

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, рекомендо-
ванных ВАК России для публикации значи-
мых 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 08.09.2023
Подписано к печати 12.09.2023
Опубликовано 20.09.2023

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 № 3. 1–148.

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 № 3 · 2023

Июль–Сентябрь

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. FS77-84858 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 Commu-
nications (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 Lea-ding
Peer-reviewed Scientific Journals and Publica-
tions, recommended by the Higher Attestation
Commission of Russia for publication of signifi-
cant 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: DigitalCirculation: 300 copies
The price is not fixed

Sent into set on 08.09.2023
Signed for publication on 12.09.2023
Published on 20.09.2023

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 3. 1-148.

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 № 3 · 2023
July–September

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 University, Chelyabinsk, Russia
N.N. Petrishchev, DSc, Prof., First St.Petersburg State Med. Univ., St.Peterburg, Russia
L.A. Severyanova, DSc, Prof., Kursk State Medical University, Kursk, Russia
V. Shvarz, PhD, Prof., Saarland University, Homburg/Saar, Germany

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Пронина И.В., Губенко М.С., Бурдённий А.М., Казубская Т.П., Брага Э.А., Логинов В.И.** Роль метилирования в регуляции экспрессии гена *DAPK1* и связанных с ним генов микроРНК при немелкоклеточном раке легкого 5
- Казиков О.В., Кабаков А.В., Повещенко А.Ф.** Взаимосвязь проонкогенных микроРНК (-21, -221, -222) и опухоль-супрессирующей микроРНК-429 лимфы со структурой тимуса при химиотерапии и оперативном лечении рака молочной железы 14
- Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Лобанов А.В., Давыдова Т.В.** Влияние антител к глутамату и F(ab')₂ фрагментов антител к глутