carcinoma. *JAMA Oncol.* 2016; 2(4): 482–90. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.5495
5. Gong T.T., Wu Q.J., Vogtmann E., Lin B., Wang Y.L. Age at menarche and risk of ovarian cancer: a meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer.* 2013; 132(12):2894–2900. doi: 10.1002/ijc.27952
6. Luan N.N., Wu Q.J., Gong T.T., Vogtmann E., Wang Y.L., Lin B. Breastfeeding and ovarian cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2013; 98(4): 1020–31. doi: 10.3945/ajcn.113.062794
7. Ciebiera M., Esfandyari S., Sibli H., Prince L., Elkafas H., Wojtyła C., Al-Hendy A., Ali M. Nutrition in Gynecological Diseases: Current Perspectives. *Nutrients.* 2021; 13(4): 1178. doi: 10.3390/nu13041178
8. Debela D.T., Muzazu S.G., Heraro K.D., Ndalama M.T., Mesele B.W., Haile D.C., et al. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med.* 2021; 9: 20503121211034366. doi: 10.1177/20503121211034366
9. Pallonen T.A., Lempiäinen S.M.M., Joutsiniemi T.K., Aaltonen R.I., Pohjola P.E., Kankuri-Tammilehto M.K. Genetic, clinic and histopathologic characterization of BRCA-associated hereditary breast and ovarian cancer in southwestern Finland. *Sci Rep.* 2022; 12(1): 6704. doi: 10.1038/s41598-022-10519-y
10. Lukina S.S., Burdenny A.M., Filippova E.A., Pronina I.V., Ivanova N.A., Kazubskaya T.P., Braga E.A., Loginov V.I. The role of long non-coding RNA and DNA methylation in the pathogenesis of ovarian cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2022; 66(4): 143–56. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2022.04.143-156
11. Wang Q., Liu J., You Z., Yin Y., Liu L., Kang Y., et al. LncRNA TINCR favors tumorigenesis via STAT3-TINCR-EGFR-feedback loop by recruiting DNMT1 and acting as a competing endogenous RNA in human breast cancer. *Cell Death Dis.* 2021; 12(1): 83. doi: 10.1038/s41419-020-03188-0
12. Statello L., Guo C.J., Chen L.L., Huarte M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021; 22(2): 96–118. doi: 10.1038/s41580-020-00315-9
13. Braga E.A., Fridman M.V., Moscovtsev A.A., Filippova E.A., Dmitriev A.A., Kushlinskii N.E. LncRNAs in Ovarian Cancer Progression, Metastasis, and Main Pathways: ceRNA and Alternative Mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 23; 21(22): 8855. doi: 10.3390/ijms21228855. PMID: 33238475; PMCID: PMC7700431
14. Zhu C., Wang X., Wang Y., Wang K. Functions and underlying mechanisms of lncRNA HOTAIR in cancer chemotherapy resistance. *Cell Death Discov.* 2022 Sep 13; 8(1): 383. doi: 10.1038/s41420-022-01174-3
15. Sharma U., Barwal T.S., Malhotra A., Pant N., Vivek., Dey D., et al. Long non-coding RNA TINCR as potential biomarker and therapeutic target for cancer. *Life Sci.* 2020; 257: 118035. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118035
16. Xu T.P., Wang Y.F., Xiong W.L., Ma P., Wang W.Y., Chen W.M., et al. E2F1 induces TINCR transcriptional activity and accelerates gastric cancer progression via activation of TINCR/STAU1/CDKN2B signaling axis. *Cell Death Dis.* 2017; 8(6): e2837. doi: 10.1038/cddis.2017.205
17. Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C., ed. *TNM Classification of Malignant Tumours.* 8th ed. John Wiley & Sons; 2017.
18. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013 Nov 27; 310(20): 2191–4. doi: 10.1001/jama.2013.281053
19. Pronina I.V., Uroshlev L.A., Moskovtsev A.A., Zaichenko D.M., Filippova E.A., Fridman M.V., Burdenny A.M., Loginov V.I., Kazubskaya T.P., Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A., Brovkina O.I. Dysregulation of LncRNA–miRNA–mRNA Interactome as a Marker of Metastatic Process in Ovarian Cancer. *Biomedicine.* 2022, 10, 824. DOI: 10.3390/biomedicine10040824
20. Pronina I.V., Filippova E.A., Brovkina O.I., Burdenny A.M., Kazubskaya T.P., Kushlinsky D.N., et al. Groups of long non-coding RNAs and microRNAs in the regulation of the expression level of a number of tumors-associated genes in ovarian cancer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2022; 174(9): 343–9. DOI 10.47056/0365-9615-2022-174-9-343-349

Сведения об авторах:

Лукина Светлана Сергеевна, аспирант, лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

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

Бурдённий Алексей Михайлович, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

Филиппова Елена Александровна, канд. биол. наук, науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

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

Кушлинский Николай Евгеньевич, доктор мед. наук, проф., акад. РАН, зав. отделом клинической биохимии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

Брага Элеонора Александровна, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП;

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

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092

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

Роль полиморфизма генов *F2*, *F5*, *FGB* и *PAI-1* в изменении гемостаза у больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 454092, Челябинск, Россия, ул. Воровского д. 64;

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

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

⁴ФГБОУ ВО «Новгородский государственный университет имени Ярослава Мудрого», 173003, Великий Новгород, Россия, ул. Большая Санкт-Петербургская, д. 41

Цель работы – исследовать ассоциацию между показателями гемостаза и полиморфизмом генов, обеспечивающих его реализацию у пациентов с COVID-19-ассоциированным повреждением легких в зависимости от тяжести клинического течения.

Методика. В исследовании принимали участие 46 больных COVID-19, которые в зависимости от тяжести поражения легких разделены на 2 группы: с поражением до 50% паренхимы легких ($n = 22$) и с поражением более 50% ($n = 24$). Контрольная группа – практически здоровые люди ($n = 15$), сопоставимые по полу и возрасту. У всех лиц до начала терапии исследовали протромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время, тромбиновое время, уровень фибриногена и Д-димера в крови, XII-зависимый фибринолиз и активность антитромбина; методом полимеразной цепной реакции определяли полиморфизмы *rs1799963* гена *F2*, *rs6025* гена *F5*, *rs1800790* гена *FGB* и *rs1799889* гена *PAI-1*. Анализ полученных данных проводили с помощью пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics v. 23.

Результаты. У больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких при средней и тяжелой степени тяжести заболевания происходит активация коагуляционного гемостаза за счет внешнего и общего пути, замедляется XII-зависимый фибринолиз и снижается активность антитромбина по сравнению со здоровыми лицами, при этом выраженность прокоагулянтных изменений увеличивается в группе больных с тяжелым течением болезни; характерно увеличение частоты встречаемости мутантных аллелей полиморфизма *rs179996* гена *F2* по сравнению с контролем; наблюдается снижение частоты немутантных гомозигот и повышение частоты гетерозигот; частота встречаемости патологических мутаций *rs6025* гена *F5*, *rs1800790* гена *FGB*, *rs1799889* гена *PAI-1* значимо не меняется; выявлена обратная связь слабой силы между гетерозиготным вариантом GA полиморфизма *rs179996* гена *F2* и протромбиновым временем при заболевании средней степени тяжести, и средней силы при тяжелой степени тяжести, не выявлено значимой связи между показателями гемостаза и полиморфизмами *rs6025* гена *F5*, *rs1800790* гена *FGB*, *rs1799889* гена *PAI-1*.

Ключевые слова: COVID-19; коагуляционный гемостаз; фибринолиз; полиморфизм; ген *F*; ген *FGB*; ген *PAI-1*

Для цитирования: Осиков М.В., Антонов В.Н., Зотов С.О., Чулков В.С. Роль полиморфизма генов *F2*, *F5*, *FGB* и *PAI-1* в изменении гемостаза у больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(2): 33-41.
DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.33-41

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Осиков М.В., Антонов В.Н.; сбор и обработка материала – Зотов С.О.; статистическая обработка – Чулков В.С., Зотов С.О.; написание текста – Осиков М.В., Зотов С.О., Чулков В.С.; редактирование – Осиков М.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции. Осиков Михаил Владимирович, e-mail: prof.osikov@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.04.2023

Принята к печати 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Osikov M.V.^{1,2}, Antonov V.N.^{1,3}, Zotov S.O.^{1,3}, Chulkov V.S.⁴**Role of F2, F5, FGB, and PAI-1 gene polymorphisms in changes of hemostasis in patients with COVID-19-associated lung injury**¹South Ural State Medical University,
Vorovskogo St. 64, Chelyabinsk, 454092, Russian Federation;²Chelyabinsk Regional Clinical Hospital,
Vorovskogo St. 70, Chelyabinsk, 454048, Russian Federation;³Regional Clinical Hospital № 3,
Prospekt Pobedy 287, Chelyabinsk, 454136, Russian Federation;⁴Yaroslav-the-Wise Novgorod State University,
Bolshaya St. Petersburg str., 41, Veliky Novgorod, 173003, Russian Federation

The aim of this work was to study the association between hemostasis and related genetic polymorphisms in patients with COVID-19-associated lung injury depending on its severity.

Methods. The study included 46 patients with COVID-19 divided into two groups based on the severity of lung injury: with injury up to 50% of the lung parenchyma ($n = 22$) and with injury more than 50% ($n = 24$). The control group consisted of sex- and age-matched practically healthy individuals ($n = 15$). Before the start of therapy, all subjects were assessed for prothrombin time, activated partial thromboplastin time, thrombin time, blood concentrations of fibrinogen and D-dimer, XII-dependent fibrinolysis, and antithrombin activity. Polymorphisms *rs1799963* of the *F2* gene, *rs6025* of the *F5* gene, *rs1800790* of the *FGB* gene, and *rs1799889* of the *PAI-1* gene were determined by polymerase chain reaction. Data were analyzed with the IBM SPSS Statistics v. 23 application software package.

Results. In patients with moderate and severe COVID-19-associated lung injury, activation of coagulation hemostasis was observed, which was due to external and common pathways, slower XII-dependent fibrinolysis, and reduced antithrombin activity compared to healthy individuals. Procoagulant changes were significantly more pronounced in the group of patients with severe disease, who had a characteristic increase in the frequency of mutant alleles of the *F2* gene *rs179996* polymorphism compared to the control, decreased frequency of non-mutant homozygotes, and increased frequency of heterozygotes. The frequency of occurrence of pathological mutations *rs6025* in the *F5* gene, *rs1800790* in the *FGB* gene, *rs1799889* in the *PAI-1* gene did not significantly change. A weak inverse correlation was found between the heterozygous GA variant of the *F2* gene *rs179996* polymorphism and the prothrombin time in moderate disease, and a moderately strong inverse correlation in severe disease with more than 50% lung injury. There was no significant correlation between parameters of hemostasis and polymorphisms *rs6025* in the *F5* gene, *rs1800790* in the *FGB* gene, and *rs1799889* in the *PAI-1* gene.

Keywords: COVID-19; coagulation hemostasis; fibrinolysis; polymorphisms; *F2* gene; *F5* gene; *FGB* gene; *PAI-1* gene

For citation: Osikov M.V., Antonov V.N., Zotov S.O., Chulkov V.S. Role of F2, F5, FGB, and PAI-1 gene polymorphisms in changes of hemostasis in patients with COVID-19-associated lung injury. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2023; 67(2): 33-41. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.33-41

Author's contribution: concept and design of the study – Osikov M.V., Antonov V.N.; collection and processing of material – Zotov S.O.; statistical processing – Chulkov V.S., Zotov S.O.; text writing – Osikov M.V., Zotov S.O., Chulkov V.S.; editing – Osikov M.V., Chulkov V.S.

Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Mikhail V. Osikov*, e-mail: prof.osikov@yandex.ru

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

Financing. The study had no sponsorship.

Information about the authors:Osikov M.V., <https://orcid.org/0000-0001-6487-9083>Antonov V.N., <https://orcid.org/0000-0002-3531-3491>Chulkov V.S., <https://orcid.org/0000-0002-0952-6856>Zotov S.O., <https://orcid.org/0000-0001-7469-2386>

Received 06.04.2023

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

Введение

Распространение COVID-19, начавшееся в китайской провинции Хубэй, было объявлено Всемирной организацией здравоохранения пандемией 11 марта 2020 г. Значимой особенностью COVID-19 являет-

ся непредсказуемый исход заболевания – в одних случаях заболевание протекает без симптомов, в других с тяжелым интоксикационным синдромом, дыхательной недостаточностью или заканчивается летальным исходом [1]. Учитывая резкий рост числа инфицированных людей и ограниченные ресурсы здравоохра-

ния во всем мире во время волн пандемии COVID-19, становится особенно актуальным выявление пациентов, больше всего нуждающихся в интенсивной терапии и госпитализации. Протромботическое состояние характерно для COVID-19, поэтому наиболее информативной может быть оценка факторов коагуляционного гемостаза, фибринолитической системы и антикоагулянтной систем организма [2]. Первоначально считалось, что пневмония и прогрессирующая дыхательная недостаточность являются основными причинами смерти пациентов с COVID-19, однако все больше исследований показывают, что тромбоз, являющийся следствием дисрегуляции гемостаза, на самом деле может быть основной причиной смерти [3]. Частота тромботических осложнений у пациентов с COVID-19 может достигать 31%, особенно у госпитализированных в отделения интенсивной терапии [4]. В настоящее время проводится ряд исследований патофизиологии коагулопатии, специфичной для COVID-19. Повышенный уровень D-димера представляет собой начальное проявление коагулопатии у пациентов в критическом состоянии, за которым следуют снижение протромбинового и активированного частичного тромбопластинового времени [5]. COVID-19 может протекать как с тромбофилическим синдромом, так и без него, часть пациентов чувствительна к антикоагулянтной терапии, другая часть нет [6]. Одним из объяснений может служить генетическая предрасположенность. Для маркеров коагулопатии целесообразно исследовать их молекулярно-генетическую основу и вклад в осложнения, связанные с тромбообразованием при COVID-19 [7]. В настоящее время продолжается активный поиск маркеров генетического детерминирования тяжести течения и исхода COVID-19. Основной массив исследований касается полиморфизмов генов ангиотензин-превращающих ферментов и мембранно-связанной сериновой протеазы (TMPRSS2) [7, 8]. Имеются данные о влиянии на течение COVID-19 полиморфизмов генов молекул адгезии, компонентов системы интерферона, цитокинов и факторов транскрипции, окислительного стресса и метаболических молекул [7, 9]. Определение генетического риска тромботических событий приобрело большое научное и практическое значение, так как тромбовоспалительный синдром является ведущим звеном патогенеза тяжелого течения COVID-19. Однако роль носительства протромбогенных мутаций и полиморфизмов при COVID-19 остается неясной. Публикаций, посвященных этой теме, явно недостаточно. Доказано лишь защитное влияние полиморфизма гена эпокси-редуктазного комплекса витамина

К (VKORC1), ассоциированное с меньшей выраженностью тромбовоспалительного синдрома при COVID-19 [10]. Ряд исследователей рассматривают полиморфизм C677T гена редуктазы метилен-тетрагидрофолиевой кислоты (MTHFR) как причину гипергомоцистеинемии, приводящую к тяжелому острому респираторному дистресс-синдрому (ОРДС) и тромбозу при COVID-19 [11]. Вместе с тем крупные метаанализы (не касающиеся COVID-19) не подтверждают значимой ассоциации между полиморфизмом генов фолатного цикла и риском тромбозов [12]. Кроме генов, регулирующих циркуляцию белков, существует ряд генов регуляции гемостаза, мутации в которых предположительно играют роль в патогенезе коагулопатии при COVID-19. Различия в частотах аллелей и полиморфизмов генов *F2*, *F5*, *FGB* и *PAI-1* могут быть использованы для определения риска тяжести течения COVID-19. **Цель исследования** – исследовать ассоциацию между показателями гемостаза и полиморфизмом генов, обеспечивающих его реализацию у пациентов с COVID-19-ассоциированным повреждением легких в зависимости от тяжести клинического течения.

Методика

В исследовании приняли участие 46 больных с COVID-19, госпитализированных в ГАУЗ ОКБ №3 г. Челябинск (24 женщины и 22 мужчины), в возрасте от 44 до 75 лет, не принимавших препараты, влияющих на коагуляционный гемостаз, исследуемый перед госпитализацией и не родственных между собой. В зависимости от объема поражения легких больные с COVID-19 поделены на группы: группа 2 с поражением до 50% – средняя степень тяжести ($n=22$) и группа 3 с поражением более 50% – тяжелая степень тяжести ($n=24$) [13]. Критериями включения в группы 2 и 3 было наличие COVID-19, подтвержденное обнаружением на слизистых оболочках зева и носовой полости РНК вируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции («РеалБест РНК SARS-CoV-2», АО «Вектор Бест», Россия). Критериями исключения являлись наличие ранее выявленных онкологических заболеваний, хронических заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной систем и органов желудочно-кишечного тракта, крайне тяжелое течение сочетанной патологии, требующее госпитализации пациента в ОРИТ, наличие у пациента артериальной гипертензии 2-й степени и выше, индекс массы тела более 30 кг/м^2 , анемия. Всеми пациентами подписано информированное согласие. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол №4 от 24.05.2021). У всех па-

циентов методом мультиспиральной компьютерной томографии грудной клетки («Siemens SOMATOM Definition AS 64») выявлено двустороннее поражение легких, соответствующее патогномичным изменениям при COVID-19: диффузное уплотнение легочной ткани по типу «матового стекла» и консолидации в сочетании с ретикулярными изменениями. В контрольную группу вошли 15 клинически здоровых добровольцев (группа 1), сопоставимых по полу и возрасту с больными COVID-19 и не родственные между собой. Забор крови проводился на 1-е сутки поступления больного в стационар до начала стандартной тромбопрофилактики. Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) определялось путем добавления «АЧТВ-тест» (ООО «Технология –Стандарт», Россия), представляющего собой смесь соевых фосфолипидов, эллаговой кислоты, буфера HEPES, стабилизатора и консерванта ProCln 300, к исследуемой плазме крови, затем регистрировалось время образования сгустка. Концентрация фибриногена в крови определялась модифицированным методом Клаусса с использованием тест-системы «МультиТех-Фибриноген» (ООО «Технология –Стандарт», Россия). Протромбиновое время (ПТВ, время образования в плазме фибринового сгустка) измеряли с помощью «Техпластин-теста» (ООО «Технология –Стандарт», Россия) после добавления к плазме хлорида кальция и тромбопластина. Протромбивый индекс рассчитывали как отношение ПТВ контрольной плазмы к ПТВ исследуемой плазмы пациента, выражали в процентах. Концентрацию Д-димера в крови определяли с помощью «Тех-D-димер-тест» методом аглютинации с латексной суспензией (ООО «Технология –Стандарт», Россия). XII-зависимый фибринолиз и спонтанный фибринолиз определяли с помощью наборов «XIIa-зависимый фибринолиз» и «Фибринолиз-тест» соответственно (ООО «Технология –Стандарт», Россия), выражали значение в минутах. Генетические исследования проводились методом ПЦР в реальном времени («Roche LightCycler 96», «Roche Molecular Systems», США), материал – буккальный соскоб эпителия. Использовали наборы реагентов для выявления полиморфизмов в генах «SNP-экспресс-кардиогенетика» (НПФ «Литех», Россия). Определяли следующие полиморфизмы: *rs6025* гена *F5*, кодирующего свертывающий фактор V (фактор Лейден); *rs1799963* гена *F2* кодирующего свертывающий фактор II (протромбин); *rs1800790* гена *FGB*, кодирующего бета-полипептидную цепь белка фибриногена (фактор I свертывания крови); *rs1799889* гена *PAI-1* кодирующего эндотелиальный ингибитор активатора плазминогена – 1 (ИАП-1), ко-

торый негативно воздействует на фибринолиз. Результаты представляли в виде частоты встречаемости гомозиготного немутантного варианта – GG для полиморфизмов *rs6025*, *rs1799963* и *rs1800790*, 5G5G для *rs1799889*; гетерозиготного варианта – GA для *rs6025*, *rs1799963* и *rs1800790*, 5G4G для *rs1799889*; гомозиготного мутантного варианта – AA для *rs6025*, *rs1799963*, *rs1800790* и 4G4G для *rs1799889*. Статистическая обработка проведена с использованием IBM SPSS Statistics v. 23 («SPSS: An IBM Company»; США), Характеристика выборок представлена в формате «Me (Q25 – Q75)», где Me – медиана, Q25, Q75 – значение нижнего и верхнего квартиля соответственно. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев Краскелла–Уолиса, Манна–Уитни. При сравнении долей использовался точный критерий Фишера. При множественных сравнениях вводили поправку Бонферрони. Частота аллелей оценивались по методу подсчета гена, а критерий χ^2 был использован для выявления отклонений от равновесия Харди-Вайнберга. Для определения уровня корреляции использовался коэффициент Спирмена (R). Отличия считали статистически значимыми при уровне $p \leq 0,05$ или с учетом поправки Бонферрони.

Результаты

У больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких средней степени тяжести до начала терапии по сравнению с группой контроля выявлено значимое ускорение? укорочение протромбинового времени (на 54% по медиане), показатель АЧТВ в этой группе существенно не меняется, происходит укорочение тромбинового времени (на 29%), увеличение в крови концентрации фибриногена (на 65%), Д-димера (в 13 раз), замедление XII-зависимого фибринолиза на 66%, снижение активности антитромбина на 21% (табл. 1). У больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких тяжелой степени тяжести протромбиновое время по сравнению с контролем укорачивается на 46% по медиане по сравнению с контролем, АЧТВ значимо не меняется, тромбиновое время меньше на 42%. Содержание фибриногена в крови больных группы 3 выше на 40% по сравнению с контролем. Уровень Д-димера по сравнению с контролем выше в 13,4 раза, XII-зависимый фибринолиз медленнее на 411% по сравнению с контролем, активность антитромбина снижается по сравнению с контролем на 77%.

У больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких тяжелой степени тяжести по сравнению с группой больных средней степени тяжести до нача-

ла терапии по медиане протромбиновое время удлиняется на 27%, АЧТВ значимо не меняется, тромбиновое время укорачивается меньше на 19%. Содержание фибриногена в крови больных группы 3 меньше на 19% по сравнению с группой 2. Уровень Д-димера не изменяется, XII-зависимый фибринолиз медленнее на 206%, активность антитромбина снижается на 67% по сравнению с группой 2.

Как видно из **таблицы 2**, в группе пациентов с COVID-19-ассоциированным поражением легких средней степени тяжести статистически значимо чаще встречается генотип GA полиморфизма *rs1799963* гена *F2* и соответственно снижается встречаемость дикого генотипа GG. Аллель А этого полиморфизма также встречается чаще, чем в группе контроля. Частота встречаемости других исследуемых полиморфизмов и аллелей в этой группе не меняется. В группе 3 при анализе полиморфизма *rs1799963* гена *F2* аллель А встречается чаще, чем аллель G по сравнению с контролем; частота встречаемости GG варианта этого полиморфизма – 77,3% наблюдений (ниже, чем в группе контроля), частота гетерозиготного GA варианта – 22,7% наблюдений (выше, чем в группе контроля), вариант AA обнаружен только в одном случае, что

не позволяет судить о частоте встречаемости этого варианта. В группе 3 при анализе распределения частоты аллелей и генотипов полиморфных локусов *rs6025* гена *F5*, *rs1800790* гена *FGB*, *rs1799889* гена *PAI-1* не выявлено статистически значимых различий с группой контроля, частота встречаемости мутантных вариантов генотипа не меняется. В группе 3 при анализе распределения частоты аллелей и генотипов исследуемых полиморфных локусов не выявлено статистически значимых различий с группой 2.

При оценке возможной корреляции в группе 2 в зависимости от варианта генотипа полиморфизма *rs1799963* гена *F2* выявлена слабая обратная связь между гетерозиготным вариантом GA и протромбиновым временем ($R=0,48$, $p<0,05$), в группе 3 выявлена обратная связь средней силы между гетерозиготным вариантом GA и протромбиновым временем ($R=0,58$; $p<0,05$).

Обсуждение

Активация гемостаза у больных COVID-19 обусловлена множеством факторов, среди которых повреждение эндотелия, цитокиновый шторм, дисфункция тромбоцитов с их гиперагрегацией,

Таблица 1/Table 1

Показатели гемостаза при COVID-19-ассоциированном поражении легких (Me (Q25–Q75))

Haemostasis parameters in COVID-19-associated lung injury (Me (Q25–Q75))

Показатели Indicators	Группа 1, Здоровые $n = 11$ Group 1, Healthy	Группа 2 Средняя степень тяжести $n = 22$ Group 2, Intermediate lung disease	Группа 3 Тяжелая степень тяжести $n = 24$ Group 3, Severe lung disease
ПВ, сек PT, sec	17,75 (13,20-24,30)	12,25 (10,20-14,75) *	10,30 (9,90-10,90) * #
АЧТВ, сек aPTT, sec	28,20 (27,50-30,10)	28,00 (27,00-31,00)	29,00 (28,00-33,00)
ТВ, сек TT, sec	19,80 (14,20-22,40)	14,10 (8,90-19,30) *	11,40 (7,60-16,50) **
Фибриноген, г/л Fibrinogen, g/l	2,85 (2,55-3,10)	4,70 (4,50-5,40) *	3,95 (3,10-4,80) * #
Д-димер, мг/л D-dimer, mg/l	0,08 (0,04-0,11)	1,10 (0,89-1,83) *	1,15 (0,93-1,85) *
Фибринолиз XII-зависимый, минуты Fibrinolysis XII-dependent, minutes	9,00 (8,00-10,00)	15,00 (9,50-23,50) *	46,00 (25,00-62,00) * #
Активность антитромбина, % Antithrombin activity, %	90,50 (84,50-99,00)	62,47 (41,06-74,09) *	31,44 (23,17-43,61) * #

Примечание. * – статистически значимые различия ($p<0,05$) с группой 1; # – с группой 2; n – количество людей в группе; ПВ – протромбиновое время; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время; ТВ – тромбиновое время.

Note. * – statistically significant differences ($p<0.05$) with group 1; # – with group 2; PT – prothrombin time; aPTT – activated partial thromboplastin time; TT – thrombin time.

Таблица 2/Table 2

Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов при анализе полиморфизмов генов *F2*, *F5*, *FGB* и *PAI-1* при COVID-19-ассоциированном поражении легких (Me (Q25–Q75))

Comparative analysis of allele and genotype frequencies in *F2*, *F5*, *FGB* and *PAI-1* gene polymorphisms in COVID-19-associated lung disease (Me (Q25–Q75))

Полиморфизм Polymorphism	Генотипы/ аллели Genotypes/ alleles		Частота генотипа							
			Группа 1 (n=15) Group 1	Группа 2 (n=22) Group 2	χ^2 (p) с группой 1 to group 1	ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)	Группа 3 (n=24) Group 3	χ^2 (p) с группой 1 to group 1	χ^2 (p) с группой 2 to group 2	ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)
			n	n			n			
<i>rs1799963</i> гена <i>F2</i>	Генотипы Genotypes	GG	15 (100%)	17 (82,7%)	3,942 (0,048)	1	16 (65,8%)	4,753 (0,030)	0,378 (0,539)	1
		GA	0	5 (17,3%)	3,942 (0,048)	4,412 (0,462-42,133)	7 (30,0%)	4,010 (0,046)	0,247(0,620)	4,529 (0,488-42,054)
		AA	0	0	-		1 (4,2%)	0,472 (0,493)	0,937 (0,334)	0,478 (0,027-8,380)
	Аллели Alleles	A	0%	10,4%	7,884 (0,005)	22,018 (0,253-20,798)	18,8%	6,359 (0,012)	1,434 (0,232)	5,077 (5,077-42,768)
<i>rs6025</i> гена <i>F5</i>	Генотипы Genotypes	GG	15 (100%)	29 (100%)	нет no	1	24 (100%)	нет		1
		GA	0	0			0			
		AA	0	0			0			
	Аллели Alleles	A	0%	0			0			
<i>rs1800790</i> гена <i>FGB</i>	Генотипы Genotypes	GG	9 (72,7%)	12 (55,2%)	1,024 (0,312)	1	15 (62,5%)	0,350 (0,555)	0,290 (0,590)	1
		GA	4 (27,3%)	8 (34,5%)	0,189 (0,664)	1,404 (0,303-6,495)	8 (33,3%)	0,129 (0,720)	0,008 (0,930)	5,500 (0,600-50,444)
		AA	0	2 (10,3%)	1,714 (0,191)	1,269 (1,269-13,584)	1 (4,2%)	0,472 (0,472)	0,718 (0,397)	0,478 (0,027-0,027)
	Аллели Alleles	A	14%	33,3%	0,064 (0,801)	2,413 (0,627-9,279)	20,8%	0,517 (0,473)	0,647 (0,422)	1,667 (0,410-6,778)
<i>rs1799889</i> гена <i>PAI-1</i>	Генотипы Genotypes	5G5G	11 (81,8%)	15 (71,2%)	1,009 (0,316)	0,422 (0,076-2,341)	16 (66,7%)	0,848 (0,357)	0,008 (0,930)	0,444 (0,077-2,562)
		5G4G	4 (18,2%)	3 (14,4%)	0,005 (0,945)	0,938 (0,153-5,728)	5 (20,8%)	0,033 (0,856)	0,111 (0,740)	1,184 (0,192-7,320)
		4G4G	0	4 (14,4%)	2,167 (0,141)	2,292 (0,239-22,018)	3 (12,5%)	1,504 (0,221)	0,230 (0,632)	1,571 (0,146-16,943)
	Аллели Alleles	4G	9,1%	21,4%	2,681 (0,102)	3,488 (0,727-16,732)	22, 9%	1,907 (0,168)	0,123 (0,726)	2,973 (2,973-14,753)

Примечание. χ^2 (p) – Хи-квадрат Пирсона и уровень значимости p при сравнении групп больных с контрольной группой, ОШ – отношение шансов, ДИ – доверительный интервал.

Note. χ^2 (p) – Pearson Chi-square and p significance level when comparing patient groups with controls, OR - odds ratio, CI – confidence interval.

повышение прокоагулянтной и снижение фибринолитической активности плазмы, окислительный стресс, образование антифосфолипидных антител. Несмотря на то что при COVID-19 ассоциированном повреждении легких воспаление и гиперкоагуляция являются ключевыми звеньями патогенеза, механизмы нарушений гемостаза отличаются от тех, которые наблюдаются при диссеминированном внутрисосудистом свертывании (ДВС) и сепсис-индуцированной коагулопатии [14]. В литературе описаны сложные взаимоотношения между циркулирующими иммунными клетками, эндотелием сосудов и множеством растворимых и мембраносвязанных факторов, которые регулируют коагуляцию и врожденный и адаптивный иммунитет, однако в контексте COVID-19 до сих пор отсутствует детальное понимание лежащих в основе молекулярных и клеточных взаимодействий каждой из этих систем [15]. Полученные в ходе представленной работы результаты соотносятся с накопленным за 3 года пандемии данными [16]. Многочисленные исследования зафиксировали повышенную прокоагулянтную и патологическую фибринолитическую активность у пациентов с COVID-19, что приводит к коагулопатии [17]. У госпитализированных пациентов с COVID-19 повышается уровень растворимого тромбомодулина в плазме, образование фибрина и его устойчивость к фибринолизу, что сопоставимо с соответствующими изменениями у больных с сепсисом, а также повышается скорость образования тромбина [18].

Предполагается, что повышенное потребление антитромбина у больных COVID-19 приводит к значительному снижению его активности у пациентов с тяжелым течением COVID-19, особенно в группе погибших [19]. В другом исследовании в плазме пациентов с COVID-19 продемонстрировано замедленное время образования тромбина, плазмينا и фибрина [20]. Гиперкоагуляция у этих больных представляет собой сложный и многофакторный процесс. SARS-CoV-2 проникает в клетки через рецептор ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2). Считается, что при присоединении вируса SARS-CoV-2 избыток ангиотензина увеличивает экспрессию *PAI-1*, который ингибирует фибринолиз с помощью эндотелиальных клеток [21]. Сообщалось также о повышенных уровнях тромбин-активируемого ингибитора фибринолиза и ингибитора протеина С (ингибитора активатора плазминогена-3) [22]. Инфекция SARS-CoV-2 приводит к острому воспалению, что приводит к увеличению уровня брадикинина и *tPA*. Однако повышенных уровней *tPA* недостаточно, чтобы уравновесить высокие уровни

PAI-1, что, вероятно, объясняет нарушение фибринолиза и накопление фибрина в альвеолах легких [23]. Отложения фибрина усиливают воспаление и фиброз и приводят к повреждению сурфактанта легких.

Транскрипционное профилирование бронхо-альвеолярного лаважа у пациентов с COVID-19 продемонстрировало различную экспрессию генов белков свертывания крови и фибринолиза: обнаружен повышенный уровень транскриптов и экспрессии тканевого фактора [24]. SARS-CoV-2 активирует гены, кодирующие факторы XI, VII и фон Виллебранда, вместе с подавлением экспрессии генов тромбомодулина и протеина S. Изменения в экспрессии генов урокиназного пути включают повышенную экспрессию генов ингибитора активатора плазминогена 1 (*PAI-1*), тканевый активатор плазминогена (*tPA*) и рецептор активатора урокиназы. Примечательно, что изменения в экспрессии генов в этих исследованиях не всегда были последовательными, что может отражать различия в исследуемой популяции, штамме вируса, тяжести и стадии заболевания и в результате других причин. Более того, трудно предвидеть функциональные последствия этих изменений, особенно учитывая наблюдения, что гены фибринолитического пути с противоположной функцией (например, *PAI-1* и *tPA*) скоординировано регулируются в определенных условиях [25]. Нарушение фибринолиза продемонстрировано у больных COVID-19, в том числе у пациентов в критическом состоянии [23].

Существуют единичные исследования касательно протромбогенных полиморфизмов гена *FII*, где показано что такие мутации (в том числе GA вариант полиморфизма *rs1799963*) являются значимым фактором риска неблагоприятного исхода у пациентов тяжелого и крайне тяжелого течения COVID-19 [26]. Противоречивые данные о влиянии генетических факторов описаны в литературе, однако учитывая количество публикаций и объем изученных популяций этот вопрос требует дальнейших исследований. Полиморфизм *rs1799963* гена *F2* возникает в результате мутаций и комбинативной изменчивости, в результате чего происходит замена гуанина (G) на аденин (A) в позиции 20210 гена *F2*. Изменение касается регуляторного участка, поэтому нарушения структуры протромбина не происходит, но у носителей мутантного аллеля A в крови обнаруживается повышенный уровень протромбина за счет избыточной экспрессии гена. Мутация в гене *F2* наследуется по аутосомно-доминантному типу, поэтому патологический эффект реализуется даже при наличии одной копии поврежденного гена (гетерозиготный генотип GA). Наличие генотипа AA повышает риск венозного тромбоза в 6,7 раз, GA

– в 2,8 раза. Протромбин активируется в тромбин, затем преобразует фибриноген в фибрин при формировании сгустка крови, стимулирует агрегацию клеток и активирует свертывающие факторы F5, F8 и F13A1 [27]. Также тромбин ингибирует коагуляцию, активируя естественный антикоагулянт – протеин С. В совокупности с другими факторами активации гемостаза при COVID-19 это приводит к гиперкоагуляции и как следствие к уменьшению протромбинового времени, что наблюдается в нашем исследовании.

Наблюдаемое отсутствие значимого изменения частоты встречаемости остальных исследованных полиморфизмов, как и их влияния на факторы гемостаза, прежде всего обусловлено относительно небольшим объемом исследованной популяции, этническим составом, но возможно и другое объяснение – действие других прокоагулянтных факторов (воспаление, повреждающее действие вируса, окислительный стресс и др.) при COVID-19 оказывает значительно более выраженное влияние на показатели гемостаза, чем генетическая детерминированность. При таком многофакторном заболевании, как COVID-19, несколько генетических и эпигенетических факторов способны регулировать фенотипическую экспрессию генов, что усложняет возможный анализ корреляции генотип-фенотип.

Выводы:

1. У больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких при средней и тяжелой степени тяжести заболевания происходит активация коагуляционного гемостаза за счет внешнего и общего пути, замедляется XII-зависимый фибринолиз и снижается активность антитромбина по сравнению со здоровыми лицами, при этом выраженность прокоагулянтных изменений увеличивается в группе больных с тяжелым течением болезни.

2. Для больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких средней и тяжелой степени тяжести характерно увеличение частоты встречаемости мутантных аллелей полиморфизма *rs179996* гена *F2* по сравнению с контролем; наблюдается снижение частоты немутантных гомозигот и повышение частоты гетерозигот; частота встречаемости патологических мутаций *rs6025* гена *F5*, *rs1800790* гена *FGB*, *rs1799889* гена *PAI-1* значимо не меняется.

3. У больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких выявлена обратная связь слабой силы между гетерозиготным вариантом GA полиморфизма *rs179996* гена *F2* и протромбиновым временем при заболевании средней степени тяжести, и средней си-

лы при тяжелой степени тяжести. Не выявлено значимой связи между показателями гемостаза и полиморфизмами *rs6025* гена *F5*, *rs1800790* гена *FGB*, *rs1799889* гена *PAI-1*.

Литература

(п.п. 1-11; 14; 15; 17 – 25 см. References)

12. Зотова И.В., Затеищиков Д.А. Наследственная тромбофилия и венозные тромбозомболические осложнения: правила тестирования в клинической практике. *Российский кардиологический журнал*. 2020; 25(3S): 4024. doi: 10.15829/1560-4071-2020-4024
13. *Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). 15 версия от 02.02.2022 [Электронный ресурс].* Режим доступа: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/059/392/original/BMP_COVID-19_V15.pdf.
16. Каштанова Е.В., Шахтшнейдер Е.В., Кручинина М.В., Логвиненко И.И., Стрюкова Е.В., Рагино Ю.И. Биохимические, молекулярно-генетические и клинические аспекты COVID-2019. *Бюллетень сибирской медицины*. 2021; 20(1): 147-57. doi: 10.20538/1682-0363-2021-1-147-157
26. Мойсова Д.Л., Городин В.Н., Скобликов Н.Э., Зотов С.В., Тихоненко Ю.В. Особенности полиморфизма некоторых генов системы гемостаза у больных COVID-19. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2021; Т. 16, 6(96): 35-40.
27. Капуста А.А. Молекулярно-генетические особенности коронавирусной инфекции COVID-19. *Новые импульсы развития: вопросы научных исследований*. 2021; (1): 17-30.

References

1. Feng Y., Ling Y., Bai T., Xie Y., Huang J., et al. COVID-19 with Different Severities: A Multicenter Study of Clinical Features. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Jun 1; 201(11): 1380-8. doi: 10.1164/rccm.202002-0445OC
2. Tuculeanu G., Barbu E.C., Lazar M., Chitu-Tisu, C.E., Moisa, E., Negoita, S.I., et al. Coagulation Disorders in Sepsis and COVID-19—Two Sides of the Same Coin? A Review of Inflammation—Coagulation Crosstalk in Bacterial Sepsis and COVID-19. *J. Clin. Med*. 2023; 12: 601. doi:10.3390/jcm12020601
3. Abou-Ismaïl M.Y., Diamond A., Kapoor S., Arafah Y., Nayak L. The hypercoagulable state in COVID-19: Incidence, pathophysiology, and management. *Thromb Res*. 2020; 194: 101-15. doi: 10.1016/j.thromres.2020.06.029
4. Klok F.A., Kruip M.J.H.A., van der Meer N.J.M., et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res*. 2020; 191: 145-7. doi: 10.1016/j.thromres.2020.04.013
5. Iba T., Levy J.H., Levi M., Connors J.M., Thachil J. Coagulopathy of Coronavirus Disease 2019. *Crit Care Med*. 2020; 48(9): 1358-64. doi: 10.1097/CCM.0000000000004458
6. Baysson H., Pennachio F., Wisniak A., Zaballa M.E., Pullen N., et al. Specchio-COVID19 study group. Specchio-COVID19 cohort study: a longitudinal follow-up of SARS-CoV-2 serosurvey participants in the

- canton of Geneva, Switzerland. *BMJ Open*. 2022; 31; 12(1): e055515. doi: 10.1136/bmjopen-2021-055515
7. Ellinghaus D., Degenhardt F., Bujanda L., et al. Severe COVID-19 GWAS Group. Genomewide association study of severe COVID-19 with respiratory failure. *N Engl J Med*. 2020; 383(16): 1522–34. doi: 10.1056/NEJMoa2020283
 8. Kaidashev I., Shlykova O., Izmailova O., et al. Host gene variability and SARS-CoV-2 infection: A review article. *Heliyon*. 2021; 7(8):e07863. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07863
 9. Taher I., Almaeen A., Ghazy A., et al. Relevance between COVID-19 and host genetics of immune response. *Saudi J Biol Sci*. 2021; 28(11): 6645–52. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.07.037
 10. Janssen R., Walk J. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) gene polymorphism as determinant of differences in Covid-19-related disease severity. *Med Hypotheses*. 2020; 144: 110218. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110218
 11. Karst M., Hollenhorst J., Achenbach J. Life-threatening course in coronavirus disease 2019 (COVID-19): Is there a link to methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism and hyperhomocysteinemia? *Med Hypotheses*. 2020; 144: 110234. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110234
 12. Zotova I.V., Zateyshchikov D.A. Inherited thrombophilia and venous thromboembolism: testing rules in clinical practice. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal*. 2020; 25(3S): 4024. (In Russian). Doi: 10.15829/1560-4071-2020-4024
 13. *Federal clinical guidelines Prevention, diagnosis and treatment of a new coronavirus infection (COVID-19), 15 version 02.02.2022 [digital resource]. [Vremennye metodicheskie rekomendatsii. Profilaktika, diagnostika i lechenie novoy koronavirusnoy infektsii (COVID-19)]. 15 versiya ot 02.02.2022 Access mode: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/059/392/original/BMP_COVID-19_V15.pdf*
 14. Iba T., Levy J.H., Connors J.M. et al. The unique characteristics of COVID-19 coagulopathy. *Crit. Care*. 2020; 24(1): 360. doi: 10.1186/s13054-020-03077-0
 15. Conway E.M., Mackman N., Warren R.Q., et al. Understanding COVID-19-associated coagulopathy. *Nat Rev Immunol*. 2022; 22: 639–49. doi:10.1038/s41577-022-00762-9
 16. Kashtanova E.V., Shakhshneider E.V., Kruchinina M.V., Logvinenko I.I., Striukova E.V., Ragino Yu.I. Biochemical, molecular genetic and clinical aspects of COVID-2019. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2021; 20(1): 147–57. doi: 10.20538/1682-0363-2021-1-147-157
 17. Yamada S., Asakura H. Coagulopathy and Fibrinolytic Pathophysiology in COVID-19 and SARS-CoV-2 Vaccination. *Int J Mol Sci*. 2022 Mar 19; 23(6): 3338. doi: 10.3390/ijms23063338
 18. Bouck E.G., et al. COVID-19 and sepsis are associated with different abnormalities in plasma procoagulant and fibrinolytic activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2021; 41: 401–14. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.315338
 19. Rostami M., Mansouritorghabeh H. Trend of fluctuations of anti-thrombin in plasma of patients with COVID-19: A meta-analysis and systematic review. *Expert Rev. Hematol*. 2022; 15: 747–55. doi: 10.1080/17474086.2022.2104708
 20. Ranucci M., et al. COVID-19-associated coagulopathy: biomarkers of thrombin generation and fibrinolysis leading the outcome. *J. Clin. Med*. 2020 doi: 10.3390/jcm9113487
 21. Blasi A., et al. In vitro hypercoagulability and ongoing in vivo activation of coagulation and fibrinolysis in COVID-19 patients on anticoagulation. *J. Thromb. Haemost*. 2020; 18: 2646–53. doi: 10.1111/jth.15043
 22. Zheng Z., et al. Interacting hepatic PAI-1/tPA gene regulatory pathways influence impaired fibrinolysis severity in obesity. *J. Clin. Invest*. 2020; 130: 4348–59. doi: 10.1172/JCI135919. PMID: 32657780
 23. FitzGerald E.S., Chen Y., Fitzgerald K.A., Jamieson A.M. Lung epithelial cell transcriptional regulation as a factor in COVID-19-associated coagulopathies. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2021; 64: 687–97. doi: 10.1165/rcmb.2020-0453OC
 24. Hashemi S.M.A., Thijssen M., Hosseini S.Y., et al. Human gene polymorphisms and their possible impact on the clinical outcome of SARS-CoV-2 infection. *Arch Virol*. 2021; 166: 2089–108. (In Engl.) doi: 10.1007/s00705-021-05070-6.
 25. Mast A.E., et al. SARS-CoV-2 suppresses anticoagulant and fibrinolytic gene expression in the lung. *eLife*. 2021 doi: 10.7554/eLife.64330
 26. Moiseva D.L., Gorodin V.N., Skoblikov N.E., Zotov S.V., Tikhonenko Y.V. Features of polymorphism of some genes of the hemostasis system in patients with COVID-19. *Meditsinskiy vestnik Bashkortostana*. 2021; vol. 16, № 6 (96): 35–40.
 27. Kapusta A.A. Molecular and genetic features of coronavirus infection COVID-19 (literature review). *Novye impul'sy razvitiya: voprosy nauchnykh issledovaniy*. 2021; (1): 17–30.

Сведения об авторах:

Осиков Михаил Владимирович, доктор мед. наук., проф., зав. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, руководитель отдела научной работы ГБУЗ Челябинская областная клиническая больница;

Антонов Владимир Николаевич, доктор мед. наук, доцент, проф. каф. терапии, ИДПО ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, заведующий областным пульмонологическим центром ГАУЗ ОКБ №3 г. Челябинска, гл. внештатный пульмонолог Министерства здравоохранения Челябинской области;

Чулков Василий Сергеевич, доктор мед. наук, доцент, и.о. директора медицинского института, проф. каф. внутренних болезней ФГБОУ ВО «Новгородский государственный университет им. Ярослава Мудрого»;

Зотов Семён Олегович, ст. лаб. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, зав. терапевтическим отд-нием ЧОИЦ ГАУЗ ОКБ № 3 г. Челябинска.

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092

Смоляков Ю.Н., Кузник Б.И., Лукьянов С.А., Шаповалов К.Г.

Оценка эффективности иммунокорректирующей терапии при среднетяжелом и тяжелом течении COVID-19

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

Оценка эффективности иммунокорректирующей терапии у больных с тяжелым течением COVID-19 является актуальнейшей задачей, так как позволяет прогнозировать характер течения и исход заболевания.

Цель исследования -- прогнозирование с помощью ROC-анализа изменений в составе тромбоцитов, лейкоцитов и их популяций, а также их взаимосвязи между собой при использовании иммунокорректоров тоцилизумаба и тималина. на 6-е сут после начала их применения.

Методика. Проведено исследование общего анализа крови и соотношения отдельных форменных элементов у 159 пациентов с тяжелым течением COVID-19. Сформировано 3 группы: 1-я группа – контроль, 44 человека, возраст $62 \pm 13,4$ г. (базовая схема лечения), 2-я – 81 пациент, возраст $58 \pm 10,9$ г. (базовая схема лечения + тоцилизумаб 4-8 мг/кг однократно внутривенно), и 3-я группа – 34 больных, возраст $61,3 \pm 10,1$ г. (базовая схема лечения + тималин 10 мг, 1 раз в сут в течение 5 сут внутримышечно). Исследования показателей крови проведены на 1-е 6-е сут терапии в контроле, после однократного введения тоцилизумаба и на следующий день после отмены тималина. При этом общепринятая терапия осуществлялась до конца пребывания больного в стационаре.

Результаты. В контрольной группе все исследуемые форменные элементы крови, а также их соотношение располагались в зонах шкалы, соответствующих неудовлетворительной или слабой оценке, что не находило отражения на результатах терапии. При использовании тоцилизумаба на 6-е сут отмечалось значительное увеличение числа эозинофилов и тромбоцитов, что по шкале оценки AUC следует расценивать как «хороший» эффект. Кроме того, в этой группе у пациентов выявлено увеличение показателей, характеризующих соотношение «тромбоциты/лейкоциты» в 1,6 раза и «тромбоциты/лимфоциты» в 1,4 раза, что может расцениваться как предиктор неблагоприятного исхода COVID-19. Под действием тималина на 6-е сут терапии у пациентов в 2 раза повышалось количество лимфоцитов, тогда как соотношение тромбоцитов/лимфоциты снижалось в 1,4 раза, а нейтрофилы/лимфоциты – в 2 раза. При этом в 1,3 раза повышалось количество лейкоцитов, в 2 раза – число моноцитов и в 1,5 раза – количество тромбоцитов. Полученные данные указывают на комплексное иммунопротекторное действие тималина у пациентов с тяжелым течением COVID-19.

Заключение. С помощью ROC-анализа у больных с тяжелым течением COVID-19 выявлены изменения (в 1-е на 6-е сут лечения) в содержании и соотношении отдельных форменных элементов крови в контроле (лечение по протоколу) и на фоне стандартной терапии иммунокорректорами (тоцилизумаб, тималин). Визуализированные графики позволяют эффективно оценить структуру и значимость сдвигов при различных терапевтических подходах.

Ключевые слова: COVID-19; ROC-анализ; тоцилизумаб; тималин; тромбоциты; лейкоциты; нейтрофилы; лимфоциты; моноциты; эозинофилы

Для цитирования: Смоляков Ю.Н., Кузник Б.И., Лукьянов С.А., Шаповалов К.Г. Оценка эффективности иммунокорректирующей терапии при среднетяжелом и тяжелом течении COVID-19. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(2): 42-51

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.42-51

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Кузник Б.И., Смоляков Ю.Н.; сбор и обработка материала – Лукьянов С.А., Шаповалов К.Г.; подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка – Смоляков Ю.Н.; написание текста и редактирование Смоляков Ю.Н., Кузник Б.И. Все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Для корреспонденции: Смоляков Юрий Николаевич,

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.09.2022

Принята к печати 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Smolyakov Yu.N., [Kuznik B.I.], Lukyanov S.A., Shapovalov K.G.

Assessment of the effectiveness of immunocorrective therapy in moderate and severe COVID-19Chita State Medical Academy,
Gorkogo St. 29a, Chita, 672000, Russian Federation

Evaluating the effectiveness of immunocorrective therapy in patients with severe COVID-19 is an urgent task, as it predicts the future course and outcome of the disease.

Aim: To use the ROC analysis for prediction of changes in the composition of platelets, leukocytes and their populations as well as their interrelations on the 6th day after the start of using the immunocorrectors, tocilizumab and thymalin.

Methods. Blood cell count and their ratios were analyzed for 159 patients with severe COVID-19. The patients were divided into three groups: 1, control, basic treatment regimen, 44 patients, age 62 ± 13.4 yrs; 2, basic treatment regimen plus tocilizumab, 4-8 mg/kg, iv, once, 81 patients, age 58 ± 10.9 yrs; 3, basic treatment regimen plus thymalin, 10 mg, im, once per day for 5 days, 34 patients, age 61.3 ± 10.1 yrs. Blood components were analyzed on the 1st and 6th days of therapy in the control group, after a single injection of tocilizumab, and on the day following withdrawal of thymalin. Conventional therapy was continued until the patients were discharged from the hospital.

Results. In the control group, all the blood count values, as well as their ratios, were in the scale zone corresponding to unsatisfactory or weak assessment. There was no consistency with the results of therapy. On the 6th day of tocilizumab treatment, there was a significant increase in the number of eosinophils and platelets, which should be regarded as a "good effect" according to the AUC scale. In this group, the ratio of platelets/leukocytes increased by 1.6 times and platelets/lymphocytes by 1.4 times. This can be regarded as a predictor of an unfavorable outcome of COVID-19. Under the influence of thymalin on the 6th day of therapy, the number of lymphocytes increased by 2 times, while the platelet/lymphocyte ratio decreased by 28.6% and neutrophils/lymphocytes by 50%. Furthermore, the number of leukocytes increased 1.3 times, the number of monocytes increased 2 times, and the number of platelets increased 1.5 times. These data indicate a complex immunoprotective effect of thymalin in patients with severe COVID-19.

Conclusion. Using ROC analysis in patients with severe COVID-19, changes from the 1st to the 6th day of treatment were found in the count and ratios of blood cells in control (treatment as per protocol) and in patients treated with the immunocorrectors, tocilizumab and thymalin. Presented graphs enable effective assessment of the structure and significance of changes in various therapeutic approaches.

Keywords: COVID-19; ROC analysis; tocilizumab; thymalin; platelets; leukocytes; neutrophils; lymphocytes; monocytes; eosinophils

For citation: Smolyakov Yu.N., [Kuznik B.I.], Lukyanov S.A., Shapovalov K.G. Assessment of the effectiveness of immunocorrective therapy in moderate and severe COVID-19. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(2): 42-51. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.42-51

For correspondence: Smolyakov Yu.N., e-mail: smolyakov@rambler.ru

Author's contribution: concept and design of the study – [Kuznik B.I.], Smolyakov Yu.N.; collection and processing of material – Lukyanov S.A., Shapovalov K.G.; preparation of illustrative material, statistical processing – Smolyakov Yu.N.; text writing, editing – [Kuznik B.I.]; Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

Information about the authors:Smolyakov Yu.N., <https://orcid.org/0000-0001-7920-7642>[Kuznik B.I.] <https://orcid.org/0000-0002-2502-9411>Lukyanov S.A., <https://orcid.org/0000-0001-7997-9116>Shapovalov K.G., <https://orcid.org/0000-0002-3485-5176>**Financing.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 12.09.2022

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

Введение

Известно, что ROC-анализ в медицинских исследованиях в основном применяется для прогноза течения и исхода физиологических или патологических процессов. Вместе с тем, ROC-анализ может быть использован при различных заболеваниях как метод кон-

троля за действием на организм тех или иных лекарственных препаратов.

В то же время доказано, что при COVID-19 может развиваться так называемый «цитокиновый шторм», сопровождаемый в основном резким увеличением

в крови провоспалительных цитокинов [1–4]. Однако в дальнейшем «Цитокиновый шторм» может смениться супрессией иммунитета, что, в конечном итоге, нередко приводит к присоединению оппортунистической бактериальной либо грибковой флоры и летальному исходу [2, 4, 5].

Между тем, для ликвидации нарушений в деятельности иммунной системы при COVID-19 нередко применяются препараты, обладающие иммуномодулирующим действием. Одним из таких лекарственных средств является ингибитор рецептора IL-6R тоцилизумаб, с успехом применяемый при среднетяжелых и тяжелых формах COVID-19 [1, 3, 6, 7–10.]. При использовании тоцилизумаба наблюдается быстрая ликвидация лихорадки, что сопровождается улучшением клинической картины, а у больных пневмонией, кроме того, регрессом воспалительных изменений в легких и повышением оксигенации. Одновременно у таких больных резко возрастает концентрация IL-6, а также снижается концентрация CRP и ферритина, что является хорошим прогностическим признаком [1–3, 7, 10, 11].

Нами [7–9, 12–15], при тяжелом течении COVID-19 применен комплекс полипептидов, выделенных из вилочковой железы и получивший наименование тималин [16–20]. Под воздействием тималина не только нормализовалось состояние иммунограммы, ведущее к ликвидации «цитокинового шторма» и его последствий, но и значительно улучшилось состояние тяжело больных, снизилась летальность и сроки пребывания пациентов в стационаре.

Вместе с тем, в литературе крайне мало исследований, позволяющих с помощью аналитических методов решить вопрос, насколько целесообразно применение тоцилизумаба или тималина при тяжелом течении COVID-19. Для решения поставленной задачи нами был использован метод ROC-анализа, позволяющий решать вопрос о целесообразности применения указанных иммунокорректоров при COVID-19.

Методика

Выполнено ретроспективное исследование результатов общего анализа крови и соотношения отдельных форменных элементов у 159 пациентов с тяжелым течением COVID-19. Все пациенты были разделены на 3 группы: 1-я – контроль (базовая схема лечения), куда вошло 44 человека (возраст $62 \pm 13,4$ г); 2-я группа – базовая схема лечения + тоцилизумаб (4–8 мг/кг однократно внутривенно), куда входил 81 пациент среднего возраста $58 \pm 10,9$ лет и 3-я – базовая схема лечения + тималин (10 мг, 1 раз в сут в течение 5 сут вну-

тримышечно) включала 34 больных (возраст $61,3 \pm 10,1$ лет). Для принятия решения о назначении дополнительно тоцилизумаба оценивали комплекс параметров: $SpO_2 \leq 93\%$, одышка в покое, температура выше $38^\circ C$ в течение 5 сут-, уровень С-реактивного белка (СРБ) ≥ 9 мг/л, число лейкоцитов $< 3,0 \times 10^9$ /л, абсолютное число лимфоцитов $< 1,0 \times 10^9$ /л, прогрессирование легочного поражения по КТ с наличием «свежих» очагов. Для принятия решения о назначении тималина принимались во внимание перечисленные выше показатели и абсолютное число лимфоцитов $< 0,75 \times 10^9$ /л. Все лабораторные исследования проводили перед введением препаратов и на 6-е сут от начала их применения. В исследование не включались пациенты с тромбоцитопенией, повышением уровня трансаминаз, почечной недостаточностью, иммунодефицитами, онкопатологией.

Все больные находились на лечении в моностационаре на базе ГУЗ «Городская клиническая больница №1» г. Читы в июне-августе 2020 г. Госпитализация всех включенных в исследование лиц проводилась с 6-го по 10-й дни с момента появления симптомов заболевания. Все проводимые мероприятия соответствовали этическим стандартам, разработанным на основе Хельсинкской декларации всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2008 г., и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 №266.

Подсчет форменных элементов в крови, в том числе лейкоцитов и их популяций производился на гемоанализаторе PENTRA-80 Horiba ABX Diagnostics (USA). Исследования показателей крови проведены на 1-е и 6-е сут терапии в контроле, после однократного введения тоцилизумаба и на следующий день после отмены тималина. При этом общепринятая терапия осуществлялась до конца пребывания больного в стационаре.

Методы статистического анализа. Решение задач классификации определяет необходимость выбрать пороговое значение анализируемого параметра для отнесения наблюдений (пациентов) к рассматриваемым в поставленной задаче классам. ROC-кривая используется для представления результатов двоичной классификации и оценки эффективности классификации. При этом выделяют 2 результирующих класса: с положительным исходом и с отрицательным исходом. Траектория положительного и отрицательно-го исхода зависит от поставленной задачи исследования. ROC-кривая показывает зависимость правильно классифицированных положительных исходов от ко-

личества неверно классифицированных отрицательных исходов. При этом чаще используют относительные показатели чувствительности (доля правильно классифицированных положительных исходов) и специфичности (доля правильно классифицированных отрицательных исходов). В биомедицинских исследованиях ROC анализ чаще всего используется для решения задач оценки прогностических моделей (бинарной логистической регрессии, дискриминантного анализа). Однако задачи классификации не ограничиваются прогностическими (оценкой полученного результата по признаку, исследованному до его наступления), но могут выполнять роль диагностических (оценка скрытого результата по признаку, исследованному после получения результата), а также лечебных с оценкой эффективности лечебных процедур по признаку, исследованному до и после лечения.

При построении ROC-кривой происходит изменение величины (порога) исследуемого фактора, при принятии решения об исходе и на заданном пороге по экспериментальным данным рассчитывается чувствительность и специфичность оценки [21]. Цикл испытания начинается с 0% чувствительности и 100% специфичности, заканчивается при 100% чувствительности, 0% специфичности. В ходе этой процедуры строится ROC кривая и определяется точка баланса чувствительности/специфичности, в которой

эти показатели максимальны. Полученная в этой точке величина исследуемого признака может считаться оптимальным порогом принятия решения, выше (или ниже, в зависимости от направления изменения признака) которого проявляется влияние исследуемой терапии. Оценку точности проводили по экспертной шкале показателей площади под ROC кривой (Area Under Curve – AUC). Экспертную шкалу оценки можно принять в следующем виде: 90-100% – отличная; 80-90% – хорошая; 70-80% – приемлемая; 60-70% – слабая; 50-60% – неудовлетворительная. Показатели AUC представлены в рамках 95% доверительных интервалов. Пороговые точки нанесены непосредственно на ROC-кривые.

Результаты

В качестве двоичного признака терапевтической классификации результата выступали сутки терапии, т.е. 0-1-е сут (до лечения) и 1-6-е сут (после окончания терапии) для тоцилизумаба и тималина. В исследуемых группах Классификации подвергались показатели общего анализа крови.

Исследуемые показатели крови в группе контроля, подвергнутые ROC моделированию, отражены на **рисунке 1**.

При оценке площади под кривой (AUC) выясняется, что качество моделирования, связывающего изме-

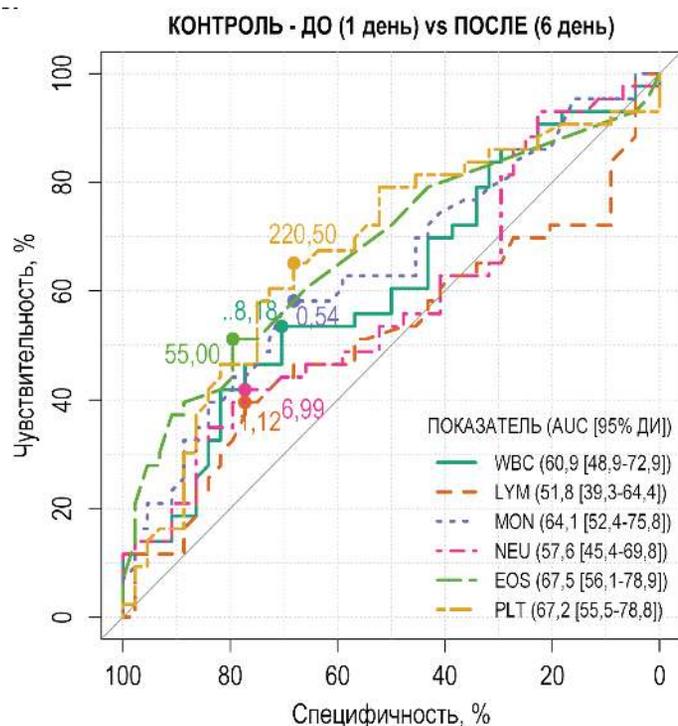


Рис. 1. ROC кривые оценки изменения параметров крови в результате традиционной схемы лечения.

Fig. 1. ROC curves for assessing changes in blood parameters as a result of the traditional treatment.

нения показателей крови с использованием традиционной терапии в большинстве случаев, попадает в зону шкалы неудовлетворительной оценки. Только увеличение (направление 1д<6д) количества эозинофилов (67,5 [56,1-78,9] %), тромбоцитов (AUC=67,2 [55,5-78,8] %) и моноцитов (AUC=64,1 [52,4-75,8] %) ассоциируется с применяемой терапией с оценкой «слабо», что вряд ли могло сказаться на результате лечения.

Иная картина отмечается при использовании однократной инъекции тоцилизумаба (рис.2).

При этом на 6-е сут отмечалось значительное увеличение числа эозинофилов (82,1 [75,4-88,9] %) и тромбоцитов (82,1 [75,4-88,9] %), что по шкале оценки AUC эффект следует расценивать как «хороший». Вместе с тем, увеличение числа тромбоцитов и эозинофилов, является плохим прогностическим признаком, ибо с одной стороны может способствовать тромбообразованию (увеличение числа тромбоцитов), а с другой - усилению провоспалительного эффекта за счет многочисленных цитотоксических белков, содержащихся в гранулах эозинофилов. В то же время, эозинофилы способны играть положительную роль в иммунном ответе. В частности, эозинофилы обладают плеiotропной функцией, выступая в качестве регуляторных клеток, участвующих в защитном иммунитете, включая противовирусные реакции [22]. Полученные нами дан-

ные несколько не умаляют положительного влияния тоцилизумаба при среднетяжелых и тяжелых стадиях COVID-19. Наш опыт показывает, что применение тоцилизумаба у больных COVID-19, находящихся в реанимационном отделении, приводит к улучшению состояния больных и снижению летальности [7, 8]

ROC-анализ в интегративной картине продемонстрировал изменение результатов в когорте пациентов COVID-19 с дополнительным введением в терапевтическую схему тималина. Так, динамика повышения лимфоцитов (AUC=83,2 [73,4-93,0] %) и эозинофилов (80,5 [69,7-91,3] %) указывает на хорошее качество выявленной связи с применяемой терапией. Динамики общего числа лейкоцитов (69,2 [56,7-81,8] %), а также моноцитов (76,5 [64,9-88,0] %) и тромбоцитов (70,0 [57,4-82,7] %) претендует на удовлетворительную оценку используемой терапии. Не вызывает сомнений, что увеличение числа лейкоцитов, лимфоцитов и моноцитов у больных, которым вводили тималин, является благоприятным процессом, ибо способствует усилению иммунитета в ответ на внедрение вируса SARS-Cov2. Согласно нашим данным [7, 9, 12, 13], применение тималина не только улучшает состояние иммунограммы у тяжелобольных COVID-19, но и снижает летальность даже по сравнению с пациентами аналогичной тяжести, которым вводили тоцилизумаб.

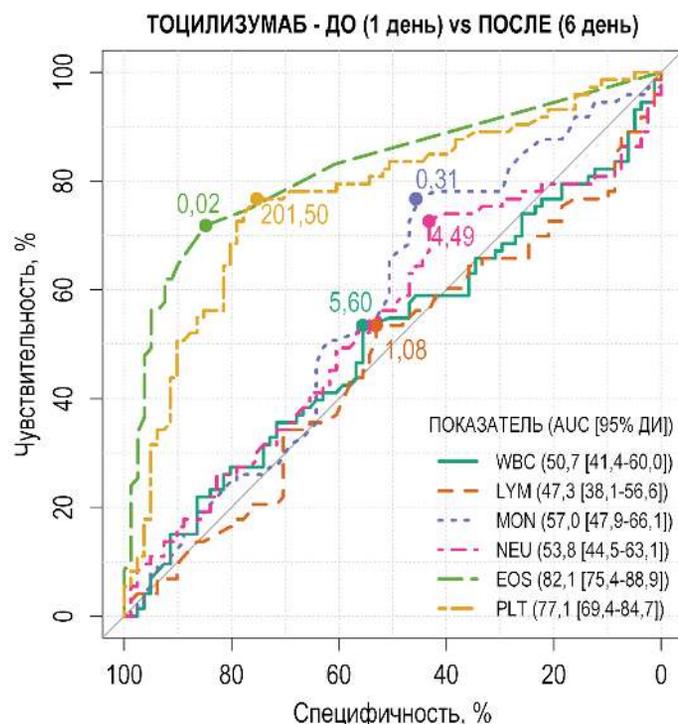


Рис. 2. ROC кривые оценки изменения параметров крови в результате применения тоцилизумаба.

Fig. 2. ROC curves for assessing changes in blood parameters as a result of the use of tocilizumab.

Более того, включение тималина в стандартную терапию лиц пожилого возраста с COVID-19 способствует нормализации показателей иммунограммы (количество лимфоцитов, CD3 + и CD4 + клеток, концентрация IL-6) через 200 суток после лечения. Кроме того, через 200 суток после лечения тималином сохраняется достаточный уровень антител IgG к SARS-CoV-2, необходимый для защиты пациентов пожилого возраста от повторного заражения COVID-19 [14].

Одной из задач наших исследований являлось с помощью ROC-моделирования выяснение, какую роль у тяжелобольных COVID-19 играет взаимосвязь тромбоцитов с общим числом лейкоцитов и отдельными их популяциями в осуществлении стандартной терапии, а также при включении в схему терапии тоцилизумаба или тималина. Данные, полученные при использовании обязательной (согласно протоколу) терапии (контроль) приведены на рис. 4.

Как видно из приведенных данных, взаимоотношения тромбоцитов, общего числа и отдельных видов лейкоцитов между собой и тромбоцитами свидетельствуют о неудовлетворительной оценке терапевтических традиционных воздействий ($AUC < 60\%$).

В то же время иные сведения получены при использовании тоцилизумаба (рис. 5) и тималина (рис. 6). Оказалось, что применение тоцилизумаба не ведет

к существенным сдвигам в соотношении тромбоцитов и отдельных видов лейкоцитов, за исключением снижения взаимосвязи PLT/WBC.

Особенно выраженные сдвиги в соотношении тромбоцитов и отдельных видов лейкоцитов отмечались при использовании тималина (рис. 6).

ROC-анализ в интегративной картине продемонстрировал изменение результатов в когорте пациентов с COVID-19 при дополнительном введении в терапевтическую схему тималина. Так, динамика повышения лимфоцитов ($AUC=83,2$ [73,4-93,0] %) и эозинофилов (80,5 [69,7-91,3] %) указывает на хорошее качество выявленной связи с применяемой терапией. Динамики общего числа лейкоцитов (69,2 [56,7-81,8] %), а также моноцитов (76,5 [64,9-88,0] %) и тромбоцитов (70,0 [57,4-82,7] %) претендует на удовлетворительную оценку используемой терапии. Полученные данные свидетельствуют о благотворном влиянии тималина на течение заболевания у тяжелобольных COVID-19.

Заключение

Как показывают наши данные с использованием ROC-анализа, у тяжелобольных COVID-19 имеются существенные различия между отдельными форменными элементами крови или их сочетаниями в контрольной группе (лечение по протоколу) и у прини-

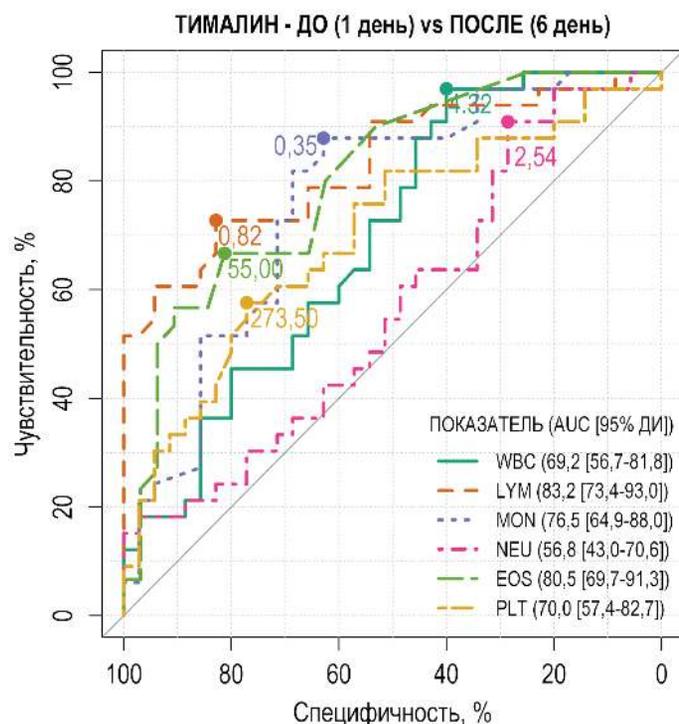


Рис. 3. ROC-кривые оценки изменения параметров крови в результате применения тималина.

Fig. 3. ROC-curves for assessing changes in blood parameters as a result of the use of thymalin.

мавших дополнительно тоцилизумаб или тималин. Так, в контрольной группе большинство исследуемых показателей располагается в зоне шкалы, соответствующей неудовлетворительной оценке. Только

увеличение количества эозинофилов, тромбоцитов и моноцитов (AUC=64,1 [52,4-75,8] %) ассоциируется с оценкой «слабо», что вряд ли может отразиться на результатах терапии.

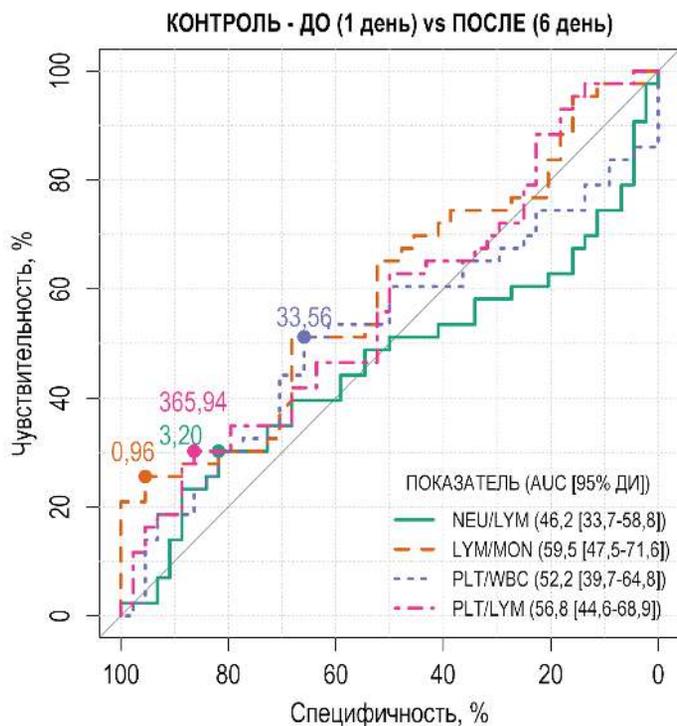


Рис. 4. ROC-кривые оценки изменения отношения форменных элементов крови в результате традиционной схемы лечения.

Fig. 4. ROC-curves for assessing the change in the ratio of blood cells as a result of the traditional treatment.

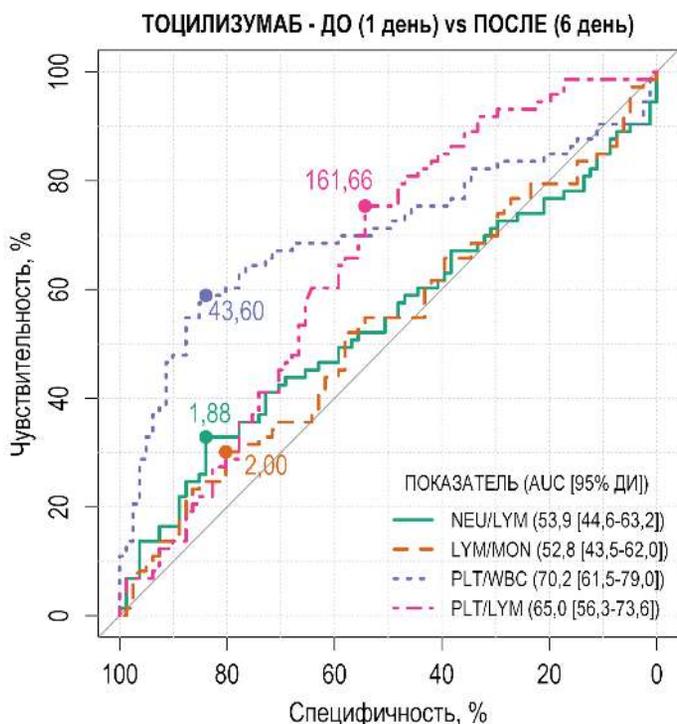


Рис. 5. ROC-кривые оценки изменения взаимосвязи отдельных форменных элементов крови в результате применения тоцилизумаба.

Fig. 5. ROC-curves for assessing changes in the relationship of individual blood cells as a result of the use of toclizumab.

В то же время при использовании тоцилизумаба на 6-е сут отмечалось значительное увеличение числа эозинофилов и тромбоцитов, что по шкале оценки AUC следует расценивать как «хороший» эффект. Вместе с тем, следует напомнить, что увеличение числа тромбоцитов и эозинофилов, является плохим прогностическим признаком, ибо это способствует тромбообразованию (за счет увеличения числа тромбоцитов), и усилению провоспалительного эффекта за счет многочисленных цитотоксических белков, содержащихся в гранулах эозинофилов. При этом ни в коем случае не отвергается положительная роль тоцилизумаба в терапии больных COVID-19. Тоцилизумаб может быть полезен для ликвидации «цитокинового шторма», что снижает летальность и уменьшает сроки пребывания тяжелобольных COVID-19 в стационаре [1–3, 7, 8, 10, 11, 23].

Интересные данные ROC-анализа получены при включении в схему терапии тяжелобольных COVID-19 тималина. Оказалось, что на 6-е сут подобная терапия сопровождалась увеличением числа лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов. При этом все полученные результаты следует расценивать как «хорошие». Остальные показатели изменялись в пределах малой степени вероятности. Безусловно, повышение в крови основ-

ных иммунных клеток – лимфоцитов и моноцитов – является благоприятным процессом, ибо способствует усилению иммунного ответа на внедрение вируса SARS-Cov2.

Аналогичные данные получены при ROC-анализе взаимосвязи тромбоцитов, общего числа лейкоцитов и отдельных их популяций. Так в контроле, каких-либо существенных изменений на 6-е сут в исследуемых взаимосвязях не выявлено.

При терапии тоцилизумабом у пациентов с COVID-19 выявлено повышение соотношений тромбоциты/лейкоциты в 1,6 раза и тромбоциты/лимфоциты в 1,4 раза, что может расцениваться как предиктор неблагоприятного исхода COVID-19 [11].

Под действием тималина на 6-е сутки терапии у пациентов в 2 раза повышалось количество лимфоцитов, а соотношение тромбоциты/лимфоциты снижалось в 1,4 раза. Кроме того, под действием тималина в 2 раза уменьшалось соотношение нейтрофилы/лимфоциты, в 1,3 раза повышалось количество лейкоцитов, в 2 раза – количество моноцитов и в 1,5 раза – количество тромбоцитов. Эти данные указывают на комплексное иммунопротекторное действие тималина у пациентов с тяжелым течением COVID-19, что согласуется с результатами других исследований [7–9].

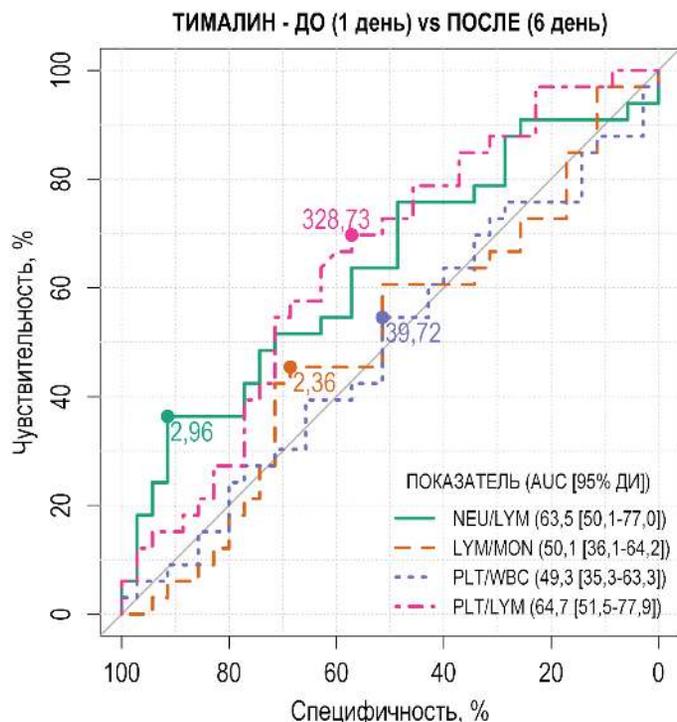


Рис. 6. ROC-кривые оценки изменения взаимосвязи отдельных форменных элементов крови в результате применения тималина.

Fig. 6. ROC-curves for assessing changes in the relationship of individual blood cells as a result of the use of thymalin.

Все представленные данные свидетельствуют о том, что применение ROC-анализа позволяет по первому исследованию предположить, какие сдвиги у тяжелобольных COVID-19 произойдут в содержании тромбоцитов, лейкоцитов и их отдельных популяций, а также во взаимодействии исследуемых показателей на 6-е сут проведения терапии. Более того, полученные данные во многом позволяют прогнозировать дальнейший ход заболевания.

Литература

(п.п. 1-7; 10; 12; 13; 17; см. References)

8. Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Лукьянов С.А., Шаповалов К.Г., Смоляков Ю.Н., Терешков П.П. и др. Влияние тоцилизумаба и тималина на системное воспаление у больных COVID-19. *Врач.* 2020; 31(11): 87-96. DOI: 10.29296/25877305-2020-11-17
9. Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Линькова Н.С. COVID-19: влияние на иммунитет, систему гемостаза и возможные пути коррекции. *Успехи физиологических наук.* 2020; 51(4): 51-63. DOI: 10.31857/S0301179820040037
11. Фомина Д.С., Потешкина Н.Г., Белоглазова М.П., Мутовина З.Ю., Самсонова И.В., Ковалевская Е.А. и др. Лысенко М.А. Сравнительный анализ применения тоцилизумаба при тяжелых COVID-19-ассоциированных пневмониях у пациентов разных возрастных групп. *Пульмонология.* 2020; 30(2): 164-72. DOI: 10.18093/0869-0189-2020-30-2-164-172
14. Лукьянов С.А., Кузник Б.И., Хавинсон В.Х. Шаповалов К.Г., Смоляков Ю.Н., Терешков П.П. и др. Использование Тималина для коррекции отклонений иммунного статуса при COVID-19 (клинический случай). *Врач.* 2020; 31(8): 74-82. DOI: 10.29296/25877305-2020-08-12
15. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Рукавишников С.А., Линькова Н.С., Ахмедов Т.А., Башук В.В. Влияние тималина на показатели клеточного, гуморального иммунитета и качество жизни у пациентов пожилого возраста с COVID-19. *Врач.* 2021; (6): 51-4. DOI: 10.29296/25877305-2021-06-09
16. Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Смирнов В.С. Особенности патогенеза и течения COVID-19 у лиц пожилого и старческого возраста. *Успехи геронтологии.* 2020; 33(6): 1032-42. DOI: 10.34922/AE.2020.33.6.003
18. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Рыжак Г.А. *Пептидные геронпротекторы - эпигенетические регуляторы физиологических функций организма.* Санкт-Петербург: Издательство РГПУ им. И.А. Герцена, 2014.
19. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. Иммуномодулирующее действие фактора тимуса в патологии. *Иммунология.* 1981; (5): 28-31.
20. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем – цитомедины. *Успехи современной биологии.* 1983; 96(3): 339-52.
21. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Иммунологические функции тимуса. *Успехи современной биологии.* 1984; 97(1): 36-49.

References

1. Wu C., Chen X., Cai Y., et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med.* 2020; E1-E10. DOI:10.1001/jamainternmed.2020.0994

2. Zhang C., Wu Z., Li J.W., Zhao H., Wang G.Q. The cytokine release syndrome (CRS) of severe COVID-19 and Interleukin-6 receptor (IL-6R) antagonist Tocilizumab may be the key to reduce the mortality. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2020; 28: 105954. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105954
3. Jamilloux Y., Henry T., Belot A., Viel S., Fauter M., El Jammal T., et al. Should we stimulate or suppress immune responses in COVID-19? Cytokine and anti-cytokine interventions. *Autoimmunity Reviews.* 2020; 19(7): 102567. DOI: 10.1016/j.autrev.2020.102567
4. Qin C., Zhou L., Hu Z., Zhang S., Yang S., Tao Y., et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clinical Infectious Diseases.* 2020; 21(15): 762-768. DOI: 10.1093/cid/ciaa248
5. Zanza C., Romenskaya T., Manetti A.C., Franceschi F., La Russa R., Bertozzi G., et al. Cytokine Storm in COVID-19: Immunopathogenesis and Therapy. *Medicina (Kaunas).* 2022; 58(2): 144. DOI: 10.3390/medicina58020144
6. Gröber U., Holick M.F. The coronavirus disease (COVID-19) - A supportive approach with selected micronutrients. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research.* 2022; 92(1): 13-34. DOI: 10.1024/0300-9831/a000693
7. Zhou M., Zhang X., Qu J. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a clinical update. *Frontiers of medicine.* 2019; 14(2): 126-35. DOI: 10.1007/s11684-020-0767-8
8. Kuznik B.I., Khavinson V.K., Lukyanov S.A., Shapovalov K.G., Smolyakov Y.N., Tereshkov P.P., et al. Effect of tocilizumab and thymalin on systemic inflammation in patients with COVID-19. *Врач.* 2020; 31(11): 87-96. (In Russian). DOI: 10.29296/25877305-2020-11-17
9. Kuznik B.I., Khavinson V.K., Linkova N.S. COVID-19: impact on immunity, hemostasis system and possible ways of correction. *Успехи физиологических наук.* 2020; 51(4): 51-63. (In Russian). DOI: 10.31857/S0301179820040037
10. Khavinson V.K., Kuznik B.I., Trofimova S.V., Volchkov V.A., Rukavishnikova S.A., Titova O.N., et al. Accepted: Results and Prospects of Using Activator of Hematopoietic Stem Cell Differentiation in Complex Therapy for Patients with COVID-19. *Stem Cell Reviews and Reports.* 2021; 17(1): 285-90. DOI: 10.1007/s12015-020-10087-6
11. Fomina D.S., Poteshkina N.G., Beloglazova M.P., Mutovina Z.Yu., Samsonova I.V., Kovalevskaya E.A., et al. Comparative analysis of the use of tocilizumab in severe COVID-19-associated pneumonia in patients of different age groups. *Pulmonologiya.* 2020; 30(2):164-72. (In Russian). DOI: 10.18093/0869-0189-2020-30-2-164-172
12. Dhampalwar S., Saigal S., Soin A.S. Treatment armamentarium of COVID-19: Evolving strategies and evidence so far. *Journal of clinical and experimental hepatology.* 2020; 10(6): 599-609. DOI: 10.1016/j.jceh.2020.07.001
13. Khavinson V., Linkova N., Dyatlova A., Kuznik B., Umnov R. Peptides: Prospects for use in the treatment of COVID-19. *Molecules.* 2020; 25(19): 4389. DOI: 10.3390/molecules25194389
14. Lukyanov S.A., Kuznik B.I., Khavinson V.H., Shapovalov K.G., Smolyakov Yu.N., Tereshkov P.P., et al. The use of Thymalin to correct deviations of the immune status in COVID-19 (clinical case). *Врач.* 2020; 31(8): 74-82. (In Russian). DOI: 10.29296/25877305-2020-08-12
15. Khavinson V.K., Kuznik B.I., Rukavishnikova S.A., Linkova N.S., Akhmedov T.A., Baschuk V.V. Influence of thymalin on indicators of cellular, humoral immunity and quality of life in elderly

- patients with COVID-19. *Vrach.* 2021; (6): 51-4. (In Russian). DOI: 10.29296/25877305-2021-06-09
16. Kuznik B., Khavinson V.K., Smirnov V. Features of pathogenesis and COVID-19 course for the elderly and old age. *Uspekhi gerontologii.* 2020; 33(6): 1032-42. DOI: 10.34922/AE.2020.33.6.003
 17. Khavinson V.K., Malinin V.V. Gerontological Aspects of Genome Peptide Regulation. Basel: Karger AG, 2005: 104.
 18. Khavinson V.K., Kuznik B.I., Ryzhak G.A. *Peptide geroprotectors-epigenetic regulators of physiological functions of the body. [Peptidnye geroprotektory - epigeneticheskie regulatory fiziologicheskikh funktsiy organizma]*. Saint-Petersburg: Publish. Herzen's RSPU. 2014. (In Russian)
 19. Khavinson V.K., Morozov V.G. Immunomodulating action of the thymus factor in pathology. *Immunologiya.* 1981; (5): 28-31. (In Russian)
 20. Morozov V.G., Khavinson V.K. A new class of biological regulators of multicellular systems - cytomedins. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 1983; 96(3): 339-52. (In Russian)
 21. Morozov V.G., Khavinson V.K. Immunological functions of the thymus. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 1984; 97(1): 36-49. (In Russian)
 22. Hughes G., Kopetzky J., McRoberts N. Mutual Information as a Performance Measure for Binary Predictors Characterized by Both ROC Curve and PROC Curve Analysis. *Entropy.* 2020; 22(9): 938. DOI: 10.3390/e22090938
 23. Lindsley A.W., Schwartz J.T., Rothenberg M.E. Eosinophil responses during COVID-19 infections and coronavirus vaccination. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2020; 146(1): 1-7 DOI: 10.1016/j.jaci.2020.04.021
 24. Khavinson V.K. Peptides and Ageing. *Neuroendocrinology Letters.* 2002; 23(3): 144.

Сведения об авторах:

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

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

Лукьянов Сергей Анатольевич, канд. мед. наук, доцент каф. пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: lukyanov-sergei@mail.ru;

Шаповалов Константин Геннадьевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: shkg26@mail.ru

© Коллектив авторов, 2023

УДК 612.285.1

Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Цорин И.Б., Крыжановский С.А., Середенин С.Б.

Сравнительное изучение антиаритмической активности анксиолитиков – производных бензодиазепамина и бензимидазола на модели электрической фибрилляции желудочков сердца

ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»,
125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Цель исследования – сравнительное изучение антиаритмической активности фабомотизола и производных бензодиазепамина (феназепам и диазепам) на модели электрической фибрилляции желудочков сердца у крыс с интактным и денервированным миокардом.

Методика. В экспериментах на интактных крысах и крысах с денервированным миокардом в сравнительном аспекте изучена антиаритмическая активность анксиолитиков – производных бензодиазепамина (феназепам и диазепам) и бензимидазола (фабомотизола).

Результаты. Показано, что феназепам (1,0 мг/кг, в/в) и фабомотизол (7,5 мг/кг, в/в) у интактных животных, в отличие от диазепама (0,5 и 1,0 мг/кг в/в), статистически значимо ($p=0,028$) повышают порог электрической фибрилляции желудочков сердца. У животных с денервированным миокардом только фабомотизол проявлял противofiбрилляторную активность ($p<0,05$).

Заключение. Таким образом, анксиолитики фабомотизол и феназепам проявляют выраженную антиаритмическую активность, однако феназепам реализует свою антиаритмическую активность преимущественно на уровне ЦНС, а фабомотизол – на уровне кардиомиоцитов

Ключевые слова: порог электрической фибрилляции желудочков сердца; денервированный миокард; диазепам; феназепам; фабомотизол

Для цитирования: Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Цорин И.Б., Крыжановский С.А., Середенин С.Б. Сравнительное изучение антиаритмической активности анксиолитиков – производных бензодиазепамина и бензимидазола на модели электрической фибрилляции желудочков сердца. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(2): 52-57. DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.52-57

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Крыжановский С.А., Середенин С.Б.; сбор и обработка материала – Вититнова М.Б., Столярук В.Н.; статистическая обработка материала – Цорин И.Б.; написание текста – Крыжановский С.А.; редактирование – Середенин С.Б. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Крыжановский Сергей Александрович, e-mail: SAK-538@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.11.2022

Принята к печати 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Stolyaruck V.N., Vititnova M.B., Tsorin I.B., Kryzhanovsky S.A., Seredenin S.B.

A comparative study of the antiarrhythmic activity of anxiolytics, benzodiazepine and benzimidazole derivatives in a model of electrical ventricular fibrillation

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

Aim. To compare the antiarrhythmic activity of fabomotizole and benzodiazepine derivatives (phenazepam and diazepam) in electrical ventricular fibrillation modeled in rats with intact and denervated myocardium.

Methods. In experiments on intact rats and rats with denervated myocardium, the antiarrhythmic activity of the anxiolytics, benzodiazepine (phenazepam and diazepam) and benzimidazole (fabomotizole) derivatives, was compared.

Results. It was shown that phenazepam (1.0 mg/kg, i.v.) and fabomotizole (7.5 mg/kg, i.v.) administered to intact animals, in contrast to diazepam (0.5 and 1.0 mg/kg, i.v.), significantly ($p=0.028$) increased the electrical ventricular fibrillation threshold. In animals with denervated myocardium, only fabomotizole showed an antifibrillatory activity ($p<0.05$).

Conclusion. It can be assumed that phenazepam implements its antiarrhythmic activity mainly at the level of the central nervous system whereas fabomotizole produces it at the level of the myocardium.

Keyword: electrical ventricular fibrillation threshold of the heart; denervated myocardium; diazepam; phenazepam; fabomotizole

For citation: Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., Tsorin I.B., Kryzhanovskii S.A., Seredenin S.B. Antiarrhythmic activity comparative study of benzodiazepine and benzimidazole derivatives anxiolytics on the model of electrical ventricular fibrillation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(2): 52-57. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.52-57

Author's contribution: concept and design of the study – Kryzhanovskii S.A., Seredenin S.B.; collection and processing of material – Stolyaruk V.N., Vititnova M.B.; statistical processing – Tsorin I.B.; text writing – Kryzhanovskii S.A.; editing – Seredenin S.B. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Sergey A. Kryzhanovskii*, Doctor of Medical Sciences, Head of Laboratory of pharmacological screening, FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", e-mail: SAK-538@yandex.ru

Information about the authors:

Stolyaruk V.N., <https://orcid.org/0000-0002-4779-427X>

Vititnova M.B., <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>

Tsorin I.B., <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>

Kryzhanovskii S.A., <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>

Seredenin S.B., <https://orcid.org/0000-0003-4482-9331>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 29.11.2022

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

Урбанизация общества, наблюдаемая в последние десятилетия, сопровождается усилением психоэмоциональных и психотравмирующих воздействий на организм, что способствует значительному росту психосоматических заболеваний. Так, если в середине XX века подобные состояния диагностировались в 5–7% случаев, то к началу XXI века их количество существенно возросло и, по данным различных авторов, колеблется в пределах 20–57% [1–3]. В частности показано, что пациенты, страдающие тревожными или астенодепрессивными синдромами, в 6 раз чаще обращаются за кардиологической помощью [4]. Не менее важно и то, что у 80% больных ИБС диагностируется кардиофобический синдром [5]. Известно, что кардиофобические состояния отягощают прогноз и течение различных сердечно-сосудистых заболеваний. Так, в клинических исследованиях была выявлена прямая зависимость между уровнем фобической тревоги и риском развития фатальных и нефатальных инфарктов миокарда, нарушений сердечного ритма и/или внезапной коронарной смерти [6]. Помимо этого показано, что фобические состояния могут инициировать нарушения сердечного ритма даже в отсутствии клинически значимой патологии сердечно-сосудистой системы [7]. В клинике для лечения такого рода пациентов широко используются анксиолитики различного химического строения и механизма действия. Так, было показано, что анксиолитики бензодиазепинового ряда достаточно эффективны при кардиофобиях [8–11]. Более того, согласно данным А.Б. Смуглевича и соавт., систематическая монотерапия анксиолитиками (бромазепам, диазепам, медазепам, оксазепам и хлордиазепоксид) восстанавливает нормальный сердечный ритм у 2/3 пациентов, страдающих фобиями [1]. Анти-

аритмические эффекты бензодиазепинов, в том числе феназепама, показаны и в экспериментальных исследованиях [12].

Механизм, лежащий в основе антиаритмического действия анксиолитиков бензодиазепинового ряда, до конца не ясен, однако можно полагать, что они могут усиливать тормозные тонические воздействия ГАМК-ергических нейронов, принимающих участие в регуляции функциональной активности дорсолатеральных областей продолговатого мозга, в частности центров, осуществляющих контроль за ритмической деятельностью сердца, поскольку известно, что подавление активности тормозных ГАМК-ергических нейронов, регулирующих вегетативные центры ЦНС, может инициировать развитие аритмий [13, 14]. Однако нельзя исключить того, что антиаритмические эффекты этой группы веществ опосредуются через их взаимодействие с периферическими бензодиазепиновыми рецепторами, локализованными в кардиомиоцитах [15].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» был разработан и фармакологически изучен селективный анксиолитик фабомотизол (афобазол), который обладает политаргетным механизмом действия, в частности он является агонистом σ_1 -рецепторов [16]. В настоящее время σ_1 -рецепторы рассматривают в качестве белков с шаперонными функциями, участвующими в механизмах цитопротекции [16]. Первоначально

полагали, что σ_1 -рецепторы локализируются преимущественно в цитозоле нейронов, однако позднее было показано, что они в большом количестве экспрессируются и в кардиомиоцитах [17]. С помощью метода patch clamp установлено, что в кардиомиоцитах и во внутрисердечных ганглиях вегетативной нервной системы агонисты σ_1 -рецепторов блокируют быстрые потенциалзависимые Na^+ -каналы, трансмембранные потенциалзависимые K^+ -каналы и медленные Ca^{2+} -каналы L-типа [18], что дает основания говорить о том, что они обладают свойствами антиаритмических лекарственных средств I, III и IV классов по классификации Vaughan Williams. Ранее нами было показано, что фабомотизол (афобазол) эффективен на аконитиновой и хлоридкальциевой моделях нарушений ритма сердца, уменьшает частоту возникновения фибрилляций желудочков сердца в условиях окклюзии и последующей реперфузии коронарной артерии у кошек и крыс, увеличивает порог электрической фибрилляции желудочков (ПЭФЖ) у кошек [19].

Цель настоящего исследования – сравнительное изучение антиаритмической активности фабомотизола и производных бензодиазепамина (феназепама и диазепама) на модели электрической фибрилляции желудочков сердца у крыс с интактным и денервированным миокардом.

Методика

Животные. Опыты проводили на белых беспородных крысах самцах массой 350–400 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Условия содержания животных соответствовали ГОСТ 33215–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» (Переиздание) и ГОСТ 33216–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Переиздание). Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, установленными международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), на основе стандартных операционных процедур, принятых в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утвержденными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени

В.В. Закусова». Протокол исследования одобрен этическим комитетом Института.

Животных рандомизировали на 5 групп по 6 крыс в каждой: 1-я группа – крысы, которым в/в вводили фабомотизол (7,5 мг/кг); 2-я группа – животные, которым в/в вводили феназепам (1,0 мг/кг); 3-я группа – крысы, которым в/в вводили диазепам (0,5 мг/кг); 4-я группа – животные, которым в/в вводили диазепам (1 мг/кг); 5-ая группа – крысы с денервированным сердцем, которым в/в вводили феназепам (1,0 мг/кг).

В исследовании использовали: субстанцию фабомотизола дигидрохлорида (ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»); раствор феназепама в ампулах по 1 мл (1 мг/мл, ОАО «Дальхимфарм»); раствор диазепама в ампулах по 2 мл (10 мг/2 мл, ВФЗ Польша).

Определение порога электрической фибрилляции желудочков (ПЭФЖ). Эксперименты проводили на наркотизированных крысах (уретан 1300 мг/кг, в/б) в условиях искусственного дыхания и открытой грудной клетки. В область средней трети передней поверхности сердца имплантировали 2 позолоченных электрода на расстоянии 5 мм друг от друга. ПЭФЖ определяли повторяющимся сканированием уязвимого периода сериями из 20 прямоугольных импульсов постоянного тока увеличивающейся силы (длительность стимула 4 мс, частота 50 имп/с) до возникновения фибрилляции. Если фибрилляция через 60 с самостоятельно не купировалась, животных дефибриллировали разрядом электрического тока (1,5 кВ). За порог фибрилляции принимали минимальную силу тока, стабильно вызывающую фибрилляцию желудочков при повторной стимуляции. В работе использовали электростимулятор HSE Stimulator II (Hugo Sach Elektronik, Германия), дефибриллятор ДИ-03 (Россия). В течение всего эксперимента регистрировали ЭКГ (II стандартное отведение). В качестве регистратора использовали электрокардиограф ЭК4Т-02 (Россия). Визуальный контроль регистрируемых параметров в течение всего эксперимента производили при помощи 4-канального осциллографа фирмы Elema-Siemens (Швеция).

Исследуемые лекарственные средства (феназепам 1,0 мг/кг, диазепам 0,5 и 1,0 мг/кг, фабомотизол 7,5 мг/кг) вводили в/в с постоянной скоростью и в постоянном объеме 0,9 % раствора хлорида натрия при помощи дозатора Syringe pump (Sage Instruments, Италия). Через 5, 10, 20, 30, 40 и 60 мин после введения исследуемых соединений повторно определяли ПЭФЖ.

Денервацию сердца у крыс осуществляли по методу [20]. Через 10–15 мин после разрушения спинного мозга и ваготомии повторно определяли порог электриче-

ской фибрилляции сердца, затем вводили изучаемый препарат и вновь определяли ПЭФЖ.

Статистический анализ. Так как распределение результатов измерения ПЭФЖ отличалось от нормального, то для сравнения 2 зависимых выборок использовали знаково-ранговый критерий Вилкоксона. Для сравнения 3 зависимых выборок (опыты с денервацией сердца) использовали непараметрический аналог дисперсионного анализа повторных измерений по Фридману с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Ньюмену-Кейлсу. Полученные результаты выражали в виде выборочных медиан и нижнего и верхнего квартилей. Для сравнения результатов регистрации частоты сердечных сокращений использовали *t*-критерий Стьюдента для зависимых выборок. Данные представляли в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Во всех случаях критический уровень статистической значимости $p=0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ результатов экспериментов показал, что фабомотизол (7,5 мг/кг, в/в) значительно повышает ПЭФЖ. Так, если медиана исходного уровня ПЭФЖ составляла 3,5 (2,0÷4,0) мА, то после введения изучаемого препарата этот показатель у всех 6 животных был более 10,0 мА ($p=0,028$). По своей активности на данной модели фабомотизол близок к антиаритмическим лекарственным средствам I класса по классификации Vaughan Williams (прокаинамиду – IA класс, лидокаину – IB класс) [21]. Результаты этой серии экспериментов хорошо коррелируют с данными, полученными нами ранее при изучении антифибрилляторной активности фабомотизола в опытах на кошках с интактным и денервированным миокардом [22].

При оценке противофибрилляторной активности феназепама (1 мг/кг, в/в) показано, что препарат, так же как и фабомотизол, во всех опытах ($n=6$) статистически значимо ($p=0,028$) повышает ПЭФЖ. Так, если медиана исходного уровня регистрируемого показателя составляла 2,5 (2,0÷4,0) мА, то феназепам во всех 6 случаях увеличивал ПЭФЖ более чем до 10 мА. Однако эффект феназепама отсрочен и реализуется через 20-30 мин после окончания введения препарата.

Если антиаритмическая активность феназепама показана как в экспериментальных [12], так и клинических исследованиях [1], то данные об антиаритмической активности диазепама крайне противоречивы. Так, с одной стороны, имеются сообщения о наличии у препарата антиаритмической, в частности противофибрилляторной активности, которая, по мнению авторов, обусловлена или центральными эффектами пре-

парата [23, 24], или его способностью блокировать поступление ионов кальция в цитозоль кардиомиоцитов [25]. С другой стороны, имеются данные о том, что сам диазепам и/или компоненты его инъекционной формы обладают проаритмической активностью [26, 27], а также о том, что препарат не проявляет антиаритмической активности [28]. В экспериментах на крысах при изучении центральных эффектов препарата, как правило, он используется в диапазоне доз от 2,0 до 15,0 мг/кг. Вместе с тем показано, что диазепам уже в дозе 2,0 мг/кг при в/в введении крысам вызывает тахикардию [29]. Помимо этого, в экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что препарат даже в низкой концентрации обладает кардиодепрессивной активностью [30]. В немногочисленных исследованиях на крысах, посвященных изучению сердечно-сосудистых эффектов диазепама, препарат применяли преимущественно в диапазоне доз от 0,2 до 1,5 мг/кг [31-33]. Исходя из сказанного, мы в своих исследованиях оценивали антифибрилляторную активность диазепама в дозах 0,5 и 1,0 мг/кг.

В отличие от фабомотизола и феназепама, диазепам на данной модели не проявлял антифибрилляторную активность. Препарат в дозах 0,5 мг/кг ($n=6$) и 1,0 мг/кг ($n=6$), введенный в/в, не только не увеличивал, но даже несколько уменьшал ПЭФЖ. Так, если исходный уровень ПЭФЖ был равен 2,0 (1,0÷3,0) мА, то диазепам в изученных дозах уменьшал этот показатель до 0,5 (0,5÷1,0) мА ($p=0,043$).

Ранее мы показали, что фабомотизол увеличивает ПЭФЖ интактного и денервированного сердца животного с одинаковой интенсивностью. При этом его антиаритмическая активность обусловлена, в частности, сродством препарата к σ_1 -рецепторам, локализованным в цитозоле кардиомиоцитов, так как галоперидол, являющийся неселективным антагонистом σ -рецепторов, блокировал противофибрилляторный эффект фабомотизола [34]. В связи с изложенным представляло несомненный интерес оценить вклад центральных и периферических механизмов в антиаритмическое действие феназепама, тем более что имеются литературные данные о том, что лиганды периферических бензодиазепиновых рецепторов (свойствами которых может обладать и феназепам), локализованных в сократительных кардиомиоцитах, проявляют антиаритмическую активность [15, 35].

В отдельной серии экспериментов ($n=6$) оценивали антиаритмическую активность феназепама у крыс с денервированным миокардом. Согласно полученным данным, денервация сердца приводит к урежению частоты сердечных сокращений (с $420,6 \pm 18,6$ до $302,4$

± 21,6 уд/мин; $p=0,003$) и незначительному снижению величины ПЭФЖ, что, по всей видимости, связано с прекращением центральных тонических влияний на сердце. ПЭФЖ определяли через 30 мин после введения феназепама, исходя из того, что у интактных животных антифибрилляторное действие препарата реализуется через 20-30 мин после его введения. Было показано, что препарат, в отличие от фабомотизола, который увеличивал уровень ПЭФЖ до тех же величин, что и до денервации, не оказывает значимого влияния ($p>0,05$) на уровень ПЭФЖ: уровень ПЭФЖ до денервации 2,0 (1,0÷4,0 мА), уровень ПЭФЖ денервация + феназепам 3,0 (2,0÷4,0 мА). Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что антиаритмическое действие феназепама реализуется преимущественно на уровне ЦНС.

Можно полагать, что феназепам или не взаимодействует, или имеет очень низкую аффинность к периферическим бензодиазепиновым рецепторам, локализованным в сократительных кардиомиоцитах. Это предположение подтверждают результаты исследования [12], в котором было показано, что у животных с экспериментальным инфарктом миокарда феназепам проявлял антиаритмическую активность, тогда как на изолированном сердце в условиях ишемии/реперфузии антиаритмическое действие препарата не реализовалось.

Заключение

Таким образом, анксиолитики фабомотизол (7,5 мг/кг, в/в) и феназепам (1 мг/кг, в/в), в отличие от диазепама (0,5 и 1,0 мг/кг, в/в), на модели электрической фибрилляции сердца проявляют выраженную антиаритмическую активность, однако вклад центральных и периферических механизмов в их антиаритмическое действие различен – если феназепам реализует свою антиаритмическую активность преимущественно на уровне ЦНС, то фабомотизол – преимущественно на уровне кардиомиоцитов.

Литература

(п.п. 2-6; 14; 15; 17; 20; 21; 23-30; 32; 33; 35 см. References)

1. Смудевич А.Б., Сыркин А.Л., Дробижев М.Ю., Иванов С.В. *Психокardiология*. 2005. М.
7. Шпак Л.В., Кононова А.Г. Состояние гемодинамики, эмоциональные расстройства и отношение личности к болезни при лечении нарушений сердечного ритма в амбулаторных условиях. *Кардиология*. 1999; 39(4): 33-7.
8. Сыркина Е.А. Нарушения ритма сердца у больных с нейроциркуляторной дистонией и их терапия бензодиазепиновыми транквилизаторами. *Автореф. дис. канд. мед. наук*. М., 1989.

9. Смудевич А.Б., Сыркин А.Л., Козырев В.Н. Психосоматические расстройства. Концептуальные аспекты (клиника, эпидемиология, терапия, модели медицинской помощи). *Журн. неврол. и психиатр.* 1999; 4: 4-16.
10. Недоступ А.В., Федорова В.И., Казиханова А.А. Психовегетативные соотношения и их коррекция при вегетативной дисфункции синусового узла. *Клиническая медицина*. 2004; 82(10): 26-30.
11. Санькова Т.А., Соловьева А.Д., Недоступ А.В. Сравнительный анализ симптоматиологии пароксизма мерцательной аритмии и панических атак. *Кардиология*. 2004; 44(6): 26-30.
12. Меерсон Ф.З., Абдикалиев Н.А., Пшенникова М.Г. Устранение нарушений электрической стабильности сердца при экспериментальном инфаркте миокарда и постинфарктном кардиосклерозе под влиянием агониста бензодиазепиновых рецепторов. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 1989; 107(5): 518-20.
13. Тюренков И.Н., Перфилова В.Н. Антиаритмические свойства ГАМК и активаторов ГАМК-ергической системы. *Эксперим. и клин. фармакол.* 2002; 65(1): 77-80.
16. Середин С.Б., Воронин М.В., Абрамова Е.В. Сигма-1 рецепторы – новая мишень фармакологической регуляции. *Эксперим. и клин. фармакология*. 2017; 80(9): 9-19.
18. Середин С.Б., Игнатов Ю.Д., Вислобоков А.И., Мельников К.Н., Яркова М.А. Влияние афобазола на трансмембранные ионные токи нейронов моллюска. *Эксперим. и клин. фармакол.* 2005; 68(5): 3-6.
19. Крыжановский С.А., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Цорин И.Б., Середин С.Б. Плейотропные (кардиотропные) эффекты анксиолитика афобазола. *Терапевт.* 2012; (1): 32-40.
22. Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Цорин И.Б., Крыжановский С.А. Изучение противofiбрилляторной активности афобазола у животных с интактным и денервированным миокардом. *Вестник российской АМН*. 2010; (4): 46-8.
31. Ковалев Г.В., Гурбанов К.Г., Тюренков И.Н. Влияние транквилизаторов на функцию миокарда при стрессовой травме. *Фармакол. и токсикол.* 1983; 46(3): 41-4.
34. Крыжановский С.А., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Цорин И.Б., Середин С.Б. К механизму противofiбрилляторного действия афобазола. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2010; 149(3): 290-3.

References

1. Smulevich A.B., Syrkin A.L., Drobizhev M.Yu., Ivanov S.V. *Psychocardiology. [Psikhokardiologiya]*. Medical Information Agency. Moscow; 2005.
2. Bankier B., Januzzi J.L., Littman A.B. The high prevalence of multiple psychiatric disorders in stable outpatients with coronary heart disease. *Psychosom. Med.* 2004; 66: 645-50.
3. Ketterer M.W., Knysz W., Keteyian S.J., Schairer J., Jafri S., Alam M. et al. Cardiovascular symptoms in coronary-artery disease patients are strongly correlated with emotional distress. *Psychosomatics*. 2008; 49: 230-4.
4. Marciniak M., Lage M.J., Landbloom R.P., Dunayevich E., Bowman L. Medical and productivity costs of anxiety disorders: case control study. *Depress Anxiety*. 2004; 19(2): 112-20.
5. Nielsen O.W. Patient differences related to management in general practice and the hospital: a cross-sectional study of heart failure in the community. *Eur. Heart J.* 2004; 25: 1718-25.
6. Watkins L.L., Blumenthal J.A., Davidson J.R.T., Babyak M.A., McCants C.B., Sketch M.H. Phobic anxiety, depression, and risk of ven-

- tricular arrhythmias in patients with coronary heart disease. *Psychosom. Med.* 2006; 68: 651–6.
7. Shpak L.V., Kononova A.G. The state of hemodynamics, emotional disorders and the attitude of the individual to the disease in the treatment of heart rhythm disorders in outpatient settings. *Cardiology.* 1999; 39(4): 33–7.
 8. Syrkin A.A. *Heart rhythm disorders in patients with neurocirculatory dystonia and their therapy with benzodiazepine tranquilizers. [Naruseniya ritma serdtsa u bol'nykh s neyrotsirkulyatornoy distoniei i ikh terapiya benzodiazepinovymi trunkvilizatorami].* Abstract. dis. kand. med. sci. Moscow; 1989.
 9. Smulevich A.B., Syrkin A.L., Kozyrev V.N. Psychosomatic disorders. Conceptual aspects (clinic, epidemiology, therapy, models of medical care). *Zhurnal nevrologii i psikiatrii* 1999; 4: 4–16.
 10. Nedostup A.V., Fedorova V.I., Kazikhanova A.A. Psychosomatic ratios and their correction in the autonomic dysfunction of the sinus node. *Klinicheskaya meditsina.* 2004; 82(10): 26–30.
 11. Sankova T.A., Solovyova A.D., Alexander A.V. Comparative analysis of symptomatology of atrial fibrillation paroxysm and panic attacks. *Cardiology.* 2004; 44(6): 26–30.
 12. Meerson F.Z., Abdikaliev N.A., Pshennikova M.G. Elimination of disorders of the electrical stability of the heart in experimental myocardial infarct and postinfarct cardiosclerosis under the influence of a benzodiazepine receptor agonist. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 1989; 107(5): 518–20.
 13. Tiurenkov I.N., Perfilova V.N. Anti-arrhythmic properties of gaba and gaba-ergic system activators. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2002; 65(1): 77–80.
 14. Ginwalla M., Biblo L.A., Paydak H. Torsade de pointes following intravenous haloperidol administration in a patient with complete heart block. *WJM.* 2009; 108(1): 48–50.
 15. Li J., Xiao J., Liu Y., Zhang G., Zhang H., Liang D., et al. Mitochondrial benzodiazepine receptors mediate cardioprotection of estrogen against ischemic ventricular fibrillation. *Pharmacol. Res.* 2009; 60(1): 61–7.
 16. Seredenin S.B., Voronin M.V., Abramova E.V. Sigma-1 receptors – a new target of pharmacological regulation. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2009; 72(1): 9–19.
 17. Fontanilla D., Johannessen M., Hajipour A.R., Cozzi N.V., Jackson M.B., Ruoho A.E. The hallucinogen *N,N*-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. *Science.* 2009; 323: 934–7.
 18. Seredenin S.B., Ignatov Yu.D., Vislobokov A.I., Mel'nikov K.N., Iarkova M.A. Effect of afobazole on transmembrane ion currents in mollusk neurons. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2005; 68(5): 3–6.
 19. Kryzhanovskii S.A., Stoliaruk V.N., Vititnova M.B., Tsorin I.B., Seredenin S.B. Pleiotropic (cardiotropic) effects of the anxiolytic afobazole. *Terapevt.* 2012; 1: 32–40.
 20. McEwen, J.E. Some technical aspects of pharmacology. *J. Sci. Technol.* 1965; 11(1): 13–8.
 21. Vaughan Williams, E.M. Electrophysiological aspects of the action of antiarrhythmic drugs. *Proc. R. Soc. Med.* 1969; 62: 75–7.
 22. Stoliaruk V.N., Vititnova M.B., Tsorin I.B., Kryzhanovskii S.A. Afobazol antifibrillation activity in animals with the intact and denervated myocardium. *Vestnik Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh Nauk.* 2010; (4): 46–8.
 23. Gu X.Q., Xu N.S. Mechanism of depressing effect of diazepam on blood pressure and on ventricular extrasystoles induced by hypothalamic stimulation in the rabbit. *Sheng Li Xue Bao.* 1989; 41(1): 10–8.
 24. Wang Y., Li D.X., Shen G.S. Inhibitory effects of gamma-aminobutyric acid and diazepam on ventricular arrhythmias induced by hypothalamic electric stimulation. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1989; 10(2): 147–50.
 25. Hara Y., Kobayashi H., Ooshiro S., Futamura K., Nishino T., Chugun A. et al. Negative inotropic effect of diazepam in isolated guinea pig heart. *J. Vet. Med. Sci.* 2001; 63(2): 135–43.
 26. Pinto J.M., Kirby D.A., Johnson D.A., Lown B. Diazepam administration prior to coronary artery occlusion increases latency to ventricular fibrillation. *Life Sci.* 1991; 49(8): 587–94.
 27. Roelofse J.A., van der Bijl P. Cardiac dysrhythmias associated with intravenous lorazepam, diazepam, and midazolam during oral surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1994; 52(3): 247–50.
 28. Dixon R.A., Edwards I.R., Pilcher J. Diazepam in immediate post-myocardial infarct period. A double-blind trial. *Br. H. J.* 1980; 43(5): 535–40.
 29. Castro J.L., Ricci D., Taira C.A., Ramirez A. Central benzodiazepine involvement in clonidine cardiovascular actions. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1999; 77(11): 844–51.
 30. Hernández J. The negative inotropic effect of diazepam in rat right ventricular strips. *J. Pharm. Pharmacol.* 1991; 43(12): 879–81.
 31. Kovalev G.V., Gurbanov K.G., Tyurenkov I.N. Effect of tranquilizers on myocardial function in stress trauma. *Farmakologiya i toksikologiya.* 1983; 46(3): 41–4.
 32. Gregg R.V., Turner P.A., Denson D.D., Stuebing R.C., Sehlhorst C.S., Forsberg T. Does diazepam really reduce the cardiotoxic effects of intravenous bupivacaine? *Anesth. Anal.* 1988; 67(1): 9–14.
 33. McDonough J.H.Jr., Jaax N.K., Crowley R.A., Mays M.Z., Morrow H.E. Atropine and/or diazepam, therapy protects against soman-induced neural and cardiac pathology. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1989; 13(2): 256–76.
 34. Kryzhanovskiy S.A., Stolyaruck V.N., Vititnova M.B., Tsorin I.B., Seredenin S.B. On the mechanism of antifibrillatory effect of afobazole. *Farmakologiya i toksikologiya.* 2010; 149(3): 290–3.
 35. Wang X., Huang Z.G., Dergacheva O., Bouairi E., Gorini C., Stephens C., et al. Ketamine inhibits inspiratory-evoked gamma-aminobutyric acid and glycine neurotransmission to cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus. *Anesthesiology.* 2005; 103(2): 353–9.

Сведения об авторах:

Столярук Валерий Николаевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., лаб. фармакологического скрининга;

Вититнова Марина Борисовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаб. фармакологического скрининга;

Цорин Иосиф Борисович, доктор биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. фармакологического скрининга;

Крыжановский Сергей Александрович, доктор мед. наук, зав. лаб. фармакологического скрининга, e-mail: SAK-538@yandex.ru;

Середин С.Б., доктор мед. наук, акад. РАН, научный руководитель института.

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092

Чепелев С.Н.¹, Висмонт Ф.И.¹, Губкин С.В.²

Участие L-лактата в реализации кардиопротекторного эффекта дистантного ишемического посткондиционирования у молодых и старых крыс

¹УО «Белорусский государственный медицинский университет»

220116, Минск, Беларусь, пр. Дзержинского, д. 83;

²ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси»,

220072, Минск, Беларусь, ул. Академическая, д. 28

Введение. Разработка новых эффективных методов предотвращения или ослабления ишемического и реперфузионного повреждения миокарда и выяснение механизмов их реализации является актуальной задачей современной экспериментальной и клинической медицины. Дистантное ишемическое посткондиционирование (ДИПост) является многообещающим неинвазивным методом, способным эффективно и безопасно уменьшить размер инфаркта миокарда.

Цель исследования – выяснение участия L-лактата в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ДИПост у молодых и старых крыс.

Методика. Исследование участия L-лактата в реализации кардиопротекторного эффекта ДИПост при ишемии-реперфузии (И/Р) миокарда выполнено на 120 нелинейных белых крысах-самцах: 60 молодых крыс (масса 200-240 г, возраст 4±1 мес), и 60 старых крыс, (масса 400-450 г, возраст 24±1 мес). Для моделирования инфаркта миокарда осуществляли коронароокклюзию (30 мин) и реперфузию (2 ч). Оценивали размер зоны некроза и зоны риска. ДИПост моделировали путем 15-минутного наложения зажимов на задние конечности через 10 мин после начала реперфузии. У животных определяли уровень L-лактата в плазме крови в модели ДИПост (15-минутное пережатие обеих бедренных артерий через 10 мин после 30-минутной острой коронароокклюзии). Посткондиционирование с помощью L-лактата (ПостЛ) осуществлялось путем введения в левую общую яремную вену раствора L-лактата (10 мг/кг) через 25 мин после начала реперфузии.

Результаты. У молодых и старых крыс после 15-минутного пережатия обеих бедренных артерий, вызывающего ДИПост, отмечалось повышение уровня L-лактата в плазме крови в 2,28 и 2,34 раза, соответственно. Размер зоны некроза в исследуемых группах был следующим: И/Р_{молодые} составил 45±4, И/Р_{старые} – 47±5, ДИПост_{молодые} – 25±3 ($p<0,001$), ДИПост_{старые} – 28±3 ($p<0,001$), И/Р+Физ.р_{молодые} – 45±6, И/Р+Физ.р_{старые} – 48±6, ПостЛ_{молодые} – 33±3 ($p<0,01$) и ПостЛ_{старые} – 35±4% ($p<0,01$).

Заключение. Установлено, что ДИПост оказывает инфаркт-лимитирующий эффект и сопровождается повышением уровня L-лактата в плазме крови. Выявлено, что ПостЛ приводит к снижению размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка у молодых и старых крыс на 26,7 и 25,5% соответственно.

Ключевые слова: кардиопротекция; L-лактат; дистантное ишемическое посткондиционирование; ишемия; реперфузия; зона некроза

Для цитирования: Чепелев С.Н., Висмонт Ф.И., Губкин С.В. Участие L-лактата в реализации кардиопротекторного эффекта дистантного ишемического посткондиционирования у молодых и старых крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(2): 58-64.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.58-64

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, подготовка иллюстративного материала, статистический анализ, написание текста – Чепелев С.Н., Висмонт Ф.И., Губкин С.В.; сбор и обработка материала – Чепелев С.Н., Висмонт Ф.И., Губкин С.В., редактирование – Висмонт Ф.И., Чепелев С.Н. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Чепелев Сергей Николаевич, e-mail: drserge1991@gmail.com

Финансирование. Экспериментальная работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований 4 «Трансляционная медицина» подпрограммы 4.2 «Фундаментальные аспекты медицинской науки», финансируемой Министерством здравоохранения Республики Беларусь, по заданию 1.26 «Изучить кардиопротекторную эффективность посткондиционирования с помощью лактата при ишемии-реперфузии миокарда и выяснить механизмы ее реализации».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.07.2022

Принята в печать 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Chepelev S.N.¹, Vismont F.I.¹, Goubkin S.V.²

Participation of L-lactate in the cardioprotective effect of remote ischemic postconditioning in young and old rats

¹Belarusian State Medical University,

Dzerzhinskogo Ave. 83, Minsk 220116, Republic of Belarus;

²Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus,

Akademicheskaya St. 28, Minsk, 220072, Republic of Belarus

Background. The development of new effective methods for preventing or mitigating ischemic and reperfusion injury to the myocardium and elucidating their mechanisms is an urgent task of modern experimental and clinical medicine. Remote ischemic postconditioning (RIPost) is a promising non-invasive method that can effectively and safely reduce the size of myocardial infarction.

The aim of the study was to elucidate the involvement of L-lactate in the infarct-limiting effect of RIPost in young and old rats.

Methods. The study of the participation of L-lactate in the realization of the cardioprotective effect of RIPost in ischemia-reperfusion (I/R) of the myocardium was performed on 120 mongrel white male rats (60 young rats weighing 200-240 g and aged 4±1 months and 60 old rats weighing 400-450 g and aged 24±1 months). Coronary occlusion (30 min) and reperfusion (2 h) were performed to model myocardial infarction. The necrotic zone area and area at risk were measured. RIPost was modeled by clamping the hind limbs for 15 minutes 10 minutes after the start of reperfusion. The concentration of L-lactate in blood plasma was measured in the RIPost model (by 15-minute ischemia of both femoral arteries 10 min after 30-minute acute coronary occlusion). Postconditioning with L-lactate (PostL) was produced by injecting L-lactate 10 mg/kg into the left common jugular vein 25 minutes after the start of reperfusion.

Results. In young and old rats, after the 15-minute clamping of both femoral arteries during RIPost, blood plasma concentrations of L-lactate increased 2.28 and 2.34 times, respectively. The sizes of the necrotic zone in the studied groups were as follows: I/R_{young} was 45±4, I/R_{old} 47±5, RIPost_{young} 25±3 ($p<0,001$), RIPost_{old} 28±3 ($p<0,001$), I/R+Saline_{young} – 45±6, I/R+Saline_{old} – 48±6, PostL_{young} 33±3 ($p<0,01$), and PostL_{old} 35±4% ($p<0,01$).

Conclusions. RIPost has an infarction-limiting effect and is accompanied by an increase in the blood plasma concentration of L-lactate. It was found that PostL leads to a decrease in the size of the necrosis zone in the myocardium of the left ventricle in young and old rats by 26.7 and 25.5%, respectively.

Keywords: cardioprotection; L-lactate; remote ischemic postconditioning; ischemia; reperfusion; necrotic zone

For citation: Chepelev S.N., Vismont F.I., Goubkin S.V. Participation of L-lactate in the cardioprotective effect of remote ischemic postconditioning in young and old rats. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimentalnaya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(2) 58-64. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.58-64

Author's contribution: study concept and design, preparation of illustrations, statistical analysis, writing – Chepelev S.N., Vismont F.I., Goubkin S.V.; material collection and processing – Chepelev S.N., Vismont F.I., Goubkin S.V.; editing – Vismont F.I., Chepelev S.N. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Sergey N. Chepelev*, Senior Lecturer of Belarusian State Medical University, e-mail: drserge1991@gmail.com

Information about the authors:

Chepelev S.N., <https://orcid.org/0000-0002-6177-4259>Vismont F.I., <https://orcid.org/0000-0002-4613-6494>Goubkin S.V., <https://orcid.org/0000-0002-1737-387X>

Financing. The experimental work was a part of the State Research Program 4 "Translational Medicine" subprogram 4.2 "Fundamental Aspects of Medical Science", funded by the Ministry of Health of the Republic of Belarus, under assignment 1.26 "To study the cardioprotective efficacy of postconditioning with lactate in myocardial ischemia-reperfusion and to elucidate the mechanisms for its implementation".

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

Received 10.07.2022

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

Введение

Высокая медицинская и социальная значимость проблемы лечения пациентов с острым инфарктом миокарда обуславливает актуальность поиска новых, эффективных методов кардиопротекции при острых нарушениях коронарного кровотока.

Последнее десятилетие объектом повышенного интереса ведущих мировых исследователей в области экспериментальной и клинической кардиологии являются кардиопротекторные эффекты дистантного ишемического посткондиционирования (ДИПост), которое

воспроизводится ишемией конечностей, осуществляемой после острой ишемии миокарда, о чем свидетельствует больше 400 публикаций на портале PubMed.

В исследовании ДИПост, представленном М. Basalaya и соавт., в экспериментах на крысах показано, что кратковременная (15-минутная) ишемия задних конечностей, осуществляемая с 10 по 25 мин реперфузии, оказывает выраженное инфаркт-лимитирующее действие на миокард [1].

Принимая во внимание известные факты о том, что гипоперфузия, ишемия органов и тканей приводит к повышению уровня L-молочной кислоты (L-лактата) в крови [2], были основания полагать, что возникающая в результате ДИПост гиперлактатемия сможет уменьшить реперфузионное повреждение миокарда, а соответственно, подтвердить выдвинутое нами предложение об участии L-лактата в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ДИПост.

Цель исследования – выяснение участия L-лактата в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ДИПост у молодых и старых крыс.

Методика

Эксперименты проведены на 120 наркотизированных нелинейных белых крысах-самцах, разделенных на 2 возрастные группы: 60 молодых крыс (масса 200–240 г, возраст – 4 ± 1 мес), и 60 старых крыс (масса 400–450 г, возраст 24 ± 1 мес).

Эксперименты проводились в соответствии с этическими нормами обращения с лабораторными животными, а также руководствуясь требованиями директив Европарламента и Совета Европейского союза (2010/63/EU), регулирующих использование животных в научных целях.

Для наркотизации животных использовали тиопентал натрия (50 мг/кг) внутривенно. Крыс переводили на искусственное дыхание атмосферным воздухом через трахеостому при помощи аппарата искусственной вентиляции легких (Harvard Apparatus Rodent Ventilator, model 683) (Harvard Apparatus, Масачусетс, США). В ходе экспериментов непрерывно регистрировали электрокардиограмму (ЭКГ) во II стандартном отведении и системное артериальное давление (АД). На протяжении эксперимента регистрировались среднее АД (A_{cp} , мм рт. ст.) и частота сердечных сокращений (ЧСС) (уд/мин).

С целью моделирования ишемически-реперфузионного (И/Р) повреждения миокарда наркотизированным животным вскрывали грудную клетку в IV межреберном промежутке слева. После периода 15-минутной стабилизации гемодинамики крысам эксперименталь-

ных групп с И/Р выполняли 30-минутную окклюзию передней нисходящей ветви левой коронарной артерии (ПНВЛКА) путем ее механического пережатия при помощи лигатуры. Реперфузия миокарда длилась 120 мин.

ДИПост выполняли в соответствии с протоколом исследования, представленным М. Basalaya и соавт., согласно которому животные групп ДИПост дополнительно подвергались воздействию 15-минутной ишемии обеих бедренных артерий через 10 минут после 30-минутной острой коронароокклюзии [1].

ПостЛ выполнялось животным, которым через 25 мин от начала реперфузии вводили в левую общую яремную вену 0,5 мл 40 мМ нейтрализованного раствора L-молочной кислоты (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США), т.е. в дозе 10 мг/кг. Крысам контрольной группы через 25 мин от начала реперфузии вводили в левую общую яремную вену физиологический раствор (физ. р-р) в объеме 0,5 мл. Нейтрализованный L-лактат готовили растворением L-молочной кислоты в 0,9% растворе NaCl для инъекций с последующим доведением pH до 7,4 с помощью NaOH. Доза L-лактата (10 мг/кг) была выбрана с целью обеспечения уровня L-лактата в крови близкого к тому, который определялся после 15-минутного наложения зажимов на обе бедренные артерии после ДИПост. Определение уровня L-лактата в плазме крови у животных проводилось спектрофотометрическим методом с использованием набора реагентов (BioSystems S. A., Барселона, Испания) на биохимическом автоматическом анализаторе A25 Random Access Analyzer (BioSystems S. A., Барселона, Испания) при длине волны 600 нм. L-лактат в исследуемых образцах плазмы крови окислялся L-лактатоксидазой до пирувата и перекиси водорода. В присутствии пероксидазы перекись водорода с 4-аминоантипирином и ТООС образует окрашенный комплекс, который измерялся спектрофотометрически [3].

В табл. 1 представлены экспериментальные группы, которые использовались для изучения уровня L-лактата в плазме крови у молодых и старых крыс в модели ДИПост.

С целью изучения инфаркт-лимитирующей эффективности ПостЛ при И/Р миокарда у молодых и старых крыс были использованы экспериментальные группы, представленные в табл. 2.

Зону риска выявляли путем окраски миокарда 5% раствором Evans Blue (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США), который вводили внутривенно в объеме 0,5 мл в конце реперфузии при повторной кратковременной окклюзии ПНВЛКА. Затем сердце извлекали и отде-

ляли от него левый желудочек. После замораживания в морозильной камере (-20°C в течение 30 мин) левый желудочек разрезали на 6 поперечных срезов. Срезы взвешивали и сканировали с обеих сторон. Зону риска определяли как зону, не окрашенную в синий цвет. Для идентификации зоны некроза срезы сердца помещали в 1% раствор 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида на 15 мин при температуре $37,0^{\circ}\text{C}$ и 24 ч инкубировали

в 10% растворе формалина, после чего сканировали повторно с обеих сторон. Жизнеспособный миокард (клетки, сохранившие дегидрогеназную активность) окрашивался в кирпично-красный цвет, а некротизированная ткань была бледно-желтой. При помощи компьютерной планиметрии и взвешивания срезов миокарда левого желудочка определяли соотношение зоны инфаркта и зоны риска [4].

Таблица 1/Table 1

Характеристика экспериментальных групп для изучения уровня L-лактата в плазме крови у молодых и старых крыс в модели ДИПост

Characteristics of the experimental groups for studying the level of L-lactate in blood plasma in young and old rats in the RIPost model

Группа Group	Характеристика группы Group characteristic
Интakтные _{молодые} (n=8) Intact _{young} (n=8)	Интakтные молодые крысы Intact young rats
Интakтные _{старые} (n=8) Intact _{old} (n=8)	Интakтные старые крысы Intact old rats
Ишемия конечностей _{молодые} (n=8) Limb ischemia _{young} (n=8)	Молодые крысы, которым выполняли наложение зажимов на обе бедренные артерии на 15 мин, что характерно для модели ДИПост Young rats clamped on both femoral arteries for 15 min, which is typical for the RIPost model
Ишемия конечностей _{старые} (n=8) Limb ischemia _{old} (n=8)	Старые крысы, которым выполняли наложение зажимов на обе бедренные артерии на 15 мин, что характерно для модели ДИПост Old rats clamped on both femoral arteries for 15 min, which is typical for the RIPost model

Таблица 2/Table 2

Характеристика экспериментальных групп для изучения инфаркт-лимитирующего эффекта ПостЛ у молодых и старых крыс

Characteristics of the experimental groups for studying the infarct-size limiting effect of PostL in young and old rats

Группа Group	Характеристика группы Group characteristic
И/Р _{молодые} (n=12) I/R _{young} (n=12)	Молодые крысы, у которых моделировали И/Р миокарда Young rats in which myocardial I/R was simulated
И/Р _{старые} (n=12) I/R _{old} (n=12)	Старые крысы, у которых моделировали И/Р миокарда Old rats in which myocardial I/R was simulated
ДИПост _{молодые} (n=12) RIPost _{young} (n=12)	Молодые крысы, у которых моделировали И/Р миокарда, а также выполняли ДИПост Young rats in which myocardial I/R was simulated and also performed RIPost
ДИПост _{старые} (n=12) RIPost _{old} (n=12)	Старые крысы, у которых моделировали И/Р миокарда, а также выполняли ДИПост Old rats in which myocardial I/R was simulated and also performed RIPost
И/Р+Физ.р-р _{молодые} (n=8) I/R+Saline _{young} (n=8)	Молодые крысы, которым моделировали И/Р миокарда, а также на 25-й мин реперфузии вводили в левую общую яремную вену физ. р-р в объеме 0,5 мл Young rats, in which myocardial I/R was modeled, as well as at the 25th min of reperfusion, were injected with saline in a volume of 0.5 ml into the left common jugular vein
И/Р+Физ.р-р _{старые} (n=8) I/R+Saline _{old} (n=8)	Старые крысы, которым моделировали И/Р миокарда, а также на 25-й мин реперфузии вводили в левую общую яремную вену физ. р-р в объеме 0,5 мл Old rats, in which myocardial I/R was modeled, as well as at the 25th min of reperfusion, were injected with saline in a volume of 0.5 ml into the left common jugular vein
ПостЛ _{молодые} (n=12) PostL _{young} (n=12)	Молодые крысы, у которых моделировали И/Р миокарда, а также выполняли ПостЛ Young rats in which myocardial I/R was simulated and also performed PostL
ПостЛ _{старые} (n=12) PostL _{old} (n=12)	Старые крысы, у которых моделировали И/Р миокарда, а также выполняли ПостЛ Old rats in which myocardial I/R was simulated and also performed PostL

Полученные в исследовании результаты анализировались с использованием стандартных пакетов статистических программ Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., США) и GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad Software, США). Оценка нормальности распределения всех количественных показателей проводилась по Колмогорову-Смирнову. Статистическую значимость различий полученных данных в случае их параметрического распределения оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием тестов множественных сравнений Данна и Бонферрони. При этом результаты представляли в виде: среднее ± стандартная ошибка среднего (M±SEM). Для оценки статистической значимости различий данных в случае их непараметрического распределения использовали

критерий Крускала–Уоллиса и тест множественных сравнений Данна. В данном случае результаты были представлены в виде: медиана и интерквартильный размах (Me (Q1; Q3)). Уровень $p < 0,05$ рассматривался как статистически значимый.

Результаты

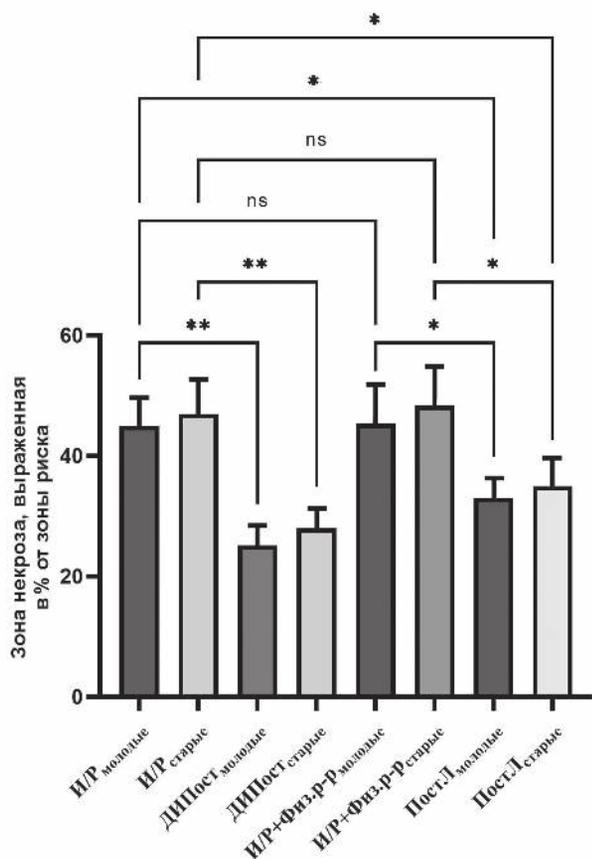
Изучение уровня L-лактата в плазме крови у молодых и старых крыс после ДИПост. Данные биохимических исследований крови показали, что содержание L-лактата в плазме крови, взятой из левой общей яремной вены, в исследуемых группах молодых и старых крыс было следующим: Интактные_{молодые} – 1,55 (1,47; 1,92), Интактные_{старые} – 1,74 (1,63; 2,04), Ишемия конечностей_{молодые} – 3,54 (3,35; 3,69) ($p < 0,001$ по сравнению с группой Интактные_{молодые}) и Ишемия конечностей_{старые} – 4,07 (3,83; 4,34) мМ/л ($p < 0,001$ по сравнению с группой Интактные_{старые}).

Следовательно, у молодых и старых крыс после 15-минутного пережатия обеих бедренных артерий, происходит повышение уровня L-лактата в плазме крови в 2,28 и в 2,34 ($p < 0,001$ по сравнению с интактными животными) раза соответственно. Таким образом, 15-минутная ишемия нижних конечностей, которая имеет место во время ДИПост, сопровождается значительным повышением уровня L-лактата в крови, что явилось основанием полагать участие L-лактата в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ДИПост.

Изучение инфаркт-лимитирующего эффекта ПостЛ при И/Р миокарда у молодых и старых крыс. В исследуемых группах молодых и старых крыс в течение первых минут после окклюзии ЛКА отмечалось снижение АД_{ср} примерно на 15–20 мм рт. ст. В дальнейшем на протяжении эксперимента АД_{ср} оставалось относительно стабильным.

Выявлено, что размер зоны некроза в миокарде левого желудочка у молодых крыс в исследуемых группах был следующим: И/Р_{молодые} составил 45±4, ДИПост_{молодые} – 25±3 ($p < 0,001$ по сравнению с группой И/Р_{молодые}), И/Р+Физ.р-р_{молодые} – 45±6 и в группе ПостЛ_{молодые} – 33±3% ($p < 0,01$ по сравнению с группами И/Р_{молодые} и И/Р+Физ.р-р_{молодые}). У старых животных в исследуемых группах размер зоны некроза в миокарде левого желудочка был следующим: И/Р_{старые} составил 47±5, ДИПост_{старые} – 28±3 ($p < 0,001$ по сравнению с группой И/Р_{старые}), И/Р+Физ.р-р_{старые} – 48±6 и в группе ПостЛ_{старые} – 35±4% ($p < 0,01$ по сравнению с группами И/Р_{старые} и И/Р+Физ.р-р_{старые}) (рисунк).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии L-лактата в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта ДИПост при ишемии-реперфу-



Размеры зоны некроза в миокарде левого желудочка у молодых и старых крыс в исследуемых группах. Данные представлены в виде M±SEM; * – $p < 0,01$ / ** – $p < 0,001$ – различия статистически значимы между анализируемыми группами; ns – различия статистически незначимы.

The size of the necrosis zone in the myocardium of the left ventricle in young and old rats in the studied groups. Data are presented as M±SEM; * – $p < 0.01$ / ** – $p < 0.001$ – differences are statistically significant between the analyzed groups; ns – differences are not significant.

зии миокарда. ПостЛ при И/Р миокарда сопровождается уменьшением размеров зоны некроза в миокарде левого желудочка как у молодых, так и у старых крыс. Однако кардиопротекторный эффект ПостЛ является менее выраженным, чем при ДИПост.

Обсуждение

В последнее время в научной литературе начали появляться сведения о ранее неизвестных эффектах L-лактата. Так, в ряде исследований показано, что L-лактат участвует в регуляции метаболизма и играет ключевую роль в формировании различных биологических процессов. Выявлено, что L-лактат постоянно образуется и используется в различных клетках организма в полностью аэробных условиях [5]. L-лактат, перемещаясь между клетками-продуцентами и клетками-потребителями, выполняет по крайней мере 3 важные функции: является основным источником энергии, предшественником глюкозы в глюконеогенезе и сигнальной молекулой [5]. Концепции «лактатного челнока» описывают роль L-лактата в доставке окислительных и глюконеогенных субстратов, а также в передаче сигналов клетками [5]. В медицине давно принято считать, что повышение уровня L-лактата в крови коррелирует с тяжестью заболевания или травмы [6]. Однако, имея в виду теорию «лактатного челнока», некоторые клиницисты теперь оценивают лактатемию как показатель «напряжения», а не как «стрессовый» биомаркер [6].

В современной литературе имеются также немногочисленные экспериментальные исследования, посвященные выяснению механизмов влияния L-лактата на сердечную деятельность. J. Zhang и соавт. в опытах на мышах показали, что L-лактат ускоряет поляризацию макрофагов M2, продуцирующих противовоспалительные цитокины, через сигнальный путь STAT3, а также оказывает кардиопротекторное действие после инфаркта миокарда за счет улучшения фракции выброса и фракционного укорочения, снижения апоптоза кардиомиоцитов и увеличения плотности микрососудов в зоне ишемии [7].

Есть мнение, что во время покоя или физической нагрузки L-лактат является основным энергетическим субстратом для здорового сердца [5]. Фактически в качестве энергетического субстрата для сердца L-лактат предпочтительнее глюкозы и свободных жирных кислот [8]. Поэтому не удивительно, что лечение сердечной недостаточности продвигается в направлении предоставления экзогенного L-лактата для улучшения сердечной функции. В клиническом исследовании M. Nalos и соавт. показано, что инфузия полумолярно-

го лактата натрия может улучшить работу сердца у пациентов с острой сердечной недостаточностью без какого-либо пагубного воздействия на функцию органов [9]. Кроме того, исследования Т. Коуама и соавт. показали, что посткондиционирование с помощью крови, обогащенной лактатом, обеспечивает потенциальную кардиопротекцию у пациентов с инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST на ЭКГ, в дальнейшем данным пациентам выполнялось первичное чрескожное коронарное вмешательство [10]. Накапливаются данные, свидетельствующие о том, что L-лактат может быть многообещающим средством лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

В проведенном исследовании ишемия нижних конечностей во время ДИПост, вызывает значительное повышение уровня L-лактата в крови. Согласно имеющимся литературным сведениям L-лактат способен ингибировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) и другие свободнорадикальные процессы [11], выраженность которых при реперфузии возрастает, и оказывает коронарорасширяющее действие, опосредованное NO [12, 13]. Кроме того, L-лактат может использоваться тканями (миокардом) после гипоксии предпочтительнее глюкозы, а также использование молочной кислоты для ресинтеза глюкозы и дальнейшего получения АТФ является важнейшей приспособительной реакцией кардиомиоцитов к гипоксии [14, 15]. Вышеизложенные факты дают основание полагать, что повышение уровня L-лактата в крови, сопровождающее ДИПост, имеет значение в реализации кардиопротекторного эффекта ДИПост.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что ДИПост и ПостЛ оказывают инфаркт-лимитирующий эффект при И/Р миокарда как у молодых, так и у старых крыс, а L-лактат участвует в реализации кардиопротекторного эффекта ДИПост.

Заключение

1. ДИПост, которое воспроизводилось 15-минутной ишемией нижних конечностей и выполнялось через 10 мин после 30-минутной острой ишемии миокарда с последующей 120-минутной реперфузией, оказывало инфаркт-лимитирующий эффект и сопровождалось повышением уровня L-лактата в плазме крови у молодых и старых крыс на 128,4 и 133,9% ($p < 0,001$), соответственно, по сравнению с интактными животными.

2. Выявлено, что ПостЛ, путем введения в левую общую яремную вену нейтрализованного L-лактата в дозе 10 мг/кг, которое осуществлялось на 25-й мин

реперфузии после 30-минутной острой ишемии миокарда, оказывает инфаркт-лимитирующий эффект. Этот эффект был менее выраженным, чем эффект ДИ-Пост, и приводил к уменьшению зоны некроза в миокарде левого желудочка у молодых и старых крыс на 26,7 и 25,5% ($p < 0,01$), соответственно, по сравнению с контрольными возрастными группами.

Литература

(п.п. 1-3; 5-12; 14 см. References)

4. Чепелев С.Н., Висмонт Ф.И., Губкин С.В., Маслов Л.Н. Кардиопротекторная эффективность фармакологического посткондиционирования с помощью молочной кислоты при ишемии-реперфузии миокарда у крыс с транзиторной гиперхолестеринемией. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук*. 2021; 18(2): 135-46. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-135-146>
13. Чепелев С.Н., Висмонт Ф.И. О значимости монооксида азота в реализации инфаркт-лимитирующего эффекта дистантного ишемического посткондиционирования при ишемии-реперфузии миокарда у молодых и старых крыс. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук*. 2020; 17(3): 353-63. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-3-353-363>
15. Трекова Н.А., Аксельрод Б.А., Юдичев И.И., Гуськов Д.А., Маркин А.В., Попов А.М. Клинические аспекты динамики лактата крови во время операции на сердце и аорте в условиях искусственного кровообращения. *Анестезиология и реанимация*. 2016; 61(5): 324-9. <https://doi.org/10.18821/0201-7563-2016-61-5-324-329>

References

1. Basalay M., Barsukevich V., Mastitskaya S., Mrochek A., Pernow J., Sjöquist P.-O., et al. Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning – similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms. *Experimental Physiology*. 2012; 97(8): 908-17. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.064923>
2. Kushimoto S., Akaishi S., Sato T., Nomura R., Fujita M., Kudo D., et al. Lactate, a useful marker for disease mortality and severity but an unreliable marker of tissue hypoxia/hypoperfusion in critically ill patients. *Acute Med Surg*. 2016; 3(4): 293-7. <https://doi.org/10.1002/ams2.207>
3. Artiss J.D., Karcher R.E., Cavanagh K.T., Collins S.L., Peterson V.J., Varma S., et al. A liquid-stable reagent for lactic acid levels. Application to the Hitachi 911 and Beckman CX7. *Am J Clin Pathol*. 2000; 114(1): 139-43. <https://doi.org/10.1309/65UJ-FQ75-DVGC-XX1N>
4. Chepelev S.N., Vismont F.I., Goubkin S.V., Maslov L.N. Cardio-protective efficiency of pharmacological postconditioning using lactic acid in ischemia-reperfusion of the myocardium in rats with tran-

sitional hypercholesterolemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Medical series*. 2021; 18(2): 135-46. (In Russian) <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-135-146>

5. Brooks G.A. The science and translation of lactate shuttle theory. *Cell Metabolism*. 2018; 27(4): 757-85. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.008>
6. Brooks G.A. Role of the Heart in Lactate Shuttling. *Front Nutr*. 2021; 8: 663560. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.663560>
7. Zhang J., Huang F., Chen L., Li G., Lei W., Zhao J., et al. Sodium lactate accelerates M2 macrophage polarization and improves cardiac function after myocardial infarction in mice. *Cardiovascular Therapeutics*. 2021; 2021: 5530541. <https://doi.org/10.1155/2021/5530541>
8. Bergman B.C., Tsvetkova T., Lowes B., Wolfel E.E. Myocardial glucose and lactate metabolism during rest and atrial pacing in humans. *Journal of Physiology*. 2009; 587(9): 2087-99. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.168286>
9. Nalos M., Leverve X.M., Huang S.J., Weisbrodt L., Parkin R., Seppele I.M., et al. Half-molar sodium lactate infusion improves cardiac performance in acute heart failure: a pilot randomised controlled clinical trial. *Critical Care*. 2014; 18(2): R48. <https://doi.org/10.1186/cc13793>
10. Koyama T., Munakata M., Akima T., Kageyama T., Shibata M., Moritani K., et al. Impact of postconditioning with lactate-enriched blood on in-hospital outcomes of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*. 2016; 220: 146-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.06.176>
11. Groussard C., Morel L., Chevanne M., Monnier M., Cillard J., Delamarche A. Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *Journal of Applied Physiology (1985)*. 2000; 89(1): 169-75. <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.1.169>
12. Montoya J.J., Fernandez N., Monge L., Dieguez G., Villalon A.L. Nitric oxide-mediated relaxation to lactate of coronary circulation in the isolated perfused rat heart. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2011; 58(4): 392-8. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318226bcf7>
13. Chepelev S.N., Vismont F.I. Significance of nitrogen monoxide in the implementation of the infarctlimiting effect of remote ischemic postconditioning in myocardial ischemia-reperfusion in young and old rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Medical series*. 2020; 17(3): 353-63. (In Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-3-353-363>
14. Ichai C., Leverve X., Orban J.C. Lactate and acute heart failure syndrome / In: Mebazaa A., Gheorghide M., Zannad F.M., Parrillo J.E. (eds) *Acute Heart Failure*. Springer, London. 2008: 768-80. https://doi.org/10.1007/978-1-84628-782-4_70
15. Trekova N.A., Akselerot B.A., Yudichev I.I., Gus'kova D.A., Mar-kin A.V., Popov A.M. Clinical aspects of the blood lactate dynamics during operations on the heart and the aorta in conditions of cardiopulmonary bypass. *Anesteziologiya i reanimatsiya*. 2016; 61(5): 324-9. (In Russian). <https://doi.org/10.18821/0201-7563-2016-61-5-324-329>

Сведения об авторах:

Чепелев Сергей Николаевич, ст. преподаватель (аспирант) каф. патологической физиологии УО «Белорусский государственный медицинский университет», e-mail: drserge1991@gmail.com;

Висмонт Франтишек Иванович, доктор мед. наук, чл.-корр. НАН Беларуси, заслуженный деятель науки Республики Беларусь, проф., зав. каф. патологической физиологии УО «Белорусский государственный медицинский университет», e-mail: patfiz@bsmu.by;

Губкин Сергей Владимирович, доктор мед. наук, чл.-корр. НАН Беларуси, проф., директор ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси», e-mail: goubkin@yandex.by

© Коллектив авторов, 2023

УДК 612.285.1

**Котиева И.М.¹, Франциянц Е.М.², Гулян М.В.¹, Шлык С.В.¹,
Дроботя Н.В.¹, Котиева Е.М.¹, Антонян Б.Г.¹, Додохова М.А.¹**

Изменение соотношения свободных факторов неогемангио- и неолимфангиогенеза как патогенетический механизм суперагрессии меланомы V_{16}/F_{10} при моделировании хронической нейропатической боли

¹ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России,

344022, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, д. 29;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России,

344037, Ростов-на-Дону, 14-я линия, д. 63

Введение. Появление и выраженность нейропатической боли в онкологии связано с ростом первичной опухоли, интенсивностью метастазирования, побочными эффектами лекарственной терапии и другими видами лечения. Интенсивность хронического болевого синдрома ухудшает качество жизни пациентов, может привести к снижению лечебной дозы или прекращению терапии, боль также является одним из факторов активации роста и диссеминации опухолевого процесса. Необходимым условием роста злокачественной опухоли и процесса метастазирования является рост новых кровеносных и лимфатических сосудов – неоангиогенез, представляющий собой сложный, многоэтапный и сопряженный процесс, в котором принимают участие несколько факторов роста. Среди всех факторов наиболее важным является семейство сосудистых эндотелиальных факторов роста (VEGF).

Цель исследования – оценка влияния хронической нейропатической боли на уровень свободных факторов роста семейства VEGF и их соотношение в интактной коже мышей C57BL/6 (самки) в фазе активной диссеминации меланомы V_{16}/F_{10} .

Методика. Экспериментальные исследования проводились на мышах (самках) линии C57BL/6. В работе использовали клеточную линию меланомы V_{16}/F_{10} , метастазирующую в легкие (подкожная перевивка). Моделирование нейропатической боли проводили путем лигирования седалищных нервов по модифицированной авторами методике. Животные были разделены на группы: две контрольные – интактные мыши и мыши с моделированием хронической боли, группу сравнения – мыши со стандартной подкожной перевивкой меланомы V_{16}/F_{10} и основную группу – мыши, которым меланому V_{16}/F_{10} перевивали через 2 нед после моделирования хронической боли. После эвтаназии на льду забирали кожу, не пораженную злокачественным процессом. В тканях с помощью стандартных тест-систем ИФА методами определяли уровень: VEGF-A, VEGF-C, VEGF-R1, VEGF-R3. Уровни свободных факторов семейства VEGF определяли как соотношение значений фактора роста и соответствующего рецептора.

Результаты. Рост меланомы V_{16}/F_{10} в сочетании с хронической болью сопровождался возрастанием уровня свободного VEGF-A и VEGF-C (увеличение в 7 и 19 раз соответственно). У интактных животных и при изолированном течении модельного онкологического процесса преобладают процессы образования кровеносных сосудов (фактор соотношения 178 и 172 соответственно). При хронической боли в изолированном и сочетании с опухолью варианте увеличивается образование лимфатических сосудов (фактор соотношения 4,3 и 64 соответственно).

Заключение. Моделирование в организме животных хронического болевого синдрома привело к активации факторов гемангио- и лимфангиогенеза как в коже интактных животных, так и животных с перевитой меланомой V_{16}/F_{10} . Преимущественная активация неолимфангиогенеза может быть ключевым звеном в патогенезе суперагрессии меланомы V_{16}/F_{10} при наличии постоянной хронической боли.

Ключевые слова: хроническая нейропатическая боль; злокачественные новообразования; меланомы V_{16}/F_{10} ; факторы семейства VEGF; неоангиогенез

Для цитирования: Котиева И.М., Франциянц Е.М., Гулян М.В., Шлык С.В., Дроботя Н.В., Котиева Е.М., Антонян Б.Г., Додохова М.А. Изменение соотношения свободных факторов неогемангио- и неолимфангиогенеза как патогенетический механизм суперагрессии меланомы V_{16}/F_{10} при моделировании хронической нейропатической боли. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(2): 65-70.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.65-70

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Котиева И.М., Франциянц Е.М., Шлык С.В.; сбор и обработка материала – Котиева И.М., Гулян М.В., Дроботя Н.В., Котиева Е.М., Антонян Б.Г., Додохова М.А.; статистическая обработка материала – Котиева

Е.М., Антонян Б.Г.; написание текста – Котиева И.М., Гулян М.В., Додохова М.А.; редактирование – Котиева И.М., Франциянц Е.М., Шлык С.В., Дроботья Н.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Додохова Маргарита Авдеевна, e-mail: dodokhova@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.08.2022

Принята к печати 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Kotieva I.M.¹, Frantsiyants E.M.², Gulyan M.V.¹, Shlyk S.V.¹, Drobotya N.V.¹, Kotieva E.M.¹, Antonyan B.G.¹, Dodokhova M.A.¹

Changes in the ratio of free factors of neohemangio- and neolymphangiogenesis as a pathogenetic mechanism for melanoma B16/F10 superaggression in a model of chronic neuropathic pain

¹Rostov State Medical University,

Nakhichevansky Pereulok 29, Rostov-on-Don, 344022, Russian Federation;

²National Medical Research Centre for Oncology,

14th Liniya 63, Rostov-on-Don, 344037, Russian Federation

Introduction. In oncology, the appearance and severity of neuropathic pain is associated with primary tumor growth, intensity of metastasis, and side effects of drug therapy and other types of treatment. Intensive chronic pain syndrome impairs quality of life, may result in dose reduction or treatment termination, and may also cause activation of tumor growth and dissemination. Neoangiogenesis, the growth of new blood and lymphatic vessels, is a complex, multi-stage and conjugate process that involves several growth factors. This process is essential for malignant tumor growth and metastasis. Among growth factors, the most important ones are the vascular endothelial growth factor (VEGF) family.

The aim of the study was to evaluate the effect of chronic neuropathic pain on the level of free growth factors of the VEGF family and their ratio in the intact skin of C57BL/6 mice in the phase of active dissemination of melanoma B16/F10.

Methods. Experiments were performed on C57BL/6 female mice. The B₁₆/F₁₀ melanoma cell line metastasizing to the lungs was used (subcutaneous grafting). Neuropathic pain was modeled by ligation of sciatic nerves using a method modified by the authors. The animals were divided into groups: two control groups, intact mice and mice with modeled chronic pain; a comparison group, mice with standard subcutaneous grafting of melanoma B₁₆/F₁₀; and a main group, mice with melanoma B₁₆/F₁₀ transplanted at 2 weeks after modeling chronic pain. The skin not affected by the malignant process was collected on ice after euthanasia. Concentrations of VEGF-A, VEGF-C, VEGFR-1, and VEGFR-3 were determined in tissues using standard ELISA test systems. Concentrations of free factors of the VEGF family were determined as a concentration ratio of the growth factor to the respective receptor.

Results. The growth of melanoma B₁₆/F₁₀ in combination with chronic pain was associated with increases in free VEGF-A and VEGF-C (7 and 19 times, respectively). Processes of blood vessel formation predominated in intact animals and animals with tumor alone (ratio factors 178 and 172, respectively). Chronic pain alone and in combination with tumor was associated with increased formation of lymphatic vessels (ratio factors 4.3 and 64, respectively).

Conclusion. Modeling of chronic pain syndrome induced activation of hemangio- and lymphangiogenesis factors both in the skin of intact animals and animals with transplanted melanoma B₁₆/F₁₀. Predominant activation of neolymphangiogenesis may be the main component in the pathogenesis of melanoma B₁₆/F₁₀ superaggression in the presence of persistent chronic pain.

Keywords: chronic neuropathic pain; malignant neoplasms; melanoma B16/F10; factors of the VEGF family; neoangiogenesis

For citation: Kotieva I.M., Frantsiyants E.M., Gulyan M.V., Shlyk S.V., Drobotya N.V., Kotieva E.M., Antonyan B.G., Dodokhova M.A. Change in the ratio of free factors of neohemangio- and neolymphangiogenesis as a pathogenetic mechanism for melanoma B16/F10 superaggression in a model of chronic neuropathic pain. *Pathological physiology and experimental therapy. Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(2) 65-70. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.65-70

Authors' contribution: concept and design of the study – Kotieva I.M., Frantsiyants E.M., Shlyk S.V.; collection and processing of the material – Kotieva I.M., Gulyan M.V., Drobotya N.V., Kotieva E.M., Antonyan B.G., Dodokhova M.A.; statistical processing of the material – Kotieva E.M., Antonyan B.G.; writing of the text – Kotieva I.M., Gulyan M.V., Dodokhova M.A.; editing – Kotieva I.M., Frantsiyants E.M., Shlyk S.V., Drobotya N.V. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: Dodokhova Margarita Avdееvna, e-mail: dodokhova@mail.ru

Financing. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:Kotieva I.M., <https://orcid.org/0000-0002-2796-9466>Frantsiyants E.M., <https://orcid.org/0000-0003-3618-6890>Gulyan M.V., <https://orcid.org/0000-0001-6023-8916>Shlyk S.V., <https://orcid.org/0000-0003-3070-8424>Drobotya N.V., <https://orcid.org/0000-0002-6373-1615>Kotieva E.M., <https://orcid.org/0000-0002-5595-8799>Antonyan B.G., <https://orcid.org/0000-0002-0596-5819>Dodokhova M.A., <https://orcid.org/0000-0003-3104-827X>

Received 20.08.2022

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

Введение

Число пациентов, имеющих верифицированный диагноз злокачественных новообразований (ЗН) различной локализации, неуклонно увеличивается. В группе впервые выявленных пациентов достаточно высоким является процент больных с первично-множественными опухолями и III–IV стадиями заболевания, которые сопровождаются выраженным болевым синдромом. Появление и выраженность нейропатической боли в онкологии связаны с ростом первичной опухоли, интенсивностью метастазирования и побочными эффектами лекарственной терапии и других видов лечения [1]. В последние годы многочисленные клинические исследования и исследования на животных изучали механизмы, лежащие в основе хронической боли, для выяснения ее клеточных и молекулярных механизмов [2, 3]. Восприятие боли основано на преобразовании механических, тепловых и химических сенсорных сигналов в субъективное осознание боли. Хроническая боль в зависимости от этиологии и патогенеза может быть ноцицептивной, связанной с повреждением тканей; невропатической, обусловленной поражением структур нервной ткани и психогенной, возникающая при психических расстройствах. Однако структура болевого синдрома в онкологии разнородна и включает в себя все компоненты с преобладанием какого-либо из факторов [4, 5]. Интенсивность хронического болевого синдрома ухудшает качество жизни пациентов, может привести к снижению дозы или прекращению терапии, а также является одним из факторов активации роста и диссеминации опухолевого процесса [6, 7]. Патогенез активации развития опухолевого процесса при выраженном хроническом болевом синдроме изучен недостаточно, что в значительной мере усложняет управление болевым синдромом. В настоящее время в исследованиях показано, что болевое воздействие способно вызывать изменения показателей гомеостаза -- нарушение основных видов обмена веществ, мобилизация адаптивных метаболических механизмов, усиление синтеза и высвобождение

цитокинов, хемокинов, факторов роста и многих протеаз, что приводит к повреждению тканей. В результате морфологических изменений, нарушаются физиологические функции тканей и органов, что сказывается на реактивности и резистентности организма, в частности, противоопухолевой устойчивости [8].

Помимо степени агрессии опухоли, активность образования вторичных очагов зависит от метаболического состояния органов-мишеней метастатического поражения при развитии злокачественных новообразований [9]. Центральным звеном «метастатического органотропизма» является изменение клеточного гомеостаза, что напрямую зависит от интенсивности ангиогенеза [10].

Модель мышинной меланомы В16 является наиболее часто используемой моделью метастатической меланомы для патогенетических исследований [11]. При подкожной перевивке меланома В16 имеет солидный вид роста и спонтанно метастазирует преимущественно в легкие [12], что позволяет одновременно оценивать влияние хронической нейропатической боли на рост первичного очага и процесс метастазирования. В предыдущих исследованиях установлено, что хронический болевой синдром в эксперименте увеличивает активность роста и развития опухолевого процесса [13].

Необходимым условием роста злокачественной опухоли и процесса метастазирования является рост новых сосудов -- неоангиогенез, представляющий собой сложный, многоэтапный и сопряженный процесс, в котором принимают участие несколько факторов роста. Среди всех факторов наиболее важным является семейство сосудистых эндотелиальных факторов роста (VEGF) [14]. Сосудистый эндотелиальный фактор роста А (VEGF-A) является секретируемым сигнальным белком и членом-основателем семейства белков VEGF, которое дополнительно включает VEGF-B,

VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и PlGF (плацентарный рост) [15]. Факторы VEGF взаимодействуют с клеткой через тирозинкиназные рецепторы, что запускает каскад реакций, способствующих выживанию, миграции и инвазивности опухолевых клеток. VEGF является специфическим митогеном для эндотелиальных клеток сосудов и поэтому играет центральную роль в ангиогенезе и ускорении гиперпроницаемости микрососудов. Помимо функции фактора пролиферации эндотелиальных клеток, он увеличивает проницаемость сосудов [16].

Интактная кожа у животных-опухоленосителей меланомы B16 может быть вовлечена в системный опухолевый процесс. Постоянная или персистирующая боль, связанная со злокачественным новообразованием, может расцениваться как изначально хроническая. [17]. Оценка влияния хронической нейропатической боли как фактора прогрессии опухолевого процесса на уровень факторов роста семейства VEGF в фазе активной диссеминации меланомы B_{16}/F_{10} (14 сут после перевивки опухолевых клеток) может открыть широкие перспективы для разработки отечественных лекарственных препаратов, как собственно противоопухолевых, так и анальгезирующих для применения в онкологии.

Цель исследования — оценка влияния хронической нейропатической боли на уровень свободных факторов роста семейства VEGF и их соотношение в интактной коже мышей C57BL/6 (самки) в фазе активной диссеминации меланомы B_{16}/F_{10} .

Методика

Экспериментальные исследования проводились на мышцах (самках) линии C57BL/6. В работе использовали клеточную линию меланомы B_{16}/F_{10} , метастазирующей в легкие (подкожная перевивка). Моделирование нейропатической боли проводили путем лигирования седалищных нервов по модифицированной авторами методике [18]. После наступления медикаментозного сна в стерильных условиях выделялся седалищный нерв, накладывалась на него лигатура. Через 2 нед после заживления раны подкожно вводили взвесь опухолевых клеток мышшиной меланомы B16/F10. Животные были распределены на группы: 2 контрольные — интактные мыши и мыши с воспроизведением хронической боли, группу сравнения — мыши со стандартной подкожной перевивкой меланомы B_{16}/F_{10} и основную группу — мыши, которым меланому B_{16}/F_{10} перевивали через 2 нед после создания модели хронической боли. Исследования проводили еженедельно вплоть до гибели животных. После эвтаназии через 14 сут после перевивки опухолевых клеток на льду

забирали кожу, не пораженную злокачественным процессом. В тканях с помощью стандартных тест-систем ИФА методами определяли уровень: VEGFA, VEGFC, VEGFR1, VEGFR3. Уровни свободных факторов семейства VEGF определяли как соотношение средних значений фактора роста и соответствующего рецептора. Фактор соотношения преимущественной активации видов неангиогенеза определен нами как отношение свободного фактора VEGFA к аналогичному показателю VEGFC.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи параметрического критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна-Уитни. Все полученные результаты были проверены на соответствие закону о нормальном распределении. Часть показателей соответствовало закону, часть — не соответствовала. Для тех показателей, которые соответствовали нормальному распределению, мы использовали параметрическую статистику, для тех показателей, распределение которых не соответствовало нормальному распределению, мы использовали непараметрическую статистику. Статистически значимыми считали различия между двумя выборками при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изменение уровня свободных факторов ангиогенеза в непораженной коже самок мышей в фазе активной диссеминации меланомы B_{16}/F_{10} мышей C57BL/6 (самки) представлено в **таблице**.

Уровень свободного VEGF-A, определяемого как соотношение VEGF-A/ sVEGF-R1, не имело значимых различий между показателями в коже интактных животных и мышей с хронической болью в фазе активной диссеминации опухолевых клеток. Содержание свободного VEGF-C в коже самок под влиянием хронической боли увеличилось в 37,6 раза. Рост меланомы B_{16}/F_{10} в сочетанном варианте с хронической болью сопровождался изменениями уровня свободного VEGF-A и VEGF-C (увеличение в 7 и 19 раз соответственно). Необходимо отметить, что изолированное моделирование хронической боли и опухолевого процесса приводит к повышению исследуемых показателей уровней свободных факторов VEGF, но степень увеличения данных показателей в сочетанном варианте моделирования на порядок выше.

Особую роль в патогенезе активации меланомы B_{16}/F_{10} в условиях хронической боли, на наш взгляд, играет отношение свободных факторов гемангио- и лимфангиогенеза. У интактных животных и при изолированном течении модельного онкологического процесса преобладают процессы образования кро-

Уровень свободных факторов ангиогенеза в непораженной коже самок мышей с меланомой B₁₆/F₁₀ и меланомой, сочетанной с хронической болью**Levels of free angiogenesis factors in unaffected skin of female B16/F10 melanoma mice and melanoma combined with chronic pain**

Группы животных Animal groups	Интактные Intact	Боль Pain	Меланома Melanoma	Боль+меланома Pain+melanoma
VEGF-A / sVEGF-R1	178,3±15,2	162,0±11,3	257,5±15,1*	1257,6±112,3*
VEGF-C / sVEGF-R3	1,0±0,21	37,6±2,4*	1,5±0,18	19,4±1,1*

Примечание. * – статистически значимо по отношению к показателям в ткани интактных животных ($p \leq 0,05$).

Note. * – statistically significant relative to values in tissue of intact animals ($p \leq 0.05$).

веносных сосудов (фактор соотношения 178 и 172 соответственно). При хронической боли в изолированном и сочетанном с опухолью варианте увеличивается образование лимфатических сосудов (фактор соотношения 4,3 и 64 соответственно).

Значительное увеличение свободных факторов VEGF под влиянием хронической нейропатической боли в сочетании с развитием меланомы B₁₆/F₁₀ может быть маркером для прогнозирования развития хронического болевого синдрома и активности метастазирования. Дисбаланс свободных факторов семейства VEGF на модели лигирования седалищных нервов вызывает нарушение ангиогенеза в изолированном и сочетанном с меланомой вариантах развития.

Заключение

Моделирование в организме животных хронического болевого синдрома привело к активации свободных факторов гемангио- и лимфангиогенеза. Избыточное относительное увеличение свободного фактора лимфангиогенеза может быть ключевым звеном в патогенезе увеличения агрессивности экспериментальной меланомы B₁₆/F₁₀ при наличии постоянной хронической боли путем увеличения лимфогенного метастазирования.

Литература

(п.п. 3; 7; 9-11; 14-16 см. References)

1. Когония Л.М., Новиков Г.А., Орлова Р.В., Сидоров А.В., Королева И.А., Сакаева Д.Д. Практические рекомендации по лечению хронического болевого синдрома у взрослых онкологических больных. *Злокачественные опухоли*. 2021; 11(3S2-2): 167-86.
2. Синцова С.В., Вотинцев А.Е. Психологические аспекты отношения к боли при соматических заболеваниях. *Российский журнал боли*. 2020; 18(S): 90-1.
4. Яхно Н.Н., Кукушкин М.Л. Хроническая боль: медико-биологические и социально-экономические аспекты. *Вестник РАМН*. 2012; 9: 54-8.
5. Кукушкин М.Л. Этиопатогенетические принципы лечения хронической боли. *Русский медицинский журнал*. 2007; 15(10): 827.

6. Франциянц Е.М., Котиева И.М., Шейко Е.А. Боль как самостоятельная форма болезни. *Российский журнал боли*. 2019; 17(3): 46-51.
8. Абузарова Г.Р., Алексеева Г.С., Невзорова Д.В., Сарманаева Р.Р., Бычкова Н.М., Кузнецов С.В. Персонализированная терапия как новая стратегия лечения хронической боли в онкологии. *Российский журнал боли*. 2021; 19(1): 46-55.
12. Додохова М.А., Сафроненко А.В., Котиева И.М., Алхусейн-Кулягинова М.С., Шпаковский Д.Б., Милаева Е.Р. Упрощенная методика скринингового исследования оловоорганических соединений с предполагаемым противоопухолевым действием. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2021; 84(11): 20-4.
13. Котиева И.М., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Бандовкина В.А., Черярина Н.Д. и др. Повышение степени злокачественности меланомы на фоне хронической боли у самок мышей. *Злокачественные опухоли*. 2017; 7(3S1): 123-4.
17. Когония Л.М., Волошин А.Г., Новиков Г.А., Сидоров А.В. Практические рекомендации по лечению хронического болевого синдрома у онкологических больных. злокачественные опухоли: практические рекомендации RUSSCO #3S2. *Злокачественные опухоли*. 2018; 8(3S2): 617-35.
18. Кит О.И., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Котиева И.М. Способ модификации хронической болию злокачественного роста меланомы B16 у мышей. Патент на изобретение RU 2650587 C1, 16.04.2018. Заявка № 2017114818 от 26.04.2017.

References

1. Kogoniya L.M., Novikov G.A., Orlova R.V., Sidorov A.V., Koroleva I.A., Sakaeva D.D. Practical recommendations for the treatment of chronic pain in adult cancer patients. *Zlokachestvennyye opukholi*. 2021; 11(3S2-2): 167-86. (In Russian)
2. Sintsova S.V., Votintsev A.E. Psychological aspects of attitude to pain in somatic diseases. *Rossiyskiy zhurnal boli*. 2020; 18(S): 90-91. (In Russian)
3. Roth W., Zadeh K., Vekariya R., Ge Y., Mohamadzadeh M. Tryptophan Metabolism and Gut-Brain Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(6): 2973.
4. Yakhno N.N., Kukushkin M.L. Chronic pain: medico-biologic and socio-economic aspects. *Annals of the russian academy of medical sciences*. 2012; 9: 54-8. (In Russian)
5. Kukushkin M.L. Etiopathogenetic principles for the treatment of chronic pain. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2007; 15(10): 827. (In Russian)
6. Frantsiyants E.M., Kotieva I.M., Sheyko E.A. Pain as an independent form of illness. *Rossiyskiy zhurnal boli*. 2019; 17(3): 46-51. (In Russian)

7. Yang S., Chang M.C. Chronic Pain: Structural and Functional Changes in Brain Structures and Associated Negative Affective States. *International journal of molecular sciences*. 2019; 20(13): 3130.
8. Abuzarova G.R., Alekseeva G.S., Nevzorova D.V., Sarmanaeva R.R., Bychkova N.M., Kuznetsov S.V. Personalized therapy as a new strategy for the treatment of chronic pain in oncology. *Rossiyskiy zhurnal boli*. 2021; 19(1): 46-55. (In Russian)
9. Liu Q., Zhang H., Jiang X., Qian C., Liu Z., Luo D. Factors involved in cancer metastasis: a better understanding to “seed and soil” hypothesis. *Mol Cancer*. 2017; 16(1): 176.
10. Basnet H., Tian L., Ganesh K., Huang Y.H., Macalino D.G., Brogi E., et al. Flura-seq identifies organ-specific metabolic adaptations during early metastatic colonization. *Elife*. 2019; 8: e43627.
11. Fridman I.A., Ponomarenko E.A., Makarova O.V., Postovalova E.A., Zolotova N.A., Khochanskiy D.N., et al. Morphological Characteristic of Melanoma B16 Progression in C57BL/6 Mice with High and Low Resistance to Hypoxia. *Bull Exp Biol Med*. 2020; 168: 390–4.
12. Dodokhova M.A., Safronenko A.V., Kotieva I.M., Alkhuseyn-Kulyaginova M.S., Shpakovskiy D.B., Milaeva E.R. Simplified screening method for organotin compounds with putative antitumor activity. *Ekspiermental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2021; 84 11. С. 20-24. (In Russian)
13. Kotieva I.M., Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Bando-vkina V.A., Cheryarina N.D., et al. An increase in the degree of malignancy of melanoma against the background of chronic pain in female mice. *Zlokachestvennye opukholi*. 2017; 7(3S1): 123-4. (In Russian)
14. Wiszniak S., Schwarz Q. Exploring the Intracrine Functions of VEGF-A. *Biomolecules*. 2021; 11(1): 128.
15. Agostino N.M., Saraceni C., Kincaid H., Shi W., Nevala W.K., Markovic S., et al. A prospective evaluation of the role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and the immune system in stage III/IV melanoma. *SpringerPlus*. 2015; (4): 186.
16. Holmes D.I., Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: Angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol*. 2005; 6: 209.
17. Kogoniya L.M., Voloshin A.G., Novikov G.A., Sidorov A.V. Practical recommendations for the treatment of chronic pain in cancer patients. malignant tumors: practical recommendations RUSSCO #3S2. *Zlokachestvennye opukholi*. 2018; 8(3S2): 617-35. (In Russian)
18. Kit O.I., Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Kotieva I.M. *A method for chronic pain modification of malignant B16 melanoma growth in mice. [Sposob modifikatsii khronicheskoy bol'yu zlokachestvennogo rosta melanomy V16 u myshey]*. Patent RU 2650587 C1, 16.04.2018. (In Russian)

Сведения об авторах:

Котиева Инга Мовлиевна, доктор мед. наук, проф., проф. каф. патологической физиологии, проректор по научной работе ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, e-mail: kotieva_im@rostgmu.ru;

Франциянц Елена Михайловна, доктор биол. наук, проф., зам. генерального директора по науке, ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, e-mail: super.gotmon@yandex.ru;

Гуляй Марина Владимировна, канд. мед. наук, доцент каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, e-mail: 25marinablik@mail.ru;

Шлык Сергей Владимирович, доктор мед. наук, проф., ректор ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, e-mail: sshlyk@mail.ru;

Дроботья Наталья Викторовна, доктор мед. наук, проф., зав. каф. кардиологии, ревматологии и функциональной диагностики, проректор по учебной работе, ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, e-mail: drobotya@yandex.ru;

Котиева Елизавета Михайловна, обучающаяся лечебно-профилактического факультета, ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, e-mail: elizaveta.kotieva@mail.ru;

Антонян Борис Гагикович, обучающийся лечебно-профилактического факультета, ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, e-mail: boriska.antonyan@mail.ru;

Додохова Маргарита Авдеевна, канд. мед. наук, зав. центральной-научно-исследовательской лабораторией, доцент каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, e-mail: dodokhova@mail.ru

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616–092.19

Михайличенко М.И., Фигурский С.А., Шаповалов К.Г., Мудров В.А., Михайличенко Ю.В.

Патогенетическое значение миодеструкции в нарушении микроциркуляции при отморожениях

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

Местная холодовая травма протекает с повреждением всех тканевых структур, в том числе и поперечно-полосатой мышечной ткани. Известно, что продукты деградации миоцитов оказывают существенное влияние на эндотелий и периферическую гемодинамику.

Цель исследования – изучение в динамике уровня миоглобина, особенностей микроциркуляции и показателей биоэлектрической активности мышц у пациентов с отморожениями.

Методика. В исследование включены данные 44 пациентов с отморожениями нижних конечностей III–IV степени в позднем реактивном периоде и периоде гранулирования и эпителизации. Измерения биоэлектрической активности мышц и уровня периферического миоглобина выполнялись на 5-е и 30-е сут от момента получения травмы. Для оценки состояния микроциркуляторного русла использован неинвазивный метод ЛДФ с помощью аппарата ЛАКК-02 (НПП «Лазма», Россия). Измерение уровня свободного миоглобина выполнялось также на 5-е и 30-е сут с момента получения травмы у одних и тех же пациентов с помощью мультиплексного анализа сыворотки крови набором реагентов фирмы Biomedical.

Результаты. Установлено, что на 5-е сут с момента криповреждения концентрация миоглобина в крови была выше в 35,6 раза по сравнению с группой контроля, в то же время отмечались более низкие (в 5,0 раз) значения амплитуды М-ответа на фоне увеличения резидуальной латентности в 1,7 раза. Показатель микроциркуляции снизился в 1,6 раза. На 30-е сут уровень миоглобина был выше по сравнению с группой контроля в 7,0 раз, амплитуда М-ответа ниже в 1,8 раза, резидуальная латентность выше показателя группы контроля в 1,5 раза, значение показателя микроциркуляции – ниже в 1,3 раза.

Заключение. У пациентов с отморожением происходит резкое повышение уровня миоглобина в ранние сроки криотравмы. Высокая концентрация свободного миоглобина сопровождается нарушением микроциркуляции и формирует локальную нейропатию. У пострадавших с местной холодовой травмой снижается амплитуда М-ответа и повышается резидуальная латентность. Выявленные изменения регистрируются в позднем реактивном и в периоде гранулирования и эпителизации.

Ключевые слова: местная холодовая травма; уровень миоглобина; лазерная доплеровская флоуметрия; электронейромиография; дисфункция эндотелия

Для цитирования: Михайличенко М.И., Фигурский С.А., Шаповалов К.Г., Мудров В.А., Михайличенко Ю.В. Патогенетическое значение миодеструкции в нарушении микроциркуляции при отморожениях. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(2): 71–76.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.71-76

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Михайличенко М.И., Фигурский С.А.; сбор и обработка материала – Михайличенко М.И.; подготовка иллюстрированного материала – М.И. Михайличенко; статистическая обработка – Мудров В.А.; написание текста – Михайличенко М.И., Михайличенко Ю.В.; редактирование – Шаповалов К.Г. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Михайличенко Максим Игоревич, e-mail: mimikhailichenko@gmail.com

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.02.2023

Принята к печати 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Mikhailichenko M.I., Figurski S.A., Shapovalov K.G., Mudrov V.A., Mikhailichenko Yu.V.

Pathogenetic significance of myodestruction in microcirculatory disorders in frostbitesChita State Medical Academy,
39A Gorkogo St., Chita, 672000, Russian Federation

Local cold injury is associated with damage to all tissue structures, including striated muscles. Myocyte degradation products are known to impact significantly peripheral hemodynamics and endothelial metabolism.

The aim of this work was to study the dynamics of myoglobin concentration, microcirculation, and variables of the bioelectric muscle activity in patients with frostbite.

Methods. This study included 44 patients with degree III–IV frostbite of the lower extremities in the late reactive period and the period of granulation and epithelization. Bioelectric activity of muscles and concentration of peripheral myoglobin were measured on the 5th and 30th days after injury. To assess the state of microcirculation, non-invasive laser Doppler flowmetry was performed with a LAKK-02 (Lazma, Russia) apparatus. Concentration of free myoglobin was also measured on the 5th and 30th days after injury in the same patients using a multiplex analysis of blood serum with a Biomedical reagent kit.

Results. On the 5th day after cryoinjury, blood concentration of myoglobin was 3460% higher compared to the control group whereas M-response amplitude was 80% lower, residual latency was 70% increased, and microcirculation index was 37.5% decreased. On the 30th day, myoglobin concentration was 600% higher than in the control group, M-response amplitude was 44.4% lower, residual latency was 50% higher, and microcirculation index was 23.1% lower than in the control group.

Conclusions. In patients with frostbite, the myoglobin concentration sharply increases at early stages of cryoinjury. A high concentration of free myoglobin is associated with microcirculatory disorders to induce local neuropathy. In patients with local cold injury, the M-response altitude decreases and the residual latency increases. These changes are observed in the late reactive period and the period of granulation and epithelization.

Keywords: local cold injury; myoglobin concentration; laser Doppler flowmetry; electroneuromyography; endothelial dysfunction

For citation: Mikhailichenko M.I., Figurski S.A., Shapovalov K.G., Mudrov V.A., Mikhailichenko Yu.V. Pathogenetic significance of myodestruction in microcirculatory disorders in frostbites. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(2) 71-76. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.71-76

Author's contribution: concept and design of the study – Mikhailichenko M.I., Figurski S.A.; collection and processing of material – Mikhailichenko M.I.; preparation of illustrative material – Mikhailichenko M.I.; statistical processing – Mudrov V.A.; text writing – Mikhailichenko M.I., Mikhailichenko Yu.V.; editing – Shapovalov K.G. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Mikhailichenko Maxim Igorevich*, Associate Prof. of the Department of Faculty Surgery with the course of Urology of the Chita State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, MD, Associate Professor, e-mail: mimikhailichenko@gmail

Information about the authors:Mikhailichenko M.I., <https://orcid.org/0000-0001-8660-2982>Figurskiy S.A., <https://orcid.org/0000-0002-3959-9503>Shapovalov K.G., <https://orcid.org/0000-0002-3485-5176>Mudrov V.A., <https://orcid.org/0000-0002-5961-5400>Mikhailichenko Yu.V., <https://orcid.org/0000-0003-1841-1599>

Financing. The study was carried out with the financial support of the Chita State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation.

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

Received 27.02.2023

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

Введение

Местная холодовая травма протекает с повреждением всех тканевых структур, расположенных в очаге альтерации и перифокально. При этом в современной литературе широко описаны особенности повреждения кожи и глубоко расположенных тканей, периферических сосудов и нервов [1–3], подробно изучена дис-

функция эндотелия, которой современные исследователи отводят главенствующую роль в патогенезе криотравмы и ее неблагоприятных последствиях.

Известно, что рабдомиолиз, в основе которого лежит повреждение периферической мускулатуры, приводит к массивному поступлению продуктов цитолиза,

в частности, миоглобина, в периферический и системный кровотоки [1, 4, 5]. Поперечнополосатая мускулатура составляет около 40% массы тела и, вне всякого сомнения, продукты последствий ее альтерации играют немаловажную роль в патогенезе местной холодовой травмы [2–4, 6].

Доказано важнейшее диагностическое и прогностическое значение уровня концентрации миоглобина (МВ) в периферической крови при дерматомиозите, полимиозите, при генерализованной мышечной атрофии, и таких жизнеугрожающих состояниях, как газовой гангрены, лептоспироз и краш-синдром [7–9]. Однако работ, посвященных рабдомиолизу у пациентов с отморожениями, в современной литературе не встречается. Мы считаем, что данная проблема требует дальнейшего изучения.

Цель работы — изучение динамики уровня миоглобина, особенностей микроциркуляции, а также показателей биоэлектрической активности мышц у пациентов с отморожениями.

Методика

В исследование включено 44 пациента (30 мужчин и 14 женщин) с отморожениями нижних конечностей III–IV степени в позднем реактивном периоде и периоде гранулирования и эпителизации.

Измерения биоэлектрической активности мышц и уровня периферического миоглобина выполнялись на 5-е и 30-е сут от момента получения травмы. В связи с этим пациенты были разделены на 2 группы: 1-я группа ($n=22$) — в позднем реактивном периоде (5-е сут с момента травмы), 2-я ($n=22$) — в периоде гранулирования и эпителизации (30-е сут). Контрольную группу составили относительно здоровые лица в возрасте от 27 до 40 лет ($n=28$).

Для определения биоэлектрической активности мышц использован неинвазивный метод накожной электронейромиографии. С помощью аппарата Нейро-ВМП, компании Нейрософт (г. Иваново) выполнялась электростимуляция накожным электродом позади медиальной лодыжки в углублении таранной кости. Оценивались амплитуда М-ответа и резидуальная латентность. Исследовалась функция мышц проксимальнее зоны демаркации.

Для оценки состояния микроциркуляторного русла использован неинвазивный метод ЛДФ с помощью аппарата ЛАКК-02 (НПП «Лазма», Россия). Показатели ЛДФ регистрировали в течение 8 мин, фиксировались перфузионные единицы (пф.ед.). Датчик устанавливали на передней поверхности в средней трети голени. Оценивался показатель микроциркуляции ПМ (пф.ед.).

Измерение уровня свободного миоглобина выполнялось также на 5-е и 30-е сут с момента получения травмы у одних и тех же пациентов с помощью мультиплексного анализа сыворотки крови набором реагентов фирмы Biomedical.

Все пациенты и добровольцы, участвовавшие в исследовании, давали письменное добровольное информированное согласие, исследование выполнено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (в ред. 2013 г.). Протокол исследования утвержден этической комиссией Читинской медицинской академии.

Статистический анализ. При проведении статистического анализа авторы руководствовались принципами Международного комитета редакторов медицинских журналов (ICMJE) и рекомендациями «Статистический анализ и методы в публикуемой литературе» (SAMPL) [11, 13]. Анализ нормальности распределения признаков, с учетом численности исследуемых групп (менее 50 человек), проводился по Шапиро-Уилка. Учитывая распределение признаков, отличное от нормального во всех исследуемых группах, полученные данные представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей: Ме [Q1; Q3]. Для сравнения двух независимых групп по одному количественному признаку использовался критерий Манна-Уитни. Для сравнения количественных показателей зависимых исследуемых групп использовали ранговый критерий Уилкоксона, который в заключении SPSS автоматически преобразуется в величину Z (z-score). Во всех случаях $p < 0,05$ считали статистически значимым. Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью пакета программ «IBM SPSS Statistics Version 25.0» (International Business Machines Corporation, США).

Результаты и обсуждение

Установлено, что на 5-е сут с момента криповреждения концентрация миоглобина в крови была выше в 35,6 [34,1; 57,5] раз ($p < 0,001$) по сравнению с группой контроля, в то же время отмечается меньшее значение амплитуды М-ответа — в 5,0 [4,4; 5,3] раз ($p < 0,001$), большая резидуальная латентность — в 1,7 [1,6; 1,8] раза ($p < 0,001$), показатель микроциркуляции меньше в 1,6 [1,5; 1,7] раза ($p < 0,001$). На 30-е сутки уровень миоглобина выше в 7,0 [6,7; 8,3] раз ($p < 0,001$) по сравнению с группой контроля, амплитуда М-ответа ниже в 1,8 [1,7; 2,1] раза ($p < 0,001$), резидуальная латентность — выше в 1,5 [1,4; 1,5] раза ($p < 0,001$), значение показателя микроциркуляции — ниже в 1,3 [1,2; 1,3] раза ($p < 0,001$), что свидетельствует о статистической зна-

чимости различий указанных показателей в исследуемых группах (табл.).

На 30-е сут с момента криоповреждения отмечается статистически значимое снижение как уровня миоглобина, так и резидуальной латентности ($p < 0,001$). Амплитуда М-ответа и показатель микроциркуляции, напротив, повышаются на 30-е сут в сравнении с 5-ми сут криоповреждения ($p < 0,001$), что свидетельствует о преобладании репаративных процессов (табл.).

При ходовой альтерации миоцитов продукты их распада, такие как олигопептиды, лизосомальные ферменты, брадикинин, гистамин, серотонин и другие биологически активные вещества поступают в кровоток [11]. Известно, что эти вещества не являются специфическими маркерами повреждения мышечной ткани [7,8]. По своей сути продукты распада, являясь факторами агрессии и тканевыми факторами, провоцируют активацию сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза, а также вызывают повреждение эндотелия с формированием его нарастающей дисфункции, происходит существенная дезорганизация ми-

кроциркуляторной гемодинамики в очаге альтерации и перифокально [2, 3, 8]. Эти явления подтверждаются лабораторными и инструментальными данными – снижается амплитуда М-ответа, увеличивается резидуальная латентность, снижается показатель микроциркуляции у пострадавших. Вероятно, продукты деградации миоцитов формируют и острое повреждение почек у пострадавших [5].

Гораздо более информативным биологическим маркером нарушения целостности мембран и альтерации миоцитов является свободный миоглобин [7–9]. Известно, что его функция – депонирование и транспортирование кислорода к митохондриям миоцитов. Выраженная **экзоцитическая** токсичность миоглобина обусловлена сосудосуживающим действием, альтерацией эндотелия. Необходимо указать и на значительный объем свободных молекул миоглобина. Его участие в повреждении почечных канальцев очевидна. В наших более ранних работах описан феномен почечной дисфункции у пациентов, перенесших местную холодовую травму [5].

Таблица / Table

Сравнительный анализ уровня исследуемых показателей в исследуемых группах
Comparative analysis of the levels of the studied indicators in the studied groups

Уровень исследуемых показателей Level of indicators investigated	Исследуемые группы The groups studied		Группа кон- троля n=28 Control group	Тестовая статистика Test statistics	
	1 группа n=22 Group 1	2 группа n=22 Group 2		Манна-Уитни Mann-Whitney	Величина Z The value of Z
Время с момента криотравмы Time since cryo-trauma	5-е сутки 5th day	30-е сутки 30th day			
Уровень миоглобина, ng/ml Myoglobin levels, ng/ml	3133,2 [3133,2; 4774,3]	618,6 [617,8; 692,7]	88,0 [83,0; 92,0]	Uк-1=0,0, pк-1<0,001; Uк-2=10,0, pк-2<0,001;	Z1-2=-4,01, p1-2<0,001
Амплитуда М-ответа, мС M-response amplitude, mS	0,7 [0,7; 0,8]	1,9 [1,8; 2,0]	3,5 [3,5; 3,7]	Uк-1=0,0, pк-1<0,001; Uк-2=0,0, pк-2<0,001;	Z1-2=-3,93, p1-2<0,001
Резидуальная латентность, мС Residual latency, mS	5,4 [5,3; 5,5]	4,6 [4,5; 4,7]	3,1 [3,1; 3,3]	Uк-1=0,0, pк-1<0,001; Uк-2=0,0, pк-2<0,001;	Z1-2=-3,89, p1-2<0,001
Показатель микроциркуляции, пф.ед. Microcirculation index, pf.u.	27,0 [26,3; 28,0]	33,0 [32,7; 35,6]	42,5 [42,2; 43,4]	Uк-1=0,0, pк-1<0,001; Uк-2=10,5, pк-2<0,001;	Z1-2=-3,87, p1-2<0,001

Примечание. U – критерий Манна–Уитни, позволяющий попарно сравнить две исследуемые группы с группой контроля; Z – величина Z (z-score), позволяющая оценить изменение уровня исследуемых показателей в динамике (сравнить результаты 1-й и 2-й группы исследования); p – значимость различий сравниваемых показателей.

Note. U - Mann–Whitney test, allowing a pairwise comparison of the two study groups with the control group; Z - Z-score to assess the change in the level of the studied parameters in the dynamics (compare the results of the 1st and 2nd study groups); p - significance of differences in the compared parameters.

У пациентов с местной холодовой травмой в реактивном периоде происходит поступление в кровеносное русло большого количества миоглобина (табл.). Доказано, что у свободного миоглобина сродство с кислородом гораздо выше, чем у гемоглобина. Вероятно, что в очаге альтерации реализуется синдром обкрадывания тканей. Формируется стойкая гипоксия в очаге альтерации. Последняя усугубляет повреждение и дисфункцию эндотелия, а также формирует стойкую гипоксическую нейропатию.

Особенности повреждения нервной ткани представлены в наших ранних работах [4]. Доказана существенная роль периферической нейропатии в формировании тяжелых и неблагоприятных последствий отморожений. Не исключено, что именно свободный миоглобин является первопричиной периферической гипоксической нейропатии. Тканевой дефицит кислорода ведет и к снижению тромборезистентности и увеличению адгезивной активности тромбоцитов и лейкоцитов [2, 3, 5].

Феномен лейкоцитарно-тромбоцитраной адгезии (ЛТА), описанный в 1999 году профессором Ю.А. Витковским, принято считать вынужденным, но обоснованным механизмом стабилизации формирующейся эндогенной катастрофы [6]. Однако, полученные нами данные (снижение показателя микроциркуляции и высокие цифры миоглобина) в поздние сроки криотравмы заставляют задуматься и о негативном влиянии феномена ЛТА.

Особенности анатомии поперечно-полосатой мышечной ткани, замкнутые пространства и фасции, делают эти высоко дифференцированные ткани уязвимыми перед компартмент-синдром, развитие которого происходит из-за отека альтерированных тканей. Сдавление сосудисто-нервных пучков, нарушение проведения нервного импульса, повреждение микроциркуляторного русла способствует прогрессированию некроза мышечных волокон [10, 12]. Вероятно, описанное явление — одно из важнейших составляющих затяжного течения криотравмы и неблагоприятных исходов повреждения. При этом и на 30-е сут с момента отморожения фиксируются чрезвычайно высокие цифры миоглобина в периферической крови пострадавших — замыкается еще один порочный круг.

Полученные нами данные указывают на значительную, а порой, и главенствующую, роль свободного миоглобина у пациентов с отморожениями. Вероятно, повреждающее влияние последнего носит системный характер. Мы видим и повреждение почечных структур у пострадавших, и длительное течение процессов деструкции и репарации, и неблагоприятные исходы даже при не столь значительном повреждении тка-

ней при отморожениях. В настоящее время не известно специфических механизмов связывания свободного миоглобина.

В связи с этим, разработка новых подходов к инактивации токсичного эндогенного маркера выведет на новый уровень лечение отморожений и их последствий, а также прочих тяжелых и жизнеугрожающих состояний.

Выводы

1. У пациентов с отморожением происходит резкое повышение уровня миоглобина в ранние сроки криотравмы. Значительное повышение концентрации сохраняется и в более поздние сроки.

2. Высокая концентрация свободного миоглобина сопровождается нарушением микроциркуляции и формирует локальную нейропатию.

3. У пострадавших с местной холодовой травмой снижается амплитуда М-ответа и повышается резидуальная латентность. Выявленные изменения регистрируются в позднем реактивном и в периоде гранулирования и эпителизации. Анатомические особенности мышечной ткани создают предпосылки для хронизации процессов воспаления в очаге альтерации и перифокально.

Литература

1. Заугольников В.С. Рабдомиолиз в клинической практике (обзор литературы). *Вятский медицинский вестник*. 2002; 3: 7–11.
2. Михайличенко М.И., Шаповалов К.Г. Микроциркуляторные нарушения в патогенезе местной холодовой травмы. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2019; 2: 4–11. DOI: 10.24884/1682-6655-2019-18-2-4-11
3. Михайличенко М.И., Шаповалов К.Г., В.А. Мудров В.А. Периферическая нейродеструкция у пациентов с местной холодовой травмой. *Новости хирургии*. 2020; 4: 536–42. DOI: 10.18484/2305-0047.2020.4.536
4. Михайличенко М.И., Шаповалов К.Г., Мудров В.А. и др. Динамика нейромышечной активности у пациентов с местной холодовой травмой. *Вестник хирургии имени И.И. Грекова*. 2019; 5: 47–51. DOI: 10.24884/0042-4625-2019-178-5-47-51
5. Михайличенко М.И., Шаповалов К.Г., Мудров В.А., Михайличенко С.И., Михайличенко А.В., Ханина Ю.С. и др. Преренальное повреждение почек у пациентов с местной холодовой травмой. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(4): 62–70. doi: 10.29413/ABS.2022-7.4.7
6. Кузник Б.И., Витковский Ю.А., Солпов А.В., Роднина О.С., Порушничак Д.Е., Порушничак Е.Б. Лейкоцитарно-тромбоцитарно-эритроцитарные взаимоотношения в различных бассейнах сосудистого русла у больных хронической формой ИБС. *Забайкальский медицинский вестник*. 2012; 2: 92–100.

References

1. Zagolnikov V.C. Rhabdomyolysis in clinical practice (literature review). *Vyatskiy meditsinskiy vestnik*. 2002; 3: 7–11.

2. Mikhailichenko M.I., Shapovalov K.G. Microcirculatory disorders in the pathogenesis of local cold injury. M.I. Mikhailichenko, *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya*. 2019; 2: 4–11. DOI: 10.24884/1682-6655-2019-18-2-4-11
3. Mikhailichenko M.I., Shapovalov K.G., Mudrov V.A. Peripheral neurodestruction in patients with local cold trauma. *Novosti khirurgii*. 2020; 4: 536–42. DOI: 10.18484/2305-0047.2020.4.536
4. Mikhailichenko M.I., Shapovalov K.G., Mudrov V.A., et al. Dynamics of neuromuscular activity in patients with local cold injury. *Vestnik khirurgii imeni I.I. Grekova*. 2019; 5: 47–51. DOI: 10.24884/0042-4625-2019-178-5-47-51
5. Mikhailichenko M.M., Shapovalov K.G., Mudrov V.A., Mikhaylichenko S.I., Mikhailichenko A.V., Hanina Yu.S., et al. Prerenal kidney damage in patients with local cold injury. *Acta biomedical scientifica*. 2022; 7(4): 62–70. doi: 10.29413/ABS.2022-7.4.7
6. Kuznik B.I. Kuznik B.I., Vitkovsky Yu.A., Solpov A.V., Rodnina O.S., Porushnichak D.E., et al. Leukocyte-platelet-erythrocyte relationships in various basins of the vascular bed in patients with chronic IHD. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2012; 2: 92–100.
7. Sauret J.M., Marinides G., Wang G.K. Rhabdomyolysis. *Am fam physician*. 2002; 5(65): 907–12.
8. Black C. Etiology and frequency of rhabdomyolysis. C. Black, H. Jick. *Pharmacotherapy*. 2002; 12(22): 1524–6.
9. D'Agnillo F., D'Agnillo F., Wood F. Effects of hypoxia and glutathione depletion on hemoglobin- and myoglobin-mediated oxidative stress toward endothelium. Porras et al. *Biochim biophys acta*. 2002; 2(1495): 150–9.
10. Huerta-Alardín A.L., Varon J., Marik P.E. Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis – an overview for clinicians. *Crit Care*. 2005; 9(2): 158–69. doi: 10.1186/cc2978
11. *International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication, 2011*. URL: <https://www.icjme.org> (Accessed February 18, 2023).
12. Kishore B., Kishore B., Thurlow V., Kessel B. Hypokalaemic rhabdomyolysis. *Ann clin biochem*. 2007; 3(44): 308–11.
13. Lang T.A., Altman D.G. Statistical analyses and methods in the published literature: The SAMPL guidelines. *Medical Writing*. 2016; 25(3): 31–6. <https://doi.org/10.18243/eon/2016.9.7.4>

Сведения об авторах:

Михайличенко Максим Игоревич, доктор мед. наук, доцент каф. факультетской хирургии с курсом урологии, e-mail: mimikhailichenko@gmail.com, SPIN-код: 4975-6313;

Фигурский Сергей Александрович, ассистент каф. лучевой диагностики, e-mail: figura89@yandex.ru, SPIN-код: 9902-2915;

Шаповалов Константин Геннадьевич, доктор мед. наук, проф., зав. каф. анестезиологии и реаниматологии, e-mail: shkg26@mail.ru, SPIN-код: 6086-5984;

Мудров Виктор Андреевич, доктор мед. наук, доцент каф. акушерства и гинекологии, e-mail: mudrov_viktor@mail.ru, SPIN-код: 5821-3203;

Михайличенко Юлия Валерьевна, ассистент каф. общей и специализированной хирургии, e-mail: mixailichenko.yul@yandex.ru, SPIN-код: 1844-5220.

© Коллектив авторов, 2023

УДК 615.322

Лупанова И.А., Мизина П.Г., Ферубко Е.В., Мясникова С.Б.

Изучение фармакологической активности экстрактов из суспензионных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР), 117216, Россия, Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1

Введение. Поиск растительных источников БАВ адаптогенного действия представляет научный и практический интерес. Однако, важной проблемой их использования как источника БАВ, является доступность исходного сырья, так как часто оно невелико. Одним из решений данной проблемы является культивирование перспективных в качестве сырья растений *in vitro*. Изучение биологической активности субстанций, полученных из клеточных культур, заслуживает особого внимания.

Цель исследования – изучение в опытах *in vivo* адаптогенных свойств комплекса БАВ из суспензионных клеточных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой полученных в ФГБНУ ВИЛАР.

Методика. Объекты исследования: экстракты из суспензионной клеточной культуры женьшеня обыкновенного и родиолы розовой, входящие в состав Биологической коллекции ФГБНУ ВИЛАР. Фармакологические исследования проводили на белых нелинейных мышах и белых нелинейных крысах. Острую токсичность изучали по методу Кербера. Влияние экстрактов на нервную систему изучали на модели «открытое поле норкового типа». Проведено изучение влияния экстракта на продолжительность жизни мышей на модели гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме, а также на выносливость и работоспособность на модели «вынужденное плавание с грузом» на мышах.

Результаты. Было показано, что экстракты из суспензионных клеточных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой малотоксичны, обладают адаптогенной активностью, оказывают антигипоксическое действие в условиях модели гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме, повышают физическую работоспособность и выносливость в условиях модели «вынужденное плавание с грузом», а также не оказывают отрицательного влияния на нервную систему и поведение опытных животных.

Заключение. Клеточные культуры женьшеня обыкновенного и родиолы розовой являются перспективным биотехнологическим сырьем для разработки на их основе безопасных лекарственных средств, повышающих неспецифическую сопротивляемость организма к негативным воздействиям окружающей среды и стрессу.

Ключевые слова: суспензионные клеточные культуры; *Sedum roseum* (L.) Scop.; *Panax ginseng* C. A. Mey; адаптогенная активность; экспериментальные модели

Для цитирования: Лупанова И.А., Мизина П.Г., Ферубко Е.В., Мясникова С.Б. Изучение фармакологической активности экстрактов из суспензионных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(2): 77-85.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.77-85

Для корреспонденции: Лупанова Ирина Александровна, e-mail: lupanova@vilarnii.ru

Участие авторов. Лупанова И.А. – ведущая роль в разработке дизайна исследования, проведении экспериментов, статистической обработке результатов и написании статьи; Ферубко Е.В., Мясникова С.Б. – участие в разработке дизайна исследования, проведении экспериментов и обработке результатов. Мизина П.Г., Ферубко Е.В. – участие в обсуждении результатов и написании статьи. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.04.2023

Принята к печати 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Lupanova I.A., Mizina P.G., Ferubko E.V., Myasnikova S.B.

Pharmacological activity of *Panax ginseng* and *Sedum roseum* cell culture extracts

All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants,
Grina St. 7, Bldg. 1, Moscow 117216, Russian Federation

The search for phytochemicals with adaptogenic activity is an important task of modern pharmacology. At the same time, an important problem for their use is the availability of raw materials, plant-to-plant variability in medicinal content, etc. An efficient and well suited solution to these problems is in vitro systems for production of medicinal plants and their extracts. Therefore, the biological activity of such in vitro-produced substances should be studied.

Aim of the study: to determine in in vivo experiments the pharmacological activity of *Panax ginseng* and *Sedum roseum* cell culture extracts obtained in the All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants.

Methods. Extracts of *Panax ginseng* C.A. Mey and *Sedum roseum* (L.) Scop. cell cultures (from the All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants Biological Collection) were studied. Pharmacological studies were performed on white, outbred mice and rats. The studies were approved by the local Bioethical Committee. Acute toxicity was studied using the Kerber method. The effect of the cell culture extracts on the nervous system was studied using the forced swim test with weight load and open field test. Experimental studies of the adaptogenic effect of the cell culture extracts were performed in animal model of hypoxia with hypercapnia.

Results. *Panax ginseng* and *Sedum roseum* cell culture extracts have low toxicity and have adaptogenic activity. Effects of both cell culture extracts in the forced swim test with weight load demonstrated increased performance efficiency and fitness. In the hypoxia-with-hypercapnia study of antihypoxic adaptogenic action, there was no negative impact on the animals' nervous system.

Conclusion. Extracts of *Panax ginseng* and *Sedum roseum* cell cultures are a promising biotechnological raw material for developing drugs to increase the body's nonspecific resistance to adverse environmental influences and stress.

Keywords: cell cultures; *Sedum roseum* (L.) Scop.; *Panax ginseng* C.A. Mey; pharmacological activity

For citation: Lupanova I.A., Mizina P.G., Ferubko E.V., Myasnikova S.B. Pharmacological activity of *Panax ginseng* and *Sedum roseum* cell cultures extracts. *Patologicheskaya Fiziologiya Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(2): 77-85. (in Russian).
DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.77-85

Author's contribution: Lupanova I.A. – a leading role in the development of study design, experimentation, statistical processing and writing the article; Ferubko E.V., Myasnikova S.B. – participated in the development of study design, experimentation and computing the data; Mizina P.G., Ferubko E.V. – participated in the results discussion and writing the article. Confirmation of the final article version and responsibility for the integrity of all article parts – all co-authors.

For correspondence: *Irina A. Lupanova*, Ph.D. (Biol.), Head of Preclinical research Center, All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Moscow, Russian Federation, e-mail: lupanova@vilarnii.ru

Information about the authors:

Lupanova I.A., <https://orcid.org/0000-0001-8183-2877>

Mizina P.G., <https://orcid.org/0000-0001-7494-2365>

Ferubko E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1949-2597>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 18.04.2023

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

Введение

Термин «адаптоген» был впервые введен в 1940-х годах Н.В. Лазаревым [1]. Классическое определение адаптогенов связано с их способностью повышать устойчивость организма к стрессовым факторам, которые имеют разную природу [2]. Примерами таких стрессовых факторов являются неблагоприятная температура окружающей среды, интенсивная физическая активность, кислородное голодание, интоксикация, инфекционные возбудители и т.д. Согласно определению, адаптогены должны не только защищать ор-

ганизм от повреждений, вызванных стрессовыми факторами, но также они не должны увеличивать потребление кислорода и нарушать нормальные функции организма. Адаптогены также называют регуляторами метаболизма, эффект описывается как «неспецифический» [2].

На сегодняшний день каждый второй лекарственный препарат полностью или частично разрабатывается на основе биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения и спрос на подобные

препараты традиционно высок. Поиск растительных источников БАВ адаптогенного действия представляет научный и практический интерес. Однако, важной проблемой их использования как источника БАВ, является доступность исходного сырья, так как часто оно невелико. Во многих случаях, когда на рынок выводится лекарственный препарат растительного происхождения, популяции растения, на основе которого он создан, оказываются под угрозой из-за масштабного сбора [3]. Одним из решений данной проблемы является культивирование перспективных в качестве сырья растений *in vitro*. Было показано, что клетки, полученные *in vitro*, по некоторым характеристикам значительно отличаются от клеток нативного растения. В большей степени это касается интенсивности роста клеток, а также особенностей синтеза и накопления вырабатываемых ими БАВ, в связи с чем изучение биологической активности субстанций, полученных из клеточных культур, заслуживает особого внимания.

Успешно создано множество растительных суспензионных клеточных культур, которые продуцируют вторичные метаболиты с высоким выходом [4]. Известны методы культивирования клеток, используемые для крупномасштабного производства метаболитов, например, производство паклитаксела из суспензионной клеточной культуры *Taxus chinensis* [5]; производство таксола из различных видов тиса [6]; производство винкристина и винбластина из *Catharanthus roseus* [7].

Среди лекарственных растений, обладающих адаптогенной активностью, можно отметить *Panax ginseng* C.A. Mey, *Eleutherococcus senticosus* Max., *Rhaponiticum carthamoides* (Wild.) Pjin, *Rhodiola spp.* и *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. [8]. Среди наиболее интересных источников БАВ адаптогенного действия можно выделить женьшень (*Panax ginseng* C.A. Mey), семейство *Araliaceae* и родиолу розовую (*Sedum roseum* (L.) Scop.), семейство *Crassulaceae*.

Известно, что БАВ женьшеня обладают анальгетической, противоопухолевой, кардио – и нейропротекторной, антимикробной, гепатопротективной, антиоксидантной и другими видами активности [3]. Химический профиль женьшеня в основном представлен тритерпеноидными гликозидами, или сапонинами, обычно называемыми «гинзенозидами», а также другими БАВ, такими как аминокислоты, алкалоиды, фенолы, белки, полипептиды, полисахариды, жирные кислоты, а также витамины В1 и В2, которые в изобилии содержатся в различных частях растения [9]. Родиола розовая, известная также как «золотой корень» обладает противодиабетическим, противоопухолевым, ан-

тивозрастным и нейропротекторным действием [10]. Из данных литературы известно более чем о 140 соединениях, обнаруженных в этом растении, включая флавоноиды, кумарины, антрахиноны и органические кислоты [11].

Культивирование данных растений является медленным процессом и требует несколько лет от посадки до стадии сбора корней. Кроме того, содержание в них БАВ варьирует в зависимости от возраста растения, сезона сбора урожая и применяемого метода экстракции [5, 12]. Тем не менее, получение культуры клеток *in vitro* является достойной альтернативой для производства биомассы данных растений [13], что позволяет осуществлять круглогодичное производство с меньшими затратами.

Из источников литературы известно успешное получение клеточных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой *in vitro* [5, 11, 13–15].

Цель исследования – изучение адаптогенных свойств комплекса БАВ из суспензионных клеточных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой.

В работе использованы биообъекты уникальной научной установки «Биоколлекция ФГБНУ ВИЛАР».

Методика

В работе использованы биообъекты уникальной научной установки «Биоколлекция ФГБНУ ВИЛАР». Объекты исследования: экстракт из суспензионной клеточной культуры женьшеня обыкновенного (линия Pa.g(S)14ВИЛАР, полученная в результате селекции из исходного штамма Pa.g(B)05ВИЛАР (ЭСКЖ) и суспензионная клеточная культура родиолы розовой (штамм Rr(S)2013ВИЛАР, входящие в состав Биологической коллекции «Клеточные штаммы лекарственных растений, штаммы паразитарной и сапрофитной культуры спорыньи». В качестве препаратов сравнения использовали коммерческие препараты: Женьшеня настойка® (ЗАО «ВИФИТЕХ», Россия) и Родиолы экстракт жидкий® (ЗАО «ВИФИТЕХ», Россия).

Экстракт из суспензионной клеточной культуры женьшеня обыкновенного обладает качественно схожим с экстрактом корней нативного растения химическим составом, в нём выявлены: гинзенозиды: Rg1, Re, Rf, Rh1, Rg2, Rb1, Rb2, Ro, Rb3, Rd, F2, Rh3, малонил-Rg1, Rb1, Rd, ногогинзенозид R1, R2, K, R6, таншинон ПА, криптотаншинон 1, 2 и др. В клеточной культуре родиолы розовой отсутствуют салидрозид и розевин, при этом присутствует значительное количество фенолпропаноидов, производные кумарового спирта, кумаровой и кофейной кислот (розин, гидроксирозин), лигнаны и ситостерины.

Исследования *in vivo* были проведены на белых нелинейных мышах-самцах исходной массой тела 18,0 – 22,0 г и белых нелинейных крысах-самцах массой тела 180,0 – 220,0 г. Фармакологические исследования выполняли согласно Решению Совета ЕЭК от 03.11.2016 №81 «Об утверждении Правил надлежущей лабораторной практики ЕАЭС», Национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежущей лабораторной практики» и «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств». Исследования одобрены биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР. Животные содержались в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе и перед началом исследований их выдерживали на карантине в течение 14 сут.

Расчёт доз для изучения фармакологической активности экстрактов был проведён согласно результатам скрининговых исследований и Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [16]. Лабораторным животным препараты вводили *per os* в дозе, соответствующей терапевтической, указанной в «Инструкции по медицинскому применению». Согласно коэффициенту пересчёта доз, для лабораторных мышей она составила 2 мл/кг [16].

При изучении острой токсичности экстрактов суспензионных клеточных культур родиолы и женьшеня по методу Кербера [17] использовали 120 белых нелинейных мышей-самцов массой тела 18,0-20,0 г. Экстракты вводили внутрижелудочно в диапазоне доз от 200 до 2000 мг/кг. Исследуемые дозы препаратов растворяли в воде очищенной до необходимого объёма – 1,0 мл/100 г массы животного. Объекты исследования однократно вводили животным *per os* при помощи металлического зонда. Контрольной группе животных однократно вводили внутрижелудочно воду очищенную. Длительность наблюдения за лабораторными животными составляла 14 сут. В ходе эксперимента следили за их поведением, внешним видом, двигательной активностью и реакцией на внешние раздражители при введении растворов.

Адаптогенную активность экстрактов, подтверждали на экспериментальных моделях *in vivo*: оценивали влияние веществ на выживаемость мышей в стандартном тесте гипоксической гипоксии с гиперкапнией; на физическую работоспособность и выносливость на модели «вынужденное плавание с грузом». Для характеристики основных параметров поведения и оценки неврологического статуса лабораторных животных в условиях кратковременного психоэмоционального стресса использовали установку «открытое поле норкового типа», отличающуюся отсутствием боко-

вых стенок и, вследствие этого, более высокой стрессогенностью.

Оценку влияния объектов исследования на выживаемость мышей в стандартном тесте гипоксической гипоксии с гиперкапнией проводили на мышах, в количестве 50 особей. Лабораторные животные были разделены на 5 групп по 10 особей: 1-я группа – контрольные животные, получали воду очищенную, в эквивалентном объёме Вторая 2-я группа получала экстракт из суспензионной клеточной культуры женьшеня (2 мл/кг), 3-я – коммерческий препарат Женьшеня настойка® (2 мл/кг); Животным 4-й группы вводили экстракт из суспензионной клеточной культуры родиолы (2 мл/кг), 5-й – коммерческий препарат Родиолы экстракт жидкий® (2 мл/кг). Изучаемые экстракты вводили животным ежедневно в течение 4 сут *per os* при помощи зонда в утренние часы за 1 ч до кормления. На 4-е сут эксперимента через 30 мин после введения препаратов проводили тест. Мышей помещали в герметически закрывающиеся банки ёмкостью 0,5 л по 4 штуки одновременно. Фиксировали длительность жизни каждого животного от момента герметизации банки до последнего заметного дыхательного движения (независимо от предшествующих терминальных судорог), вычисляли среднее время выживания животных в гермообъёме.

Изучение влияния объектов исследования на физическую работоспособность и выносливость проводили на белых нелинейных мышах в количестве 50 особей. Лабораторных животных делили на 5 групп по 10 особей по схеме аналогичной первому эксперименту. Изучаемые экстракты вводили животным в течение 4 сут внутрижелудочно при помощи зонда в утренние часы за 1 ч до кормления. На 4-е сут эксперимента через 30 минут после введения препаратов изучали их влияние на работоспособность и выносливость животных на экспериментальной модели «вынужденное плавание с грузом». Первое плавание начинали через 30 мин после последнего введения исследуемых объектов. Фиксировали длительность плавания животных с грузом 5% массы тела до неспособности животного к активным плавательным действиям (погружение на дно бассейна). В этот момент животное быстро извлекали из воды. Через 1 ч отдыха животных снова заставляли плавать с тем же грузом, в тех же условиях. По результатам первого плавания судили о работоспособности животных, по результатам второго плавания – о выносливости животных.

Оценку основных параметров поведения и неврологического статуса лабораторных животных в усло-

виях кратковременного психоэмоционального стресса проводили на установке «открытое поле норкового типа». Белых нелинейных крыс в количестве 50 особей делили на 5 групп по 10 животных. Первая – контрольные животные получали *per os* воду очищенную, вторая и третья группы – исследуемый экстракт женьшеня (2 мл/кг) и настойку женьшеня (2 мл/г), четвертая и пятая – исследуемый экстракт родиолы розовой (2 мл/кг) и Родиолы экстракт жидкий® (2 мл/г). Изучаемые препараты растворяли в воде очищенной. На 4-е сут эксперимента было изучено их влияние на нервную деятельность животных на модели «открытое поле». Через 30 мин после последнего введения препаратов крыс помещали на середину поля и наблюдали за их поведением в течение 3 мин. Тест позволяет определять двигательную-ориентировочную и исследовательскую активность животных, уровень эмоциональности, выявить неврологические нарушения (дрожь, подергивания век, щек, мигания), а также anomalous поведение: стереотипию, встряхивания.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием лицензионного пакета программ статистического анализа Statistica 13 (Software Inc., США). Для оценки значимости различий выборок, имеющих нормальное распределение, применяли параметрический t-критерий Стьюдента, для ненормального распределения – U-критерий Манна-Уитни. Вы-

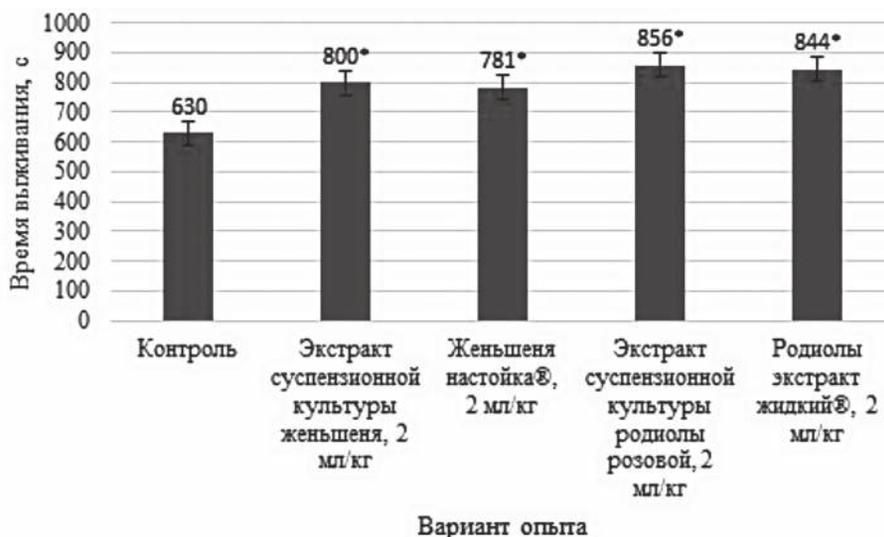
числяли среднее значение (M) и стандартную ошибку среднего (m). Различия между сравниваемыми значениями считали статистически значимыми при уровне вероятности 95% и более ($p < 0,05$).

Результаты

Изучение параметров острой токсичности объектов исследования показало, что у мышей всех групп в течение срока наблюдения (14 сут) клинические признаки интоксикации отсутствовали. Клинико-функциональный статус животных не имел отклонений от физиологического состояния, присущего мышам данной возрастной группы. В течение периода наблюдения гибели мышей в опытных группах не было. Животные были активны, охотно поедали корм, адекватно реагировали на внешние раздражители. Мыши контрольной группы также оставались клинически здоровыми.

Результаты оценки влияния объектов исследования на выживаемость мышей в стандартном тесте гипоксической гипоксии с гиперкапнией представлены на рисунке.

В результате проведенных исследований (рис.) установлено, что экстракт из суспензионной клеточной культуры женьшеня и коммерческий препарат женьшеня увеличивали среднее время выживания животных в гермообъеме на 27 % и 24 % соответственно; введение лабораторным животным экстракта родио-



Влияние экспериментальных экстрактов из суспензионных клеточных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой на время выживания мышей в гермообъеме

Effects of the *Panax ginseng* and *Sedum roseum* cell cultures extracts on survival time.

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с данными контрольной группы.

Note. * – $p < 0.05$ compared with the data of the control group.

лы розовой из биотехнологического сырья приводило к увеличению среднего времени выживания животных в гермообъеме на 36 %, а коммерческого жидкого экстракта родиолы – на 34 % по сравнению с контролем.

Результаты изучения влияния экспериментальных и фармакопейных экстрактов женьшеня и родиолы на физическую работоспособность и выносливость мышей представлены в **таблице 1**.

При сравнительном изучении влияния экстрактов из суспензионных клеточных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой на работоспособность и выносливость мышей в тесте «вынужденное плавание с грузом» (**табл. 1**) показано, что объекты исследования не оказывают значимого негативного влияния на изучаемые показатели, что свидетельствует об отсутствии у них миорелаксирующего эффекта.

Следует отметить, что экстракт из суспензионной клеточной культуры женьшеня существенно увеличивает работоспособность и выносливость животных (на 25 и 27 % соответственно по отношению к контролю. В то время как коммерческий препарат женьшеня повышает работоспособность лишь на 17 %, а выносливость животных на 15 % по сравнению с контрольной группой лабораторных животных.

Из данных представленных в **табл. 1** следует, что экстракт родиолы розовой из биотехнологического сырья увеличивает работоспособность на 23 %, а выносливость животных на 35 % по сравнению с контролем, в то время как коммерческий жидкий экстракт родиолы повышает работоспособность на 19 %, а выносливость животных на 23 % по сравнению с контролем.

Изучение основных параметров поведения и неврологического статуса лабораторных животных в условиях кратковременного психоэмоционального стресса с применением установки «открытое поле норкового типа» показало, что изучаемые экстракты из суспензионных клеточных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой не оказывали отрицательного влияния на нервную систему и поведение опытных животных.

Обсуждение

В целях поиска альтернативного источника сырьевой базы биологически активных веществ ранее в ФГБНУ ВИЛАР в условиях опытов *in vitro* с применением запатентованных специфических ферментных биотест-систем была установлена адаптогенная активность экстрактов из суспензионных клеточных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой [18, 19]. Результаты, полученные нами экспериментах на экспериментальных моделях (лабораторные животные) подтверждают полученные *in vitro* данные.

Безусловно, адаптогенное действие выбранных объектов исследования обусловлено активностью их комплекса БАВ. Так, основными действующими веществами экстракта корней и корневищ женьшеня обыкновенного являются гинзенозиды, при этом качественный состав БАВ экстракта из суспензионной клеточной культуры женьшеня, полученного в ФГБНУ ВИЛАР схож с БАВ нативного растения.

В экстракте из суспензионной клеточной культуры родиолы розовой отсутствуют салидрозид и розевин,

Таблица 1/Table 1

Влияние экстрактов из суспензионных клеточных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой на физическую работоспособность и выносливость мышей

Effects of the *Panax ginseng* and *Sedum roseum* cell cultures extracts on the performance efficiency and fitness

Группы животных / количество животных в группе / Animal groups/number of animals in the group, n=10	Длительность плавания, с / Swimming time duration, sec	
	1-е плавание / 1 st swimming	2-е плавание / 2 ^d swimming
Контрольная / Control	265,0 ± 26,5	318,0 ± 27,6
Экстракт суспензионной культуры женьшеня, 2 мл/кг / Ginseng suspension Culture Extract, 2 ml/kg	331,3 ± 8,9*	404,4 ± 13,3*
Женьшеня настойка®, 2 мл/кг / Ginseng tincture®, 2 ml/kg	312,2 ± 10,5	366,7 ± 10,9
Экстракт суспензионной культуры родиолы розовой, 2 мл/кг / Rhodiola rosea suspension culture extract, 2 ml/kg	325,8 ± 9,2*	430,5 ± 11,5*
Родиолы экстракт жидкий® / Rhodiola rosea fluid extract	316,4 ± 12,6	390,0 ± 22,3

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с данными контрольной группы.

Note. * – $p < 0.05$ compared with the data of the control group.

которые по данным литературы повышают неспецифическую сопротивляемость организма негативным факторам окружающей среды [11]. Однако, из полученных нами данных (табл. 1, рис.) видно, что изучаемый экстракт обладал адаптогенной активностью, сравнимой с активностью экстракта из нативного сырья. Это может быть связано с тем, что в экстракте из суспензионной клеточной культуры было обнаружено большое количество фенилпропаноидов, которые, как известно, являются перспективным источником адаптогенных лекарственных средств [20].

Неспецифическая резистентность, развивающаяся при адаптации к условиям гипоксии, имеет большое значение в снижении воздействия на организм неблагоприятных факторов окружающей среды, в профилактике и лечении ряда заболеваний [21]. В данной работе в стандартном тесте гипоксической гипоксии с гиперкапнией экстракты из суспензионных клеточных культур увеличивали среднее время выживания лабораторных животных, что согласуется с данными литературы. Так, например, А. Lagunin и соавт. в своей работе предсказали с помощью Программы PASS (версия 2019) антигипоксические свойства культуры клеток *Panax japonicas* var. *repens* (Т. Nees) С.А. Мей [22].

Полученные нами данные подтверждены результатами работ других авторов. В экспериментах *in vitro*, *in vivo* и клинических исследованиях учёными доказаны безопасность препаратов из клеточных культур женьшеня обыкновенного, их антиоксидантная, противодиабетическая, антифибротическая, противовоспалительная, противоопухолевая и гепатопротекторная активность (табл. 2).

Исследуемые авторами экстракты из суспензионной клеточной культуры родиолы розовой также доказали свою эффективность и обладали меньшим количеством побочных эффектов по сравнению с современными препаратами для лечения различных заболеваний; Показана возможность использования БАВ экстракта родиолы розовой, полученного из биотехнологического сырья в разработке лекарственных средств и биологически активных добавок, оказывающих адаптогенное, противоопухолевое, противомикробное, антиоксидантное действие [14].

Так как растительные адаптогены должны быть безопасны, мы оценивали острую токсичность изучаемых экстрактов. При этом не установлены показатели ЛД₅₀, так как введенные дозы исследуемых экстрактов в желудок мышам не приводили к гибели жи-

Таблица 2/Table 2

Биологическая активность клеточных культур женьшеня обыкновенного
***Panax ginseng* cell cultures biological activity**

№ п/п	Тип биологической активности / Biological activity	Источник литературы (№ по порядку цитирования) / source of literature (№ in order of citation)
1.	Антиоксидантная / Antioxidant	[,]
2.	Противодиабетическая / Antidiabetic	[]
3.	Антифибротическая / Antifibrotic	[]
4.	Антигипертензивная и сосудорасширяющая / Antihypertensive and vasodilator	[]
5.	Противовоспалительная / Anti-inflammatory	[]
6.	Увеличение периферического кровотока / Peripheral blood flow increasing	[]
7.	Гепатопротекторная / Hepatoprotective	[]
8.	Ингибирование пролиферации раковых клеток / Inhibition of cancer cell proliferation	[]
9.	Ингибирование агрегационной активности и активации тромбоцитов крови человека / Aggregation activity inhibition and human blood platelets activation	[]
10.	Стимуляция иммунных клеток / Immune cells stimulation	[]
11.	Ингибирование активности L-дигидроксифенилаланин оксидазы (отбеливание кожи) / L-dihydroxyphenylalanine oxidase activity inhibition (skin whitening)	[]
12.	При лечении эректильной дисфункции / Erectile dysfunction treatment	[]
13.	При лечении гиперлипидемии / Hyperlipidemia treatment	[]
14.	При лечении сперматогенных нарушений / Spermatogenic disorders treatment	[]

вотных. По результатам изучения острой токсичности экстракты из суспензионных клеточных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой относятся к малотоксичным веществам, в соответствии с классификацией токсичности химических веществ по ГОСТу 12.1.007-76.

Заключение

Таким образом, увеличение времени выживаемости лабораторных животных в условиях теста гипоксической гипоксии с гиперкапнией; повышение работоспособности и выносливости в условиях теста «вынужденное плавание с грузом», а также полученные данные о том, что экстракты из суспензионных клеточных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой не оказывали отрицательного влияния на нервную систему и поведение лабораторных животных на модели «открытое поле» норкового типа подтверждают установленные ранее *in vitro* результаты об их адаптогенной активности. На основе полученных данных можно сделать вывод, что клеточные культуры женьшеня обыкновенного и родиолы розовой являются перспективным биотехнологическим сырьем для разработки на их основе безопасных лекарственных средств, повышающих неспецифическую сопротивляемость организма к негативным воздействиям окружающей среды и стрессу.

Данная работа выполнена согласно плану научно-исследовательской работы ФГБНУ ВИЛАР по теме: «Направленный скрининг, оценка фармакологической активности и безопасности биологически активных веществ и фармацевтических композиций на их основе» (FGUU-2022-0010).

Литература

(п.п. 1-15; 22-34 см. References)

16. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Часть первая. Под ред. А.Н. Миронова. М.; Гриф и К; 2012.
17. Сернов Л.Н., Гацура В.В. *Элементы экспериментальной фармакологии*. М.; Медицина; 2000.
18. Лупанова И.А., Стрелкова Л.Б., Савина Т.А., Ферубко Е.В. Исследование биологической активности экстракта из клеточной культуры родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.) с применением специфических ферментных биотест-систем в условиях *in vitro*. *Вопросы обеспечения качества лекарственных средств*. 2017; 3(17): 9-15.
19. Лупанова И.А., Пыбулько Н.С., Савина Т.А., Ферубко Е.В. Исследование биологической активности экстракта из биомассы женьшеня обыкновенного (*Panax Ginseng* s.a. Meу) с применением специфических ферментных биотест-систем *in vitro*. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017; 3(20): 104-6.
20. Куркин В.А. Фенилпропаноиды как важнейшая группа биологически активных соединений лекарственных растений. *Меж-*

дународный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015; 12(7): 1338-42.

21. Макаренко А.Н., Карандеева Ю.К. Адаптация к гипоксии как защитный механизм при патологических состояниях. *Вестник проблем биологии и медицины*. 2013; 2(100): 27-32.

References

1. Wagner H., Nörr H., Winterhoff H. Plant adaptogens. *Phytomedicine*. 1994; 1(1): 63-76. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(11\)80025-5](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(11)80025-5)
2. Panossian A., Wikman G., Wagner H. Plant adaptogens III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. *Phytomedicine*. 1999; 6(4): 287-300. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(99\)80023-3](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(99)80023-3)
3. Cordell G.A. Sustainable medicines and global health care. *Planta Med*. 2011; 77(11): 1129-38. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1270731>
4. Zenk M.H. The impact of plant cell culture on industry. In *Frontiers of Plant Tissue Culture. International Association for Plant Tissue Culture*. 1978; 1-13.
5. Liberti L.E., Der Mardersian A. Evaluation of commercial ginseng products. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1978; 10: 1487-89.
6. Murthy H.N., Georgiev M.I., Kim Y.S., Jeong C.S., Kim S.J., Park S.Y., et al. Ginsenosides: prospective for sustainable biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014; 98(14): 6243-54. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5801-9>
7. Jeziorek M., Sykłowska-Baranek K., Pietrosiuk A. Hairy Root Cultures for the Production of Anti-cancer Naphthoquinone Compounds. *Current Medicinal Chemistry*. 2018; 25(36): 4718-39. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170821161844>
8. Esmaealzadeh N., Iranpanah A., Sarris J., Rahimi R. A literature review of the studies concerning selected plant-derived adaptogens and their general function in body with a focus on animal studies. *Phytomedicine*. 2022; 105: 1543-54. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154354>
9. Murthy H.N., Dandin V.S., Park S.-Y., Paek K.-Y. Quality, safety and efficacy profiling of ginseng adventitious roots produced in vitro. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018; 102(17): 7309-17. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9188-x>
10. Pu W.-L., Zhang M.-Y., Bai R.-Y., Sun L.-K., Li W.-H., Yu Y.-L., et al. Anti-inflammatory effects of *Rhodiola rosea* L.: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020; 121: 109552. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109552>
11. Marchev A., Dinkova-Kostova A., György Z., Mirmazloum I., Aneva I., Georgiev M. *Rhodiola rosea* L.: from golden root to green cell factories. *Phytochemistry Reviews*. 2016; 15: 515-36. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9453-5>
12. Phillipson JD, Anderson LA. Ginseng-quality, safety and efficacy? *Pharm J*. 1984; 232: 161-5.
13. Paek K.Y., Murthy H.N., Hahn E.J., Zhong J.J. Large scale culture of ginseng adventitious roots for production of ginsenosides. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*. 2009; 113: 151-76. https://doi.org/10.1007/10_2008_31
14. Asyakina L., Sukhikh S., Ivanova S., Prosekov A., Ulrikh E., Chupahin E., et al. Determination of the qualitative composition of biologically-active substances of extracts of *in vitro* callus, cell suspension, and root cultures of the medicinal plant *rhodiola rosea*. *Biomolecules*. 2021; 11: 365. <https://doi.org/10.3390/biom11030365>

15. Wu S., Zu Y., Wu M. High yield production of salidroside in the suspension culture of *Rhodiola sachalinensis*. *J Biotechnol.* 2003; 106(1): 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.07.009>
16. *Nonclinical Drug Study Guidelines. Part one. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya]*. Ed. A.N. Mironova. Moscow; Vulture and K; 2012. (in Russian)
17. Sernov, L.N., Gatsura V.V. *Elements of experimental pharmacology. [Elementy eksperimental'noy farmakologii]*. Moscow; Medicine; 2000. (in Russian)
18. Lupanova I.A., Strelkova L.B., Savina T.A., Ferubko E.V. Study of biological activity of *Rhodiola Rosea* L. extract from cell culture using specific enzyme biotest systems in vitro. *Voprosy obespecheniya kachestva lekarstvennykh sredstv.* 2017; 3 (17): 9–15. (in Russian)
19. Lupanova I.A., Tsybulko N.C., Savina T.A., Ferubko E.V. Study of the biological activity of an extract from the biomass of common ginseng (*Panax Ginseng* c.a. Mey) using specific enzyme biotest systems in vitro. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv.* 2017; 3 (20): 104–6. (in Russian)
20. Kurkin V.A. Phenylpropanoids as the most important group of biologically active compounds of medicinal plants. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy.* 2015; 12 (7): 1338–42. (in Russian)
21. Makarenko A.N., Karandeeva Yu.K. Adaptation to hypoxia as a protective mechanism in pathological states. *Vestnik problem biologii i meditsiny.* 2013; 2 (100): 27–32. (in Russian)
22. Lagunin A., Povydysh M., Ivkin D., Luzhanin V., et al. Antihypoxic action of panax japonicus, tribulus terrestris and dioscorea deltoidea cell cultures: in silico and animal studies. *Molecular Informatics.* 2020; 39(11): e2000093. <https://doi.org/10.1002/minf.202000093>
23. Ali M.B., Hahn E.J., Paek K.-Y. Protective role of Panax ginseng extract on lipid peroxidation and antioxidant status in polyethylene glycol induced *Spathiphyllum* leaves. *Biochem Eng J.* 2006; 32(3): 143–8.
24. Lim H.K., Kim Y.W., Lee D.H., Cho S.K., Cho M. The antifibrotic and antioxidant activities of hot water extract of adventitious root culture of Panax ginseng (ARCP). *J. Appl. Biol Chem.* 2007; 50:74–84.
26. Murthy H.N., Dandin V.S., Lee E.J., Paek K.Y. Efficacy of ginseng adventitious root extract on hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 2014b; 153: 917–21.
27. Hong M.H., Lim H.K., Park J.E., Jun N.J., Lee Y.J., Cho M., et al. The antihypertensive and vasodilating effects of adventitious root extracts of wild ginseng. *J. Korean. Soc. Appl. Biol. Chem.* 2008; 51: 102–7.
28. Yu G.J., Choi I.W., Kim G.Y., Kim B.W., Park C., Hong S.H., et al. Antiinflammatory potential of saponins derived from cultured wild ginseng root in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Int. J. Mol. Med.* 2015; 35: 1690–8.
29. Lee I.S., Kim S.K., Jeon M.H., Jeon W.K. Ethyl acetate extract from tissue-cultured mountain ginseng adventitious roots inhibits in vitro platelet aggregation in whole human blood and augments peripheral blood flow in mice. *J Ginseng Res.* 2011; 35: 442–8.
30. Murthy H.N., Dandin V.S., Paek K.Y. Hepatoprotective activity of ginsenosides from Panax ginseng adventitious roots against carbon tetrachloride treated hepatic injury in rats. *J Ethnopharmacol.* 2014; 158: 442–6.
31. Oh C.H., Kang P.S., Kim J.W., Kwon J., Oh S.H. Water extracts of cultured mountain ginseng stimulate immune cells and inhibit cancer cell proliferation. *Food Sci. Biotechnol.* 2006; 15: 369–73.
32. Xu G.H., Choo S.J., Ryoo I.J., Kim Y.H., Paek K.Y., Yoo I.D. Polyacetylenes from the tissue cultured adventitious roots of Panax ginseng C. A. Meyer. *Nat. Prod. Sci.* 2008; 14: 177–81.
33. Kim T.H., Jeon S.H., Han E.J., Paek K.Y., Park J.K., Youn N.Y., et al. Effects of tissue-cultured mountain ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) extract on male patients with erectile dysfunction. *Asian J. Androl.* 2009; 11: 356–61.
34. Lee E.J., Zhao H.L., Li D.W., Jeong C.S., Kim J.H., Kim Y.S. Effect of MeOH extract of adventitious root culture of Panax ginseng on hyperleidemic rat induced by high fat rich diet. *Korean. J. Pharmacogn.* 2003; 34: 179–84.
35. Park J.S., Hwang S.Y., Lee W.S., Yu K.W., Paek K.Y., Hwang B.Y., et al. The therapeutic effect of tissue cultured root of wild Panax ginseng C.A. Meyer on spermatogenic disorder. *Arch. Pharm. Res.* 2006; 29: 800–7.

Сведения об авторах:

Лупанова Ирина Александровна, канд. биол. наук, руководитель Центра доклинических исследований, ФГБНУ «ВНИИ лекарственных и ароматических растений», e-mail: lupanova@vilarnii.ru;

Мизина Прасковья Георгиевна, доктор фарм. наук, советник, ФГБНУ «ВНИИ лекарственных и ароматических растений», e-mail: mizina-pg@yandex.ru;

Ферубко Екатерина Владимировна, доктор мед. наук, зав. отделом экспериментальной фармакологии, ФГБНУ «ВНИИ лекарственных и ароматических растений», e-mail: ferubko@vilarnii.ru;

Мясникова С.Б., науч. сотр., лаб. биотехнологии ФГБНУ «ВНИИ лекарственных и ароматических растений», e-mail: vilarnii@mail.ru

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092.9

Слаутин В.Н.¹, Гребнев Д.Ю.^{1,2}, Маклакова И.Ю.^{1,2}, Базарный В.В.¹, Валамина И.Е.¹

Антифибротическое действие фукоксантина при тетрахлорметан-индуцированном фиброзе печени

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

620028, Екатеринбург, Россия, ул. Репина, д. 3;

²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,

620026, Екатеринбург, Россия, ул. Карла Маркса, д. 22А;

³ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора,

620030, Екатеринбург, Россия, ул. Летняя, д. 23

Несмотря на успехи современной медицины, в настоящее время не существует альтернативы хирургическому методу лечения цирроза печени – трансплантации печени, использование которого в массовой практике затруднительно. Наиболее перспективной стратегией подавления развития фиброза печени является ингибирование канонического пути трансформирующего фактора роста- β , как основного профиброгенного фактора роста, ответственного за стимулирование процессов активации и дифференцировки перисинусоидальных клеток печени Ито в миофибробласты. **Цель исследования** – изучение эффективности и механизмов действия фукоксантина при фиброзе печени.

Методика. Исследования проведены на 50 белых мышах-самцах (возраст 8-10 нед, масса 20-22 г). В экспериментах использовался фукоксантин (10 мг/кг) ежедневно per os, через зонд. Исследование было разделено на 2 этапа: Первый этап – моделирование тетрахлорметан-индуцированного фиброза печени. Было выделено 3 группы по 10 животных в каждой: группа интактных животных; опытная группа, которая получала 25% раствор тетрахлорметана (2 мкл/г) на персиковом масле внутривентриально; группа контроля, которая получала персиковое масло в эквивалентных дозах. Второй этап – изучение эффективности и механизмов действия фукоксантина при фиброзе печени. Было выделено 2 группы животных с фиброзом печени: группа сравнения ($n=10$), которой не проводилось лечение и основная группа, которой вводили фукоксантин (10 мг/кг, $n=10$) в течение 5 нед. Выраженность фиброза печени оценивалась по шкале METAVIR. Методом ИФА в гомогенате печени исследовали уровень трансформирующего фактора роста- β . Иммуногистохимически оценивали количество α -SMA+ клеток, определяли уровень тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1 (TIMP1), матриксных металлопротеиназ-9 и -13. Для оценки степени замещения паренхимы печени соединительной тканью использовалось окрашивание Sirius Red.

Результаты. Было установлено, что фукоксантин в дозе 10 мг/кг обладает антифибротическим действием, которое реализуется через ингибирование основного профиброгенного фактора TGF- β . Следствием снижения уровня TGF- β было уменьшение количества миофибробластов, TIMP-1 и объема соединительной ткани в печени.

Заключение. Фукоксантин можно рассматривать как перспективный препарат для лечения фиброза печени.

Ключевые слова: фукоксантин; фиброз печени; трансформирующий фактор роста- β ; перисинусоидальные клетки печени Ито; миофибробласты

Для цитирования: Слаутин В.Н., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Базарный В.В., Валамина И. Е. Антифибротическое действие фукоксантина при тетрахлорметан-индуцированном фиброзе печени. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(2): 86-93.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.86-93

Участие авторов: проведение исследования, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка графических элементов и иллюстративного материала – Слаутин В.Н.; проведение исследования, сбор данных, написание текста – Гребнев Д.Ю.; статистическая обработка материала – Маклакова И.Ю.; концепция и дизайн исследования, редактирование статьи – Базарный В.В.; выполнение морфометрических исследований – Валамина И.Е. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Для корреспонденции: Слаутин Василий Николаевич, e-mail: vas-slautin@yandex.ru; Гребнев Дмитрий Юрьевич, dr-grebnev77@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.11.2022

Принята к печати 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Slautin V.N.^{1,3}, Grebnev D.Yu.^{1,2}, Maklakova I.Yu.^{1,2}, Bazarniy V.V.¹, Valamina I.E.¹**Antifibrotic effect of fucoxanthin in tetrachloromethane-induced hepatic fibrosis**¹Ural State Medical University,

Repina St. 3, Yekaterinburg, 620028, Russian Federation;

²Institute of Medical Cell Technologies,

Karl Marx St. 22a, Yekaterinburg, 620026, Russian Federation;

³Federal Budgetary Institution of Science "Federal Scientific Research Institute of Viral Infections "Virome" Federal Service for Surveillance on Customer Rights Protection and Human Wellbeing",

Letnyaya str. 23, Yekaterinburg, 620030, Russian Federation

Currently, the most promising strategy for suppressing the development of liver fibrosis is the inhibition of a canonical pathway of transforming growth factor- β , the main profibrogenic growth factor stimulating the activation and differentiation of hepatic stellate cells into myofibroblasts.

The aim of the study was to evaluate the effectiveness and mechanisms of action of fucoxanthin in liver fibrosis.

Methods. The study was conducted on 50 white male mice aged 8-10 weeks, weighing 20-22 g. For the experiments, fucoxanthin was administered at a dose of 10 mg/kg daily, orally, through a probe. The study included two stages. The first stage was modeling carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. Three groups of 10 animals each were used: group of intact animals; test group that received 2 μ l/g of 25% solution of carbon tetrachloride in peach oil, intraperitoneally; and control group treated with peach oil in equivalent doses. The second stage was focused on studying the fucoxanthin effectiveness and antifibrotic mechanisms. Two groups of animals with liver fibrosis were used at this stage: untreated, comparison group and main group, which was administered fucoxanthin at a dose of 10 mg/kg for 5 weeks. Severity of liver fibrosis was assessed with the METAVIR scale. Concentration of transforming growth factor- β was measured in liver homogenates by ELISA. Amount of α -SMA+ cells and concentrations of tissue inhibitor of metalloproteinases-1, matrix metalloproteinases-9 and -13 were assessed immunohistochemically. Sirius Red staining was used to assess severity of fibrosis.

Results. Fucoxanthin 10 mg/kg produced an antifibrotic effect mediated by inhibition of the main profibrogenic factor, TGF- β . The decrease in TGF- β resulted in decreases in the number of myofibroblasts, TIMP-1 and connective tissue in the liver.

Conclusion. Fucoxanthin can be considered as a promising therapy for liver fibrosis.

Keywords: fucoxanthin; liver fibrosis; transforming growth factor- β ; hepatic stellate cells; myofibroblasts

For citation: Slautin V.N., Grebnev D.Yu., Maklakova I.Yu., Bazarniy V.V., Valamina I.E. Antifibrotic effect of fucoxanthin in tetrachloromethane-induced hepatic fibrosis. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental' nayaterapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(2): 86-93. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.86-93

Author's contribution: conducting the study, collecting, analyzing and interpreting data, preparing graphic elements and illustrative material – Slautin V.N.; conducting the study, collecting data, writing text – Grebnev D.Yu.; statistical processing of the material – Maklakova I.Yu.; concept and design of the study, editing of the article – Bazarniy V.V.; performing morphometric studies – Valamina I.E. All co-authors – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

For correspondence: *Dmitry Y. Grebnev*, MD, Associate Prof., Head of the Department of Pathological Physiology of the Federal State Budgetary Educational Institution of the Ministry of Health of the Russian Federation, e-mail: dr-grebnev77@mail.ru

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

Financing. The study had no sponsorship.

Information about authors:Slautin V.N., <https://orcid.org/0000-0002-0071-4042>Grebnev D.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5698-8404>Maklakova I.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-6895-7947>Bazarniy V.V., <https://orcid.org/0000-0003-0966-9571>Valamina I.E., <https://orcid.org/0000-0001-7387-5287>

Received 21.11.2022

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

Введение

В последние годы широкое распространение приобретают хронические заболевания печени, способные приводить к развитию фиброза и его терминальной

стадии – цирроза печени. По данным ВОЗ, в настоящее время смертность от цирроза печени занимает 9-е место в мире среди всех причин смерти и 6-е –

среди трудоспособного населения. В связи с дефицитом донорских органов и сроками ожидания операции трансплантации печени, актуальной проблемой является поиск альтернативных нехирургических методов лечения, способных приводить к регрессу фиброзных изменений в органе [1, 2].

Наше внимание привлекла возможность использования фукоксантина для терапии фиброза печени. В ранее проведенных исследованиях *in vitro* была доказана способность фукоксантина ингибировать дифференцировку перисинусоидальных клеток печени Ито, через ингибирование канонического сигнального пути трансформирующего фактора роста- β [3].

Фукоксантин – это пигмент, получаемый в основном из бурых и диатомовых водорослей. Благодаря своему уникальному химическому строению (в составе молекулы имеется алленовая связь, эпоксидная, гидроксильная, карбонильная и карбоксильная группы) фукоксантин обладает выраженным противовоспалительным, антиоксидантным и гепатопротекторным действием [4].

Противовоспалительное действие фукоксантина реализуется за счёт ингибирования выработки модуляторов и медиаторов воспаления (простагландина E_2 , фактора некроза опухоли- α , интерлейкина-1 и интерлейкина-6), а также ферментов – циклооксигеназы-2 и индуцируемой NO-синтазой оксида азота (подавление активации транскрипционного фактора NF- κ B и фосфорилирования митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) [4, 5].

Фукоксантин способен ингибировать образование активных форм кислорода, продуктов перекисного окисления липидов и обеспечивать антиоксидантную защиту через повышение экспрессии ферментов, участвующих в синтезе глутатиона: глутамат-цистеинлигазы и глутатион-синтазы [4, 6].

Цель исследования – изучение эффективности и механизмов действия фукоксантина при фиброзе печени.

В эксперименте использовано 50 самцов мышей в возрасте 8-10 нед, массой 20-22 г. Содержание животных и дизайн исследования одобрены этическим комитетом ФГБОУ ВО УГМУ МЗ России. Исследование проводилось в 2 этапа: 1-й этап – моделирование фиброза печени с применением тетрахлорметана, широко используемого для моделирования различных патологических процессов, в том числе фиброза печени [7]. Модель ранее была апробирована нами при изучении антифиброгенных механизмов действия аллогенных плацентарных мультипотентных мезенхимальных клеток при фиброзе печени [8, 9]. На 1-м этапе было

выделено 3 группы по 10 мышей. Животным опытной группы внутривенно вводили тетрахлорметан на персиковом масле (1:4) – 2 мкл/г 2 раза в нед в течение 6 нед. Мыши контрольной группы получали эквивалентное количество персикового масла (Галено-Фарм, Россия). Группу сравнения составили 10 интактных животных.

На 2-м этапе животные с тетрахлорметан-индуцированным фиброзом печени были разделены на 2 группы – основную и группу сравнения. Животные основной группы получали ежедневно фукоксантин (Sigma Aldrich, США) в дозе 10 мг/кг внутривенно в течение 5 нед. Группе сравнения препарат не вводили. Выведение животных из эксперимента проводилось методом цервикальной дислокации. Схема эксперимента представлен на **рисунке 1**.

Образцы ткани (10x10x5 мм) левой доли печени фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина («Ретиноиды», Россия). После депарафинизации гистологические срезы 3-5 мкм использовались для гистологического и иммуногистохимического исследования.

Гистологическое исследование. Для оценки выраженности фиброза печени использовалась шкала METAVIR. Количественный анализ содержания коллагена в печени проводили с использованием набора Picro Sirius Red Stain Kit (Abcam, Великобритания). В каждом препарате анализировали 15 областей по 0,28 мм². Распространенность фиброза в каждом образце определялась как отношение окрашенной области (соединительная ткань) к общей площади анализируемого препарата. Итоговое значение общей выраженности фиброза и фиброза в паренхиме печени определялось как среднее значение \pm стандартное отклонение в 15 областях в %. Для анализа микрофотографий использовалась морфометрическая программа SIAMS800 (ООО «Сиамс», Россия).

Иммуногистохимическое исследование. Депарафинированные срезы инкубировали с первичными кроличьими специфическими к мышце антителами (Abcam, Великобритания) в течение 12 ч при температуре +4°C: 1) MMP9 (matrix metalloproteinase, MMP, матриксная металлопротеиназа; Recombinant Anti-MMP9 antibody), 1: 5000, (Abcam, Великобритания). 2) TIMP1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1, тканевой ингибитор металлопротеиназы-1; Anti-TIMP1 antibody), 1: 500, (Abcam, Великобритания). 3) α -SMA (Alpha-smooth muscle actin, альфа гладкомышечный актин; Recombinant Anti-alpha smooth muscle actin antibody), 1: 1000, (Abcam, Великобритания). Срезы инкубировали с вторичными антителами Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)

при комнатной температуре в течение 2 ч, 1: 500 (Abscam, Великобритания). При выполнении иммуногистохимических исследований была использована система детекции с субстратом пероксидазы (DAB Substrate Kit, набор для приготовления рабочего раствора диаминобензидина) (Abscam, Великобритания). Для окраски ядер клеток использовали гематоксилин Майера (Avantor, Нидерланды).

Определение TGF-β в гомогенате ткани печени проводили методом иммуноферментного анализа с использованием набора Mouse TGF beta 1 ELISA Kit (Abscam, Великобритания).

Полученные данные обрабатывались вариационно-статистическим методом с использованием t-критерия Стьюдента. При отсутствии нормального распределения данных статистическую значимость различий определяли, используя непараметрический критерий Манна-Уитни (U). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Введение тетрахлорметана приводит к развитию окислительного стресса и воспаления [7, 10, 11]. Известно, что провоспалительные цитокины и активные формы кислорода вызывают активацию перисинусоидальных клеток печени Ито с последующей их дифференцировкой в α-SMA+ миофибробласты [12]. После введения в течение 6 нед тетрахлорметана количество α-SMA+ клеток увеличилось в 24 раза по сравнению с интактными животными (рис. 2, рис. 3, а).

Миофибробласты (α-SMA+ клетки) при фиброзе печени ответственны за чрезмерную выработку компонентов соединительной ткани, что приводит к изменению состава и объёма внеклеточного матрикса [12]. При анализе площади области, окрашенной на соединительную ткань, было выявлено значительное увеличение данного показателя по сравнению с группой интактных животных (рис. 2, рис. 3, б).

При оценке гистологической картины (табл.) в группе животных, получавших тетрахлорметан, подтверждено развитие фиброза печени (3-я стадия по шкале METAVIR). У лабораторных животных, получавших персиковое масло, не выявлено значимых изменений количества α-SMA+ клеток и площади соединительной ткани по сравнению с группой интактных животных. При анализе по шкале METAVIR гистологическая картина соответствовала нулевой стадии фиброза печени (табл.).

Известно, что модель тетрахлорметан-индуцированного фиброза печени у мышей обратима при прекращении действия этиологического фактора [14]. По результатам группы сравнения (без введения фукоксантина), было установлено спонтанное снижение числа α-SMA+ клеток (на 30,97%) и снижение площади занимаемой соединительной тканью на 39,52% по сравнению с животными опытной группы (рис. 3 в, г). При оценке гистологической картины по шкале METAVIR количество животных, имеющих 3-ю стадию фиброза печени, снизилось на 20% (табл.).

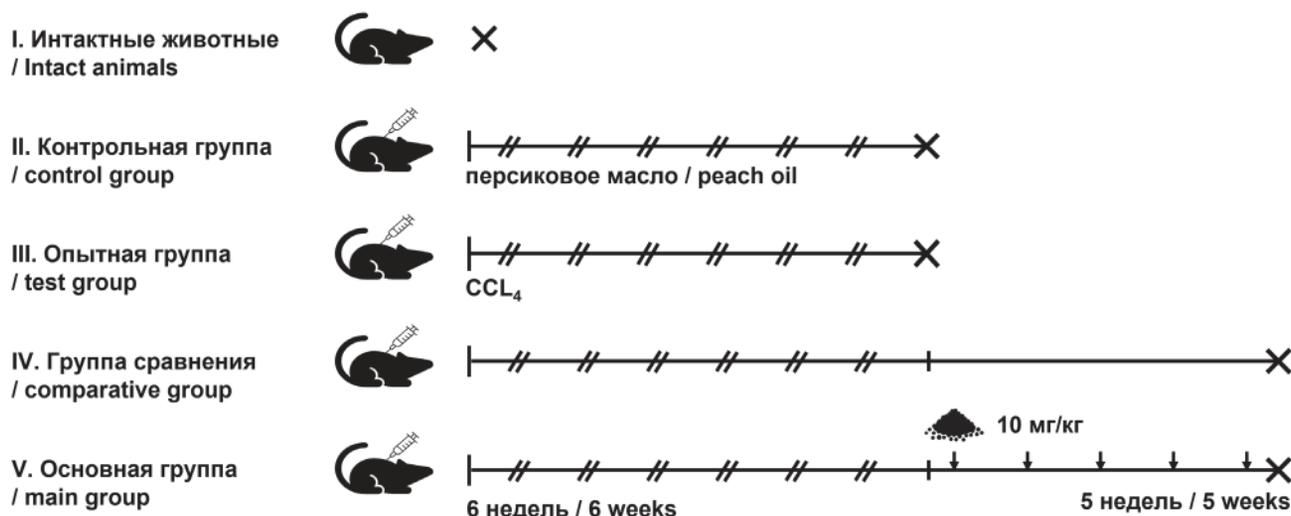


Рис. 1. Дизайн исследования. Распределение лабораторных животных по группам.

Fig. 1. Design of the study. Distribution of laboratory animals into groups.

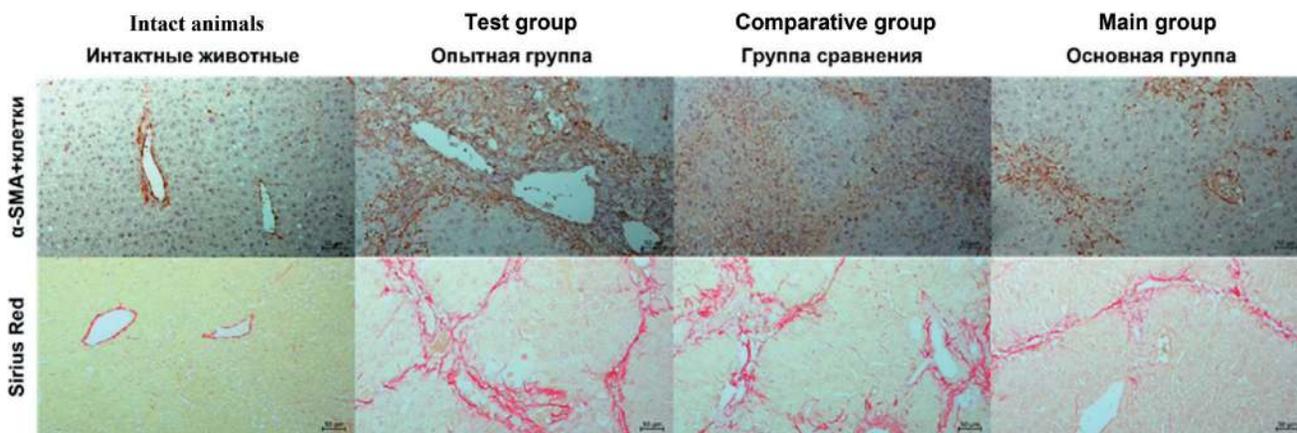
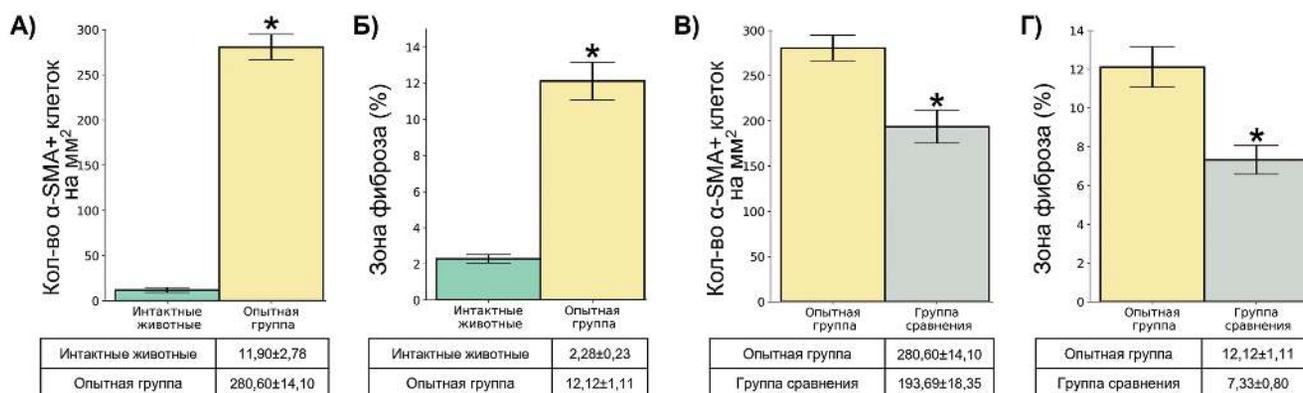


Рис. 2. Окраска гистологических препаратов печени на α-SMA+ клетки и на соединительную ткань (Sirius red).

Fig. 2. Histological staining of hepatic preparations for α-SMA+ cells and connective tissue (Sirius red).



* - Наличие достоверных различий в сравниваемых группах животных

Рис. 3. Содержание α-SMA положительных клеток и соединительной ткани при CCl₄ моделированом фиброзе печени. * – статистически значимые различия между сравниваемыми группами.

Fig. 3. Contents of α-SMA positive cells and connective tissue after modeling hepatic fibrosis. * – statistically significant differences in the compared groups of laboratory animals.

В ранее проведенных исследованиях на культурах клеток печени Ито было установлено, что фукоксантин обладает антифибротическим действием через ингибирование канонического пути трансформирующего фактора роста-β [3].

Трансформирующий фактор роста-β (TGF-β) представляет собой многофункциональный регуляторный фактор роста, участвующий в различных физиологических процессах, в том числе в дифференцировке, пролиферации, миграции клеток и апоптозе. В то же время TGF-β может играть важную роль в развитии различных патологических процессов. Установлена его роль при онкологических и аутоиммунных заболеваниях, а также при фиброзе различных органов.

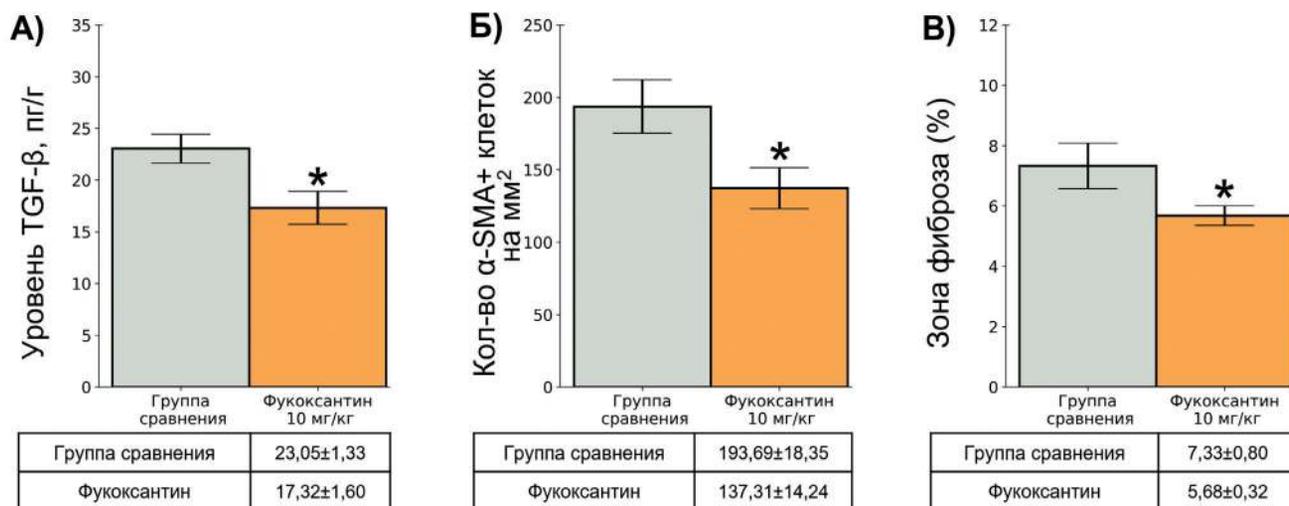
Трансформирующий фактор роста-β является ключевым профиброгенным медиатором в развитии фиброза печени, благодаря своей способности активировать перисинусоидальные клетки печени Ито в миофибробласты. Своё действие TGF-β реализует через канонический и неканонические (PI3K/Akt/Nrf2 и MAPK и др.) пути [2, 13, 14].

В нашем исследовании через 5 нед после моделирования фиброза печени уровень TGF-β снизился на 24,86% по сравнению с группой, не получавшей лечения (рис. 4, а).

Блокирование канонического пути TGF-β приводит к ингибированию активации перисинусоидальных клеток печени Ито в α-SMA+ миофибробласты

Оценка выраженности фиброза по шкале METAVIR
Assessment of fibrosis severity according to the METAVIR scale

Группа / Group	Stage 0	I	II	III	IV
Интактные животные Intact animals	10	0	0	0	0
Группа контроля Control group	10	0	0	0	0
Опытная группа Test group	0	0	0	10	0
Группа сравнения Comparative group	0	0	2	8	0
Основная группа Main group	0	0	6	4	Н\



*** - Наличие достоверных различий в сравниваемых группах животных**

Рис. 4. Уровень TGF-β, количество α-SMA+ клеток и содержание соединительной ткани после введения фукоксантина на фоне фиброза печени.

Fig. 4. TGF-β level, α-SMA+ cell number and connective tissue content after fucoxanthin administration in the background of hepatic fibrosis.

* -- the presence of significant differences in the compared groups of laboratory animals.

[2]. В проведенных исследованиях количество α-SMA+ клеток снизилось на 29,1% (рис. 4, б).

Ингибирование активации клеток печени Ито приводит к снижению выработки избыточного количества компонентов соединительной ткани [12]. По результатам, полученным в исследовании установлено, что зона фиброза сократилась на 22,58% по сравнению с группой, не получавшей фукоксантин (рис. 4, в).

Выявленное снижение площади соединительной ткани в печени нашло своё отражение в изменении степени выраженности фиброза печени по шкале METAVIR. Количество животных с третьей стадией фиброза после введения фукоксантина уменьшилось на 50% (табл.).

Известно, что равновесное состояние между ферментами – матриксными металлопротеиназами и их ингибиторами – позволяет поддерживать физиологическое состояние внеклеточного матрикса. Избыточная выработка миофибробластами тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1 приводит к ингибированию металлопротеиназ, способных разрушать внеклеточный матрикс и к смещению равновесия между ферментами в сторону фиброгенеза [15–17].

В настоящем исследовании отмечено, что уровень тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1 снизился на 17,36% относительно группы сравнения (рис. 5, а). При этом не было установлено изменения

уровня матриксной металлопротеиназы-13 — основного представителя семейства коллагеназ у мышей, способных разрушать фибриллярные коллагены (рис. 5, 6).

Интересно, что при исследовании механизмов действия фукоксантина на линиях клеток глиобластомы человека U87 и U251 было обнаружено ингибирующее действие данного препарата на активность матриксных металлопротеиназ из семейства желатиназ (ММР-2 и ММР-9), реализующееся через ингибирование семейства р38-митоген-активируемых протеинкиназ (р38-МАРК) [18]. Однако, в нашем исследовании статистически значимых различий по уровню активности матриксной металлопротеиназы-9 выявлено не было (рис. 5).

Обсуждение

В настоящем исследовании было впервые выявлено антифибротическое действие фукоксантина в дозе 10 мг/кг при фиброзе печени.

Известно, что в экспериментальной модели тетрахлорметан-индуцированного фиброза печени введение CCl_4 приводит к повреждению гепатоцитов, образованию активных форм кислорода (АФК), выделению провоспалительных цитокинов, факторов роста [7, 10, 11].

Наиболее значимым профиброгенным фактором роста является TGF- β . Обладая широким спектром фи-

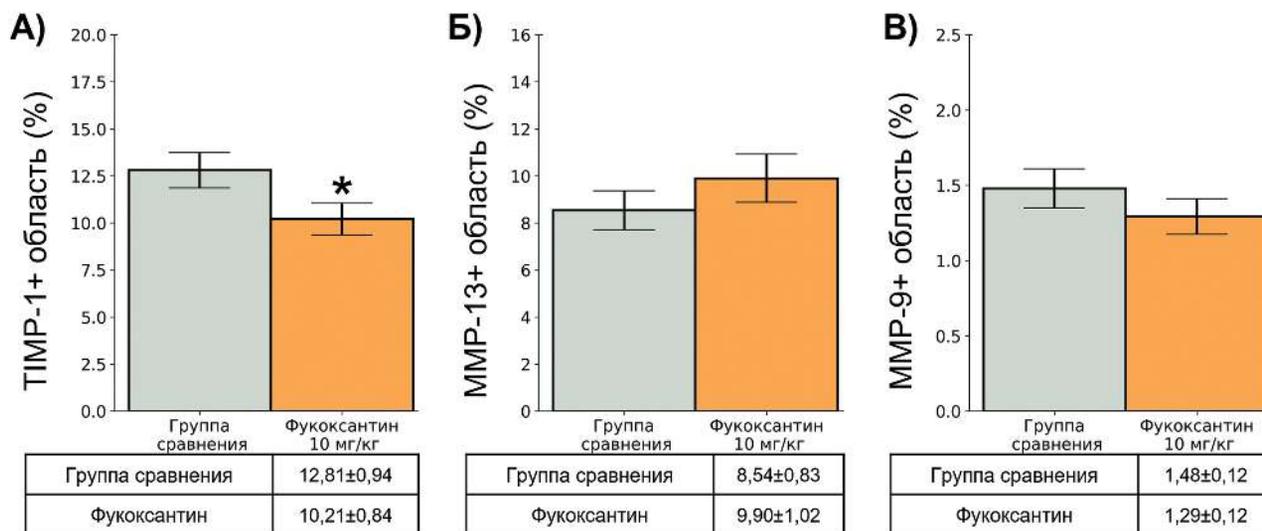
зиологических функций в организме человека, трансформирующий фактор роста- β играет важную роль в развитии различных заболеваний, в том числе фиброза печени [2, 13, 14]. В ранее опубликованном исследовании авторы на культуре клеток печени Ито установили, что фукоксантин способен блокировать канонический сигнальный путь TGF- β [3].

В нашем исследовании установлено, что фукоксантин снижает уровень избыточно выделяемого трансформирующего фактора роста- β .

Повреждение гепатоцитов с последующим выделением факторов роста, провоспалительных цитокинов и АФК приводит к активации и дифференцировке перисинусоидальных клеток печени Ито в миофибробласты [10, 12].

Наши результаты свидетельствуют о том, что ингибирование TGF- β приводит к снижению количества активированных миофибробластов в печени.

В современной концепции фиброза печени миофибробласты играют основную роль, так, они ответственны за синтез избыточного количества компонентов соединительной ткани, TIMP-1 и TGF- β [12]. В настоящем исследовании установлено снижение уровня этих показателей. Результаты гистологических исследований, в нашем эксперименте, также указывают на эффективность применения фукоксантина.



* - Наличие достоверных различий в сравниваемых группах животных

Рис. 5. Уровень матриксных металлопротеиназ-9 и -13, тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1 после введения фукоксантина на фоне фиброза печени.

Fig. 5. The level of matrix metalloproteinases-9 and -13, a tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 after administration of fucoxanthin on the background of hepatic fibrosis; * – the presence of statistically significant differences in the compared groups of laboratory animals.

Несмотря на ранее опубликованные данные, свидетельствующие о том, что применение фукоксантина на линиях клеток глиобластомы человека U87 и U251 приводило к ингибированию MMP-9, в нашем исследовании мы не обнаружили влияния фукоксантина на уровни экспрессии матриксных ферментов.

Заключение

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о перспективности использования фукоксантина для лечения фиброза печени, реализующееся через воздействие на основные звенья патогенеза фиброза печени.

Литература

(п.п. 1-7; 10-18 см. References)

8. Гребнев Д.Ю., Слаутин В.Н., Маклакова И.Ю., Береснева О.Ю., Конышев К.Ю. Механизмы антифибротического действия плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Электронный ресурс. *Вестник уральской медицинской академической науки*. 2022; 19(4): 355–64. DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-4-355-364
9. Базарный В.В., Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Юсупова В.Ч., Петрунина Е.М. К вопросу о клеточной регуляции регенерации печени. *Вестник уральской медицинской академической науки*. 2019; 16(3): 357–64. DOI: 10.22138/2500-0918-2019-16-3-357-364

References

1. Zanetto A., Shalaby S., Gambato M., et al. New indications for liver transplantation. *J. Clin. Med.* 2021; Vol. 10, DOI: 10.3390/jcm10173867
2. Ong C.H., Tham C.L., Harith H.H., Firdaus N., Israf D.A. TGF- β -induced fibrosis: A review on the underlying mechanism and potential therapeutic strategies. *Eur. J. Pharmacol.* 2021; 911: 174510. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174510
3. Kim M.B., Bae M., Hu S., et al. Fucoxanthin exerts anti-fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019; 513: 657–62. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.04.052
4. Bae M., Kim M.B., Park Y.K., Lee J.Y. Health benefits of fucoxanthin in the prevention of chronic diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 2020; 1865: 158618. DOI: 10.1016/j.bbalip.2020.158618
5. Liu M., Li W., Chen Y., Wan X., Wang J. Fucoxanthin: A promising compound for human inflammation-related diseases. *Life Sci.* 2020; 255. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117850

Сведения об авторах:

Слаутин Василий Николаевич, аспирант, каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России; мл. науч. сотр., ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора, e-mail: vas-slautin@yandex.ru;

Гребнев Дмитрий Юрьевич, доктор мед. наук, доцент, зав. каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: dr-grebnev77@mail.ru;

Маклакова Ирина Юрьевна, доктор мед. наук, доцент, зав. каф. нормальной физиологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: Makliu@mail.ru;

Базарный Владимир Викторович, доктор мед. наук, проф., гл. науч. сотр. ЦНИЛ ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: vlad-bazarny@yandex.ru;

Валамина Ирина Евгеньевна, канд. мед. наук, доцент каф. патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, e-mail: ivalamina@mail.ru

6. Yang G., Li Q., Peng J., et al. Fucoxanthin regulates Nrf2 signaling to decrease oxidative stress and improves renal fibrosis depending on Sirt1 in HG-induced GMCs and STZ-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2021; 913: 174629. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174629
7. Faccioli L.A.P., Dias M.L., Paranhos B.A., dos Santos Goldenberg R.C. Liver cirrhosis: An overview of experimental models in rodents. *Life Sci.* 2022; 301: 120615. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120615
8. Grebnev D.Ju., Slautin V.N., Maklakova I.Ju., Beresneva O.Y., Konyshev K.Y. Mechanisms of antifibrotic action of placental multipotent mesenchymal stromal cells. [Online]. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2022; 19(4): 355–64. (In Russian). DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-4-355-364
9. Bazarniy V.V., Maklakova I.Yu., Grebnev D.Yu., Yusupova V.Ch., Petrunina E.M. About Cellular Regulation of Liver Regeneration. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2019; 16(3): 357–64. (In Russian). DOI: 10.22138/2500-0918-2019-16-3-357-364
10. Xue L., Li X., Zhu X., et al. Carbon tetrachloride exposure induces ovarian damage through oxidative stress and inflammatory mediated ovarian fibrosis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2022; 242: 113859. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2022.113859
11. Scholten D., Trebicka J., Liedtke C., Weiskirchen R. The carbon tetrachloride model in mice. *Lab. Anim.* 2015; 49: 4–11. DOI: 10.1177/0023677215571192
12. Baghaei K., Mazhari S., Tokhanbigli S., et al. Therapeutic potential of targeting regulatory mechanisms of hepatic stellate cell activation in liver fibrosis. *Drug Discov.* 2022; 27: 1044–61. DOI: 10.1016/j.drudis.2021.12.012
13. Gough N.R., Xiang X., Mishra L. TGF- β Signaling in Liver, Pancreas, and Gastrointestinal Diseases and Cancer. *Gastroenterology* 2021; 161: 434–52.e15. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.04.064
14. Hu H.H., Chen D.Q., Wang Y.N., et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis. *Chem. Biol. Interact.* 2018; 292: 76–83. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.07.008
15. Duarte S., Baber J., Fujii T., Coito A.J. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol.* 2015; Vol. 44–46: 147–56. DOI: 10.1016/j.matbio.2015.01.004
16. Mott J.D., Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004; 16: 558–64. DOI: 10.1016/j.cob.2004.07.010
17. Rohani M.G., Parks W.C. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biol.* 2015; Vol. 44–46: 113–21. DOI: 10.1016/j.matbio.2015.03.002
18. Liu Y., Zheng J., Zhang Y., et al. Fucoxanthin Activates Apoptosis via Inhibition of PI3K/Akt/mTOR Pathway and Suppresses Invasion and Migration by Restriction of p38-MMP-2/9 Pathway in Human Glioblastoma Cells. *Neurochem. Res.* 2016; 41: 2728–51. DOI: 10.1007/s11064-016-1989-7

Обзоры

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616.155.2

**Измажера Н.В., Попов А.А., Антропова И.П., Кадников Л.И.,
Испавский В.Е., Шамбатов М.А., Браженко Г.Г., Салов Д.В.**

Роль полиморфизма гена *T1565C*, кодирующего интегрин бета-3 в развитии тромботических событий и его влияние на эффективность антитромбоцитарной терапии

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России,
620028, Екатеринбург, Россия, ул. Репина, д. 3

В обзоре анализируются современные представления о структурно-функциональных особенностях интегринов у человека; исследования связи между полиморфизмом гена *T1565C*, кодирующего интегрин бета-3 (ITGβ3), тромботических явлений и эффективность применяемых антитромбоцитарных препаратов; рассмотрена целесообразность исследования на наличие данного полиморфизма. Анализ проведен на основе публикаций, представленных в базах данных и web-ресурсах: MEDLINE, PubMed, Google Scholar, Cyberleninka, электронной библиотеке eLibrary, охватывающих временной период с 1989 по 2022 г. Критериями включения в обзор являлись статьи на русском и английском языках, результаты когортных и рандомизированных исследований, мета-анализов, систематические обзоры исследуемой проблемы, а также описания клинических случаев. Критериями исключения из выборки послужили исследования с отсутствием четко сформулированных выводов или наличием противоречивых результатов.

Ключевые слова: интегрины; тромбоциты; агрегация; *T1565*; интегрин бета-3, ITGβ3; ацетилсалициловая кислота; клопидогрел; двойная антитромбоцитарная терапия

Для цитирования: Измажера Н.В., Попов А.А., Антропова И.П., Кадников Л.И., Испавский В.Е., Шамбатов М.А., Браженко Г.Г., Салов Д.В. Роль полиморфизма гена *T1565C*, кодирующего интегрин бета-3 в развитии тромботических событий и его влияние на эффективность антитромбоцитарной терапии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(2): 94-105.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.94-105

Участие авторов: Измажера Н.В., Попов А.А., Антропова И.П. – концепция обзора, отбор публикаций, критический пересмотр и редактирование текста, обсуждение результатов, написание статьи, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; Кадников Л.И. – концепция обзора, отбор публикаций, обзор публикаций, критический пересмотр и редактирование текста, обсуждение результатов, написание статьи, оформление рукописи для публикации; Испавский В.Е., Шамбатов М.А. – критический пересмотр и редактирование текста, обсуждение результатов, написание статьи; Браженко Г.Г., Салов Д.В. – обзор публикаций, сбор материала, анализ и систематизация данных литературы, написание статьи, обсуждение результатов. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Измажера Надежда Владимировна, e-mail: nadezhda_izm@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 07.03.2023.

Принята к печати 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Izmozherova N.V., Popov A.A., Antropova I.P., Kadnikov L.I., Ispavsky V.E., Shambatov M.A., Brazhenko G.G., Salov D.V.

The role of the *T1565C* gene polymorphism encoding integrin beta 3 in the development of thrombotic events and its influence on the efficiency of anti-platelet therapy

Ural State Medical University of Ministry of Public Health of the Russian Federation,
3 Repina str., Yekaterinburg, 620028, Russian Federation

This review describes the main modern provisions on the structural and functional features of integrins in humans; studies of the relationship between polymorphism of the *T1565C* gene encoding integrin beta 3 (ITGβ3), thrombotic events and the effectiveness of antiplatelet drugs used; the expediency of research for the presence of this polymorphism is considered. Data analysis was carried out on the basis of publications presented in databases and web resources: MEDLINE, PubMed, Google Scholar, Cyberleninka, eLibrary, covering the time period from 1989 to 2022. The inclusion criteria for the review were articles in Russian and English, results of cohort and randomized studies, meta-analyses, systematic reviews of the problem under study, as well as descriptions of clinical cases. Exclusion criteria were studies with no clear-cut conclusions or conflicting results.

Keywords: integrins; platelets; aggregation; *T1565C*; beta-3 integrin; ITGβ3; acetylsalicylic acid; clopidogrel; dual antiplatelet therapy

For citation: Izmozherova N.V., Popov A.A., Antropova I.P., Kadnikov L.I., Ispavsky V.E., Shambatov M.A., Brazhenko G.G., Salov D.V. The role of the *T1565C* gene polymorphism encoding integrin beta 3 in the development of thrombotic events and its influence on the efficiency of anti-platelet therapy. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(2): 94-105. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.94-105

Author's contribution: Izmozherova N.V., Popov A.A., Antropova I.P. – the concept of review, selection of publications, critical revision and editing of the text, discussion of the results, writing an article, approval of the final version of the manuscript for publication; Kadnikov L.I. – the concept of review, selection of publications, review of publications, critical revision and editing of the text, discussion of the results, writing an article, design of a manuscript for publication; Ispavsky V.E., Shambatov M.A. – critical revision and editing of the text, discussion of the results, writing an article; Brazhenko G.G., Salov D.V. – review of publications, collection of material, analysis and systematization of literature data, writing an article, discussion of results. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Nadezhda V. Izmozherova*, M.D., Head, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology; 3 Repina str., 620028, Yekaterinburg, Russian Federation, e-mail: nadezhda_izm@mail.ru.

Information about authors:

Izmozherova N.V., <https://orcid.org/0000-0001-7826-9657>

Popov A.A., <https://orcid.org/0000-0001-6216-2468>

Antropova I.P., <https://orcid.org/0000-0002-9957-2505>

Kadnikov L.I., <https://orcid.org/0000-0002-2623-2657>

Ispavsky V.E., <https://orcid.org/0000-0001-8152-6474>

Shambatov M.A., <https://orcid.org/0000-0001-7312-415X>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 07.03.2023

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

Введение

Несмотря на широкое внедрение в последние годы ряда высокотехнологичных методов лечения, смертность и инвалидизация вследствие артериальных тромбозов неприемлемо часто осложняет течение заболеваний сердечно-сосудистой системы [1]. В развитии и течении тромботических осложнений сердечно-сосудистых заболеваний важную роль могут играть генетически детерминированные особенности тромбообразования. Комплексное использование в диагностике результатов генетических исследований и «традиционных» факторов риска развития патологических процессов в органах сердечно-сосудистой системы (таба-

коурение, артериальная гипертензия, сахарный диабет, дис- и гиперлипидемия, ожирение, атеросклероз, фибрилляция предсердий, стеноз сонной артерии и её ветвей, малоподвижный образ жизни, старение, принадлежность у мужскому полу и целый ряд других) позволяют повысить эффективность выявления рисков развития сердечно-сосудистых заболеваний. Сочетание множественных факторов риска является предпосылкой для развития патологических состояний с синергическими взаимодействиями «ген–ген» и «ген–среда», повышая риск в степени, значительно превышающей алгебраическую сумму влияния отдельных факторов риска [2].

Однонуклеотидный полиморфизм (single-nucleotide polymorphism — SNP) представляет собой замену одного нуклеотида в некотором положении в геноме в зародышевой линии. SNP определяют различия в восприимчивости носителя минорного аллеля к широкому спектру заболеваний. Тяжесть течения заболевания, скорость развития осложнений, направленность и выраженность ответа на терапевтическое вмешательство, также являются проявлениями комплекса генетических вариаций. Полиморфный маркер rs5918 T>C в гене *ITGB3*, кодирующий β субъединицу гликопротеина $\alpha\text{IIb}\beta 3$ представляет собой однонуклеотидную («Т» на «С») замену в хромосоме 17 в позиции 47,283,364 (chr17:47283364; GRCh38.p13) [3–5]. Также, данный аллельный вариант гена *ITGB3* ассоциирован с изменением функциональных особенностей тромбоцитов и имеет связь как с устойчивостью к коррекции антитромбоцитарными препаратами, так и с увеличением риска сердечно-сосудистых событий.

Структура интегринов. Интегрины — семейство родственных трансмембранных гетеродимерных (состоящих из комплексов α и β субъединиц) рецепторов. Каждая субъединица пронизывает цитоплазматическую мембрану и подразделяется на большой внеклеточный домен (около 1600 молекул аминокислот) и 2 небольших цитоплазматических домена (порядка 20–50 молекул аминокислот каждый). Основной функцией интегринов является связывание клетки с веществами внеклеточного матрикса (молекулы коллагена, фибронектина, ламинина и др.). Адгезия рассматривается в качестве основной функции интегринов. Кроме регуляции адгезии клеток, интегрины при связывании лиганда с рецептором передают сигнал через цитоплазматическую мембрану к цитоскелету и индуцируют сигнальные пути внутри клетки по схеме outside-in (снаружи внутрь). В то же время по механизму аллостерического равновесия интегрины обеспечивают передачу внутриклеточных сигналов по схеме inside-out (изнутри наружу) для обеспечения изменений конформации рецептора, динамически регулирующих функциональные способности интегринов [6–8]. Выступая в качестве «механических передатчиков» от наружного клеточного контакта к цитоскелету внутри клетки, подавляющее большинство интегринов (за исключением $\alpha\beta 4$) связано с системой актиновых микрофиламентов, на которую интегрины оказывают регулирующее и модулирующее действие. Особые субмембранные белки, связывающие цитоплазматический домен интегринов с цитоскелетом клетки, многообразны, их взаимодействия с доме-

ном рецептора в цитоплазме и друг с другом представляются довольно сложными [6, 7].

Интегрины являются рецепторами клеточной поверхности, играющими решающую роль, как в адгезии, так и в активации и агрегации тромбоцитов. Рецептор фибриногена представляет собой образующийся на мембране тромбоцита комплекс интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$, составленного из субъединицы интегрин альфа-IIb (αIIb , CD41, ITGaIIb) и субъединицы интегрин бета-3 ($\beta 3$, CD61, ITG $\beta 3$). Субъединица интегрин альфа-IIb известна так же, как мембранный гликопротеин (platelet glycoprotein) GP IIb, а субъединица интегрин бета-3 — как мембранный гликопротеин GP IIIa [7]. Комплекс интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (GPIIb/IIIa) имеет ключевое значение для агрегации тромбоцитов посредством связывания растворимого фибриногена. Последний способен связываться с $\alpha\text{IIb}\beta 3$ и на поверхности мегакариоцитов, стимулируя образование и высвобождение тромбоцитов [9]. Субъединицы αIIb и $\beta 3$ кодируются генами *ITGA2b* и *ITGB3* соответственно [10].

Основной тромбоцитарный интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ обнаруживается в большом количестве на мембранах покоящихся тромбоцитов в неактивированном состоянии. При стимуляции тромбоцитов интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ переходит в активную конформационную форму за счёт сигнализации «inside-out», идущей от ядра клетки к наружной мембране. В конформации, обеспечивающей активное состояние, интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ может связывать собственный основной лиганд фибриноген, фактор фон Виллебранда и фибронектин, что приводит к сильной адгезии тромбоцитов к сосудистой стенке и их агрегации друг с другом [6, 8].

Значимость интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ для процесса гемостаза весьма существенна. Однонуклеотидные полиморфизмы в генах, кодирующих интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (например, при тромбастении Гланцмана), приводят к клинически значимым нарушениям в работе свертывающей системы крови. Вещества-антагонисты, препятствующие связыванию интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ с фибриногеном, антитела к интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ или низкомолекулярные соединения, идентифицирующие данный интегрин, являются антитромботическими препаратами высокой эффективности. Активация интегрин $\alpha\text{IIb}\beta 3$ может инициироваться в результате действия эpineфрина, тромбина, сигнализации через активацию фактора фон Виллебранда, АДФ или коллагеном путём активации гликопротеина VI и интегрин $\alpha 2\beta 1$ [11, 12].

Находящиеся на тромбоцитарной мембране интегрины являются основной группой рецепторов к внеклеточному матриксу, ответственных за адгезию клеток. Интегрины функционально и структурно связаны

с актиновыми и другими белковыми цитоскелетными молекулами, например, такими как талин и винкулин [8].

Активация интегринов осуществляется после серии последовательных «inside-out» сигнальных событий, что в результате обуславливает связывание двух основных внутриклеточных активаторов интегринов (талина и киндлина) с их цитоплазматическим доменом. Индукция связывания талина с субъединицей цитоплазматического домена интегрин β играет важную роль в активации рецептора $\alpha\text{IIb}\beta_3$ и тромбоцита в целом [13]. Киндлины играют важную роль в поддержке активации интегрин, сотрудничая с талином [14]. Основной функциональной изоформой внутри тромбоцитов является киндлин-3. Данная изоформа необходима для интегрин-регулируемых ответов, осуществляемых за счёт связывания киндлина-3 с цитоплазматической частью β -цепи, необходимой для модуляции аффинности интегрин. Доказано, что отсутствие киндлина-3 ведёт к повышению риска кровотечений и иммунологическим нарушениям у человека [15].

В молекуле интегрин цитоплазматические домены α - и β -субъединиц являются наиболее значимыми участниками процесса проведения сигнала при адгезии тромбоцитов. Чаще всего белки цитоплазмы взаимодействуют с β -субъединицей интегрин. В этой связи именно β -субъединицу рассматривают в качестве наиболее значимого участника фокальной адгезии, организации цитоскелета и внутриклеточной сигнализации, проходящих при непосредственном участии интегрин. Рецепторы β_1 , β_2 и β_3 -субъединиц интегрин, в которых отсутствуют цитоплазматические домены, менее активны в связывании лигандов и обладают сниженной сигнальной функцией [15].

Интегрины опосредуют сигнализацию по одному из основных механизмов сигнальных систем клетки – через каскадные реакции фосфорилирования, катализаторами которых являются внутриклеточные фосфокиназы. Активация тромбоцита стимулирует кластеризацию интегринных рецепторов, что позволяет повысить плотность связей и эффективность адгезии. Процесс кластеризации интегрин приводит к формированию фокальной адгезии, включающей белки цитоскелета, а также приводит к повышению концентрации некоторых фосфокиназ в образовавшихся структурах. Активность фосфокиназ обеспечивает старт поочередного фосфорилирования и осуществления специфических функций внутриклеточных белков. Некоторые подвергающиеся процессу фосфорилирования, в результате запуска такого каскадного сигнального механизма, белки (к примеру, тензин и паксиллин)

напрямую вовлечены в процесс фокальной адгезии. Более того, интегрины инициируют фосфорилирование протеинкиназ, расположенных в зонах фокальной адгезии и считающихся необходимыми для их активации (Abl, FAK, Src и др.) [8].

Таким образом, имеется основание считать, что адгезия напрямую связана с тромбоцитарным цитоскелетом и при отсутствии подобной связи белков адгезии и цитоскелета принципиально представляется бы невозможным процесс прикрепления тромбоцитов к сосудистой стенке в условиях потока крови, так как механическая прочность подобного контакта была бы очень низкой.

Полиморфизм гена, кодирующего ITGB3 . Интегрин β_3 или бета-субъединица комплекса $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) – кодируется геном *ITGB3* и представляет собой мембранный белок, обнаруженный в различных тканях, участвующий в опосредованной поверхностью клетки сигнализации и клеточной адгезии. Интегрин $\alpha\text{IIb}\beta_3$ является рецептором для протромбина, фибриногена, плазминогена, фибронектина, витронектина и тромбоспондина. Интегрин $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (и другие интегрины) распознаёт специфическую последовательность аминокислот Arg-Gly-Asp (аргинилглициласпарагиновая кислота или RGD-последовательность – трипептид, который состоит из L-аргинина, глицина и L-аспарагиновой кислоты) в большом количестве разнообразных молекул-лигандов. Кроме того, интегрин $\alpha\text{IIb}\beta_3$ способен распознавать специфическую последовательность в гамма-цепи молекулы фибриногена (-H-H-L-G-G-G-A-K-Q-A-G-D-V-) [5–7]. За кодирование интегрин β_3 отвечает ген *ITGB3*. Экзоны и интроны гена *ITGB3* содержат большое количество полиморфных областей, одна из которых, как было установлено, связана с развитием патологических процессов сердечно-сосудистой системы. Полиморфизм *T1565C* обусловлен заменой в 1565 положении тимина (T) цитозина (C). Распространённость минорного аллеля *C ITGB3*: 1565 T>C (Leu59Pro) в европейской популяции – от 8 до 15% [16]. Тромбоциты с большей вероятностью склонны к агрегации у носителей минорного аллеля, что теоретически может являться фактором повышенного риска образования тромбов (и развитию тромбоэмболии), ведущего к увеличению вероятности развития сердечно-сосудистых патологических состояний [3, 4].

Носители полиморфизма Leu59Pro, по сравнению с гомозиготами по основным аллелям, имеют большой процент тромбоцитов, экспрессирующих P-селектин – гликопротеин тромбоцитов, свидетельствующий о статусе активации, что указывает на повышенный риск разрыва атеросклеротической бляшки [10].

Ген человека, кодирующий гликопротеин IIIa, существует в европейской популяции в 8 вариантах, которые различаются последовательностью аминокислот. Чаще всего, он присутствует в виде – Т и С [6]. Полиморфизм гена гликопротеина IIIa вызван точечной заменой нуклеотида (Leu59Pro), что приводит к замене алифатической аминокислоты лейцина (Leu) на гетероциклическую аминокислоту пролин (Pro) в положении 59 и к изменению конформации GPIIb/IIIa. Это, в свою очередь, имеет ассоциацию с повышенной агрегацией тромбоцитов и пролиферацией гладкомышечных клеток (ГМК) сосудов. Более сильная связь тромбоцита с фибриногеном за счет бета-субъединицы рецептора фибриногена опосредована наличием аллеля С гликопротеина IIIa [17].

Субъединица GPIIb/IIIa полиморфна, с одиночными аминокислотными заменами, приводящими к ряду стабильных аллельных вариантов [18]. Система диаллельных антигенов TC является одной из наиболее изученных из-за ее участия в аллоиммунитете и является предметом продолжающихся споров, связанных с ее возможной ассоциацией с сердечно-сосудистыми заболеваниями и устойчивостью к антитромбоцитарным агентам [19].

Сообщалось, что данный однонуклеотидный полиморфизм является фактором риска многих типов заболеваний, таких как инфаркт миокарда [23], ишемическая болезнь сердца, диабет 2 типа, астма [24, 25], многие виды рака, включая рак толстой кишки, неходжкинскую лимфому [26], рак молочной железы [27-29], рак яичников [30], рак почки [31] и гиперплазия

эндометрия [41]. Распространенность аллеля С зависит от этнической принадлежности, с частотой примерно 15 на 100 в кавказских популяциях, снижаясь до 1 на 100 в восточных популяциях [30]. Так, в исследовании пациентов из Бангладеш [31] для оценки терапевтического ответа клопидогрела и ацетилсалициловой кислоты была исследована распространенность полиморфизма TC гена *ITGB3*. Наблюдалось 84,1% гомозиготных (TT), 15,6% гетерозиготных (TC) и только 0,3% мутантных аллеля (CC).

Напротив, в России, у жителей Сибирского региона, была выявлена большая распространенность встречаемости минорного аллеля С гена *ITGB3*. Частота аллеля С у жителей г. Томска соответствовала 14,7%, г. Кемерово – 15,0%, а генотипа CC – 8,8% [32].

Исследование, проведенное в Иране на 132 пациентах, отобранных из 412 пациентов, которые обратились в кардиологические центры больницы Афшар (Йезд, Иран) из-за симптомов инфаркта миокарда в период с 2012 по 2015 год, показало, что аллель Т встречается в 83,9%, а С – в 16,1% случаев [3]. При этом генотипический вариант TT встречается с частотой 74,4%, TC – 18,9%, а CC – 6,7%. Частоты генотипов и аллельных вариантов у пациентов приводятся в таблице.

Было установлено, что тромбоциты, несущие минорный аллель *Leu59Pro* в гене, кодирующем β3-субъединицу интегрина αIIbβ3, характеризуются повышенным риском агрегации и иммуногенными свойствами [38, 39]. Поскольку количество агрегатов тромбоцитов увеличивается у носителей аллеля С с ИБС, интересно определить, связан ли данный полиморфный вариант

Частоты генотипов и аллельных вариантов

Frequencies of genotypes and allelic variants

Исследование Study	Популяция Population	N	Генотип (%) Genotype (%)			Аллель (%) Allele (%)		Платформа генотипирования Genotyping platform
			TT	TC	CC	T	C	
(rs5918 SNP)								
Khatami et al. [3]	Иран Iran	254	74.4	18.9	6.7	83.9	16.1	T-ARMS-ПЦП T-ARMS-PCR
Torabi et al. [33]	Иран Iran	200	70	14	16	77	23	ПЦП-RFLP PCR-RFLP
Nikolajevic-Starcevic et al. [34]	Словения Slovenia	342	47	36.8	16.2	65.5	34.5	ПЦП-RFLP PCR-RFLP
Zhang et al. [35]	Китай China	622	96	4	0	98	2	HRM (high-resolution melting analysis)
Yilmaz et al. [36]	Турция Turkey	184	83.7	13	3.3	90.2	9.8	ПЦП-RFLP PCR-RFLP
Bianconi et al. [37]	Австрия Austria	109	79.8	17.4	2.8	88.5	11.5	ПЦП-RFLP PCR-RFLP

с ИБС. Предыдущие данные об ассоциации генотипа *TC ITGB3* как с артериальным, так и с венозным тромбозом в различных этнических группах [40, 41] противоречивы [42, 43]. Наличие аллеля *C* связано с повышенной аффинностью связывания с фибриногеном, а также с агрегируемостью тромбоцитов в ответ на адреналин, аденозиндифосфат и коллаген *in vitro* [44]. В нескольких исследованиях было высказано предположение, что аллельный вариант *C* вызывает измененную чувствительность к ацетилсалициловой кислоте и повышенную чувствительность к индукторам при агрегации тромбоцитов различными агонистами [45, 46].

В другом исследовании [4] было показано, что полиморфизм rs5918 (*C*) может увеличивать число венозных тромботических событий, причем у лиц женского пола. Так, среди пациенток с тромбозом глубоких вен нижних конечностей (ТГВ) была рассчитана частота встречаемости носительства *CC* и *TC*. Встречаемость минорного генотипа *CC* в общей популяции составила менее 1%. Кроме того, 50%-ная вероятность первого события ТГВ у пациенток, которые были носителями *CC*, была значительно выше по сравнению с контрольной группой, особенно у молодых пациенток. Этот эффект не наблюдался ни у мужчин, ни у пожилых женщин. Эти результаты показывают, что носительство *CC* может быть одним из факторов риска однократного и повторного возникновения ТГВ у женщин в молодом возрасте [4].

Наличие минорного аллеля *C* у пациентов связано с повышенным риском возникновения острого коронарного синдрома (ОКС). Так, в исследовании, проведенном E. Rapp минорный аллель *C* выявлен у 59 из 158 пациентов с ОКС и у 51 из 199 человек без ОКС [47]. Причем, носители аллеля *C* имели значительно более высокий риск развития ОКС даже после коррекции факторов риска.

Помимо того, что наличие аллеля *C ITGB3* связано с риском возникновения инфаркта миокарда (ИМ), особенно в молодом возрасте, существуют исследования, подтверждающие его участие в осложненном течении ишемической болезни сердца (ИБС), при котором ИБС сочетается с артериальной гипертензией и гиперхолестеринемией [17].

Смертность от тромботических осложнений болезней сердечно-сосудистой системы у взрослых является стимулом разработки новых методов лечения для снижения функциональной активности тромбоцитов. Циркулирующие тромбоциты поддерживаются в состоянии покоя и активируются в местах повреждения сосудов с помощью тщательно контролируемых меха-

низмов, тем самым обеспечивая целостность сосудов и не вызывая внутрисосудистого тромбоза. Тромбоциты играют центральную роль в артериальном тромбозе, поэтому процессы активации, адгезии и агрегации тромбоцитов стали логичными целями для разработки антитромботической терапии [18].

Антитромботическая терапия. Антитромботическая терапия является основой лечения ИБС, cerebrovasкулярных болезней (ЦВБ), заболеваний периферических артерий. Одобренными антитромбоцитарными агентами являются ацетилсалициловая кислота; ингибиторы рецепторов гликопротеина IIb/IIIa; антагонисты рецептора P2Y₁₂.

Ацетилсалициловая кислота (АСК) и клопидогрел на сегодняшний день являются наиболее изученными и используемыми антитромбоцитарными препаратами при сердечно-сосудистых заболеваниях в качестве двойной антиагрегантной терапии или монотерапии одним из них.

1. Ацетилсалициловая кислота. Ацетилсалициловая кислота является хорошо известным базовым антитромбоцитарным агентом для лечения и профилактики ИБС. Она необратимо ацетирует остаток серина в положении 529 в простагландинсинтазе тромбоцитов и ингибирует циклооксигеназный канал (ЦОГ), связанный с агрегацией тромбоцитов. Циклооксигеназы-1 и -2 (ЦОГ-1 и ЦОГ-2) катализируют превращение арахидоновой кислоты в простагландин H₂, первый шаг к биосинтезу простаноидов. Следовательно, АСК эффективно снижает выработку простаноидов. Изофермент ЦОГ-1 ингибируется при низких дозах, тогда как ингибирование индуктивного ЦОГ-2 требует более высокой дозы. Клинически АСК широко используется для вторичной профилактики сердечно-сосудистых событий у пациентов с заболеваниями коронарных артерий, периферических сосудов и сосудов головного мозга [48]. Ингибирование ЦОГ-1, осуществляемое ацетилсалициловой кислотой, процесс необратимый. В тромбоцитах почти останавливается синтез тромбоксана A₂, а в эндотелиальных клетках снижается синтез простациклина. Простациклин оказывает сосудорасширяющее действие и ингибирует активность тромбоцитов, поэтому снижение его синтеза эндотелием нежелательно. Однако, в отличие от тромбоцита, эндотелиальная клетка имеет ядро, которое позволяет осуществлять синтез нового ЦОГ-1 на фоне приема препарата. Из-за окончательного ингибирования ЦОГ-1 и отсутствия ядра, снижение продукции тромбоксана A₂ в тромбоците сохраняется на протяжении всей его жизни. В условиях приема АСК дисбаланс между нормальным уровнем простациклина, се-

к্রেतिруемым эндотелиальными клетками, и сниженным уровнем тромбосана A2 в тромбоцитах обладает явным антитромботическим эффектом [16].

Авторами из Китая, был проведен крупный мета-анализ, в результате которого было выбрано 35 клинических исследований и включено 19 025 пациентов с ИБС [30]. В одном из разделов, который включал 16 исследований, были описаны ассоциации между полиморфизмом гена *ITGB3* и резистентностью к ацетилсалициловой кислоте 3077 пациентов. Имеющиеся данные позволили также сравнить 2 метода определения функциональной активности тромбоцитов: оптическую агрегометрию (Light Transmission Aggregometry, LTA, анализируется богатая тромбоцитами плазма) и анализ PFA-100 (анализируется цельная кровь) в пункте оказания медицинской помощи. Анализ подгрупп LTA показал значительную однородность между исследованиями, но не выявил значимой связи между носительством аллеля С и резистентностью к АСК. Анализ подгрупп PFA-100 выявил значительную связь между носительством аллеля С и чувствительностью к АСК, но показал существенную гетерогенность между исследованиями. В другом разделе этого мета-анализа были отобраны 4091 пациента с ИБС для изучения ассоциации между генотипом *TC* и неблагоприятными сердечно-сосудистыми событиями. Анализ показал, что носители *TC* имели аналогичный риск смерти по сравнению с *TT*. В результате обнаружили, что нет существенной связи между генотипом *TC* и резистентностью к АСК или полиморфизмом *TC* и худшими клиническими исходами [30].

Полученные результаты можно объяснить следующим образом. Фактически, ацетилсалициловая кислота уменьшает активацию тромбоцитов путем необратимого ацетилирования серина в положении 529 циклооксигеназы-1 (ЦОГ-1) и тем самым уменьшает образование тромбосана A2 (ТХА2) в тромбоцитах [49]. Таким образом, эффективное блокирование АСК канала ЦОГ-1 будет снижать агрегацию тромбоцитов вследствие меньшего образования тромбосана A2, даже у носителей С, которые имеют повышенную активность рецептора GPIIb/IIIa [30].

У пациентов с ИБС, получающих АСК, лабораторная (определяемая различными методами *in vitro*) резистентность тромбоцитов к препарату ассоциирована с ранней смертью от сердечно-сосудистых катастроф, что объясняется неэффективностью стандартной профилактики. Так, в мета-анализе, включающем в себя 65 исследований с участием 10729 пациентов, было обнаружено, что распространенность лабораторно определенной резистентности к аспирину у паци-

ентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями составила 24,7%, причем женщины подвержены повышенному риску лабораторно определенной резистентности к аспирину по сравнению с мужчинами с отношением шансов 1,16 [50].

В исследовании, проведенном в китайской популяции, в выборку которого входило 450 пожилых людей, пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от их устойчивости к действию ацетилсалициловой кислоты: группа с устойчивостью (AR) ($n=236$) и группа с чувствительностью к ацетилсалициловой кислоте (AS) ($n=214$) [51]. Результаты показали, что в группе AR 224 участника имели генотип *TT*, а 12 - генотип *TC*. Все пациенты в группе AS имели генотип *TT*. Таким образом, между этими двумя группами была существенная разница в распределении генотипов.

В отечественном исследовании не было выявлено статистически значимой ассоциации между реакцией пациентов на АСК и полиморфизмом T1565C гена *ITGB3* [52]. Частоты вариантов *TT* (нормальная агрегационная способность тромбоцитов), *TC* (агрегационная способность тромбоцитов умеренно повышена), *CC* (агрегационная способность тромбоцитов высокая) в выборке лиц, у которых отсутствовал ответ на АСК, составили 66,7%, 29,6% и 3,7%, соответственно, в выборке со сниженной эффективностью АСК — 58,8% и 41,2%, (гомозиготы *CC* отсутствовали), а в выборке с нормальным ответом — 63,9% и 36,1% (гомозиготы *CC* отсутствовали).

2. *Ингибиторы рецепторов P2Y₁₂*. P2Y₁₂ представляет собой рецептор, связанный с G-белком, который связывает аденозиндифосфат (АДФ) и тем самым усиливает устойчивую агрегацию тромбоцитов посредством внутриклеточной активации сигнала и конформационных изменений рецептора GPIIb/IIIa, увеличивая сродство к его основному лиганду, растворимому фибриногену [53]. Доступные в настоящее время ингибиторы P2Y₁₂ включают 2 семейства: тиенопиридины (клопидогрел и прасугрел), и нуклеозид-нуклеотидные производные (тикагрелор и кангрелор).

Клопидогрел, который является пролекарством, перед связыванием с рецептором P2Y₁₂ должен быть превращен в активный метаболит, с помощью ферментной системы цитохрома печени P450 [54]. Клопидогрел был предпочтительным P2Y₁₂ ингибитором в острых условиях в течение многих лет [55]. Он характеризуется отсроченным началом действия, значительной вариабельностью ответа и недостаточной антитромботической активностью у некоторых пациентов, также известной как высокая остаточная реактивность тромбоцитов при лечении [55]. Эти характе-

ристики побудили к разработке более мощных и надежных препаратов, нацеленных на P2Y₁₂ рецептор: еще один тиенопирин — прасугрел проявляет большую биодоступность, более мощный антитромбоцитарный эффект и меньшую межиндивидуальную вариабельность ответа, чем клопидогрел [56]. Кроме того, он превосходил как клопидогрел, так и тикагрелор в снижении ишемических исходов у пациентов с ОКС, проходящих чрескожные коронарные вмешательства (ЧКВ), но не у пациентов с ОКС, находящихся под медицинским наблюдением [55].

В отличие от тиенопиринидинов, нуклеозид–нуклеотидные антагонисты кангрелол и тикагрелол не требуют опосредованной P450 биотрансформации для обратимого связывания с рецептором P2Y₁₂ и ингибирования АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Тикагрелор, подобно прасугрелу, проявляет высокую биодоступность и меньшую вариабельность ответа по сравнению с клопидогрелом [56]. Аналог аденозинтрифосфата (АТФ) кангрелор является единственным внутривенно доступным P2Y₁₂ ингибитором. Он обратимо блокирует рецепторы P2Y₁₂, имеет быстрое начало действия — 2 мин, и короткий период полувыведения — от 3 до 5 мин. Введение кангрелора вместе с АСК одобрено для пациентов с ЧКВ без предварительного лечения ингибиторами P2Y₁₂ [55].

Систематический обзор, включающий 9 исследований, в котором анализировалось влияние полиморфизма *ITGB3* на эффективность антагонистов P2Y₁₂ клопидогрела, определил следующие результаты. В 3 исследованиях, включавших 100 резистентных к клопидогрелу и 212 чувствительных к клопидогрелу пациентов с ишемической болезнью сердца, наблюдалась резистентность к клопидогрелу у субъектов, несущих аллель *C*. Из остальных 6 исследований в одном сообщалось о положительной связи между носительством аллеля *C* и устойчивостью к клопидогрелу, и в 1 сообщалось об отрицательной ассоциации, а в остальных не удалось выявить какой-либо ассоциации [57].

Индивидуальная вариабельность реакции на клопидогрел известна, но ее механизм плохо изучен. J. Dropinski и др. также исследовали данную взаимосвязь [58]. Клопидогрел (75 мг/сут; 2 нед) назначали 48 пациентам с ишемической болезнью сердца. Время кровотечения, образование тромбина в месте микрососудистого повреждения, функция тромбоцитов при высоком сдвиговом усилии при использовании PFA-100 с картриджом АДФ, маркеры активации тромбоцитов (P-селектин и детектируемый антителом PAC-1 сайт связывания фибриногена на комплексе GPIIb/IIIa),

изучались как до, так и после лечения клопидогрелом. Помимо спонтанной активации тромбоцитов определяли активацию, индуцированную 0,02 мкМ и 1 мкМ АДФ. Полиморфизм гликопротеина IIIa оценивали с помощью полимеразной цепной реакции и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Авторы идентифицировали 32 гомозиготы *TT*, 15 гетерозигот *TC* и одну гомозиготу *CC*. В результате исследования была выявлена исходно более высокая активность тромбоцитов у носителей аллеля *C* в сравнении с гомозиготами *TT*. На фоне клопидогреля подавление активности тромбоцитов также было выражено в большей степени у пациентов, имевших *C*. Таким образом, у пациентов с ишемической болезнью сердца антитромботический эффект клопидогреля более выражен у лиц — носителей аллеля *C*, чем у гомозигот *TT* [58].

Исследований, в которых рассматривается эффективность прасугрела или тикагрелора в связи у пациентов с различными аллельными вариантами гена *ITGB3* найдено не было.

3. Антагонисты рецепторов гликопротеина Iib/IIIa. Антагонисты рецепторов гликопротеина IIb/IIIa являются лиганд-миметическими молекулами, которые не дают связываться фибриногену с активированными тромбоцитами и тем самым непосредственно ингибируют агрегацию тромбоцитов [59]. В настоящее время широко известны 3 ингибитора GPIIb/IIIa: тирофибан, абциксимаб и эптифибатид. Абциксимаб представляет собой гуманизированный антигенсвязывающий фрагмент моноклонального антитела мыши. Эптифибатид представляет собой циклический гептапептид, а тирофибан — непептидную малую молекулу — оба имитируют фибриноген-связывающую последовательность в GP IIb/IIIa. Все 3 препарата вводятся внутривенно, и из-за высокого риска кровотечения их клиническое применение ограничено пациентами с ОКС с высокой тромбозной нагрузкой [55].

Рецепторы фибриногена GP IIb/IIIa, количество которых достигает десятков тысяч копий на поверхности каждого тромбоцита, играют ключевую роль в адгезии и агрегации тромбоцитов. Поэтому фармакологическое блокирование данных рецепторов как путем необратимого связывания абциксимаба, так и путем конкурентных малых молекул (тирофибан и эптифибатид) вызывает в последние десятилетия большой интерес [60].

Ингибиторы GP IIb/IIIa, фактически продемонстрировали преимущества в клиническом исходе у пациентов с острым инфарктом миокарда, в сложных плановых процедурах чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ) и нарушениях острого мозгового

кровообращения [61, 62]. Тем не менее, обнаружилось наличие индивидуальных вариаций в ответе на абциксимаб, что может приводить к неблагоприятным клиническим последствиям [63].

Изучение влияния полиморфизма гена *ITGB3* на ингибирование агрегации тромбоцитов после введения ингибиторов Gp IIb/IIIa было проведено у 80 пациентов, перенесших плановую коронарную реваскуляризацию и получавших ингибиторы GpIIb/IIIa (болюсная и эндовенозная инфузия; 40 пациентов с абциксимабом и 40 пациентов с эптифибатином или тирофибаном). Не выявлено влияния полиморфизма гена *ITGB3* на ингибирование агрегации тромбоцитов после введения абциксимаба или малых молекул (тирофибана и эптифибатид). Конкурентные антагонисты рецепторов гликопротеина IIb/IIIa, такие как тирофибан или эптифибатид, обладают сходным эффектом с абциксимабом, но отличаются по фармакокинетике, поскольку их блокирование может быть отменено с увеличением концентрации фибриногена. Вместе с тем исследование показало, что рестеноз стента более часто обнаруживался у носителей аллеля *C* [60]. Работа, проведенная Ernst NM et al, показала, что у носителей данного аллеля более низкий порог агрегации в ответ на адреналин, АДФ и, возможно, другие агонисты, таким образом, тромбогенная среда при острых коронарных ишемических синдромах может усиливаться, при наличии *C* [64].

Причиной того, что исследование [60] не выявило влияния полиморфизма гена *ITGB3* на ингибирование агрегации тромбоцитов абциксимабом, тирофибаном и эптифибатином, возможно, заключается в особенностях транспорта GP IIb-IIIa в клетке. Данный рецептор менее эффективно транспортируется к поверхности мембраны, предпочтительно направляясь во внутренний пул, где он может быть защищен от ингибирования абциксимабом, но доступен для рекрутирования с помощью соответствующего стимула, в частности, тромбина, образующегося во время коронарных вмешательств или при спонтанном разрыве атеросклеротических бляшек [64]. Кроме того, поскольку внутренние рецепторы Gp IIb/IIIa часто связаны с фибриногеном, их экспозиция может привести к образованию тромбоцитов, праймированных связанным фибриногеном и невосприимчивых к ингибированию абциксимабом [65].

4. Двойная антитромбоцитарная терапия. Двойная антитромбоцитарная терапия клопидогрелом и ацетилсалициловой кислотой формирует современный стандарт медицинской помощи при лечении пациентов с ОКС и пациентов после имплантации стента [1].

Несмотря на адекватную двойную антитромбоцитарную терапию, сердечно-сосудистые катастрофы могут происходить у лиц с резистентностью тромбоцитов к терапии ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом, а также с лежащим в их основе генетическим разнообразием.

Исследование V. Arya и соавт. [66] посвящено определению ассоциации между полиморфизмами генов, кодирующих GPIIb/IIIa, а также CYP2C19, CYP3A5 (изоферменты цитохрома P450) и резистентностью тромбоцитов к ацетилсалициловой кислоте и клопидогрелу в когорте пациентов индийской этнической принадлежности. Тестирование функции тромбоцитов методом оптической агрегометрии было проведено у 72 пациентов с ИБС/ОКС, которые были стабильны на двойной антитромбоцитарной терапии (клопидогрел 75 мг и ацетилсалициловая кислота 150 мг). Для определения базовых уровней агрегации исследование проводилось также у 72 пациентов контрольной группы.

Резистентность к клопидогрелу определялась, как понижение агрегации тромбоцитов до менее 10% от исходного уровня в ответ на АДФ 10 мкМ, а частичная реактивность (сниженная чувствительность) - как понижение агрегации до 30% от исходного уровня. На основании этих критериев 1,4% оказались устойчивыми к клопидогрелу, 50% пациентов имели сниженную чувствительность к препарату. Распределение генотипов полиморфизма *T1565C* было следующим: гомозиготный нормальный *TT* -- 73,6%, гетерозиготный *TC* - 23,6% и гомозиготный минорный *CC* - 2,7%. Частоты для аллелей *T* и *C* составили 85,4% и 14,6% соответственно. Была обнаружена ассоциация между минорным гомозиготным генотипом и сниженной чувствительностью к клопидогрелу ($p = 0,03$). Исследование показало, что у пациентов, адекватно отвечающих на терапию и контрольной группой частоты мутантных аллелей всех четырех полиморфизмов гена, кодирующего GPIIb/IIIa, были почти одинаковыми. В то же время среди пациентов со сниженным ответом на терапию, получающих клопидогрел, значительно выше была встречаемость аллеля *C*, что указывает на роль, которую могут играть полиморфизмы генов в неадекватном ответе на терапию. Исследование так же показало, значительную связь между резистентностью к клопидогрелу и генетическими вариантами изофермента CYP2C1 цитохрома P450, участвующего метаболизме данного препарата [66].

В другом исследовании не было выявлено влияния полиморфного маркера rs5918 на ингибирование тромбоцитов клопидогрелом, но наличие данного ал-

лея снижало чувствительность к АСК. Совместное применение клопидогреля с ацетилсалициловой кислотой значительно улучшало исход у пациентов с минорным гомозиготным генотипом и острым коронарным синдромом по сравнению с пациентами, получающими только ацетилсалициловую кислоту, именно за счет клопидогреля, учитывая, что действие АСК на тромбоциты модифицируется однонуклеотидным полиморфизмом гликопротеина IIIa [67].

Заключение

Анализ данных литературы о связи между полиморфизмом маркера T1565C гена *ITGB3* и действием антитромбоцитарных препаратов показал, что ассоциация между полиморфизмом данного гена и резистентностью к антитромбоцитарным лекарственным средствам, является противоречивым и спорным вопросом, требующим дальнейшего изучения.

Литература

(п.п. 1-4; 8-16; 18-28; 30; 31; 33-51; 53-55; 57-67 см. References)

5. Гергесова Е.Е. Функции тромбоцитов, полиморфизм генов *Leu33-Pro GpIIIa*, *C807-T GpIa* и система *AB0* в норме и патологии. *Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии: Материалы V Всероссийской конференции*. 2011: 129-30.
6. Воронина Е.Н., Филипенко М.Л., Сергеевичев Д.С. Мембранные рецепторы: функции и полиморфизм. *Вестник ВОГиС*. 2006; 10(3): 553–64.
7. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. ГЭОТАР-Медиа; 2011. 480 с.
17. Зотова Т. Ю., Мяндина Г. И., Фролов В. А., Комарова А. Г., Зотов А. К. Влияние полиморфизма гена *itgb3* на частоту развития артериальной гипертензии у больных с острым коронарным синдромом. *Клиническая медицина*. 2013; 91(8): 22-4.
29. Серегина П.Е., Тотчиев Г.Ф., Панова Е.А. Прогностическая значимость аллелей *pla1/a2* гена гликопротеида *GPIIb* при гиперпластических процессах эндометрия. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. 2009; (5): 154-61.
32. Гончарова И.А., Бабушкина Н.П., Минайчева Л.И., Маркова В.В., Кулиш Е.В., Салахов Р.Р. и др. Распространенность аллелей полиморфных вариантов *Leu33Pro* и *Leu66Arg* гена *ITGB3* у жителей Сибирского региона. *Генетика*. 2013; 49(8): 1008–12. DOI: 10.7868/S0016675813070059
52. Муслимова Э.Ф., Афанасьев С.А., Реброва Т.Ю., Сергиенко Т.Н., Репин А.Н. Ассоциация полиморфизмов генов *ITGB3*, *P2RY12*, *CYP2C19* с функциональной активностью тромбоцитов у пациентов с ишемической болезнью сердца на фоне двухкомпонентной антиагрегантной терапии. *Терапевтический архив*. 2017; 89(5): 74-8. DOI: 10.17116/terarkh201789574-78
56. Лагута П.С., Панченко Е.П. Место прасугрела среди других ингибиторов *P2Y12*-рецепторов тромбоцитов. *Атеротромбоз*. 2017; (2): 43-52. DOI: 10.21518/2307-1109-2017-2-43-52

References

1. Visseren F.L.J., Mach F., Smulders Y.M., Carballo D., Koskinas K.C., Böck M., et al. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J*. 2021; 42(34): 3227-337. DOI: 10.1093/eurheartj/ehab484
2. Rosendaal F.R. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999; 353(9159): 1167-73. DOI: 10.1016/S0140-6736(98)10266-0
3. Khatami M., Heidari M.M., Soheilyfar S. Common rs5918 (*PIA1/A2*) polymorphism in the *ITGB3* gene and risk of coronary artery disease. *Arch Med Sci Atheroscler Dis*. 2016; 1(1): e9-e15. DOI: 10.5114/amsad.2016.59587
4. Komsa-Penkova R., Golemanov G., Tsankov B., Ivanov P., Beshchev L., Tonchev P. Rs5918/*ITGB3* Polymorphism, Smoking, and BMI as Risk Factors for Early Onset and Recurrence of DVT in Young Women. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2017; 23(6): 585-95. DOI: 10.1177/1076029615624778
5. Gergesova E.E. *Platelet functions, polymorphism of genes Leu33-Pro GPIIb, C807-T GPIa and ABO system in norm and pathology. [Klinicheskaya gemostaziologiya i gemoreologiya v serdechno-sosudistoy khirurgii: Materialy V Vserossiyskoy konferentsii]*. 2011: 129-30. (In Russian)
6. Voronina E.N., Filipenko M.L., Sergeevichev D.S., Pikalov I.V. Platelet membrane glycoprotein receptors: functions and polymorphism. *Vestnik VOGiS*. 2006; 10(3): 553–64. (In Russian)
7. Mazurov A.V. *Physiology and pathology of platelets. [Fiziologiya i patologiya trombocitov]*. GJeOTAR-Media; 2011. (In Russian)
8. Horton E.R., Humphries J.D., James J., Jones M.C., Askari J.A., Humphries M.J. The integrin adhesome network at a glance. *Journal of cell science*. 2016; 129(22): 4159–63. DOI: 10.1242/jcs.192054
9. Larson M.K., Watson S.P. Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin alpha IIb beta3. *Blood*. 2006; 108(5): 1509-14. DOI: 10.1182/blood-2005-11-011957
10. Kucharska-Newton A.M., Monda K.L., Campbell S., Bradshaw P.T., Wagenknecht L.E., Boerwinkle E., et al. Association of the platelet *GPIIb/IIIa* polymorphism with atherosclerotic plaque morphology: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Atherosclerosis*. 2011; 216(1): 151-6. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.038
11. Grainger J.D., Thachil J., Will A.M. How we treat the platelet glycoprotein defects; Glanzmann thrombasthenia and Bernard Soulier syndrome in children and adults. *Br J Haematol*. 2018; 182(5): 621–632. DOI: 10.1111/bjh.15409
12. Iqbal I., Farhan S., Ahmed N. Glanzmann thrombasthenia: A clinicopathological profile. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2016; 26(8): 647-50. PMID: 27539755
13. Lagarrigue F., Paul D.S., Gingras A.R., Valadez A.J., Sun H., Lin J., et al. Talin-1 is the principal platelet Rap1 effector of integrin activation. *Blood*. 2020; 136(10): 1180-90. DOI: 10.1182/blood.2020005348
14. Gao J., Huang M., Lai J., Mao K., Sun P., Cao Z., et al. Kindlin supports platelet integrin $\alpha IIb\beta 3$ activation by interacting with paxillin. *J Cell Sci*. 2017; 130(21): 3764-75. DOI: 10.1242/jcs.205641
15. Heemskerk J.W., Mattheij N.J., Cossemans J.M. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost*. 2013; 11(1): 2-16. DOI: 10.1111/jth.12045
16. Eizayaga F.X., Belon P., Desplat V., Ageujouf O., Doutremepuich C. Effects of Ultra-Low-Dose Aspirin in Thrombosis and Haemorrhage. *Haemopathy*. 2019; 108(3): 158-68. DOI: 10.1055/s-0038-1677495
17. Zotova T.Yu., Myandina G.I., Frolov V.A., Komarova A.G., Zotov A.K. The influence of *itgb3* gene polymorphism on the frequen-

- cy of arterial hypertension in patients with acute coronary syndrome. *Klinicheskaja medicina*. 2013; 91(8): 22-4. (In Russian)
18. Hook K.M., Bennett J.S. Glycoprotein IIb/IIIa antagonists. *Handb Exp Pharmacol*. 2012; (210): 199-223. DOI: 10.1007/978-3-642-29423-5_8
 19. Newman P.J., Derbes R.S., Aster R.H. The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest*. 1989; 83(5): 1778-81. DOI: 10.1172/JCI114082
 20. Floyd C.N., Mustafa A., Ferro A. The PIA1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa as a risk factor for myocardial infarction: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014; 9(7): e101518. DOI: 10.1371/journal.pone.0101518
 21. Zimrin A.B., Gidwitz S., Lord S., Schwartz E., Bennett J.S., White G.C., et al. The genomic organization of platelet glycoprotein IIIa. *J Biol Chem*. 1990; 265(15): 8590-5. PMID: 2341395.
 22. Mikkelsen J., Perola M., Laippala P., Penttilä A., Karhunen P.J. Glycoprotein IIIa PI(A1/A2) polymorphism and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36(4): 1317-23. DOI: 10.1016/s0735-1097(00)00871-8
 23. Cerhan J.R., Ansell S.M., Fredericksen Z.S., Kay N.E., Liebow M., Call T.G., et al. Genetic variation in 1253 immune and inflammation genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2007; 110(13): 4455-63. DOI: 10.1182/blood-2007-05-088682
 24. Bojesen S.E., Kjaer S.K., Høgdall E.V., Thomsen B.L., Høgdall C.K., Blaakaer J., et al. Increased risk of ovarian cancer in integrin beta3 Leu33Pro homozygotes. *Endocr Relat Cancer*. 2005; 12(4): 945-52. DOI: 10.1677/erc.1.01083 PMID: 16322334.
 25. Langsenlehner U., Renner W., Yazdani-Biuki B., Eder T., Wascher T.C., Paulweber B., et al. Integrin alpha-2 and beta-3 gene polymorphisms and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat*. 2006; 97(1): 67-72. DOI: 10.1007/s10549-005-9089-4
 26. Jin Q., Hemminki K., Grzybowska E., Klaes R., Söderberg M., Försti A. Re: Integrin beta3 Leu33Pro homozygosity and risk of cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004; 96(3): 234-5; author reply 235. DOI: 10.1093/jnci/djh032
 27. Wang-Gohrke S., Chang-Claude J. Re: Integrin beta3 Leu33Pro homozygosity and risk of cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97(10): 778-9; author reply 779-80. DOI: 10.1093/jnci/dji135
 28. Kallio J.P., Mikkelsen J., Tammela T.L., Karhunen P.J., Kellokumpu-Lehtinen P. Genetic variation in platelet integrin alpha-beta (GPIIb/IIIa) and the metastatic potential of renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2006; 98(1): 201-4. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2006.06196.x
 29. Seregina P.E., Totchiev G.F., Panova E.A. Prognostic significance of plal1/a2 alleles of the GPIIIa glycoprotein gene in endometrial hyperplastic processes. *Vestnik Rossijskogo universiteta druzhby narodov. Serija: Medicina*. 2009; (5): 154-61. (In Russian)
 30. Wang J., Liu J., Zhou Y., Wang F., Xu K., Kong D., et al. Association among PIA1/A2 gene polymorphism, laboratory aspirin resistance and clinical outcomes in patients with coronary artery disease: An updated meta-analysis. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 13177. DOI: 10.1038/s41598-019-49123-y
 31. Islam M.R., Nova T.T., Momenuzzaman N., Rabbi S.N.I., Jahan I., Binder T., et al. Prevalence of CYP2C19 and ITGB3 polymorphisms among Bangladeshi patients who underwent percutaneous coronary intervention. *SAGE Open Med*. 2021; 9: 20503121211042209. DOI: 10.1177/20503121211042209
 32. Goncharova I.A., Babushkina N.P., Minajcheva L.I., Markova V.V., Kulish E.V., Salahov R.R., et al. Prevalence of alleles of polymorphic variants Leu33Pro and Leu66Arg of the ITGB3 gene in residents of the Siberian region. *Genetika*. 2013; 49(8): 1008-12. (In Russian). DOI: 10.7868/S0016675813070059
 33. Torabi R., Zarei S., Zeraati H., Zarnani A.H., Akhondi M.M., Hadavi R., et al. Combination of thrombophilic gene polymorphisms as a cause of increased the risk of recurrent pregnancy loss. *J Reprod Infertil*. 2012; 13(2): 89-94. PMID: 23926530
 34. Nikolajevic-Starcevic J., Petrovic M.G., Petrovic D. A1/A2 polymorphism of the glycoprotein IIIa gene and diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. *Clin Exp Ophthalmol*. 2011; 39(7): 665-72. DOI: 10.1111/j.1442-9071.2011.02520.x
 35. Zhang Y., Han Y., Dong L., Yu H., Cheng L., Zhao X., et al. Genetic variation of ITGB3 is associated with asthma in Chinese Han children. *PLoS One*. 2013; 8(2): e56914. DOI: 10.1371/journal.pone.0056914
 36. Yilmaz U., Zeybek U., Kahraman O.T., Kafadar A.M., Toptas B., Yamak N., et al. Investigation of ICAM-1 and beta3 integrin gene variations in patients with brain tumors. *Asian Pacif J Cancer Prevent*. 2013; 14(10): 5929-34. DOI: 10.7314/apjcp.2013.14.10.5929
 37. Bianconi D., Schuler A., Pausz C., Geroldinger A., Kaider A., Lenz H.J., et al. Integrin beta-3 genetic variants and risk of venous thromboembolism in colorectal cancer patients. *Thromb Res*. 2015; 136(5): 865-9. DOI: 10.1016/j.thromres.2015.08.010
 38. Franchini M., Peyvandi F., Mannucci P.M. The genetic basis of coronary artery disease: from candidate genes to whole genome analysis. *Trends Cardiovasc Med*. 2008; 18(5): 157-62. DOI: 10.1016/j.tcm.2008.04.003
 39. Ozaki K., Tanaka T. Molecular genetics of coronary artery disease. *J Hum Genet*. 2016; 61(1): 71-7. DOI: 10.1038/jhg.2015.70
 40. Preuss M., König I.R., Thompson J.R., Erdmann J., Absher D., Asimes T.L., et al. Design of the coronary artery disease genome-wide replication and meta-analysis (CARDIoGRAM) study: A Genome-wide association meta-analysis involving more than 22 000 cases and 60 000 controls. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010; 3(5): 475-83. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.109.899443
 41. Musunuru K., Kathiresan S. HapMap and mapping genes for cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2008; 1(1): 66-71. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.108.813675
 42. Feng D., Lindpaintner K., Larson M.G., Rao V.S., O'Donnell C.J., Lipinska I., et al. Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PIA2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19(4): 1142-7. DOI: 10.1161/01.atv.19.4.1142
 43. Vijayan K.V., Liu Y., Dong J.F., Bray P.F. Enhanced activation of mitogen-activated protein kinase and myosin light chain kinase by the Pro33 polymorphism of integrin beta 3. *J Biol Chem*. 2003; 278(6): 3860-7. DOI: 10.1074/jbc.M208680200
 44. Goodall A.H., Curzen N., Panesar M., Hurd C., Knight C.J., Ouweland W.H., et al. Increased binding of fibrinogen to glycoprotein IIIa-proline33 (HPA-1b, PIA2, Zwb) positive platelets in patients with cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 1999; 20(10): 742-7. DOI: 10.1053/eurh.1998.1203
 45. Papp E., Havasi V., Bene J., Komlosi K., Czopf L., Magyar E., et al. Glycoprotein IIIA gene (PIA) polymorphism and aspirin resistance: is there any correlation? *Ann Pharmacother*. 2005; 39(6): 1013-8. DOI: 10.1345/aph.1E227
 46. Cooke G.E., Liu-Stratton Y., Ferketich A.K., Moeschberger M.L., Frid D.J., Magorien R.D., et al. Effect of platelet antigen polymorphism on platelet inhibition by aspirin, clopidogrel, or their combination. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 47(3): 541-6. DOI: 10.1016/j.jacc.2005.09.034

47. Papp E., Havasi V., Bene J., Komlosi K., Czopf L., Magyar E., et al. Glycoprotein IIIa gene (PIA) polymorphism and aspirin resistance: is there any correlation? *Ann Pharmacother.* 2005; 39(6): 1013-8. DOI: 10.1345/aph.1E227
48. Lim J.W., Chee S.X., Wong W.J., He Q.L., Lau T.C. Traditional Chinese medicine: herb-drug interactions with aspirin. *Singapore Med J.* 2018; 59(5): 230-9. DOI: 10.11622/smedj.2018051
49. Tacconelli S., Contursi A., Falcone L., Mucci M., D'Agostino I., Fullone R., et al. Characterization of cyclooxygenase-2 acetylation and prostanoid inhibition by aspirin in cellular systems. *Biochem Pharmacol.* 2020; 178: 114094. DOI: 10.1016/j.bcp.2020.114094
50. Ebrahimi P., Farhadi Z., Behzadifar M., Shabaninejad H., Abolghasem Gorji H., Taheri Mirghaed M., et al. Prevalence rate of laboratory defined aspirin resistance in cardiovascular disease patients: A systematic review and meta-analysis. *Caspian J Intern Med.* 2020; 11(2): 124-34. DOI: 10.22088/cjim.11.2.124
51. Wang B.Y., Tan S.J. Platelet glycoprotein IIIa gene polymorphism (Leu33Pro) and aspirin resistance in a very elderly Chinese population. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2014; 18(6): 389-93. DOI: 10.1089/gtmb.2013.0433
52. Muslimova Je.F., Afanas'ev S.A., Rebrova T.Ju., Sergienko T.N., Repin A.N. Association of polymorphisms of ITGB3, P2RY12, CY-P2C19 genes with platelet functional activity in patients with coronary heart disease on the background of two-component antiplatelet therapy. *Terapevticheskij arhiv.* 2017; 89(5): 74-8. (In Russian). DOI: 10.17116/terarkh201789574-78
53. Rozalski M., Nocun M., Watala C. Adenosine diphosphate receptors on blood platelets: potential new targets for antiplatelet therapy. *Acta Biochim Pol.* 2005; 52(2): 411-5. PMID: 15912207.
54. Jiang X.L., Samant S., Lesko L.J., Schmidt S. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel. *Clin Pharmacokinet.* 2015; 54(2): 147-66. DOI: 10.1007/s40262-014-0230-6
55. Tscharre M., Michelson A.D., Gremmel T. Novel Antiplatelet Agents in Cardiovascular Disease. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2020; 25(3): 191-200. DOI: 10.1177/1074248419899314
56. Laguta P.S., Panchenko E.P. Niche of prasugrel among other platelet p2y12-receptor inhibitors. *Aterotromboz.* 2017; (2): 43-52. (In Russian). DOI: 10.21518/2307-1109-2017-2-43-52
57. Floyd C.N., Ferro A. The PIA1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa in relation to efficacy of antiplatelet drugs: a systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol.* 2014; 77(3): 446-57. DOI: 10.1111/bcp.12204
58. Dropinski J., Musial J., Jakiela B., Wegrzyn W., Sanak M., Szczeklik A. Anti-thrombotic action of clopidogrel and P1(A1/A2) polymorphism of beta3 integrin in patients with coronary artery disease not being treated with aspirin. *Thromb Haemost.* 2005; 94(6): 1300-5. PMID: 16411409
59. Tummala R., Rai M.P. Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors. 2022. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. PMID: 32119263
60. Verdoia M., Pergolini P., Camaro C., Restifo M., Rolla R., Schaffer A., et al. PIA(1)/PIA(2) polymorphism does not influence response to Gp IIb-IIIa inhibitors in patients undergoing coronary angioplasty. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2013; 24(4): 411-8. DOI: 10.1097/MBC.0b013e32835d546e
61. Hu X., Wang W., Ye J., Lin Y., Yu B., Zhou L., et al. Effect of GP IIb/IIIa inhibitor duration on the clinical prognosis of primary percutaneous coronary intervention in ST-segment elevation myocardial infarction with no-/slow-reflow phenomenon. *Biomed Pharmacother.* 2021; 143: 112196. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112196
62. Zhu X., Cao G. Safety of Glycoprotein IIb-IIIa Inhibitors Used in Stroke-Related Treatment: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2020; 26: 1076029620942594. DOI: 10.1177/1076029620942594
63. Ernst N.M., Suryapranata H., Miedema K., Slingerland R.J., Ottervanger J.P., Hoorntje J.C., et al. Achieved platelet aggregation inhibition after different antiplatelet regimens during percutaneous coronary intervention for ST segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44(6): 1187-93. DOI: 10.1016/j.jacc.2004.06.050
64. Gawaz M., Ruf A., Pogatsa-Murray G., Dickfeld T., Rüdiger S., Taubitz W., et al. Incomplete inhibition of platelet aggregation and glycoprotein IIb-IIIa receptor blockade by abciximab: importance of internal pool of glycoprotein IIb-IIIa receptors. *Thromb Haemost* 2000; 83(6): 915-22. PMID: 10896249.
65. Wencel-Drake J.D., Boudignon-Proudhon C., Dieter M.G., Criss A.B., Parise L.V. Internalization of bound fibrinogen modulates platelet aggregation. *Blood.* 1996; 87(2): 602-12. PMID: 8555482.
66. Arya V., Mahajan P., Saraf A., Mohanty A., Sawhney J.P., Bhargava M. Association of CYP2C19, CYP3A5 and GPIIb/IIIa gene polymorphisms with Aspirin and Clopidogrel Resistance in a cohort of Indian patients with Coronary Artery Disease. *Int J Lab Hematol.* 2015; 37(6): 809-18. DOI: 10.1111/ijlh.12416
67. Cooke G.E., Liu-Stratton Y., Ferketich A.K., Moeschberger M.L., Frid D.J., Magorien R.D., et al. Effect of platelet antigen polymorphism on platelet inhibition by aspirin, clopidogrel, or their combination. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47(3): 541-6. DOI: 10.1016/j.jacc.2005.09.034

Сведения об авторах:

Изможерова Надежда Владимировна, доктор мед. наук, доцент, зав. каф. фармакологии и клинической фармакологии;

Попов Артем Анатольевич, доктор мед. наук, доцент, зав. каф. госпитальной терапии и скорой медицинской помощи;

Антропова Ирина Петровна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаборатории УГМУ;

Кадников Леонид Игоревич, аспирант каф. фармакологии и клинической фармакологии

Испавский Владислав Евгеньевич, аспирант каф. фармакологии и клинической фармакологии;

Шамбатов Мурад Акбар оглы, аспирант каф. фармакологии и клинической фармакологии;

Браженко Герман Германович, студент леч. проф. факультета;

Салов Дмитрий Викторович, студент леч. проф. факультета.

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092.11-616.-002.1

Галимова С.Ш.², Литвицкий П.Ф.¹, Галимова Э.Ф.², Мочалов К.С.², Галимов Ш.Н.²

Молекулярные аспекты патогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом

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

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

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России,

450008, Уфа, Россия, ул. Ленина, д. 3

Цель обзора – анализ современных данных о механизмах развития геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС). Дана характеристика зоонозной инфекции, структуры и уровней заболеваемости в различных регионах мира. Инициальным патогенетическим звеном этой формы патологии, после инфицирования хантавирусом, является репликация вируса в эпителии верхних дыхательных путей с их повреждением и последующей активацией альвеолярных макрофагов и дендритных клеток. Дисфункция эндотелиальных клеток приводит к нарушению целостности стенок микрососудов, активации факторов системы иммунобиологического надзора за постоянным и индивидуальным антигенным составом организма и сопровождается расстройством состояния системы гемостаза. Это инициирует агрегацию тромбоцитов с активацией процесса тромбообразования и развитием осложнений в виде ДВС-синдрома и острой почечной недостаточности. Обсуждаются факты тесного взаимодействия в этом процессе различных классов цитокинов с тромбоцитами. Активация цитокинов наблюдается уже на ранних этапах заболевания. Об этом свидетельствует повышение в крови уровня интерферона γ (IFN- γ), фактора некроза опухоли α (ФНО- α), трансформирующего фактора роста β (ТФР- β), интерлейкинов: IL-6, IL-21 и IL-10, что коррелирует с тяжестью состояния пациента. Экстремальные уровни IL-6, IL-10 и IFN- γ сочетаются с развитием геморрагической лихорадки с высокой летальностью. Анализируются фактические данные о роли и месте в патогенезе ГЛПС микроРНК, обсуждаются перспективы их использования в качестве потенциальных биомаркеров прогноза развития заболевания и эффективности терапии ГЛПС. Расшифровка закономерностей динамики содержания в крови пациентов с ГЛПС различных регуляторных молекул будет способствовать пониманию механизмов развития заболевания, а также разработке принципов и методов лечения и профилактики этой тяжелой формы патологии человека.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом; хантавирус; патогенез; цитокины; микроРНК

Для цитирования: Галимова С.Ш., Литвицкий П.Ф., Галимова Э.Ф., Мочалов К.С., Галимов Ш.Н. Молекулярные аспекты патогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(2): 106-111.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.106-111

Участие авторов: концепция и дизайн работы – Литвицкий П.Ф.; сбор данных – Галимова С.Ш.; анализ и интерпретация данных – Мочалов К.С.; написание статьи – Галимова С.Ш., Галимова Э.Ф.; редактирование статьи – Галимов Ш.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 26.04.2023

Принята к печати 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Galimova S.Sh.², Litvitskiy P.F.¹, Galimova E.F.², Mochalov K.S.², Galimov Sh.N.²

Molecular aspects of the pathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome

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

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

²Bashkir State Medical University,

Lenina St. 3, Ufa, 450008, Russian Federation

This review focuses on the mechanisms of development of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). A brief description of this zoonotic infection, the structure and values of its incidence are provided for various regions of the world. Following the infection with hantavirus, the disease starts from the virus replication in cells of the upper respiratory tract, their damage, and sub-

sequent activation of alveolar macrophages and dendritic cells. Dysfunction of endothelial cells results in disturbed integrity of microvascular walls, activation of the immunobiological surveillance over the constant and individual antigenic composition of the body, and hemostatic disorders. This initiates platelet aggregation with the activation of thrombus formation and the development of complications in the form of disseminated intravascular coagulation (DIC) and acute renal failure. Cytokines, chemokines, and platelets have been demonstrated to closely interact in this process. Cytokine activation is noted already in early stages of the disease in association with increased levels of interferon γ (IFN- γ), tumor necrosis factor α , transforming growth factor β , and interleukins IL-6, IL-21 and IL-10, which correlates with severity of the patient's condition. Extremely high levels of IL-6, IL-10, and IFN- γ contribute to the development of severe hemorrhagic fever with a high mortality rate. The review also provides information on the role and place of microRNAs in the pathogenesis of HFRS and the prospects for their use as potential biomarkers for predicting the disease development and the effectiveness of therapy. Studying the dynamics of changes in the content of various regulatory molecules in the blood of patients with HFRS will provide new data on mechanisms of the disease and help development of treatment and prevention of this severe pathology.

Keywords: hemorrhagic fever with renal syndrome; hantavirus; pathogenesis; cytokines; microRNA

For citation: Galimova S.Sh., Litvitsky P.F., Galimova E.F., Mochalov K.S., Galimov Sh.N. Molecular aspects of the pathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(2): 106-111. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.106-111

Author's contribution: the concept and design of the work – Litvitsky P.F.; data collection – Galimova S.Sh.; analysis and interpretation of data – Mochalov K.S.; article writing – Galimova S.Sh., Galimova E.F.; article editing – Galimov Sh.N. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

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

Financing. The study had no sponsorship.

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

Information about the authors:

Galimova S.Sh., <https://orcid.org/0000-0002-7865-8326>

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

Galimova E.F., <https://orcid.org/0000-0002-3351-7669>

Mochalov K.S. <https://orcid.org/0000-0002-8010-3338>

Galimov Sh.N., <https://orcid.org/0000-0002-5871-5151>

Received 26.04.2023

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), вызываемая ортохантавирусами, занимает одно из ведущих мест среди природно-очаговых заболеваний человека. Ортохантавирусы – зоонозные патогены, относящиеся к роду Orthohantavirus семейства Hantaviridae [1, 2]. Некоторые представители рода Orthohantavirus являются патогенными для человека, например, вирус Хантаан (HNTV), Сеульский вирус (SEOV), вирусы Пуумала (PUUV) и Добрава-Белград (DOBV). В настоящее время идентифицировано около 38 видов ортохантавирусов [1]. Из них, по меньшей мере, 24 способны вызывать различные заболевания человека [3], в том числе острые формы патологии: геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС) и сердечно-легочный синдром (HCPS) [4, 5]. Вирус Пуумала (PUUV) является основным представителем ортохантавирусов, вызывающим ГЛПС в Европе. В Китае ГЛПС вызывается в основном вирусом Хантаан (HNTV) и Сеульским вирусом (SEOV) [6]. При этом полосатая полевая мышь *Apodemus agrarius* рассма-

тривается в качестве основного хозяина-резервуара для ГЛПС. Число пациентов с диагнозом ГЛПС в Европе растет и составляет в настоящее время более 3000 случаев в год. Около 90% всех инфицированных ГЛПС, зарегистрированных в Российской Федерации, выявлены в Волго-Уральском и Дальневосточном регионах. Высокие показатели заболеваемости отмечаются в Республике Башкортостан – крупнейшем очаге ГЛПС в Приволжском Федеральном округе [7]. Летальность при ГЛПС колеблется в диапазоне 5-10% в зависимости от вызвавшего её возбудителя.

Хантавирусы представляют собой оболочечные РНК-вирусы овальной или сферической формы диаметром от 80 до 120 нм. Однопочечный РНК-содержащий геном разделен на 3 основных сегмента: малый [S: от 1696 до 2083 нуклеотидов (нт) в длину], средний (M: от 3613 до 3707 нт) и большой (L: от 6530 до 6550 нт). Белок нуклеокапсида (N) кодируется сегментом S; гликопротеины оболочки (G1 и G2) -- сегментом M; а белок РНК-зависимой полимеразы сегментом L [8].

Вирус довольно стабилен во внешней среде и остается вирулентным в течение 2 нед при комнатной температуре, а при более низких температурах и дольше.

Клиническая картина ГЛПС характеризуется наличием лихорадочного периода, поражением почек с развитием их острой недостаточности (ОПН), ДВС-синдрома, сочетающегося с кровотечениями и полиорганной недостаточностью [9, 10]. Тяжесть течения ГЛПС варьирует от субклинических форм до легкой, средней и тяжелой степени. Вирусы HTNV, DOBV и AMRV чаще вызывают тяжелое течение ГЛПС; SEOV, как правило – сравнительно легкое. В России чаще диагностируется ГЛПС, вызываемая PUUV, которая протекает, как правило, с острым поражением почек [11].

ГЛПС – циклическое заболевание, имеющее определенные симптомы в каждой его фазе. Повышение проницаемости стенок сосудов микроциркуляторного русла нередко приводит к развитию генерализованного интерстициального отека. Часто наблюдаются острое повреждение почек (ОПП), острый отек легких, полиорганная недостаточность различной степени тяжести, нередко – гемодинамический шок.

Ключевую роль в патогенезе ГЛПС играет прямое повреждающее действие вируса на эндотелиальные клетки, повышение проницаемости стенок микрососудов и нарушение их целостности [12]. Считается, что хантавирусная инфекция развивается в результате вдыхания воздуха, содержащего вирус, а также других форм контакта с ним. Входными воротами, местом репликации и размножения вируса, как правило, является эпителий дыхательных путей. Доказано наличие хантавируса в сыворотке крови пациентов уже в инкубационном периоде заболевания [13]. Выявлено, что высокая вирусная нагрузка в лихорадочный период ГЛПС коррелирует с тяжестью течения и неблагоприятным прогнозом заболевания.

При проникновении в эндотелиоциты вирус взаимодействует с β -интегринами, которые вирусом и экспрессируются. В дальнейшем в зараженных эндотелиоцитах происходит репликация вируса. Интегрины представляют собой гетеродимерные рецепторы, состоящие из субъединиц α и β . Они участвуют в поддержании целостности тканей, включая механизмы регуляции адгезии и пролиферации клеток.

Репликация вируса в эндотелиоцитах является пусковым звеном патогенеза геморрагической лихорадки с почечным синдромом, определяющим прогноз и тяжесть течения болезни. Дисфункция эндотелиальных клеток инициирует агрегацию тромбоцитов, гиперкоагуляцию белков крови и тромбообразование [14]. Активация β -интегринов приводит к формированию их

комплекса с VEGFR2 (рецептор сосудисто-эндотелиального фактора роста) в инфицированных клетках. Это играет существенную роль в дезорганизации цитоскелета [15] и последующем повышении проницаемости стенок микрососудов.

Одновременно комплекс β -интегринов с VEGF способствует миграции эндотелиоцитов и индукции ангиогенеза, а также замещению поврежденных клеток. Сывороточный и тканевые уровни VEGF при ГЛПС коррелируют с тяжестью и степенью поражения почек.

Снижение концентрации других сигнальных молекул: VE-кадгерина, клаудина-1, ZO-1, синдекана-1, проангиогенного ангиопоэтина-1 в эндотелии сосудистой стенки и в эпителии почечных канальцев у пациентов с ГЛПС свидетельствует о значительном повреждении монослоя эндотелиоцитов с последующими патогенными последствиями. Основным эффектом действия указанных выше молекул является регуляция межклеточных взаимодействий, контроль пролиферации клеток, их дифференцировки и поляризации [16, 17].

Существенным звеном патогенеза ГЛПС является высвобождение цитокинов и активация ответа системы иммунобиологического надзора за постоянным и индивидуальным антигенным составом организма на внедрение вирусов [18]. Репликация их в легочном эпителии вызывает активацию альвеолярных макрофагов и дендритных клеток. При высвобождении цитокинов с реализацией «цитокинового шторма» повышается проницаемость стенок микрососудов, что способствует адгезии к ним лейкоцитов и экстравазации последних [18]. Активация медиаторов воспаления отмечается уже на ранних этапах заболевания, что индуцирует лавинообразное высвобождение цитокинов с провоспалительным действием: IFN- γ , ФНО- α , трансформирующего фактора роста β (TGF- β), IL-6, IL-21 и IL-10. Интенсивность этого процесса коррелирует со степенью тяжести течения заболевания [19, 20]. Экстремальное повышение в крови уровней IL-6, IL-10 и IFN- γ ассоциируется с развитием тяжелых форм геморрагической лихорадки с высоким показателем летальности.

Каждый цитокин, а также их совокупные эффекты, вносят существенный вклад в механизм развития воспаления. Так, синергизм IL-1 β , IL-6 и ФНО- α при ГЛПС проявляется в их пирогенном эффекте, поскольку все 3 цитокина являются эндогенными пирогенами, а также индуцируют синтез белков ответа острой фазы на повреждение. Именно поэтому в крови пациентов с ГЛПС можно обнаружить повышенный уровень С-реактивного белка и ферритина [21]. Выявлено

также, что IL-1 β , изменяя проницаемость стенок микрососудов, индуцирует экспрессию тканевого фактора (тромбопластина) и коагулопатии у пациентов при ГЛПС. IL-1 β , являясь продуктом активированной инфламмосомы, способствует развитию иммунного ответа с участием Th1 и Th17 [22]. IL-1 β поддерживает также праймирование Т-клеток и высвобождение IFN- γ . Комбинация IL-1 β и IFN- γ способствует реализации иммуногенной реакции с привлечением Th1. Напротив, при взаимодействии IL-1 β с IL-6 в иммунный ответ вовлекаются Th17. IL-6 непосредственно участвует в стимуляции пролиферации В-клеток и активации тромбоцитопоэза. В совокупности, повышенный уровень указанных выше цитокинов в сыворотке крови пациентов обеспечивает активацию иммуногенных реакций с участием лимфоцитов типа Th1, а также стимуляцию процесса образования тромбоцитов [23]. Лабораторные данные подтверждают эти данные: у пациентов с ГЛПС обнаружены циркулирующие CD8⁺ лимфоциты, повышенный уровень в сыворотке крови антител к хантавирусу, а также признаки активации тромбоцитопоэза.

Доказано, что тромбоз и ДВС-синдром являются основными причинами смерти при ГЛПС [24, 25]. Тромбопластин (TF) инициирует внешний путь каскада свертывания белков системы гемостаза крови при взаимодействии с фактором свертывания VII. При этом происходит экспрессия тканевого фактора на поверхности клеточной мембраны. Долгое время считалось, что TF экспрессируется только внесосудистыми, субэндотелиальными клеточными элементами, такими как гладкомышечные клетки, макрофаги и фибробласты. Однако дальнейшие исследования показали, что тканевой фактор может экспрессироваться также эндотелиальными и циркулирующими форменными элементами крови, такими как моноциты и тромбоциты [26, 27]. Экспрессия тканевого фактора этими клетками в острой фазе инфекции может способствовать повышенному риску диссеминированного внутрисосудистого свертывания белков системы гемостаза.

Тромбоциты играют ключевую роль в инициации и прогрессировании тромбообразования. А-гранулы тромбоцитов экспрессируют рецепторы, способствуя их адгезии с другими клетками и высвобождая широкий спектр медиаторов. Эти вещества участвуют в регуляции таких процессов как хемотаксис, миграция клеток, их пролиферация и дифференцировка, ангио- и лимфангиогенез, репликация вируса в клетках эндотелия [28]. Обнаружено, что HTNV-инфицированные эндотелиальные клетки специфически вызывают адгезию меченных кальцеином тромбоцитов, в то время

как клетки, инфицированные непатогенным TULV, не способны рекрутировать тромбоциты на поверхность эндотелиальных клеток.

Экспрессируемые тромбоцитами рецепторы имеют решающее значение для адгезии пластинок к стенке сосуда, а также для их взаимодействия с лейкоцитами и эндотелиальными клетками. Молекулы Р-селектина, гликопротеина (GP) Ib-IX-V, фактора Виллебранда (vWF) и GPIIb/IIIa критически важны для агрегации тромбоцитов при их взаимодействии с молекулами фибронектина, витронектина и фибриногена. Рецепторы коллагена необходимы для адгезии тромбоцитов к стенке сосуда. Они представлены в основном гликопротеином (GPVI), семейством иммуноглобулинов и α/β интегрином. Тромбин -- ключевой компонент каскада свертывания белков системы гемостаза, является одним из самых мощных активаторов тромбоцитов. Этот процесс опосредуется рецепторами при участии протеазы (PARs). Реализация функций PARs происходит путем протеолитического расщепления тромбином и демаскирования специфического лиганда [29]. Взаимодействие между vWF и GPIIb α способствует замедлению циркуляции тромбоцитов и дает им возможность «просачиваться» через стенку сосуда, тем самым позволяя другим рецепторам тромбоцитов взаимодействовать с компонентами открытого внеклеточного матрикса и/или локально генерируемыми растворимыми агонистами, такими как, например, тромбин. Анионные фосфолипиды внешней мембраны тромбоцитов формируют прокоагулянтную поверхность, обеспечивая плазматическую мембрану критической способностью поддерживать выработку тромбина. Кроме того, воздействие фосфатидилсерина на внешнюю поверхность мембраны побуждает тромбоциты резко изменять свою форму, что сопровождается потерей большей части их цитоскелетной основы, набуханием и превращением в баллонные структуры. Это, в свою очередь, еще больше увеличивает площадь их прокоагулянтной поверхности. Таким образом, функция тромбоцитов при ГЛПС выходит далеко за рамки их вклада в первичный гемостаз.

Тромбоциты содержат большой набор прокоагулянтных факторов, а также представляют собой матрицу, необходимую для реализации каскада свертывания белков системы гемостаза. При ГЛПС наблюдается закономерно удлиненное протромбиновое время и наличие активированного тромбопластина [30]. Кроме того, установлено, что снижение уровней факторов свертывания крови II, V, VIII, IX и X и повышение уровня фибриногена в сыворотке крови отрицательно коррелируют с тромбоцитопенией [31].

Хемокины, как семейство цитокинов, принимающих участие в миграции лейкоцитов в очаг воспаления [32], непосредственно влияют на развитие ответа системы иммунобиологического надзора организма при ГЛПС. При этой форме патологии наиболее активны хемокины CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 и CXCL12. Они принимают участие в рекрутировании лейкоцитов в регион воспаления, привлекая в него, в основном, мононуклеарные клетки. CXCL10 и CXCL12 активируют также Th1-лимфоциты, естественные киллеры (NK) и CD8+ лимфоциты. Считается, что хемокины при ГЛПС выполняют существенную защитную роль [33].

Одно из современных направлений исследования патогенеза ГЛПС связано с анализом динамики и роли экспрессии отдельных классов микроРНК на разных стадиях заболевания и при различной тяжести его течения [34, 35]. Показано, что миРНК-155 и миРНК-146а могут быть маркерами прогноза тяжести течения ГЛПС. Установлены также взаимосвязи полиморфных вариантов некоторых генов-мишеней (например, гена *CCDC6*, общего для семейства специфичных для ГЛПС микроРНК-146а, -218, -410, -503) со сниженным риском тяжелого течения болезни [36].

В целом, результаты анализа литературы о механизмах развития хантавирусной инфекции свидетельствуют о ведущей роли в нем повреждения эндотелиальных клеток сосудов, изменений в системе гемостаза и реализации эффектов цитокинов различных классов.

Сложные взаимодействия между вирусами, системой иммунобиологического надзора организма и эндотелиальными клетками во многом определяют выраженность функциональных расстройств и развитие осложнений ГЛПС в виде ОПН и/или ДВС-синдрома. Степень дисфункции системы иммунобиологического надзора также тесно коррелирует с тяжестью течения болезни. Изучение динамики содержания различных маркеров инициации и прогрессирования ГЛПС, включая микроРНК, способствует расшифровке механизмов развития заболевания, а также повышению эффективности его лечения и профилактики [30].

Литература

(п.п. 1-10; 12; 13; 15-35 см. References)

11. Кирьянов Н.А., Мокрецов А.Г., Суханов С.А. Патоморфология геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Международный научно-исследовательский журнал*. 2019; 1-1(79): 128-31.
14. Хлебникова А.Н., Седова Т.Г., Гуревич Л.Е., Селезнева Е.В., Молочков А.В. Экспрессия клаудина-1 в клетках эпителиальных опухолей кожи. *Клиническая дерматология и венерология*. 2021; 20(1): 43-9. <https://doi.org/10.17116/klind-erma20212001143>

36. Гилязова И.Р., Иванова Е.А., Хасанова А.Н. Хасанова Г.М., Измайлов А.А., Сафиханов Р.Я. и др. Ассоциация полиморфного варианта rs1127327 гена-мишени микро РНК-146А *CCDC6* с пониженным риском развития тяжелой формы геморрагической лихорадки с почечным синдромом у пациентов из Волго-Уральского региона России. *Якутский медицинский журнал*. 2022; 2(78): 5-8. <https://doi.org/10.25789/YMJ.2022.78.01>

References

1. *ICTV Current ICTV Taxonomy Release*. Available online: <https://ictv.global/taxonomy> (accessed on 8 August 2022).
2. Laenen L., Vergote V., Calisher C.H., Klempa B., Klingström J., Kuhn J.H., et al. Hantaviridae: Current Classification and Future Perspectives. *Viruses*. 2019; 11: 788.
3. Noack D., Goeijenbier M., Reusken C.B.E.M., Koopmans M.P.G., Rockx B.H.G. Orthohantavirus Pathogenesis and Cell Tropism. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020; 10: 399.
4. Echterdiek F., Kitterer D., Alscher M. D., Schwenger V., Ruckebrod B., Bald M., et al. Clinical course of hantavirus-induced nephropathia epidemica in children compared to adults in Germany-analysis of 317 patients. *Pediatr.* 2019; 34(7): 1247-52. <https://doi.org/10.1007/s00467-019-04215-9>
5. Chandy S., Abraham S., Sridharan G. Hantaviruses: an emerging public health threat in India? A review. *J Biosci.* 2008; 33(4): 495-504. <https://doi.org/10.1007/s12038-008-0068-x>
6. Lagerqvist N., Hagström Å., Lundahl M., et al. Molecular diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome caused by Puumala Virus. *J Clin Microbiol.* 2016; 54(5): 1335-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.00113-16>
7. Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshein A.D., Morozov V.G., Siniugina A.A., et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg Infect Dis.* 2019; 25(12): 2325-8. <https://doi.org/10.3201/eid2512.181649>
8. Jiang H, Zheng X., Wang L., Du H., Wang P., Bai X. Hantavirus infection: a global zoonotic challenge. *Virology*. 2017; 32(1): 32-43. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3899-x>
9. Krautkrämer E., Zeier M. Old World hantaviruses: aspects of pathogenesis and clinical course of acute renal failure. *Virus Res.* 2014; 187: 59-64. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.043>
10. Krautkrämer E., Zeier M., Plyusnin A. Hantavirus infection: an emerging infectious disease causing acute renal failure. *Kidney Int.* 2013; 83(1): 23-7. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.360>
11. Kiryanov N.A., Mokretsov A.G., Sukhanov S.A. Pathomorphology of hemorrhagic fever with renal syndrome. Polymorphism rs1127327 of the microRNA-146A target gene *CCDC6* associated with a reduced risk of severe hemorrhagic fever with renal syndrome in patients from the Volga-Ural region of Russia. *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal*. 2019; 1 (79).
12. Dheeraseskara K., Sumathipala S., Muthugala R. Hantavirus Infections-Treatment and Prevention. *Curr Treat Options Infect Dis.* 2020; 12(4): 410-21. <https://doi.org/10.1007/s40506-020-00236-3>
13. Yi J., Xu Z., Zhuang R., Wang J., Zhang Y., Ma Y., et al. Hantaan virus RNA Load in patients having hemorrhagic fever with renal syndrome: correlation with disease severity. *J. Infect. Dis.* 2013; 207: 1457-61.
14. Khebnikova A.N., Sedova T.G., Gurevich L.E., Selezneva E.V., Molochkov A.V. Expression of claudin-1 in epithelial skin tumor cells.

- Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya*. 2021; 20(1): 43-9. <https://doi.org/10.17116/klinderma20212001143>.
15. Wang W., Zhang Y., Li Y., Pan L., Bai L., Zhuang Y., Huang C.X., Wang J.P., Yu H.T., Wei X., et al. Dysregulation of the B3 Integrin-VEGFR2 complex in Hantaan Virus-Directed hyperpermeability upon treatment with VEGF. *Arch. Virol.* 2012; 157: 1051–61.
 16. Jangra R.K., Herbert A.S., Li R., et al. Protocadherin-1 is essential for cell entry by New World hantaviruses. *Nature*. 2018; 563(7732): 559-63. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0702-1>
 17. Nusshag C., Osberghaus A., Baumann A., Schnitzler P., Zeier M., Krautkrämer E. Deregulation of levels of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 is associated with severe courses of hantavirus infection. *J Clin Virol.* 2017; 94: 33-6. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.07.007>
 18. Nourshargh S., Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*. 2014; 41(5): 694-707. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.008>
 19. Lee G.Y., Kim W.K., No J.S., et al. Clinical and immunological predictors of hemorrhagic fever with renal syndrome outcome during the early phase. *Viruses*. 2022; 14(3): 595. <https://doi.org/10.3390/v14030595>
 20. Korva M., Rus K.R., Pavletič M., et al. Characterization of biomarker levels in Crimean-Congo hemorrhagic fever and hantavirus fever with renal syndrome. *Viruses*. 2019; 11(8): 686. <https://doi.org/10.3390/v11080686>
 21. Che L., Wang Z., Du N., et al. Evaluation of serum ferritin, procalcitonin, and C-Reactive protein for the prediction of severity and mortality in hemorrhagic fever with renal syndrome. *Front Microbiol.* 2022; 13: 865233. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.865233>
 22. Ye W., Lei Y., Yu M., et al. NLRP3 inflammasome is responsible for hantavirus inducing interleukin-1 β in THP-1 cells [published correction appears in *Int J Mol Med*. 2019 Jun;43(6): 2533]. *Int J Mol Med*. 2015; 35(6): 1633-40. doi:10.3892/ijmm.2015.2162
 23. Dzagurova T.K., Siniugina A.A., Ishmukhametov A.A., et al. Pre-clinical studies of inactivated polyvalent HFRS vaccine. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10: 545372. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.545372>
 24. Camera M., Brambilla M., Toschi V., Tremoli E. Tissue factor expression on platelets is a dynamic event. *Blood*. 2010; 116(23): 5076-7. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-307306>
 25. Scridon A. Platelets and their role in hemostasis and thrombosis—from physiology to pathophysiology and therapeutic implications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(21): 12772. <https://doi.org/10.3390/ijms232112772>
 26. Göbel K., Eichler S., Wiendl H., Chavakis T., Kleinschnitz C., Meuth S.G. The Coagulation factors fibrinogen, thrombin, and factor XII in inflammatory disorders-A Systematic Review. *Front Immunol.* 2018; 9:1731. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01731>
 27. Schmedes C.M., Grover S.P., Hisada Y.M., Goeijenbier M., Hultdin J., Nilsson, S.; Thunberg T., Ahlm C., MacKman N., Connolly A.M.F. Circulating extracellular vesicle tissue factor activity during orthohantavirus infection is associated with intravascular coagulation. *J. Infect. Dis.* 2020; 222: 1392–9.
 28. Rumbaut R.E., Thiagarajan P. *Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Chapter 2, General Characteristics of Platelets.
 29. Aquino-Domínguez A.S., Romero-Tlalolini M.L.A., Torres-Aguilar H., Aguilar-Ruiz S.R. Recent advances in the discovery and function of antimicrobial molecules in platelets. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(19): 10230. <https://doi.org/10.3390/ijms221910230>
 30. Sehgal A., Mehta S., Sahay K., et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome in Asia: History, pathogenesis, diagnosis, treatment, and prevention. *Viruses*. 2023; 15(2): 561. <https://doi.org/10.3390/v15020561>
 31. Laine O., Mäkelä S., Mustonen J., et al. Platelet ligands and ADAMTS13 during Puumala hantavirus infection and associated thrombocytopenia. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2011; 22(6): 468-72. <https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e328346a420>
 32. Sokol C.L., Luster A.D. The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 7(5):a016303. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016303>
 33. Tang K., Cheng L., Zhang C., et al. Novel Identified HLA-A*0201-Restricted hantaan virus glycoprotein cytotoxic T-Cell epitopes could effectively induce protective responses in HLA-A2.1/K^b transgenic mice may associate with the severity of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Front Immunol.* 2017; 8: 1797. Published 2017 Dec 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01797>
 34. Shuang Lu, Ni Zhu, Weiwei Guo, Xin Wang, Kaiji Li, Jie Yang, et al. RNA-Seq Revealed a Circular RNA-microRNA-mRNA Regulatory Network in Hantaan Virus Infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10: 97. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00097>
 35. Gilyazova I., Ivanova E., Pavlov V., et al. Exosomal miRNA-155 and miRNA-146a are promising prognostic biomarkers of the severity of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Noncoding RNA Res.* 2022; 8(1): 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2022.10.003>
 36. Gilyazova I.R., Ivanova E.A., Khasanova A.N., Khasanova G.M., Izmaylov A.A., Safikhonov R.Ya., et al. Polymorphism rs1127327 of the microRNA-146A target gene CCDC6 associated with a reduced risk of severe hemorrhagic fever with renal syndrome in patients from the Volga-Ural region of Russia. *Yakutskiy meditsinskiy zhurnal.* 2022; 2(78): 5-8. <https://doi.org/10.25789/YMJ.2022.78.01>

Сведения об авторах:

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

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

Мочалов Константин Сергеевич, канд. биол. наук, заведующий Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России;

Галимов Шамиль Нариманович, доктор мед. наук, профессор, заведующий кафедрой биологической химии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России.

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092

Пальцын А.А.^{1,2}, Гусева М.Н.³, Свиридкина Н.Б.¹

Интеллект в старости

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;

³ФГБОУ ВО Государственный университет управления,

109542, Москва, Россия, Рязанский просп., д. 99

Интеллект человека – подарок многотысячелетней эволюции вида *Homo sapiens* и 15 – 30 лет личного желаяния, образования, воспитания, воли и труда. После возраста 30 – 40 лет происходит инволюция интеллекта с большими межиндивидуальными различиями скорости и глубины развития процесса в зависимости от наследственности, мировоззрения, образования, самодисциплины, особенностей труда и быта. Значительная инволюция интеллекта снижает качество жизни индивида и становится тяжелой нагрузкой для семьи, общества и государства. В статье обсуждаются некоторые приемы сохранения интеллекта в старости.

Ключевые слова: интеллект; возраст; тренировки; саморазвитие; внушение.

Для цитирования: Пальцын А.А., Гусева М.Н., Свиридкина Н.Б. Интеллект в старости. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(2): 112-117.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.112-117

Участие авторов: концепция и дизайн работы – Пальцын А.А.; сбор и обработка материала – Пальцын А.А., Гусева М.Н., Свиридкина Н.Б.; написание текста – Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б. редактирование – Пальцын А.А., Гусева М.Н. 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 09.06.2022

Принята к печати 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Paltsyn A.A.^{1,2}, Guseva M.N.³, Sviridkina N.B.¹

Intelligence in old age

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. 2, Moscow, 125993, Russian Federation;

³State University of Management,

Ryazansky Prosekt 99, Moscow, 109542, Russian Federation

The human intellect is a gift of many thousands of years of evolution of the species *Homo sapiens* and 15–30 years of personal desire, education, upbringing, will power, and labor. After the age of 30–40 years, involution of intelligence begins with great inter-individual differences in the speed and depth of the developing process depending on heredity, worldview, education, self-discipline, and features of work and life. A significant involution of the intellect reduces the quality of life of an individual and becomes a heavy burden for the family, society and state. The article describes some methods for maintaining intelligence in old age.

Keywords: intellect; age; workout; self-development; suggestion

For citation: Paltsyn A.A., Guseva M.N., Sviridkina N.B. Intelligence in old age. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(2): 112-117. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.112-117

Author's contribution: concept and design of the study – Paltsyn A.A.; collection and processing of material – Paltsyn A.A., Guseva M.N., Sviridkina N.B.; text writing – Paltsyn A.A., Sviridkina N.B.; editing – Paltsyn A.A., Guseva M.N. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article

For correspondence: **Aleksandr A. Paltsyn**, e-mail: lrrp@mail.ru

Financing. The study had no sponsorship.

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

Information about authors

Guseva M.N., <https://orcid.org/0000-0002-5576-6164>

Received 09.06.2022

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

Постоянно и всюду наблюдаемое возрастное снижение когнитивных способностей не должно восприниматься медициной и обществом в целом как неизбежность или, по меньшей мере, рациональность нередко проявляющегося, скептического или даже отрицательного отношения к интеллекту пожилых. К сожалению, в обществе распространено убеждение о невозможности сохранения полноценного здоровья старшего поколения и использования результатов когнитивной активности старых людей в производстве.

Формально-статистически для такого отношения есть основания [1]. В пожилом возрасте при низкой степени двигательной и когнитивной активности обитателей домов престарелых, у них действительно часто развивается когнитивная недостаточность. Этому способствуют малоподвижность, депрессии и, конечно, возраст. Однако, не всё так просто в жизни. Метаанализом результатов 51 исследования со 123771 участником было установлено, что регулярные, адекватные состоянию исследуемых физические нагрузки, улучшение сна, прием витамина D, регулирование веса тела и, что особенно важно, устранение негативных эмоций, решение семейных и социальных проблем, а также привлекательный досуг и повышение самооценки, заметно улучшали физическое и когнитивное здоровье.

Принципиально неправильным, не только безнравственным, но и ненаучным было бы предвзятое отрицательное отношение к результатам и рекомендациям биоисследований, мотивированное лишь преклонным возрастом обследуемых. Научная несостоятельность такого подхода имеет много доказательств. Календарный и биологический возраст часто не соответствуют один другому. Невозможно определить познавательную ценность работы по паспорту исполнителя. Количество лет курса образования пройденного людьми, положительно коррелирует с их когнитивными способностями на протяжении всей взрослой жизни и снижает риск развития деменции как в среднем, так и в позднем возрасте [2]. Это свидетельствует

о том, что когнитивные способности в значительной степени формируются продолжительностью образовательной селекции и таким фактором, как социоэкономический ресурс родителей. Lövdén и соавт. [2] справедливо считают, что уровень образования влияет на когнитивную функцию в любом, в том числе, пожилом возрасте, прежде всего, способствуя индивидуальным различиям – оригинальности в когнитивном багаже, навыках, особенностях мышления, которые проявляются в раннем взрослом возрасте, но сохраняются, как правило, долго и в старости.

Улучшение условий, определяющих интеллектуальное развитие в течение первых десятилетий жизни, несет в себе большой потенциал совершенствования когнитивных способностей в раннем, среднем и позднем взрослом возрасте. Развитый, тренированный интеллект уменьшает нагрузку на общественное здравоохранение в старости индивида, помогает избежать деменции. О положительном влиянии тренировки по результатам исследования 16366 мужчин и 15098 женщин старше 60 лет сообщили индийские врачи [3]. Когнитивная функция (память, ориентация, счет, исполнительная функция и перечисление названий объектов) возросла почти вдвое (в 1,98 раза от исходной для мужчин и в 2,32 раза для женщин) по сравнению с нетренирующимся контролем.

Канадские врачи показали, что в старости благотворная роль физических нагрузок возрастает. У стариков ходьба увеличивала общую продолжительность сна, снижала частоту пробуждений. У молодых такого действия не наблюдали [4].

Творческая активность, участие в когнитивно-стимулирующей деятельности замедляет появление признаков когнитивной недостаточности, препятствует развитию деменции [5]. Авторы исследовали индивидуальную и комбинированную связь четырех когнитивных показателей (уровень образования, сложность профессии, социальная активность и когнитивно-стимулирующие виды досуга) с объективным и субъективным познанием [5]. Уровень образова-

ния и участие в когнитивно-стимулирующем досуге были индивидуально связаны с эффективностью памяти. Результаты были классифицированы на основе того, насколько высоко участники оценивали индексы когнитивной вовлеченности по шкале от нуля до четырех. По сравнению с участниками «без индексов», участники с двумя или более индексами продемонстрировали существенное улучшение результатов сохранения памяти.

В отношении пластичности, механизмов развития и деградации память и когнитивная способность вообще оказались сходными с особенностями демонстрируемыми мускулатурой. Более разнообразные и объёмные когнитивные нагрузки на ранних этапах развития обеспечивали больший объём и свободу использования памяти в поздние годы жизни [1]. Справедливость принципа «кто не работает – тот не ест» подтверждает распространённость когнитивной недостаточности среди обитателей домов престарелых [1]. «Недостаточные» отличались плохим аппетитом. На наш взгляд, у этой категории людей возможно отрицательно действующее вмешательство депрессии в результаты исследования. Те же авторы регистрировали высокий когнитивный уровень на поздних этапах жизни у людей умственно-деятельных смолоду.

Мультимодальные вмешательства с целью сохранить и, тем более, восстановить когнитивные способности должны включать комплекс физических нагрузок, полноценное питание, антидепрессивные меры, оптимизацию сна, достаточную общественную активность, благоприятную эмоциональную среду.

Опубликованы результаты исследования того, как участие в обогащающей когнитивной, физической и социальной деятельности в детстве влияет на когнитивные функции спустя десятилетия [6]. Восемьдесят восемь здоровых пожилых людей (в возрасте 60–80 лет) заполняли ретроспективную анкету, касающуюся их участия в 7 видах деятельности (игра на музыкальных инструментах, изучение языков, занятия спортом, уроки искусства/танцев, скаутинг, волонтерство, семейный отдых) в возрасте до 13 лет. После учета состояния на момент исследования (возраст, уровень образования, социально-экономический статус, образ жизни) оказалось, что большая активность в детстве значимо коррелировала с лучшим словарным запасом и стилем речи, эпизодической памятью и лабильностью интеллекта у взрослого. Авторы заключили, что участие в большем объеме когнитивно обогащающих действий в раннем возрасте является отражением как социально-контекстной среды человека, так и вовлеченности в эту среду. Разнообразие интеллектуальных

занятий в детстве поднимает на более высокий уровень когнитивные функции, способствует успешности на протяжении последующей жизни. Но не бесконечно долго. Ситуация меняется после 80 лет. По описаниям китайских врачей, среди этой категории жителей Шанхая увеличивается риск когнитивного снижения. Оно значительнее при исходной умственной и физической пассивности [7].

Ранняя когнитивная недостаточность поддается исправлению, но не полному. Взрослые из неблагополучного детства, достигшие впоследствии высокого уровня образования, часто переживают деменцию легче по состоянию и короче по продолжительности, чем взрослые из благополучного детства, оставшиеся на низком уровне образования [8]. Усугубляют проявление деменции курение, физическая пассивность, ожирение, чрезмерное употребление алкоголя, гипертоническая болезнь, диабет, одиночество, воздействие загрязненного воздуха, нарушения сна. В США деменции боятся больше, чем сердечно-сосудистых болезней и диабета, хотя и считают её неизбежным спутником старости, причиной любых зависимостей, ударом по личным, семейным и даже правительственным ресурсам. Литература склоняет нас к согласию с американским взглядом за исключением слова «неизбежным». Нам кажется житейски и мировоззренчески правильнее (мудрее) ориентироваться на другую цитату: «взаимодействие между этими образовательными, когнитивными и социальными факторами в детстве и раннем взрослом возрасте формирует индивидуальные активности и способности, которые сохраняются на протяжении всей жизни» [2].

В 2020 году международная группа исследователей опубликовала когнитивные характеристики населения США [9] по данным о ментальном здоровье при выходе на пенсию в 1998–2014 годах 29304 американцев.

Исследовали главные показатели когнитивной недостаточности: риск сокращения срока жизни, возраст выявления недостаточности, продолжительность инвалидности. Анализировали слабые и значительные (деменция) когнитивные нарушения, а также учитывали такие характеристики, как пол, раса, национальность, образование. По мнению авторов результаты исследования отражают многомерную картину первого комплексного анализа когнитивного здоровья населения США старше 50 лет. Авторы оценивают вероятность развития деменции: 37% для женщин и 24% для мужчин. Продолжительность жизни: 83 года для женщин и 79 для мужчин. По статистике из трёх жителей США, доживших до 70 лет, двое – с когнитивными нарушениями. Для женщин статистика предсказывает жизнь

с легкими когнитивными нарушениями 4,2 года, с деменцией — 3,2 года; Аналогичные показатели характерны и для мужчин. Важный вывод заключается в том, что для наиболее благополучных групп (т.е. белых и/или лиц с высшим образованием) когнитивные нарушения проявляются с задержкой и смещаются к самому концу жизни. Неблагополучные по рассматриваемой проблеме группы (чернокожие и/или люди с низким уровнем образования) отличаются укороченным общим сроком жизни, большей вероятностью заболевания, более ранним возрастом начала болезни и, соответственно, большим количеством лет жизни с когнитивными нарушениями. Для мужчин, имеющих как минимум степень младшего специалиста, риск слабоумия в течение жизни составляет 21%, а для мужчин с образованием ниже среднего — 35%. Ожидаемая продолжительность жизни белых женщин с когнитивными нарушениями составляет 6 лет, а для чернокожих женщин и латиноамериканок 12 и 13 лет.

Авторы статьи считают, что эти образовательные и расовые/этнические различия подчеркивают очень неравномерное бремя когнитивных нарушений. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы определить механизмы, приводящие к таким различиям в когнитивных нарушениях. Выяснение механизмов может подсказать профилактические меры и терапию. Мы — авторы этого обзора — добавим замечание о целесообразности контроля и соответствующих поправок на вполне вероятное присутствие в расовых/этнических различиях социальной составляющей. Так в сравнительном исследовании по ожидаемой продолжительности жизни без инвалидности населения Англии и США разницы не обнаружено [10], хотя по этническому составу населения этих стран различаются.

Продолжительная жизнь без ментальной инвалидности — заветная мечта многих жителей Земли. Исследование индийских врачей (31 464 участника исследования с почти равным числом мужчин и женщин) показывает, что такая мечта осуществима в разумных пределах даже, что очень важно на наш взгляд, для бедных людей старше 60 лет. Результаты демонстрируют положительное влияние частых физических упражнений на когнитивные функции пожилых людей, то-есть, регулярная физическая активность может рассматриваться как эффективный фактор образа жизни, способствующий здоровому когнитивному старению, не говоря уже о физическом старении. Когнитивную способность оценивали по показателям: памяти, ориентации, решению арифметических задач, исполнительным функциям, запоминанию объектов.

Авторы убедились, что регулярная и достаточная по величине физическая активность может стать эффективным фактором образа жизни, способствующим здоровому когнитивному старению [11].

Всё, совершающееся в организме, управляется мозгом и влияет на мозг. Поэтому вполне разумной представляется задача авторов большой (65 стр.) обзорной статьи — монографии [12] ответить на вопрос: создают ли различные виды интеллектуальной, физической и социальной деятельности эффекты обогащения когнитивных функций, то есть улучшают ли они когнитивные способности в разные периоды жизни взрослого человека и, в особенности, в пожилом возрасте. Поведение — когнитивная функция. Чтобы эта функция не угасала, а лучше, — развивалась, авторы рекомендуют всеми доступными приемами: физическими, интеллектуальными, волевыми усложнять поведение — создавать и решать физические и мыслительные задачи. «Показано, что воображение и наблюдение моторных действий приводят к активации тех же областей мозга, что и их физические аналоги, и, что они могут вызывать такие же пластические изменения в моторной системе, что и реальная физическая тренировка» [13]. Человек, желающий пожить долго, должен благоприятно для своей мечты, использовать неизвестность предела своего здоровья. От сознательной, нарочитой и разумной по величине гипероценки предела он только выиграет. В соответствии с этой концепцией неизбежное возрастное ухудшение функций должно встречать в организме неприятие этого ухудшения — реакцию, направленную мыслью и действием на интеллектуальное и двигательное совершенствование, не опровергать в себе мнение о том, что поведение может улучшать когнитивные функции, а верить, причем вполне обоснованно, в справедливость этого мнения. Ход нормального старения формирует зону возможного осуществления функций, которая отражает специфические способности-характеристики человека и связанные с возрастом ограничения. Люди сами влияют на то, функционируют ли они в более высоких или низких диапазонах этой зоны, участвуя или воздерживаясь от полезной интеллектуальной, физической и социальной деятельности. Чувство границ зоны называют житейской мудростью.

Скорость старения может быть замедлена фармацевтическими препаратами [14] и многими другими способами, например, при помощи средств нормализации показателей системной эндотоксинемии [15].

Управляя всем в организме, мозг по принципу обратной связи и сам всем организмом управляется. Большое медицинское значение управляемой нейропластич-

ности уже не только осознается, но и вышло на уровень клинического использования [16], пока еще незначительного сравнительно с возможностями. Под нейромодуляцией понимают любое оптимизирующее воздействие на функции ЦНС в условиях ее патологии, основанное на активации процессов позитивной нейропластичности, т.е. всего многообразия изменений структуры и функций мозга в течение жизни. Фундаментальной составляющей нейропластичности является синаптическая пластичность. Многообразие синаптических контактов, сформированных множеством путей, комплексов сочетающихся клеток и структур мозга, объясняет разнообразие феноменов нейропластичности.

Когнитивные возрастные изменения определяются генетикой и образом жизни. Важный компонент когнитивного статуса человека — самооценка его значения, возможностей и оптимальность использования. Английские врачи представили недавние результаты ковариационного анализа этих данных [17] по результатам изучения 3130 соотечественников старше 40 лет. Это был первый опрос, проведенный в масштабах Соединенного Королевства, в ходе которого выяснили мнение взрослых об образе жизни, определяющем когнитивное старение.

Большинство респондентов (62,2%) выразили мнение, что генетика и образ жизни в равной степени ответственны за их возрастные когнитивные изменения. Как можно было предвидеть, респонденты, которые считали, что генетические факторы имеют большее влияние, с меньшей надеждой ожидали сохранения когнитивных навыков с возрастом и вовсе не надеялись на улучшение. Мужчины чаще, чем женщины, считали, что гены в большей степени влияют на их когнитивные способности. Они были менее уверены в том, какое поведение может быть связано со здоровьем мозга, и неохотно участвовали в поведении, включающем в качестве полезных для здоровья новые физические и интеллектуальные нагрузки. Имели в виду, что геном ни физкультурой, ни алгеброй не переделаешь. Поэтому мнения некоторых респондентов не согласовывались с объективными результатами исследования старения. Авторы считают необходимым просвещать таких участников исследований. Убеждать в приоритете фактических результатов над их мыслительными конструкциями.

Возможно, что люди, которые хорошо учатся в школе и участвуют в стимулирующих мероприятиях, таковы потому, что генетически предрасположены к увеличению своего когнитивного резерва. Ранее сообщалось, что женщины с большей убежденностью, чем мужчины, верят, что люди могут изменять (улучшать) когнитивные способности в любом воз-

расте, и более склонны к освоению и совершенствованию соответствующих навыков.

Имея в виду, специфику ответов, обусловленную возрастом, полом, культурой респондента, старались учесть это и в специфике вопросов, чтобы получить истинно значимый ответ. Предлагали респондентам выбор вариантов ответа: «полностью определяются нашими генами», «в основном определяются нашими генами», «вероятно, наполовину определяется нашими генами и наполовину нашим образом жизни», «в основном определяется нашим образом жизни» или «полностью определяется нашим образом жизни». Полученные по такой схеме ответы оказались достаточными для организации когнитивной терапии. Следует подчеркнуть: воплощение геномом обусловленных возможностей или ограничений в состоянии организма, определяется средой. Для генома среда в первом приближении — это организм с условиями его жизни, в которой нет независимых от чего-то или не влияющих на что-то изменений. Всё взаимосвязано. Мысленно выполняемые (воображаемые) движения способствуют реабилитации и оптимизации реальных, физических движений. Разумная и настойчивая гигиена старения — надежная профилактика деменции.

Литература

1. Tao Zhang, Yan Ren, Ping Shen, Shixie Jiang, Yanrong, Yan Wang et al. Prevalence and Associated Risk Factors of Cognitive Frailty: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Aging Neurosci.* 2022;Jan28;13:755926.
2. Martin Lövdén, Laura Fratiglioni, Maria Glymour, Ulman Lindenberger, Elliot M Tucker-Drob. Education and Cognitive Functioning Across the Life Span. *Psychol Sci Public Interest.* 2020;Aug;21(1):6-41.
3. Manish Kumar, Shobhit Srivastava, T Muhammad. Relationship between physical activity and cognitive functioning among older Indian adults. *Sci Rep.* 2022;Feb 17;12(1):2725.
4. Tara Kuhn, Jennifer Heisz. Cardiorespiratory Fitness May Protect Memory for Poorer Sleepers. *Front Psychol.* 2022; 13: 793875.
5. Lisa Bransby, Rachel F Buckley, Emily Rosenich, Katherine H Franks, Nawaf Yassi, Paul Maruff et al. The relationship between cognitive engagement and better memory in midlife. *Alzheimers Dement (Amst).* 2022;Feb 9;14(1):e12278.
6. Timothy P Morris, Meishan Ai, Laura Chaddock-Heyman, Edward McAuley, Charles H Hillman, Arthur F Kramer. Relationships between enriching early life experiences and cognitive function later in life are mediated by educational attainment. *J Cogn Enhanc.* 2021;Dec;5:449-458.
7. Lei Shen, Xiaochen Tang, Chunbo Li, Zhenying Qian, Jijun Wang, and Wei Liu. Status and Factors of Cognitive Function Among Older Adults in Urban China. *Front Psychol.* 2021; 12: 728165.
8. Hyungmin Cha, Mateo P. Farina, and Mark D. Hayward. Socioeconomic status across the life course and dementia-

- status life expectancy among older Americans. *SSM Popul Health*. 2021;Sep; 15: 100921.
9. Jo Mhairi Hale, Daniel C Schneider, Neil K Mehta, Mikko Myrskylä Cognitive impairment in the U.S.: Lifetime risk, age at onset, and years impaired. *SSM Popul Health*. 2020 Mar31;11:100577.
 10. Paola Zaninotto, George David Batty, Sari Stenholm, Ichiro Kawachi, Martin Hyde, Marcel Goldberg et al. Socioeconomic Inequalities in Disability-free Life Expectancy in Older People from England and the United States: A Cross-national Population-Based Study. *J Gerontol ABIol Sci Med Sci*. 2020 Apr 17;75(5):906-913.
 11. Manish Kumar, Shobhit Srivastava, T Muhammad. Relationship between physical activity and cognitive functioning among older Indian adults. *Sci Rep*. 2022;Feb 17;12(1):2725.
 12. Christopher Hertzog, Arthur F Kramer, Robert S Wilson, Ulman Lindenberger. Enrichment Effects on Adult Cognitive Development: Can the Functional Capacity of Older Adults Be Preserved and Enhanced? *Psychol Sci Public Interest*. 2008 Oct; 9(1):1-65.
 13. Ю.К. Столбков, Ю.П. Герасимов. Когнитивная двигательная реабилитация: воображение и наблюдение моторных действий. *Физиология человека* 2021; 47(1): 123-132.
 14. 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.
 15. Яковлев М.Ю. Кишечный эндотоксин: иммунитет – воспаление – старение, как звенья одной цепи. *Патогенез* 2020; 18(1): 82-94.
 16. Нарышкин А.Г., Галанин И.В., Егоров А.Ю. Управляемая нейропластичность. *Физиология человека* 2020; 46(2): 112-120.
 17. Malwina A. Niechcial, Eleftheria Vaportzis, and Alan J. Gow. Genes Versus Lifestyles: Exploring Beliefs About the Determinants of Cognitive Ageing. *Front Psychol*. 2022; 13: 838323.
 4. Tara Kuhn, Jennifer Heisz. Cardiorespiratory Fitness May Protect Memory for Poorer Sleepers. *Front Psychol*. 2022; 13: 793875.
 5. Lisa Bransby, Rachel F Buckley, Emily Rosenich, Katherine H Franks, Nawaf Yassi, Paul Maruffetal. The relationship between cognitive engagement and better memory in midlife. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2022;Feb 9;14(1):e12278.
 6. Timothy P Morris, Meishan Ai, Laura Chaddock-Heyman, Edward McAuley, Charles H Hillman, Arthur F Kramer. Relationships between enriching early life experiences and cognitive function later in life are mediated by educational attainment. *J Cogn Enhanc*. 2021;Dec;5:449-458.
 7. Lei Shen,Xiaochen Tang,Chunbo Li,Zhenying Qian,Jijun Wang,and Wei Liu. Status and Factors of Cognitive Function Among Older Adults in Urban China. *Front Psychol*. 2021; 12: 728165.
 8. Hyungmin Cha, Mateo P. Farina, and Mark D. Hayward. Socioeconomic status across the life course and dementia-status life expectancy among older Americans.*SSM Popul Health*. 2021;Sep; 15: 100921.
 9. Jo Mhairi Hale, Daniel C Schneider, Neil K Mehta, Mikko Myrskylä Cognitive impairment in the U.S.: Lifetime risk, age at onset, and years impaired. *SSM Popul Health*. 2020 Mar31;11:100577.
 10. Paola Zaninotto, George David Batty, Sari Stenholm, Ichiro Kawachi, Martin Hyde, Marcel Goldberg et al. Socioeconomic Inequalities in Disability-free Life Expectancy in Older People from England and the United States: A Cross-national Population-Based Study. *J Gerontol ABIol Sci Med Sci*. 2020 Apr 17;75(5):906-913.
 11. Manish Kumar, Shobhit Srivastava, T Muhammad. Relationship between physical activity and cognitive functioning among older Indian adults. *Sci Rep*. 2022;Feb 17;12(1):2725.
 12. Christopher Hertzog, Arthur F Kramer, Robert S Wilson, Ulman Lindenberger. Enrichment Effects on Adult Cognitive Development: Can the Functional Capacity of Older Adults Be Preserved and Enhanced? *Psychol Sci Public Interest*. 2008 Oct; 9(1):1-65.
 13. Yu.K. Stolbkov, Yu.P. Gerasimov. Cognitive motor rehabilitation: imagination and observation of motor actions. *Human Physiology* 2021; 47(1): 123-132.
 14. Kirova Yu.I., Terekhina O.L., Shakova F.M. Morphofunctional features of astrocytes and microglia in the brain of aging rats with the course use of ethylmethylhydroxypyridine succinate. *Pathological physiology and experimental therapy* 2022; 66(1): 4-16.
 15. Yakovlev M.Y. Intestinal endotoxin: immunity - inflammation - aging, as links of the same chain. *Pathogenesis*. Volume: 18 Number: 1 Year: 2020 Pages: 82-94.
 16. A.G. Naryshkin, I.V. Galanin, A.Y. Egorov. Controlled neuroplasticity. *Human Physiology* 2020; 46(2): 112-120.
 17. Malwina A. Niechcial, Eleftheria Vaportzis, and Alan J. Gow. Genes Versus Lifestyles: Exploring Beliefs About the Determinants of Cognitive Ageing. *Front Psychol*. 2022; 13: 838323.

Referenses

1. Tao Zhang, Yan Ren , Ping Shen, Shixie Jiang , Yanrong , Yan Wang etal. Prevalence and Associated Risk Factors of Cognitive Frailty: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Aging Neurosci*. 2022;Jan28;13:755926.
2. Martin Lövdén, Laura Fratiglioni, Maria Glymour, Ulman Lindenberger, Elliot M Tucker-Drob. Education and Cognitive Functioning Across the Life Span.*Psychol Sci Public Interest*. 2020;Aug;21(1):6-41.
3. Manish Kumar, Shobhit Srivastava, T Muhammad. Relationship between physical activity and cognitive functioning among older Indian adults. *Sci Rep*. 2022;Feb 17;12(1):2725.

Сведения об авторах:

Пальцын Александр Александрович, доктор биол. наук, проф., лауреат Государственной премии СССР, гл. науч. сотр., НИИОПП, проф. каф. общей патологии и патофизиологии РМАНПО;

Гусева Мария Николаевна, докт. экон. наук, проф., ФГБОУ ВО Государственный университет управления, Кафедра управления проектом;

Свиридкина Надежда Борисовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. НИИОПП.

Методика

© Коллектив авторов, 2023
УДК 612.285.1

Степанова О.И.¹, Клёсов Р.А.¹, Семёнов Х.Х.¹, Помыткин И.А.¹, Онищенко Н.А.², Каркищенко В.Н.¹

Способ неинвазивного изучения тканевых нарушений при сахарном диабете 2 типа у мышей db/db с помощью лазерной доплеровской флуометрии

¹ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России,

143442, МО, Красногорский р-н, п. Светлые горы, д. 1;

²ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России, 123182, Москва, Россия, ул. Щукинская, д. 1

Введение. Согласно данным литературы Аппарат лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ» не был ранее использован для доклинических исследований тканевых нарушений на мелких лабораторных животных.

Цель исследования – изучение возможности использования аппарата лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ» на мелких лабораторных животных – мутантных мышах линии C57BL/KsJYLepr^{db/+} (db/db) – в качестве новой тест системы, для оценки тканевых изменений при сахарном диабете 2 типа (СД 2).

Методика. Патологические изменения у мышей с СД изучали на генетической модели СД 2 у мутантных мышей C57BL/KsJYLepr^{db/+} (db/db) (n=40); для контроля использовали группу фенотипически здоровых гетерозиготных мышей той же линии (db/+m) (n=16). Общее количество животных составляло 56 голов. Исследование проводили на аппарате лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ», который адаптирован приспособлением, ограничивающим подвижность мышей во время измерений. Аппарат «ЛАЗМА СТ» позволяет осуществлять одновременный неинвазивный контроль состояния микроциркуляции крови и лимфы, а также определять уровень активности митохондриальных окислительных коферментов в тканях. Дополнительно измеряли уровень глюкозы в крови фотометрическим методом на приборе Accu-Chek (Швейцария).

Результаты. Использование аппарата ЛАЗМА СТ позволило в реальном времени неинвазивно изучить в динамике нарушения микроциркуляции (крови и лимфы) и окислительного метаболизма (НАДН и ФАД) при СД 2, сопоставить их с нарушениями глюкозы в крови, а также прогнозировать тяжесть выявленных нарушений в условиях компенсации, субкомпенсации и декомпенсации. Аппарат ЛАЗМА СТ позволил одновременно выявить начавшиеся нарушения липидного и белкового обмена (пигменты-липофусцин и порфирин), которые свидетельствуют о тяжести прогноза заболевания.

Выводы. Аппарат ЛАЗМА СТ, адаптированный для применения у мышей с генетической моделью СД 2 типа, представляет собой новую неинвазивную, информативную и безопасную тест-систему, позволяющую в динамике контролировать и прогнозировать тяжесть нарушений микроциркуляции и тканевых окислительно-восстановительных коферментов – НАДН и – ФАД.

Ключевые слова: НАДН; ФАД; мыши db/d; Аппарат лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ»; СД 2 типа

Для цитирования: Степанова О.И., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х., Помыткин И.А., Онищенко Н.А., Каркищенко В.Н. Способ неинвазивного изучения тканевых нарушений при сахарном диабете 2 типа у мышей db/db с помощью лазерной доплеровской флуометрии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(2): 118-129.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.118-129

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Степанова О.И., Клёсов Р.А., Помыткин И.А.; сбор и обработка материала – Степанова О.И., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х.; техническая подготовка материала, подготовка иллюстративного материала – Степанова О.И., Онищенко Н.А.; написание текста – Степанова О.И.; редактирование – Онищенко Н.А., Каркищенко В.Н. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Степанова Ольга Ивановна, e-mail: olgsima50@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 21.12.2022

Принята к печати 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Stepanova O.I.¹, Klesov R.A.¹, Semenov Kh.Kh.¹, Pomytkin I.A.¹, Onishchenko N.A.², Karkischenko V.N.¹

A method for noninvasive studying tissue disorders in type 2 diabetes mellitus in db/db mice using laser Doppler flowmetry

¹Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Village Svetlye Gory 1, Krasnogorsky District of Moscow Region, 143442, Russian Federation;

²Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Shchukinskaya St. 1, Moscow, 123182, Russian Federation

According to published reports, the LAZMA ST laser diagnostic apparatus has not been previously used for preclinical studies of tissue disorders in small laboratory animals.

The aim of this study was to evaluate a possibility of using the LAZMA ST laser diagnostic apparatus in small laboratory animals, C57BL/KsJYLeprdb/+ (db/db) mutant mice, as a new test system for assessing changes in tissues in type 2 diabetes mellitus (DM2). **Methods.** Pathological changes were studied on a genetic model of DM2 in C57BL/KsJYLeprdb/+ (db/db) mutant mice ($n=40$). Phenotypically healthy heterozygous mice of the same strain (db/+m) ($n=16$) were used as a control group. The study was performed with a LAZMA ST laser diagnostic apparatus that was adapted for mice with a device limiting their mobility during measurements. LAZMA ST allows simultaneous noninvasive monitoring of blood and lymph microcirculation along with measurements of tissue activity of mitochondrial oxidative coenzymes. Additionally, blood glucose was measured photometrically with an Accu-Chek (Switzerland) glucometer.

Results. The use of LAZMA ST allowed noninvasive, real-time evaluation of disorders in blood and lymph microcirculation and oxidative metabolism (NADH and FAD) in DM2, comparing them with glycemic disorders, and also predicting severity of these disorders in the conditions of DM2 compensation, subcompensation and decompensation. The LAZMA ST device provided simultaneous detection of the onset of lipid and protein metabolic disorders (lipofuscin and porphyrin pigments) to predict severity of the disease.

Conclusion. The LAZMA ST device adapted for using in a murine genetic model of DM2 is a new, noninvasive, informative, and safe test system that allows to monitor and predict the dynamics of severity of disorders in microcirculation and tissue redox coenzymes, NADH and FAD.

Keywords: NADH; FAD; db/db mice; laser diagnostic device LAZMA ST; type 2 diabetes mellitus

For citation: Stepanova O.I., Klesov R.A., Semenov Kh. Kh., Pomytkin I.A., Onishchenko N.A., Karkischenko V.N. A method for noninvasive studying tissue disorders in type 2 diabetes mellitus in db/db mice using laser Doppler flowmetry. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(2): 118-129. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02. 118-129

Author's contribution: research concept and design – Stepanova O.I., Klesov R.A., Pomytkin I.A.; Data collection – Stepanova O.I., Klesov R.A., Semenov Kh. Kh.; Technical data preparation, preparation of illustrative material – Stepanova O.I., Onishchenko N.A.; text writing – Stepanova O.I.; editing – Onishchenko N.A., Karkischenko V.N. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Olga I. Stepanova*, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, e-mail: olgsima50@mail.ru

Financing. The study has no sponsorship.

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

Received 21.12.2022

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

Введение

Сахарный диабет 1 и 2 типа – тяжелые хронические заболевания, характеризующиеся нарушением всех видов обмена веществ и в первую очередь, углеводного [1–3]. Развитие СД 1 типа характеризуется снижением выработки инсулина островковыми клетками поджелудочной железы, а развитие СД 2 типа обусловлено

нарушением трансмембранного транспорта инсулина и формированием в организме состояния инсулинорезистентности тканей и гиперинсулинемии. Недостаточность реализации регуляторной роли инсулина на углеводный обмен в организме приводит к гипергликемии, развитию оксидативного стресса, за счет на-

копления супероксидных радикалов, активации полиолового пути метаболизма глюкозы и протеинкиназы С, а также к накоплению конечных токсичных продуктов гликирования [2]. Эти перечисленные факторы становятся при СД ведущими причинами возникновения эндотелиальных дисфункций в сосудах различных органов и систем с развитием микро- и макроангиопатий, которые ведут к возникновению тяжелых осложнений [2, 4–7] и повышают смертность таких больных [8]. Развитие эндотелиальных дисфункций и ангиопатий связано непосредственно со снижением стимуляции оксидом азота (NO) активности мембранной Na^+/K^+ -АТФ-азы, которое обусловлено снижением синтеза NO в эндотелиальных клетках из-за снижения образования в эндотелии Ca^{2+} зависимой NO-синтазы. Между тем дефицит NO-синтазы возникает не только в клетках сосудистого эндотелия, но и в клетках других органов, индуцирующих образование NO-синтазы. В результате наряду с эндотелиальными дисфункциями (диабетическая нефропатия, ретинопатия, диабетическая стопа и др.) снижение синтеза нейрональной и индуцированной NO-синтазы ведет при СД к развитию тяжелых нейропатий (диабетическая нейропатия) [7, 9] и повреждению сердечно-сосудистой системы [3, 5, 6]. Сниженный уровень глюкозы в тканях при СД снижает уровень окислительных процессов в них, что ведёт к нарушению транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий клеток. Увеличение доступности электронов и/или насыщенности митохондрий электронами способствует восстановлению кислорода до супероксид-анион-радикалов, которые дополнительно вызывают дегенеративные изменения в митохондриях клеток. Развивающийся дисбаланс редокс – системы митохондрий (нарушение соотношения НАДН и НАД, ФАДН и ФАД) и окислительный стресс (образование свободных радикалов) становятся таким образом ведущими факторами гипоксического (ишемического) повреждения органов при СД. Показано, что вазодилатация и усиление кровотока являются ранними сосудистыми реакциями на острую гликемию и тканевую гипоксию [10–15], а проведенный мета-анализ [16], подтвердил четкую взаимосвязь между патологическими проявлениями сахарного диабета и нарушением кожной микроциркуляции [17].

Относительно недавно для оценки состояния микроциркуляторного русла было предложено использовать методы высокочастотной ультразвуковой доплерографии и лазерной доплеровской флуометрии (ЛДФ) [18, 19], которые обладают несомненными достоинствами, ввиду простоты их использования, неинвазивности, а также отсутствия противопоказаний

к применению в клинике при обследовании больных, в том числе с СД.

Метод ЛДФ в настоящее время активно используется в клинике для диагностики диабетической микроангиопатии [15, 20–22]. С помощью этого метода исследуются амплитуды колебательных процессов сосудистой стенки, обусловленные эндотелиальными, миогенными и нейрогенными механизмами в микроциркуляторном русле. В РФ исследование микроциркуляторного русла в клинике проводится на лазерном диагностическом аппарате «ЛАЗМА СТ» (разработчики А.И. Крупаткин, В.В. Сидоров Технопарк «Строгино» ООО НПП «ЛАЗМА» E-mail: lazma@plusnet.ru) [18].

Аппарат лазерный диагностический «ЛАЗМА СТ», позволяет определять тяжесть заболевания: субкомпенсированные нарушения; декомпенсированные нарушения; признаки диабетической стопы и оценивать эффективность лекарственной терапии при индивидуальном подборе препаратов. Области, используемые для диагностики микроциркуляции у людей – лицо, конечности и палец стопы, которые наиболее чувствительны к диабетическим осложнениям.

В ходе одной диагностической процедуры на этом аппарате одновременно контролируются активность окислительных коферментов способом лазерной флуоресцентной спектроскопии и состояние микроциркуляции крови и лимфы в той же зоне методом лазерной доплеровской флуометрии, а эффективность лекарственной терапии оценивается путем сравнения результатов измерения с контрольными значениями диагностических показателей.

Отсутствие в литературе данных по использованию аппарата лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ» для экспериментального изучения тканевых нарушений на мелких лабораторных животных, в том числе с моделью сахарного диабета, для контроля тяжести состояния и оценки эффективности терапии, позволило нам сформулировать цель и задачи настоящего исследования.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности использования аппарата лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ» на мелких лабораторных животных – мутантных мышах линии C57BL/KsJYLepr^{db}/+ (db/db)- в качестве нового диагностического подхода для оценки тканевых изменений при сахарном диабете 2 типа (СД 2).

Для достижения указанной цели нами были поставлены следующие задачи:

– Изучить функциональные возможности лазерного диагностического аппарата «ЛАЗМА СТ» и адаптировать его для экспериментальных исследований на мелких лабораторных животных.

– Оценить эффективность применения подготовленного аппарата лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ» для контроля тяжести микроциркуляторно-тканевых нарушений у лабораторных мышей с СД 2 типа.

Методика

Лазерный диагностический аппарат «ЛАЗМА СТ» фирмы ООО НПП «ЛАЗМА» Россия включает в себя анализатор периферического кровотока, лимфотока и окислительно-восстановительных коферментов ткани комплект «ЛАЗМА-Д» и блока для температурных и электростимуляционных функциональных проб «ЛАЗМА -ТЕСТ» [18, 19, 23].

Достоинство аппарата «ЛАЗМА СТ» заключается в возможности одновременного контроля состояния микроциркуляции (крови и лимфы) методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) и окислительно-восстановительных процессов методом лазерной флуоресцентной спектроскопии (ЛФС). При ЛДФ аппарат проводит зондирование ткани лазерным излучением, а затем обработку отраженного от ткани излучения путем выделения доплеровского сдвига частоты отраженного сигнала, пропорционального скорости движения частиц (клеток крови, лимфы) в микроциркуляторном русле. При ЛФС проводится регистрация спектра вторичного излучения (флуоресценция) ткани при ее зондировании способом флуоресцентной спектроскопии на длине волны, соответствующей длине волны максимального поглощения излучения исследуемым коферментом [24, 25].

Аппарат «ЛАЗМА СТ» (рис. 1) в реальном времени определяет состояние микроциркуляции (уровень периферического кровотока, лимфотока) и обменных процессов (содержание коферментов – кофермент -НАДН -восстановленный никотинамид-адениндинуклеотид, и кофермент -ФАД – окисленный флавиноадениндинуклеотид, которые являются биомаркерами состояния окислительного метаболизма в ткани). В аппарате применяются источники возбуждения двух длин волн: УФ- 365 нм (для НАДН в диапазоне 460 нм) и Син. – 450 нм (для ФАД в диапазоне 515 нм).

Для оценки флуоресценции исследуемых коферментов применяют отношения нормативных амплитуд: амплитуды их флуоресценции к амплитуде интенсивности обратно-рассеянного излучения, определяемые по формуле: $A_{\text{надн}} = A_{\text{фл. (УФ)}} / A_{\text{уф}}$; $A_{\text{фад}} = A_{\text{фл. (Син.)}} / A_{\text{син.}}$, где: $A_{\text{фл. (УФ)}}$ и $A_{\text{фл. (Син.)}}$ – максимумы (пики) интенсивности излучения в линиях флуоресценции соответствующих коферментов, $A_{\text{уф}}$ и $A_{\text{син.}}$ – максимумы интенсивностей обратно-рассеянного излучения. Показатели кровотока и лимфотока определяются косвенными параметрами по оптическим характеристикам области зондирования в относительных единицах, как функция времени, а нормативные амплитуды флуоресценции в ткани определяются в безмерных единицах программного обеспечения прибора.

Патологические изменения в организме мышей с СД 2 типа изучали на генетической модели сахарного

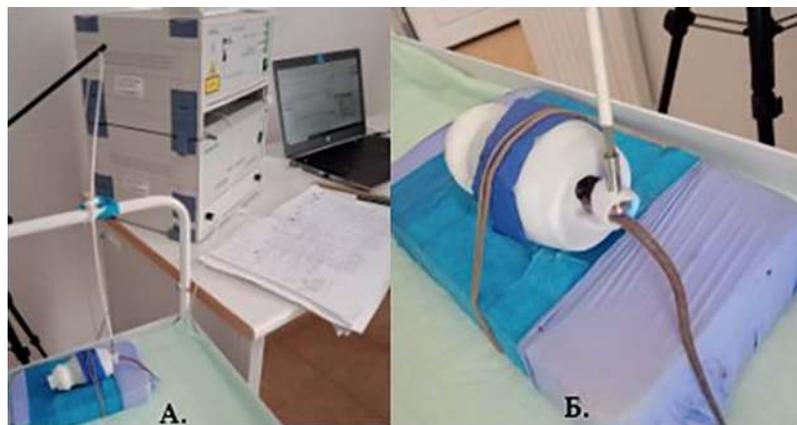


Рис. 1. Аппарат «ЛАЗМА СТ» для исследования состояния микроциркуляции (кровоток, лимфоток) и окислительных коферментов -НАДН и -ФАД. в ткани животного.

А.– Аппарат «ЛАЗМА СТ» с подключённой камерой в работе; Б. – Камера для мышей с массой тела 40–50 г, обеспечивающая состояние покоя животного.

Fig. 1. Apparatus «LAZMA ST» for studying the state of microcirculation (blood flow, lymph flow) and oxidative coenzymes -NADH and -FAD. in animal tissue

A.– Apparatus «LAZMA ST» with a connected camera in operation.; B. – A chamber for mice with a body weight of 40–50 g, providing a resting state of the animal.

диабета на мутантных мышцах C57BL/KsJYLepr^{db}/+(V/Ks-Lepr^{db}/+) – (db/db), которые несут рецессивный ген leptinreceptor-Lepr^{db} – (db) (8-я группа сцепления, 4-я хромосома). Ген db в гомозиготном состоянии вызывает диабет, сходный с diabetesmellitus, с дегрануляцией β-клеток в островках поджелудочной железы (ПЖ), но без дефицита инсулина. Мыши – диабетички V/Ks-Lepr^{db}/Lepr^{db} (db/db) ($n=40$) обоих полов бесплодны. Для контроля динамики развития СД 2 типа использовали группу фенотипически здоровых гетерозиготных мышей той же линии V/Ks-Lepr^{db}/+ (db/+m) ($n=16$). Общее количество животных, задействованных в эксперименте, составляло 56 голов.

Кроме динамического изучения показателей микроциркуляции и тканевых окислительно-восстановительных коферментов изучали динамику изменения глюкозы в крови фотометрическим методом на приборе Ассу-Чек (Швейцария) с использованием тест-полосок.

В ходе работы нами была адаптирована платформа для размещения животных. Платформа ограничивала их подвижность (обеспечивала состояние покоя) (рис. 1, Б) для устранения помех и получения точных показаний микроциркуляции (периферического кровотока, лимфотока) и обменных процессов (содержания окислительных коферментов в ткани). Платформа была подобрана по массе тела мышей (20–70 г), для чего использовали специально подготовленные съемные камеры и фиксатор зонда, который фиксируется на хвосте у мыши.

После размещения животного в съёмной камере, прибор ЛАЗМА СТ выводил показатели на компьютер по установленной специальной программе, которая позволяет оценивать не только состояние тканевых изменений, но и одновременно дает оценку сосудистого тонуса и окислительного метаболизма в ткани хвоста в соответствии с протоколом программы прибора (в режиме реального времени). Согласно протоколу, длительность изучения записи ведется в течение 4 минут: из них 2 минуты (в УФ)- запись показателей кровотока, лимфотока и амплитуды флуоресценции НАДН и 2 минуты (в Син.) продолжается регистрация показателей кровотока, лимфотока, а также регистрируются амплитуды флуоресценции ФАД. После завершения 4 минут регистрации записей выдаются следующие результаты исследований: Анадн – нормированная амплитуда флуоресценции кофермента НАДН; Афад – нормированная амплитуда флуоресценции кофермента ФАД; Мпк – среднее арифметическое значение показателя микроциркуляции кровотока; Мпл – среднее арифметическое значение

показателя микроциркуляции лимфотока; ПОМ – показатель окислительного метаболизма, это комплексный диагностический показатель, характеризующий состояние связанных между собой компартментов микроциркуляторно-тканевой системы кожи: микроциркуляции крови и биомаркеров окислительного метаболизма – коферментов НАДН и ФАД; определяется по формуле $ПОМ = M_{\text{нутр}} / (A_{\text{надн}} + A_{\text{фад}})$, где $M_{\text{нутр}}$ – среднее значение нутритивного кровотока ($M_{\text{нутр}} = A_m / (A_n + A_c)$); где A_m , A_n – амплитуды колебаний кровотока, обусловленные миогенными и нейрогенными механизмами регуляции сосудистого тонуса; A_c – амплитуда сердечных колебаний кровотока); ФС МТС – суммарный параметр обследования функционального состояния микроциркуляторно – тканевой системы, объединяющий микроциркуляцию и окислительный метаболизм; позволяет судить о степени тяжести заболевания. Эти показатели определяются автоматически программным обеспечением.

Измерение показателей НАДН, ФАД и ПОМ у мышей с СД 2 типа и в группе контроля производили после предварительной подготовки и адаптации аппарата ЛАЗМА СТ к работе на мышцах. Полученные результаты в сравниваемых группах были подвергнуты статистической обработке на персональном компьютере с предварительным использованием теста Шапиро-Уилкса на небольшом количестве выборок ($n \geq 5$), для доказательства нормальности распределения экспериментальных данных. Достоверность различий определялась с помощью t-критерия Стьюдента (стандартный программный пакет Microsoft Excel 2007). Различия считались статистически значимыми, при $p < 0,05$.

Результаты

С помощью показателей, измеряемых на приборе ЛАЗМА СТ, у мышей db/db (генетическая модель СД) с разными сроками жизни ($n=24$), была выявлена разная степень тяжести состояния, усиливающаяся по мере увеличения прожитого ими срока. Измерение НАДН, ФАД, ПОМ и ФС МТС позволило по степени тяжести развивающихся нарушений выявить 3 группы животных (рис. 2) с СД 2: с декомпенсацией ($n=10$), с повышенной активностью и субкомпенсацией ($n=8$), а также с повышенной активностью и компенсацией ($n=6$). Группу 4 составляли фенотипически здоровые мыши db/+m – гетерозиготы ($n=6$), которые были приняты за норму.

Из рисунка 2 видно, что в группе СД2 с декомпенсацией амплитуды коферментов были высокими: для кофермента НАДН – амплитуда составляла $4,37 \pm 1,85$, для кофермента – ФАД $1,45 \pm 0,36$, а показатель окис-

лительного метаболизма (ПОМ) был достоверно низким по сравнению с нормой и другими группами исследования и составлял $1,78 \pm 0,52$ ($p < 0,05$).

В группе с СД 2 с субкомпенсацией коферментов амплитуды НАДН ($1,03 \pm 0,16$) ФАД ($1,42 \pm 0,42$) и ПОМ ($7,29 \pm 1,45$) также достоверно отличались от контроля ($p < 0,05$).

В группе с компенсацией были выявлены не достоверные изменения амплитуд коферментов и ПОМ.

Среди группы животных с декомпенсацией было установлено, что 3 мыши db/db после измерения показателей (НАДН, ФАД и ПОМ), имели особенно выраженную тяжесть течения СД 2 типа: амплитуда кофермента НАДН была высокой и составляла $4,48 \pm 1,18$ при норме $0,54 \pm 0,15$ ($p < 0,05$), амплитуда кофермента – ФАД составляла $1,74 \pm 0,06$ (норма $0,77 \pm 0,13$) ($p < 0,05$) и ПОМ их имел низкие значения $1,62 \pm 0,22$ (норма $13,95 \pm 4,98$) ($p < 0,05$). Т.е. у этих 3-х мышей был выявлен достоверно выраженный низкий уровень окислительных процессов в тканях организма на фоне высокого уровня глюкозы в крови (более 33 ммоль/л). В результате в течение 3–6 последующих дней эти мыши погибли от гипергликемической комы, в возрасте 105, 151 и 167 дней.

В группе мышей db/db с декомпенсацией было выявлено животное с массой тела 40 г (рис. 3, А) и с мокнущей язвенной мацерацией кожи в области холки и ушей (срок жизни 169 дней). До возникновения мацерации масса животного составляла 54 г. Аппарат ЛАЗМА СТ позволил в реальном времени определить у этого животного состояние декомпенсированного окислительного метаболизма: амплитуды: НАДН = 2,283, ФАД = 1,358 и ПОМ = 1,939 (рис. 3, Б); уровень глюкозы в крови у этой мыши во время исследования составлял 31 ммоль/л.

В ходе данного исследования нами было установлено, что в графиках (рис. 3, Б), где отображались амплитуды коферментов НАДН (УФ) и ФАД (Син.) было выявлено формирование пиков при возбуждении с длиной волны 440 нм – первый пик в диапазоне 545 нм – 2-й пик – основной. Появление таких пиков характерно при накоплении в крови животного пигмента Липофусцина (рис. 3, Б, указан красными стрелками), который служит дополнительным доказательством тяжести нарастания патогенетических изменений в организме при данном заболевании.

Липофусцин – известен как пигмент старения (или тяжести патологии); пигмент липидной и/или глюко-

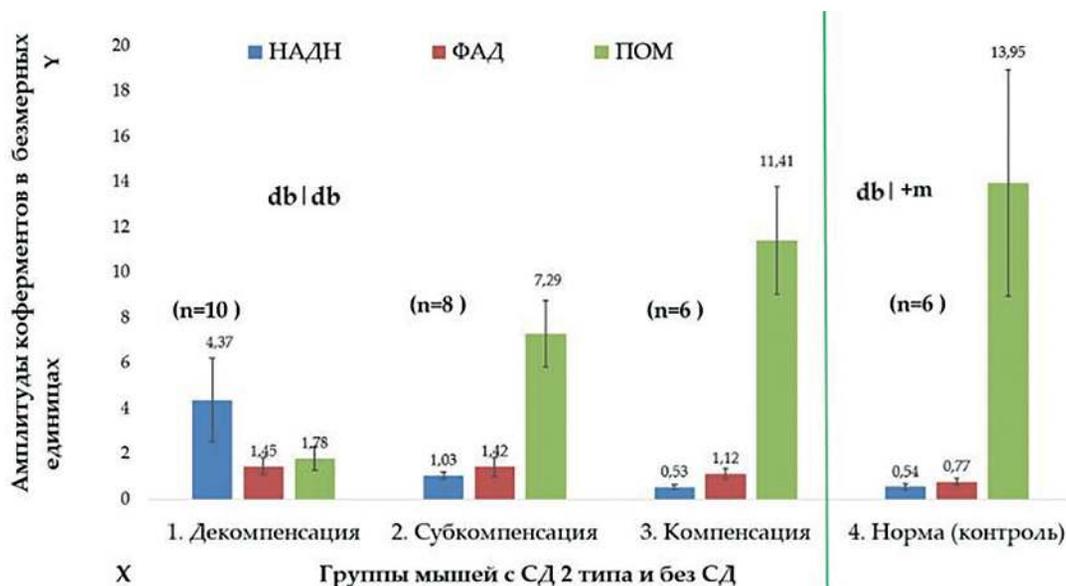


Рис. 2. Результаты измерения показателей коферментов НАДН, ФАД и ПОМ (средние значения) в ткани хвоста у мышей db/db (генетическая модель СД) и у мышей db/+m (контроль). На осях координат: X – разные группы мышей по степени выраженности тканево-метаболических нарушений (автоматическая оценка прибором): 1. Декомпенсация; 2. Субкомпенсация; 3. Компенсация; 4. Норма (контроль); Y- амплитуды коферментов в безмерных единицах.

Fig. 2. Measurement results of NADH, FAD and POM coenzymes (mean values) in tail tissue in db/db mice (genetic model of DM) and in db/+m mice (control). On the coordinate axes: X – different groups of mice according to the severity of tissue-metabolic disorders (automatic assessment by the device): 1. Decompensation; 2. Subcompensation; 3. Compensation; 4. Norm (control); Y- amplitudes of coenzymes in dimensionless units.

протеиновой природы, накапливается в пост – митотических клетках разных тканей и органов. Накопление липофусцина в клетке приводит к ее апоптозу или некрозу; в УФ – излучении 365 нм наблюдается эмиссия в области 530–650 нм [26–29]. Полученные данные как клинические (мокнущая язвенная мацерация) и биохимические (высокий уровень глюкозы в крови), так и данные по неинвазивной оценке микроциркуляторно-тканевых нарушений у декомпенсированных животных с СД, полученные на аппарате ЛАЗМА СТ, указывают на выраженную тяжесть патологии, что отражается на качестве и длительности срока жизни данной мыши db/db.

В ходе изучения тканевых изменений с помощью аппарата ЛАЗМА СТ при СД 2 типа у другой мыши db/db с субкомпенсацией, массой тела 51 г и с уровнем глюкозы в крови 24 ммоль/л, были также выявлены по-

вышенные амплитуды показатели – НАДН – 1,189 (норма 0,54±0,15); – ФАД – 1,669 (норма 0,77±0,13) и ПОМ 4,987 (норма 13,95±4,98). В реальном времени аппарат выявил у этой мыши не только формирование пиков Липофусцина, (рис. 4 красная стрелка – при возбуждении с длиной волны 440 нм – первый пик и в диапазоне 545 нм – 2 пик – основной), но также и формирование новых пиков – пиков Порфирина. Пики Порфирина формируются при возбуждении с длиной волны 770 нм – первый пик и в диапазоне 811 нм – 2 пик (рис.4 синяя стрелка) и свидетельствуют о прогрессирующем развитии заболевания.

Порфирины – это предшественники гема, азотосодержащие пигменты, лишенные железа. Избыточное накопление их крови у животных сопровождается развитием гемолитической анемии и спленомегалии. Нарушение порфиринового обмена ухудшает течение

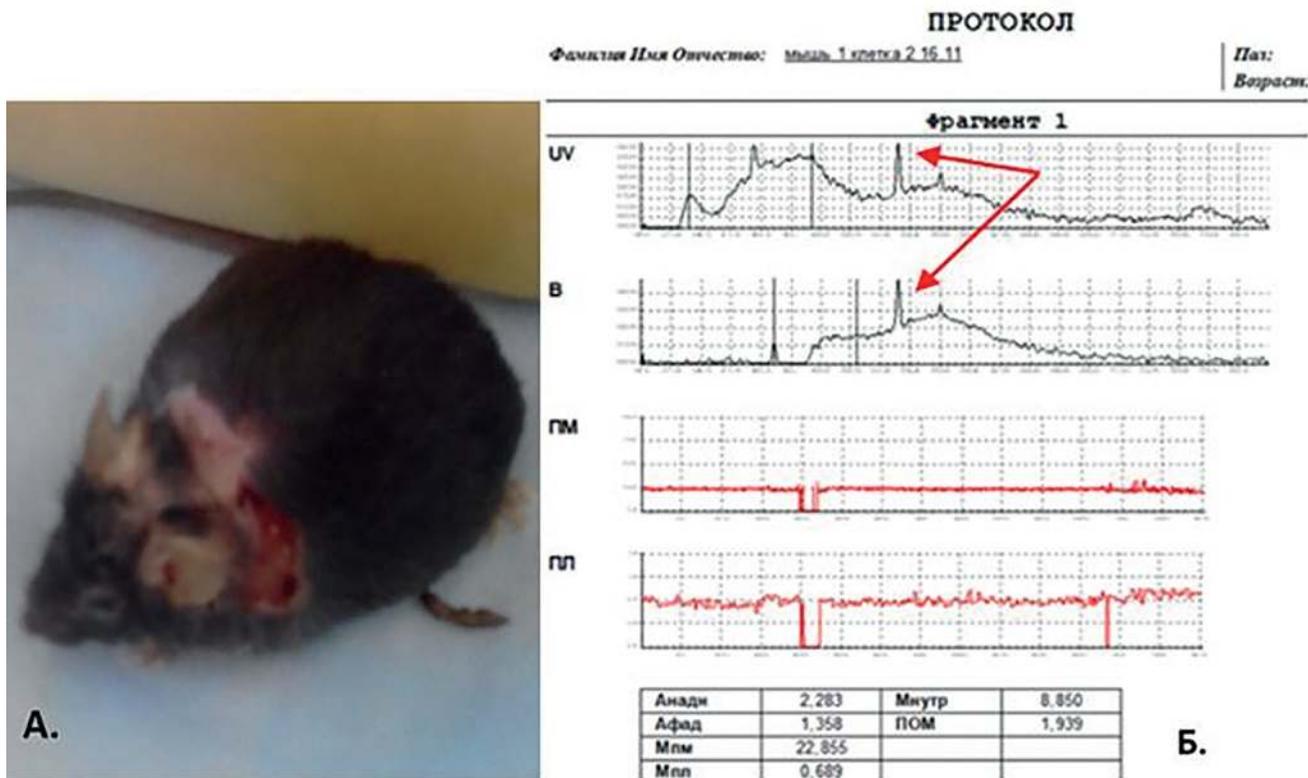


Рис. 3. Исследование микроциркулярно-тканевых процессов у мыши db/db с СД в стадии декомпенсации.

А – Мышь с мацерацией кожи в области холки.; Б – Регистрация НАДН, ФАД, кровотока и лимфотока в области хвоста. Обозначения на мониторе: UV – амплитуда НАДН; В – амплитуда ФАД; ПМ – кровотока; ПЛ – лимфотока. Стрелками обозначены пики пигмента липофусцина на кривой UV и В.

Fig. 3. Study of microcirculatory tissue processes in a db/db mouse with DM in the decompensation stage.

A – A mouse with maceration of the skin in the region of the withers.; B – Registration of NADH, FAD, blood flow and lymph flow in the tail area. Designations on the monitor: UV-amplitude of NADH; B is the FAD amplitude; PM – blood flow; PL – lymph flow. The arrows indicate the peaks of the lipofuscin pigment on the UV and B curve.

сердечно-сосудистых заболеваний, неблагоприятно влияет на углеводный метаболизм и утяжеляет течение заболевания СД 2 типа [30–35]. В УФ – излучении 365 нм наблюдается эмиссия в области 700–900 нм.

Новая диагностическая тест-система для оценки тканевых изменений при СД 2 типа у мышей db/db была использована нами также в длительных опытах в течение 220 дней, параллельно с измерением глюкозы, начиная с возраста 1–1,5 мес. До 6,5 мес мыши db/db ($n=40$) и db/+m ($n=16$).

Нами установлено (рис. 5), что в возрасте 1,5 мес организм мыши db/db, активно адаптируется (компенсируется) к нарастающей гликемии $10,3 \pm 2,4$ ммоль/л (норма для здоровых мышей db/+m $5,4 \pm 0,5$ ммоль/л). При одновременной оценке активности тканевых коферментов на аппарате ЛАЗМА СТ: были установлены

амплитуды: – НАДН= $0,77 \pm 0,21$ (норма $0,54 \pm 0,15$), – ФАД= $1,27 \pm 0,45$ (норма $0,77 \pm 0,13$) и ПОМ= $9,42 \pm 3,15$ (норма $13,95 \pm 4,98$), Аппаратом ЛАЗМА СТ формирование первых пиков Липофусцина было отмечено уже в возрасте 1,5 мес у 30% животных, однако состояние декомпенсации по окислительно-восстановительным процессам не было выявлено.

Формирование в организме животных первых признаков декомпенсаций обнаруживается в возрасте 2–2,5 мес у 14% голов, когда идет активно набор веса и уровень гликемии растет (до $18,7 \pm 3,83$ ммоль/л); появляются выраженные клинические признаки полиурии, а показатели микроциркуляции (активность трофики) медленно снижаются, амплитуды коферментов повышаются – НАДН= $1,16 \pm 0,47$, – ФАД= $1,51 \pm 0,44$ и понижается уровень ПОМ= $6,26 \pm 2,36$. Полученные

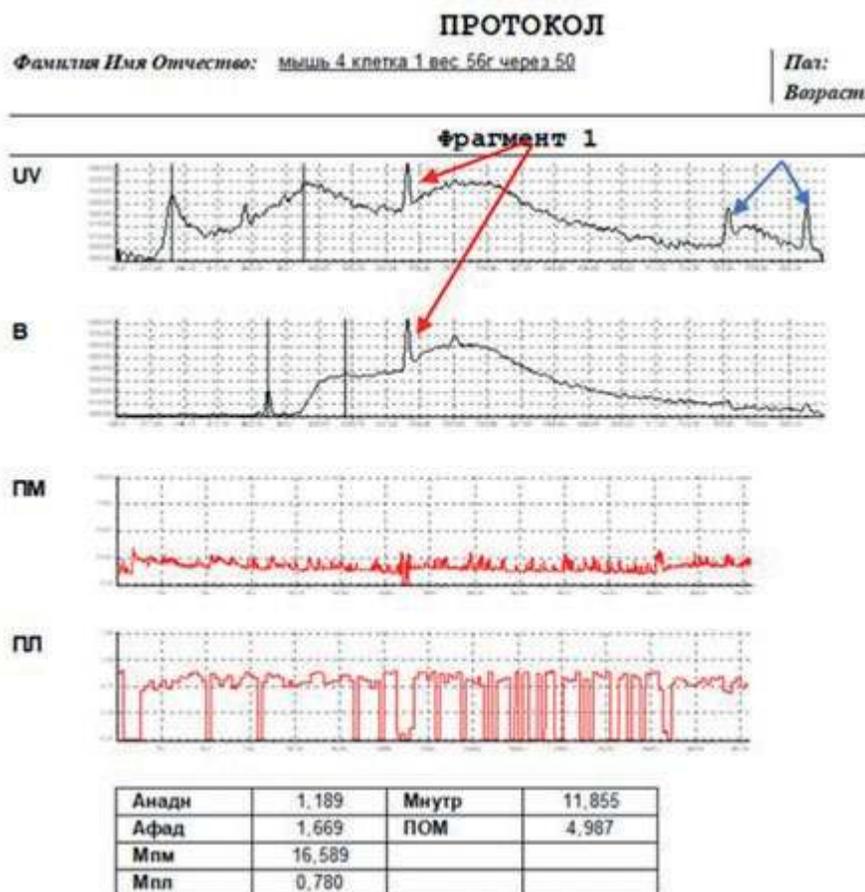


Рис. 4 Регистрация НАДН, ФАД, кровотока и лимфотока у мыши db/db с СД в стадии субкомпенсации. Обозначения на мониторе: UV- амплитуда НАДН; В – амплитуда ФАД; ПМ – кровотока; ПЛ – лимфотока. Красные стрелки – пики пигмента липофусцина и синие стрелки – пики порфирина.

Fig. 4 Registration of NADH, FAD, blood flow and lymph flow in db/db mice with DM in the subcompensation stage. Designations on the monitor: UV-estimation of NADH; B is the FAD value; PM – blood flow; PL – lymph flow. Red arrows are lipofuscin pigment peaks and blue arrows are porphyrin peaks.

данные указывают на снижение интенсивности окислительных процессов и развитие тканевой гипоксии в организме на этом сроке.

С увеличением возраста у животных повышаются: инсулинорезистентность – гипергликемия (глюкозо-токсичность), полиурия, полифагия, что введет к снижению адаптивных процессов, а также к снижению резистентности организма и усилению тяжести патологических признаков болезни. В возрасте 6–6,5 мес у мышей db/db (рис. 5) наблюдается гипергликемия $27,4 \pm 2,09$ ммоль/л (норма $5,7 \pm 0,65$ ммоль/л $p < 0,05$) и высокие амплитуды коферментов: -НАДН= $1,42 \pm 0,75$ (норма $0,65 \pm 0,01$ $p < 0,05$), – ФАД= $1,51 \pm 0,33$ (норма $0,97 \pm 0,02$ $p < 0,05$) и низкий уровень ПОМ= $3,97 \pm 1,39$ (норма $10,912 \pm 2,04$ $p < 0,05$). На этом сроке аппаратом ЛАЗМА СТ было выявлено появление пиков пигмента Липофусцина у 40% животных и у двух мышей (5%) экспериментальной группы отмечено появление пиков пигмента Порфирина, а также состояния декомпенсации у 35% животных.

Обсуждение

Заболеваемость СД 2 типа с развитием тяжелых метаболических нарушений в организме и опасных для жизни осложнений неуклонно увеличиваются во всем мире. Это указывает на актуальность продолжения поиска эффективных методов лечения под контролем

доступных, системных и нормативных показателей, позволяющих оценивать микроциркуляторные и метаболические нарушения, а также прогнозировать результаты применяемой терапии.

В настоящее время в клиниках РФ при СД используется диагностический аппарат ЛАЗМА СТ, который позволяет исследовать микроциркуляцию методом лазерной доплеровской флуометрии [18,19], окислительно-восстановительные процессы в тканях методом лазерной флуоресцентной спектроскопии [15, 20-22], а также позволяет автоматически, с помощью программного обеспечения, определять степени тяжести нарушений и прогнозировать течение заболевания. Между тем, диагностические возможности аппарата ЛАЗМА СТ не исследовались на мелких лабораторных животных (мышях), в том числе при СД.

Ставя своей целью применить аппарат ЛАЗМА СТ для диагностики микроциркуляторно- метаболических нарушений у мутантных мышей db/db с генетической моделью СД 2 типа нам необходимо было прежде всего устранить помех на датчике, ограничить подвижность животного во время измерения. Для этих целей была подготовлена платформа, соответствующая массе тела мышей (20–70 г), а также использованы специально подготовленные съемные камеры и фиксатор зонда, который фиксировался на участке хвоста (рис.1, А, Б). С помощью аппарата ЛАЗМА СТ проводилось ис-

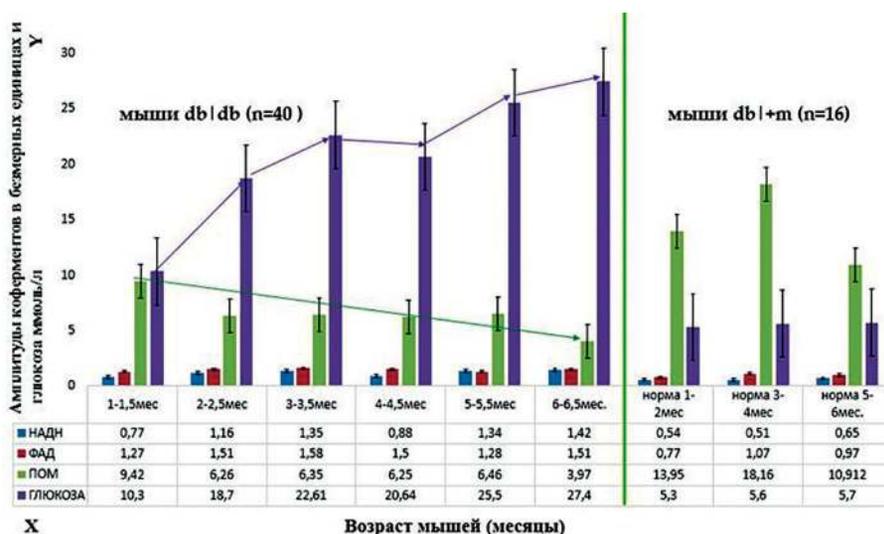


Рис. 5. Динамика изменения гликемии и микроциркуляторно – тканевых показателей у мышей db/db с СД и у мышей без СД db/+m (норма) в разном возрасте (возраст мышей указан под амплитудами и измеряемых показатели: НАДН; ФАД; ПОМ и Глюкоза). На осях координат: X- возраст мышей (месяцы); Y- амплитуды коферментов в безмерных единицах и глюкоза ммоль/л.

Fig. 5. Dynamics of changes in glycemia and microcirculatory-tissue parameters in db/db mice with DM and in mice without DM db/+m (normal) at different ages (the age of mice is indicated under the amplitudes and measured parameters: NADH; FAD; POM and Glucose). On coordinate axes: X- age of mice (months); Y- amplitudes of coenzymes in measureless units and glucose mmol / l.

следование показателей микроциркуляции (кровоток и лимфоток), активности окислительных – восстановительных процессов (коферментов НАДН и ФАД), а также ПОМ – показатель окислительного метаболизма и ФС МТС – показателя, автоматически рассчитываемого программным обеспечением аппарата и характеризующего степень тяжести состояния животных с СД.

Было выполнено две серии опытов, в которых оценивалась возможность определения степени тяжести состояния животных с СД 2, а также зависимость нарастания степени тяжести и повышения уровня глюкозы в крови по мере увеличения срока жизни мышей с СД 2 типа. Мы показали, что одновременное измерение НАДН, ФАД и ПОМ позволяет выявить 3 группы животных, различающихся по степени отклонения их показателей от контроля: компенсация, субкомпенсация и декомпенсация (рис. 2). Именно у мышей в состоянии декомпенсации метаболические показатели тяжести состояния подтверждались критически высоким уровнем глюкозы, мацерацией кожи в области холки (рис. 3) и гибелью животных на фоне гипергликемической комы. Исследование связи тяжести нарушения микроциркуляторно-метаболических показателей у мышей с СД 2 типа в зависимости от увеличения сроков жизни животных – подтвердило связь прогрессирующих в организме циркуляторно-метаболических нарушений с неуклонно повышающимся уровнем глюкозы в крови (рис. 5). Примечательно, что у животных в декомпенсированном и субкомпенсированном состоянии при регистрации амплитуд НАДН и ФАД появляются дополнительные пики активности, соответствующие появлению в тканях свободных пигментов – липофусцина (у 40% мышей) и порфирина (у 5%) (рис. 4). Выявления свободных пигментов – липофусцина и порфирина, которые в норме входят в состав тканей, образуя соединения с белками, липидами и включаются в структуры клеточных мембран и клеточных ферментов, свидетельствуют о развитии тяжелых деструктивных процессов организма и прогнозируют не благоприятный исход.

Таким образом, использование аппарата ЛАЗМА СТ позволяет не только изучать в динамике нарушения тканевого метаболизма у мышей с СД и сопоставлять их с нарушениями глюкозы в крови, но также прогнозировать тяжесть нарушения микроциркуляции и окислительного метаболизма в условиях субкомпенсации и декомпенсации, выявляя начавшиеся нарушения липидного и белкового обмена, прогнозирующие тяжелый исход заболевания.

Выводы

1. Заводской Аппарат лазерной диагностики «ЛАЗМА СТ» пригоден для выполнения доклинических исследований НАДН, ФАД и ПОМ на мелких лабораторных животных с СД, но должен быть адаптирован для использования на мышах: должны быть созданы съёмные камеры для животных разной массы тела и подобран фиксатор зонда на хвосте для ограничения его подвижности во время измерения;

2. Аппарат ЛАЗМА СТ, адаптированный для применения, позволяет в динамике контролировать и прогнозировать тяжесть микроциркуляторно – тканевых нарушений в организме мышей с генетической моделью СД 2 типа и расширенно характеризовать тяжесть состояния животного при одновременном измерении уровня глюкозы в крови;

3. Аппарат ЛАЗМА СТ при регистрации активности НАДН и ФАД позволяет выявить в ткани у животных с СД 2 типа в состоянии декомпенсации и субкомпенсации характерные – пики амплитуд пигмента Липофусцина у 40% животных и пики амплитуд пигмента Порфирина у 5% животных, в качестве дополнительных маркеров тяжести метаболических изменений при СД 2 типа;

4. Преимуществом использования аппарат ЛАЗМА СТ в качестве тест-системы, является не только её высокая информативность и безопасность применения, но и возможность неинвазивного получения в реальном времени данных о динамике коферментов окислительно-восстановительных процессов в тканях организма (-НАДН и -ФАД).

Авторы выражают глубокую благодарность Сидорову В.В. (Технопарк «Строгино» ООО НПП «ЛАЗМА», e-mail: lazma@plusnet.ru) за помощь в адаптации и интерпретации полученных результатов у мелких лабораторных животных.

Литература

(п.п. 6–9; 11–17; 20–22; 24; 25; 28; 29; 31–35 см. References)

1. Нурдинова Г.У., Авезова С.Г., Бердиева Д.Б., Шеркузиева Г.Ф. Эпидемиология сахарного диабета. *International scientific review*. 2016; 7(17): 93–5.
2. Стаценко М.Е., Деревянченко М.В., Титаренко М.Г., Пастухова О.Р. Нарушения микроциркуляции кожи у больных с артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2-го типа в зависимости от стадии хронической болезни почек. *Нефрология*. 2015; 19(5): 57–63.
3. *Осложнения сахарного диабета: лечение и профилактика* / под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой. 2017: 78–82.
4. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. *Биологическая химия: учеб.*, 3-е изд., стереотипное. М.; Медицина, 2008.

5. Мкртумян А.М., Егшатын Л.В. Субетта – новый активатор рецептора инсулина. *Эффективная фармакотерапия*. 2019; 15(12): 12–7.
10. Подколodный Н.Л., Твердохлеб Н.Н., Подколodная О.А. Математическая модель циркадного осциллятора млекопитающих: взаимодействие с системой NAD⁺/S Биологическая химия IRT1 и возрастные изменения экспрессии генов циркадного осциллятора. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016; 20(6): 848–56.
18. *Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови*/ Под ред. А.И. Крупаткина, В.В. Сидорова: Руководство для врачей. 2005.
19. Петрищев Н.Н. Медицинская технология. Способ определения реактивности сосудов микроциркуляторного русла и вазомоторной 138 функции эндотелия с использованием высокочастотной доплерографии. 2009.
23. Тучин В.В. *Оптическая биомедицинская диагностика*, в 2-х томах/Пер. с англ. под ред. В.В. Тучина. 2007; 2.
26. Ефимов А.А., Маслякова Г.Н. О роли липофусцина в инволютивных и патологических процессах. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2009; 5(1): 111–5.
27. Лугин И.А., Игнатенко В.В., Прокофьева К.С. Современные представления о липофусцине как о биомаркере старения. *Синергия наук*. 2017; 18: 1147–56.
28. Чаплыгина А.В., Векшин Н.Л. Липофусцин и митолитофусцин в органах молодых и взрослых крыс. *Успехи геронтологии*. 2018: 31 (2): 197–202
30. Пуховская С.Г., Иванова Ю.Б., Семейкин А.С., Сырбу С.А., Крук Н.Н. Исследование кислотных и координационных свойств октабром-замещенных порфиринов в системе 1,8-диазабисцикло [5,4,0] ундец-7-ен – ацетонитрил. *Российский химический журнал (Журн. Рос. хим. общества имени Д.И. Менделеева)*. 2017; LXI (1): 56–66.
8. Roglic G., Unwin N., Bennett P.H. The burden of mortality attributable to diabetes: Realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care*. 2005; 28(9): 2130–5.
9. Vinik A.I., Nevoret M.L., Casellini C., Parson H. Diabetic Neuropathy. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2013; 42(4): 747–87.
10. Podkolodny N.L., Tverdokhle N.N., Podkolodnaya O.A. Mathematical model of the mammalian circadian oscillator: interaction with the NAD⁺/S system Biological chemistry of IRT1 and age-related changes in circadian oscillator gene expression. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii*. 2016; 20(6): 848–56. (In Russian)
11. Fernyhough P., McGavock J. Mechanisms of disease: mitochondrial dysfunction in sensory neuropathy and other complications in diabetes. *Handb. Clin. Neurol.* 2014; 126; 353–77.
12. Klonizakis M., Manning G., Lingam K., et al. Effects of diabetes on the cutaneous microcirculation of the feet in patients with intermittent claudication: *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2015; 61(3): 439–44.
13. Kabbani M., Rotter R., Busche M., et al. Impact of diabetes and peripheral arterial occlusive disease on the functional microcirculation at the plantar foot. *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open*. 2013; 1(7): 48.
14. Luo X., Li R., Yan L.J. Roles of pyruvate, NADH, and mitochondrial complex I in redox balance and imbalance in β cell function and dysfunction. *J. Diabetes Res*. 2015; 2: 1–12.
15. Shinkin M.V., Mkrumyan A.M., Zvenigorodskaya L.A., Sidorov V.V. Methods of laser Doppler flowmetry and fluorescence spectroscopy for assessing the state of the microcirculatory channel and oxidative metabolism in people with diabetes mellitus. Methodological recommendations. 2019.
16. Fuchs D., Dupon P.P., Schaap L.A., Draijer R. The association between diabetes and dermal microvascular dysfunction noninvasively assessed by laser Doppler with local thermal hyperemia: A systematic review with meta-analysis. *Cardiovascular Diabetology*. 2017; 16(1): 1–12.
17. Jörneskog G., Kalani M., Kuhl J. Early microvascular dysfunction in healthy normal-weight males with heredity for type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2005; 28(6): 1495–7.
18. *Laser Doppler flowmetry of blood microcirculation. [Lazernaya dopplerovskaya fluometriya mikrotsirkulyatsii krovi]*. Ed. A.I. Krupatkin, V.V. Sidorov: A guide for doctors. 2005. (In Russian)
19. Petrishchev N.N. *Medical technology. A method for determining the reactivity of the vessels of the microvasculature and the vasomotor function of the endothelium using high-frequency dopplerography. [Meditsinskaya tekhnologiya. Sposob opredeleniya reaktivnosti sudov mikrotsirkulyatornogo rusla i vazomotornoy 138 funktsii endoteliya s ispol'zovaniem vysokochastotnoy doplerografii]*. N.N. Petrishchev, E.Yu. Vasina. 2009. (In Russian)
20. Bruno R.M. Advances in the non-invasive assessment of vascular dysfunction in metabolic syndrome and diabetes: Focus on endothelium, carotid mechanics and renal vessels/ R.M. Bruno, K.D. Resink, L. Ghiadoni. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2017; 27: 121–8.
21. Clark M.G. Impaired microvascular perfusion: a consequence of vascular dysfunction and a potential cause of insulin resistance in muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008; 295(4): 732–50.
22. Hsui H. Differences in laser-Doppler indices between skin-surface measurement sites in subjects with diabetes. *Microvasc. Res.* 2018; 115: 1–7.

References

1. Nurdinova G.U., Avezova S.G., Berdiev D.B., Sherkuzev G.F. Epidemiology of diabetes mellitus International scientific review. 2016; 7(17): 93–5. (In Russian)
2. Statsenko M.E., Derevyanchenko M.V., Titarenko M.N., Pastukhov O.R. Skin microcirculation disorders in patients with arterial hypertension and type 2 diabetes depending on the stage of chronic kidney disease. *Nephrology*. 2015; 19(5): 57–63. (In Russian)
3. *Complications of diabetes mellitus: treatment and prevention [Oslozheniya saharnogo diabeta: lechenie i profilaktika]*. Ed. I.I. Dedova, M.V. Shestakova. 2017: 78–82. (In Russian)
4. Berezov T.T., Korovkin B.F. *Biological chemistry: textbook, 3rd ed. [Biologicheskaya himiya: ucheb., 3-e izd.]*. stereotypical. Moscow; Meditsina Publ., 2008. (In Russian)
5. Mkrumyan A.M., Egshatyan L.V. Subetta is a novel insulin receptor activator. *Effective pharmacotherapy*. 2019; 15(12): 12–7. (In Russian)
6. Greenman R.L., Panasyuk S., Wang X., et al. Early changes in the skin microcirculation and muscle metabolism of the diabetic foot. *Lancet*. 2005; 366(9498): 1711–7.
7. Head K.A. Peripheral neuropathy: pathogenic mechanisms and alternative therapies. *Alternative medicine review: a journal of clinical 106 therapeutic*. 2006; 11(4): 294–329.

23. Tuchin, V.V. Optical biomedical diagnostics. in 2 volumes / Per. from English. ed. V.V. Tuchin. 2007; 2. (In Russian)
24. Mayevsky A. Rogatsky G.G. Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007; 292(2): 615–40.
25. Mokry M., Gal P. and et.al. Experimental study on predicting skin flap necrosis by fluorescence in the FAD and NADH bands during surgery. *Photochem. Photobiol.* 2007; 83(5): 1193–6.
26. Efimov A.A., Maslyakova. G.N. On the role of lipofuscin in involutive and pathological processes. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal.* 2009. 2009; 5(1): 111–5. (in Russian)
27. Lugin I.A., Ignatenko V.V., Prokofieva K.S. Modern concepts of lipofuscin as a biomarker of aging. *Sinerhiya nauk.* 2017; 18: 1147–56. (In Russian)
28. Chaplygina, A. V., Vekshin N.L. Lipofuscin and mitolipofuscin in organs of young and adult rats. *Advances in gerontology. Uspekhi gerontologii.* 2018: 31 (2): 197–202.
29. Radu R.A., et al. Treatment with isotretinoin inhibits lipofuscin accumulation in a mouse model of recessive Stargardt's macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003; 100: 4742–7.
30. Pukhovskaya S.G., Ivanova Yu. B., Semeikin A.S., Syrbu S.A., Kruk N.N. Acidic and coordination properties the oktabrom-substituted porphyrins in the system 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ene-acetonitrile. *Rossiyskiy khimicheskiy jurnal (Jurn. Ros. Him. Obshchestva imeni D.I. Mendeleeva).* 2017; LXI (1): 56–66. (In Russian)
31. Bonnett R. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy.* Gordon and Breach Science Publishers, 2000; 305.
28. Chaplygina, A. V., and N.L. Vekshin. Lipofuscin and mitolipofuscin in organs of young and adult rats. *Advances in gerontology. Uspekhi gerontologii.* 2018: 31(2): 197–202.
32. Ivanova Yu. B., Pukhovskaya S.G., Mamardashvili N.Zh., Koifman O.I., Kruk M.M. Rate-acidity hysteresis and enthalpy-entropy compensation upon metalloporphyrin formation: implication for the metal ion coordination mechanism. *Journal of Molecular Liquids.* 2019; 275 issue 3: 491–8.
33. Kadish K.M., Smith K.M., Guillard R. *Handbook of porphyrin science.* Acad. Press: New-York: World Scientific. 2010–2019: Vol. I–XX.
34. Nam D.T., Ivanova Yu. B., Pukhovskaya S.G., Kruk M.M and Sergei A. Syrba Acid-base equilibria and coordination chemistry of the 5,10,15,20-tetraalkyl-porphyrins: implications for metalloporphyrin synthesis. *RSC Advances.* 2015; 5 (33): 26125–31.
35. Pukhovskaya S.G., Nam D. T, Ivanova Y.B., Liulkovich L.S., Semeikin A.S. Porphyrin acidity and metal ion coordination revisited: electronic substitution effects. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.* 2017; 89 (issue 3–4): 325–32.

Сведения об авторах:

Степанова Ольга Ивановна, канд. биол. наук, зав. лаб. № 5 ФГБУН «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА России, e-mail: olgsima50@mail.ru;

Клёсов Роман Алексеевич, науч. сотр., лаб. № 5 ФГБУН «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА России, e-mail: klesrom@mail.ru;

Семёнов Хызыр Хыйсаевич, канд. биол. наук, зав. лаб. № 10 ФГБУН «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА России;

Помыткин Игорь Анатольевич, канд. хим. наук, зам. дир. по науке, ФГБУН «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА России, e-mail: ipomytkin@mail.ru;

Онищенко Нина Андреевна, доктор мед. наук, проф., гл. спец. Отдела биомед. Технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России;

Каркищенко Владислав Николаевич, доктормед. наук, проф., директор, ФГБУН «НЦ биомедицинских технологий» ФМБА России, e-mail: scbmt@yandex.ru

Памяти ученого

© Цыган В.Н., Мамаева С.А., 2023

Цыган В.Н., Мамаева С.А.

Жизненный путь и научные труды академика В.К. Кулагина

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

Статья посвящена анализу массива научных публикаций выдающегося патофизиолога академика Виктора Константиновича Кулагина. Цель сообщения – раскрыть и подчеркнуть вклад В.К. Кулагина в разработку учения о травме и шоке. Анализ показал, что основными аспектами экспериментальных исследований ученого были нейрогуморальные механизмы развития травматического шока, различия травматического шока и шока при кровопотере, роль нарушений функций эндокринной системы (гипофиз, кора надпочечников) и значение изменений ряда ферментных систем в патогенезе шока. Кулагин разработал методы ранней профилактики и принципы лечения шока и кровопотери с использованием крови, крове-заменителей, аденокортикотропного гормона, кортикостероидов и некоторых ферментов. Результаты проведенных им исследований позволили создать целостную патогенетически обоснованную картину шока. Кулагин вплотную подошел к решению проблемы ранней профилактики шока, стоял у истоков концепции травматической болезни.

Ключевые слова: Виктор Константинович Кулагин; кафедра патологической физиологии Военно-медицинской академии; травматический шок; нейрогенная теория; теория плазма/кровопотери; нейрогуморальные механизмы патогенеза шока; классификация шока

Для цитирования: Цыган В.Н. Мамаева С.А. Жизненный путь и научные труды академика В.К. Кулагина. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(2): 130-136.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.130-136

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.04.2023

Принята к печати 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Tsygan V.N., Mamaeva S.A.

The life path and scientific works of Academician V.K. Kulagina

Military Medical Academy C.M. Kirov of the Ministry of Defense of the Russian Federation,
st. Akademika Lebedeva 6, Sankt-Peterburg, 194044, Russian Federation

The purpose of the article is based on the analysis of the array of scientific publications of the outstanding pathophysiological, academician V.K. Kulagina to reveal his contribution to the development of the doctrine of trauma and shock. The analysis showed that the main aspects of the scientist's experimental studies were the neurohumoral mechanisms of the development of traumatic shock, the differences between traumatic shock and blood loss, the role of dysfunctions of the endocrine system (pituitary gland, adrenal cortex), the significance of changes in a number of enzymatic systems in the pathogenesis of shock. Kulagin developed methods for early prevention and principles for the treatment of shock and blood loss using blood, blood substitutes, adrenocorticotrophic hormone, corticosteroids, and certain enzymes. The results of his studies made it possible to create a holistic pathological picture of shock. Kulagin came close to solving the problem of early prevention of shock, stood at the origins of the concept of traumatic disease.

Keywords: Viktor Konstantinovich Kulagin; Department of Pathological Physiology; Military Medical Academy; traumatic shock; neurogenic theory; plasma/blood loss theory; neurohumoral mechanisms of pathogenesis of shock; shock classification

For citation: Tsygan V.N., Mamaeva S.A. The life path and scientific works of Academician V.K. Kulagina. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal). 2023; 67(2): 130-136. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.130-136

Information about authors:

Tsygan V.N., <https://orcid.org/0000-0003-1199-0911>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 18.04.2023

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

Судьбы ученых, при всей уникальности, сводятся к двум разновидностям: кому-то суждено открывать новые пути, а кому-то — заниматься их «благоустройством», кропотливо выявляя и исправляя изъяны и «шероховатости». Имя Виктора Константиновича Кулагина — выдающегося ученого-патолофизиолога, профессора, академика АМН СССР, 100-летие со дня рождения которого мы отмечаем в 2023 г. — до сих пор остается несколько в тени его замечательного учителя, основоположника научной школы, академика И.Р. Петрова. С годами становится очевидно, что научный вклад Кулагина в разработку патофизиологической концепции травматического шока ничуть не меньше.

Становление ученого. Научная биография Виктора Константиновича неразрывно связана с кафедрой патологической физиологии: сначала в качестве адъюнкта (1951), затем — преподавателя (1955), старшего преподавателя (1961), начальника кафедры (1967–1980) [1]. Его становление как ученого происходило в творческой атмосфере кафедральной научной школы Иоакима Романовича Петрова. Эта школа во главе с ее лидером и основоположником в годы Великой Отечественной войны внесла неоценимый вклад в организацию противошоковой терапии в условиях боевых действий. Патофизиологи (И.Р. Петров, М.Г. Данилов, Т.Е. Кудрицкая, П.Н. Веселкин, Т.П. Гугель–Морозова) неоднократно выезжали на фронт для изучения шока и кровопотери буквально на полях сражений, а также для испытания изобретенных в лаборатории противошоковых растворов [2]. Кровезамещающая плазма, разработанная на кафедре и известная военным медикам как «жидкость профессора Петрова» с большим успехом была перелита в 47,2% всех трансфузий во время войны, т.е. многим миллионам раненых [2]. Ученики школы И.Р. Петрова стали кадровой базой «группы №1 по изучению шока», проводившей в период 1942–1943 гг. испытание «на большом количестве раненых всех основных предложенных до последнего времени способов и средств борьбы с шоком» [3]. Результаты испытаний стали основой реорганизации принципов и стандартов оказания противошоковой помощи в масштабе всей медицинской службы Советской Армии.

Таким образом, Кулагин, как и полагается каждому настоящему ученому, стоял на плечах своих предшественников, с большим почтением относясь к их заслугам и достижениям. Свидетельство тому — его

публикации, посвященные оценке значения вклада сотрудников Военно-медицинской академии и, в первую очередь, кафедры патофизиологии, в разработку проблемы шока.

В.К. Кулагин является автором около 200 работ по широчайшему диапазону теоретических и прикладных проблем травматического шока. Подход Кулагина к изучению этого сложного патологического феномена был поистине всеохватным. Не ставя перед собой задачу в рамках одной статьи дать полный обзор его научных публикаций, остановимся лишь на некоторых, наиболее значимых направлениях его научных изысканий.

Концептуальные предпочтения. Общетеоретические представления Кулагина об этиологии и патогенезе шока нашли отражение в нескольких десятках работ, относящихся к разным периодам жизни ученого. Изучив их, можно увидеть эволюцию представлений о шоке в динамике, в развитии по мере накопления и осмысления всё новых и новых научных фактов, полученных экспериментально. Существовало множество теорий шока, однако, основными в середине XX века были две: нервно-рефлекторная (нейрогенная) теория и теория крово/плазмпотери. По сути, вопрос стоял о том, что первично для развития шока.

В СССР доминировала нервно-рефлекторная теория. Считалось, что поступающий из зоны повреждения поток нервных импульсов способствует чрезмерному раздражению ЦНС, её истощению, с развитием в ней охранительного торможения. Именно расстройство ЦНС представлялось пусковым механизмом дисфункции в системах организма и нарушения гомеостаза. Разработкой этой теории на экспериментальной основе активно занимался, в частности, учитель В.К. Кулагина — И.Р. Петров (1940–1950), а вслед за ним — и В.К. Кулагин. Система исходных теоретических представлений В.К. Кулагина нашла свое отражение, в первую очередь, в его докторской диссертации (1961) [4].

Приверженцы альтернативной теории крово/плазмпотери определяющим фактором в развитии шока были склонны считать наружную и внутреннюю кровопотерю. Кулагин не признавал притязания на абсолютное методологическое главенство теории плазмо/кровопотери, правомерно указывая на ее ограниченность. Он отказывался поставить знак тождества меж-

ду травматическим шоком и кровопотерей, выделяя геморрагический шок в самостоятельную категорию [5]. Его позиция базировалась на результатах многочисленных экспериментов, в том числе сравнительных исследований, которые изложены в ряде опубликованных работ.

В частности, в 1968 году он инициировал комплексное исследование по сравнительной характеристике травматического шока по Кеннону и неосложненной острой кровопотери при одинаковой гипотензии (70 мм рт. ст.) [5]. Исследование позволило систематизировать представления об общих и специфических механизмах их развития. Результаты работы показали, что для патогенеза шока и кровопотери характерны некоторые общие механизмы, особенно на поздних стадиях развития этих процессов, в частности, артериальная гиповолемия и гипоксия.

Однако, в начальных стадиях наблюдается существенная разница. Выявлены не только количественные, но и качественные отличия шока от кровопотери. Различия между шоком и кровопотерей были обнаружены на системном, органном, клеточном и субклеточном уровнях. Общие механизмы развития поздних стадий этих патологических процессов подтвердили правомерность термина «геморрагический шок» [6].

Концептуальные представления Кулагина о природе шока нашли выражение в данной им общей характеристике, периодизации и классификации шока. На основании этиологического фактора В.К. Кулагин выделил следующие виды (типы) шока [5]: *рецепторный шок*: а) психический; б) болевой; в) электрический; *травматический шок*: а) при механической травме (операционный, раневой, геморрагический, при длительном сдавлении ткани); б) ожоговый; *токсический шок*: а) эндотоксиновый; б) экзотоксиновый; в) анафилактический; г) септический; *ишемический шок*: а) турникетный; б) при тромбозе и эмболии артериальных сосудов; *центрогенный шок*, при повреждении (травма, эмболия, спазм сосудов и др.) продолговатого и спинного мозга, гипоталамических центров, гипофиза; *смешанный шок*, возникает при сочетании нескольких типов шока.

Важно подчеркнуть, что научные взгляды и представления Виктора Константиновича эволюционировали и пересматривались на протяжении всей жизни. Интегралом всех его научных достижений в области исследования шока стала монография «Патологическая физиология травмы и шока», изданная в 1978 г. [5]. В этой работе Кулагин, в частности, отмечал: «конкретные формулировки и схемы нейрогенной теории 50-60-х годов в значительной степени устарели.

Шок, конечно, сейчас нельзя рассматривать как нечто развивающееся только по механизму рефлекса (чрезмерное раздражение рецепторов и нервных проводников -- торможение нервной системы -- нарушения гемодинамики и дыхания -- шок). Механизм развития шока представляется в настоящее время более сложным и многокомпонентным» [5].

Научная позиция Кулагина всегда оставалась взвешенной и конструктивной, открытой для убедительных доводов идейных противников. В.К. Кулагин был весьма восприимчив к новым методологическим подходам. В частности, он всецело принял теорию травматической болезни: «За последние годы у нас в стране появилась, на наш взгляд, прогрессивная тенденция рассматривать шок как один из начальных периодов травматической болезни. С методологических позиций такой подход является вполне оправданным, так как шок в таком случае предстает не как случайное осложнение травмы, а как типовой патологический процесс, характерный для начального периода развертывания более сложного явления -- болезни [5]. Этот подход обеспечивал анализ шока не как состояния, а как сложного динамического процесса, что было крайне важно для Кулагина.

Лабораторный эксперимент vs клиническое исследование. В послевоенные годы изучение шока переместилось из лабораторий в клиники. Однако, как полагал Кулагин, роль лабораторного эксперимента на животных в изучении шока по-прежнему должна играть ведущую роль. «Несмотря на создание отлично оборудованных противошоковых центров, все же в клинике не представляется возможным изучение шока в полном объеме, так как в задачу врача входит прежде всего наиболее ранняя терапия, и поэтому в последующем наблюдается уже леченный шок. Кроме того, не все необходимые методы исследования шока допустимы на человеке, а клинический материал отличается очень большим разнообразием по ряду параметров, что затрудняет вскрытие общих закономерностей шокового процесса» [5]. Решающим условием успеха он считал координацию экспериментальных и клинических исследований шока. В его работах с исчерпывающей полнотой охарактеризованы принципы и методы моделирования шока в эксперименте. Он уделял большое внимание обновлению оборудования лабораторий, использованию всех новейших достижений науки и техники. Принципиальное значение имел выбор подопытных животных, здесь тоже был ряд специально разработанных критериев. Один из краеугольных принципов Кулагина -- работа с ненаркотизированными

ми животными, когда это необходимо для результатов опыта [7].

Ученого занимал вопрос корректной трактовки и эффективного использования полученных в эксперименте данных [8], экстраполяции данных, полученных в эксперименте, на человека. Во второй половине 1970-х гг. проблема сопоставимости результатов экспериментов в патофизиологии шока вышла на первый план [9]. В 1970 г. по инициативе В.К. Кулагина были сделаны первые шаги по унификации экспериментальных моделей шока, а также периодов исследования показателей и объединению усилий исследователей на решение наиболее актуальных теоретических проблем шока [5]. В основу сотрудничества был положен т.н. «Метод комплексного исследования» [8]. В работе приняли участие 3 кафедры патологической физиологии (ВМА им. С.М. Кирова, Кишиневского и Ростовского медицинских институтов). На единых моделях были изучены общие и специфические механизмы патогенеза травматического и геморрагического шока [8]. Метод комплексного исследования доказал свою продуктивность, особенно при изучении типовых патологических процессов.

Изучение шока на системном уровне. Кулагина отличало целостное и системное видение травматического процесса. Оно проистекало из представления о том, что ответ организма на шоковый удар исходил из одного «центра управления» – коры головного мозга. Функционирование мозга и всей нервной системы нарушалось, и это приводило к расстройству всех регулируемых ею систем: сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной, иммунной, пищеварительной, [10]. И практически весь спектр системных изменений в той или иной мере становился предметом экспериментирования Кулагина и возглавляемой им кафедры.

В начальный период Кулагиным исследовались нарушения функций самой нервной системы, а также эффективность нейротропных средств для его ранней профилактики. Всесторонне была исследована сердечно-сосудистая система. В начале 1960-х годов он изучал изменения мозгового кровообращения [11]. В последние годы его внимание было приковано к специфике регионарных перераспределений крови при травматическом шоке и кровопотере, емкостной функции системы кровообращения [12]. Изучалось им и явление кислородного голодания при различных видах шока. По результатам исследований Виктор Константинович описал особенности гемической гипоксии, которая возникает при травматическом шоке. Им были апробированы в лабораторных условиях и методы борьбы с гипоксией посредством оксигенобаротерапии.

В поисках оптимальных подходов к переливанию крови, Кулагин неоднократно обращался к сравнительному анализу различных методов трансфузионной терапии при тяжелой кровопотере и шоке [13]. Им был модифицирован метод внутриартериального введения крови и жидкости Петрова для лечения агональных состояний, возникающих при осложнении шока кровопотерей [14].

Начальный этап шока и поиск мер профилактики. Экспериментальная разработка основ профилактики и ранней терапии шока постоянно находилась в зоне внимания Кулагина. Именно этой теме была посвящена его кандидатская диссертация (1954) [15], а также множество статей и выступлений. Вновь он возвращается к этому вопросу в 1975 г. – в центре внимания должен был предстать именно старт, пусковой механизм шока. В исследовании принимали участие коллективы патофизиологов и фармакологов [16]. Понимание механизмов развития начальных стадий шока было совершенно необходимо для рациональной разработки мер ранней медикаментозной его профилактики.

Исследование позволило доказать, что эректильная фаза шока не является однородным процессом. Ее условно можно разделить на 2 периода: первый имеет много общих черт с реакциями защиты, которые сопровождаются мобилизацией всех ресурсов организма в ответ на экстремальные воздействия; второй характеризуется началом декомпенсации функций сердечно-сосудистой системы и завершается развитием торпидной фазы шока [16]. Фармакологическое вмешательство на раннем этапе позволяло предупредить развитие торпидной стадии шока и смерти животных при введении противошоковых средств в ближайшее время после травмы [17].

Нейрогуморальные механизмы развития шока и их фармакологическая коррекция. Особенности патологии нейрогуморальных механизмов, эндокринной системы при шоке постоянно оставались в фокусе научного внимания Кулагина. На протяжении всей научной биографии он с постоянным вниманием исследовал эндокринные следствия травматического шока и искал действенные способы их медикаментозной гормональной коррекции [18]. Всего проблематике нейроэндокринных нарушений при шоке Кулагин посвятил порядка 40 публикаций.

В.К. Кулагин первым у нас в стране начал изучение реакции гипоталамо-гипофизарно-кортико-адреналовой системы на тяжелую травму, сопровождающуюся выраженными сдвигами гомеостаза [19]. Он продемонстрировал, что течение шокового процесса и его

исход в значительной степени определяются нарушением функции передней доли гипофиза и коры надпочечников [20]. В результате тщательного изучения изменения функций эндокринных желез на разных стадиях шокового процесса Кулагиным были сформулированы четкие рекомендации по применению различных гормональных препаратов АКТГ и гормонов коры надпочечников с целью профилактики и терапии шока [21]. Благодаря своевременному приему гормональных препаратов достигалось предупреждение развития необратимых состояний и тяжелых последствий шока.

Исследуя многочисленные метаболические нарушения и биохимические сдвиги, Кулагин показал значение ряда ферментных систем в развитии шока и сформулировал рекомендации по применению ферментов в комплексной терапии травмы. Многолетние исследования по изучению состояния холинэргетических процессов при шоке послужили основой для включения в противошоковый комплекс препаратов холинэстеразы [22].

Оценка противошоковой эффективности различных фармакологических средств, которые могут найти применение в клинической практике, стала одной из центральных задач научных экспериментов Кулагина.

Подводя итоги всему сказанному, следует признать, что В.К. Кулагин за период своего руководства сделал кафедру патофизиологии Военно-медицинской академии научным центром планирования и координации работ по исследованию в сравнительном аспекте патогенеза шока и кровопотери, вплотную подошел к решению проблемы ранней профилактики шока, стоял у истоков концепции травматической болезни, отчетливо представляя ее прикладное значение [1]. Результаты трудов Кулагина имели не только теоретическое значение – на их основе разрабатывались конкретные методики профилактики и терапии шока. Его достижения, в частности, нашли применение в практике работы скорой помощи Ленинграда [23].

В.К. Кулагин играл заметную роль в общественной, образовательной и научной жизни академии и профессионального медицинского сообщества. С 1968 по 1976 гг. он возглавлял Ленинградское научное общество патофизиологов (ЛНОП). С 1975 по 1979 исполнял обязанности Ученого секретаря академии, был членом трех Ученых советов. В 1978 году был избран действительным членом АМН СССР, являлся членом президиума ВАК [24]. В.К. Кулагин осуществлял активную редакционно-издатель-

скую деятельность, в частности, являлся членом редколлегии журнала «Патологическая физиология и экспериментальная терапия» [24].

В 1980 г. Виктор Константинович был назначен Начальником НИИ военной медицины МО СССР, что открывало перед ним новые перспективы. Мечтая о создании всесоюзного центра по изучению травматического шока, Виктор Константинович на страницах своей итоговой (как впоследствии оказалось) монографии излагал обширную программу новых исследований в этой области: «Заслуживает внимание изучение шока с общепатологических позиций в эволюционном аспекте. Следующим подходом является общепатологический анализ шока, т.е. вскрытие и изучение типовых механизмов этого патологического процесса. Наконец, заключительным этапом исследований является подход, предусматривающий изучение особенных для каждого случая и групповых характеристик развития шока, что имеет большое значение для клиники» [5]. Он считал, что современный этап развития исследований по проблеме шока характеризуется углубленным исследованием механизмов нарушения функций различных органов и систем, а также метаболизма. Одна из последних публикаций ученого посвящена патологическим изменениям в иммунной системе при тяжелой механической травме [25].

Жизнь страстного исследователя, талантливого педагога и руководителя В.К. Кулагина оборвалась слишком рано. Виктор Константинович умер 4 января 1982 г., не дожив до 59 лет, от острой сердечной недостаточности. Похоронен на Богословском кладбище г. Санкт-Петербурга [24].

Его научные публикации сегодня вполне могут быть отнесены к классике патофизиологии травматического шока.

Литература

1. Александров В.Н. В.К. Кулагин – учёный, учитель, врач. *Военный врач*. 1993; 29(1276): 5.
2. Кулагин В.К. Вклад патофизиологов в победу советского народа в Великой Отечественной войне. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1975; 3: 3-10.
3. Устинов П.Н., Ахутин М.Н., Геселевич А.М., ред. *Труды Группы № 1 по изучению шока*. Прага: Действующая Армия; 1945.
4. Кулагин В.К. *Материалы к патогенезу и терапии травматического шока*: дис... д-ра мед. наук. Л.; 1961.
5. Кулагин В.К. *Патологическая физиология травмы и шока*. Л.: Медицина; 1978.
6. Кулагин В.К. Патогенез геморрагического шока. В кн.: *Первая Всесоюзная конференция сердечно-сосудистых хирургов*. М.; 1975: 25-34.

7. Болдина И.Г., Фаршатов М.Н., Кулагин В.К. и др. Стандартная модель для изучения противошоковой терапии. *Военно-медицинский журнал*. 1975; 7: 17-9.
8. Долинин В.А., Кулагин В.К., Шанин Ю.Н. Итоговые данные комплексных экспериментальных исследований по проблемам патогенеза и экспериментальной терапии травматического шока. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1982; 6: 23-9.
9. Кулагин В.К., Жижин В.Н., Галкин В.В. О путях повышения эффективности и ускорении темпов научных исследований в области травматического шока и кровопотери. *Проблемы гематологии и переливания крови*. 1976; 21(8): 3-8.
10. Кулагин В.К. К вопросу об изменениях функции нервной системы при шоке. В кн.: *Труды ВМОЛА*. Л.; 1962; 143: 24-44.
11. Кулагин В.К. Значение изменений мозгового кровообращения в развитии расстройств нервной деятельности при травматическом шоке. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1963; 7(2): 26-30.
12. Кулагин В.К., Ковалев О.А., Криворучко Б.И., Шереметевская С.К. Емкостная функция системы кровообращения в динамике геморрагического и травматического шока. *Вопросы скорой медицинской помощи*. 1981; 1: 51-60.
13. Кулагин В.К., Ассур М.В. Сравнительная оценка различных методов трансфузионной терапии при тяжелой кровопотере. *Военно-медицинский журнал*. 1972; 8: 42-5.
14. Кулагин В.К. Модификация метода внутриартериального введения крови и жидкости Петрова для лечения агональных состояний, возникающих при осложнении шока кровопотерей. *Вестник хирургии им. Грекова*. 1961; 86(5): 24-9.
15. Кулагин В.К. О ранней профилактике и механизме развития травматического шока в эксперименте: дис... канд. мед. наук. Л.; 1954.
16. Кулагин В., Кудрин В. Кафедра патологической физиологии – 100 лет. *Военный врач*. 1979; 32: 3.
17. Кулагин В.К. Патологическая физиология начальных стадий травматического шока. В кн.: *Труды ВМА*. Л.; 1979; 203: 17-23.
18. Давыдов В.В., Дерябин И.И., Кулагин В.К., Шурыгин Д. Гормональные сдвиги у больных при тяжелых механических повреждениях. *Военно-медицинский журнал*. 1980; 4: 38-41.
19. Кулагин В.К., Давыдов В.В. Методологические аспекты оценки функции гипоталамо-гипофизарно-кортико-адреналовой системы при стрессе, сопровождающийся выраженными сдвигами гомеостаза. В кн.: *Стресс и его патологические механизмы*. Кишинев; 1973: 28-31.
20. Кулагин В.К. *Роль коры надпочечников в патогенезе травмы и шока*. Л.: Медицина; 1965.
21. Кулагин В.К. Патологические основы терапии шока и кровопотери кортикостероидами и АКГТ. *Военно-медицинский журнал*. 1964; 12: 7-12.
22. Кулагин В.К., Давыдов В.В., Ермаков А.М. О лечебном действии холинэстеразы при экспериментальном травматическом шоке. *Вестник хирургии им. Грекова*. 1969; 102(1): 76-8.
23. Памяти В.К. Кулагина. *Военный врач*. 1982; 3: 4.
24. Памяти В.К. Кулагина. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1982; 4: 94.
25. Александров В.Н., Кулагин В.К. Патологические изменения в иммунной системе при тяжелой механической травме. *Военно-медицинский журнал*. 1982; 8: 21-4.

References

1. Aleksandrov V.N. V.K. Kulagin is a scientist, teacher, doctor. *Voennyi vrach*. 1993; 29(1276): 5.
2. Kulagin V.K. The contribution of pathophysiologicals to the victory of the Soviet people in the Great Patriotic War. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 1975; 3: 3-10.
3. Ustinov P.N., Akhutin M.N., Geselevich A.M., ed. *Proceedings of the Group No. 1 on the study of shock. [Trudy Gruppy № 1 po izucheniyu shoka]*. Praga: Deistvuyushchaya Armiya; 1945.
4. Kulagin V.K. *Materials for the pathogenesis and therapy of traumatic shock. [Materialy k patogenezu i terapii travmaticheskogo shoka: dis... d-ra med. nauk]*. Leningrad; 1961.
5. Kulagin V.K. *Pathological physiology of trauma and shock. [Patologicheskaya fiziologiya travmy i shoka]*. Leningrad: Meditsina; 1978.
6. Kulagin V.K. *The pathogenesis of hemorrhagic shock. In.: First All-Union Conference of Cardiovascular Surgeons. [Patogenez gemorragicheskogo shoka. V kn.: Pervaya Vsesoyuznaya konferentsiya serdechno-sudistykh khirurgov]*. Moscow; 1975: 25-34.
7. Boldina I.G., Farshatov M.N., Kulagin V.K., et al. Standard Model for the Study of Anti-Shock Therapy. *Voенно-медицинский журнал*. 1975; 7: 17-9.
8. Dolinin V.A., Kulagin V.K., Shanin Yu.N. Final data of complex experimental studies on the problems of pathogenesis and experimental therapy of traumatic shock. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 1982; 6: 23-9.
9. Kulagin V.K., Zhizhin V.N., Galkin V.V. On ways to increase efficiency and accelerate the pace of scientific research in the field of traumatic shock and blood loss. *Problemy gematologii i perelivaniya krovi*. 1976; 21(8): 3-8.
10. Kulagin V.K. *To the question of changes in the function of the nervous system during shock. In.: Trudy VMOLA. [K voprosu ob izmeneniyakh funktsii nervnoy sistemy pri shoke. V kn.: Trudy VMOLA]*. Leningrad; 1962; 143: 24-44.
11. Kulagin V.K. Significance of changes in cerebral circulation in the development of disorders of nervous activity in traumatic shock. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 1963; 7(2): 26-30.
12. Kulagin V.K., Kovalev O.A., Krivoruchko B.I., Sheremetevskaya S.K. Capacitive function of the circulatory system in the dynamics of hemorrhagic and traumatic shock. *Voprosy skoroy meditsinskoj pomoshchi*. 1981; 1: 51-60.
13. Kulagin V.K., Assur M.V. Comparative evaluation of various methods of transfusion therapy for severe blood loss. *Voенно-медицинский журнал*. 1972; 8: 42-5.
14. Kulagin V.K. Modification of the method of intra-arterial injection of blood and Petrov's fluid for the treatment of agonal conditions that occur when shock is complicated by blood loss. *Vestnik khirurgii imeni Grekova*. 1961; 86(5): 24-9.
15. Kulagin V.K. *On early prevention and the mechanism of development of traumatic shock in the experiment: diss. [O ranney profilaktike i mekhanizme razvitiya travmaticheskogo shoka v eksperimente: dis... kand. med. nauk]*. Leningrad; 1954.
16. Kulagin V., Kudrin V. The Department of Pathological Physiology is 100 years old. *Voennyi vrach*. 1979; 32: 3.
17. Kulagin V.K. *Pathological physiology of the initial stages of traumatic shock In.: Trudy VMA. [Patologicheskaya fiziologiya nachal'nykh stadiy travmaticheskogo shoka. V kn.: Trudy VMA]*. Leningrad; 1979; 203: 17-23

18. Davydov V.V., Deryabin I.I., Kulagin V.K., Shurygin D. Hormonal shifts in patients with severe mechanical injuries. *Voенно-медицинский журнал*. 1980; 4: 38-41.
19. Kulagin V.K., Davydov V.V. *Methodological aspects of assessing the function of the hypothalamic-pituitary-cortico-adrenal system during stress, accompanied by pronounced shifts in homeostasis. In.: Stress and its pathological mechanisms. [Metodologicheskie aspekty otsenki funktsii gipotalamo-gipofizarno-kortiko-adrenalovoy sistemy pri stresse, soprovozhdayushchijisya vyrazhennymi sdvigami gomeostaza. V kn.: Stress i ego patologicheskie mekhanizmy].* Kishinev; 1973: 28-31.
20. Kulagin V.K. *The role of the adrenal cortex in the pathogenesis of trauma and shock. [Rol' kory nadpocheknikov v patogeneze travmy i shoka].* Leningrad; Meditsina; 1965.
21. Kulagin V.K. Pathological basis for the treatment of shock and blood loss with corticosteroids and ACTH. *Voенно-медицинский журнал*. 1964; 12: 7-12.
22. Kulagin V.K., Davydov V.V., Ermakov A.M. On the therapeutic effect of cholinesterase in experimental traumatic shock. *Vestnik khirurgii imeni Grekova*. 1969; 102(1): 76-8.
23. In memory of V.K. Kulagin. *Voенный врач*. 1982; 3: 4.
24. In memory of V.K. Kulagin. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 1982; 4: 94.
25. Aleksandrov V.N., Kulagin V.K. Pathological changes in the immune system in severe mechanical trauma. *Voенно-медицинский журнал*. 1982; 8: 21-4.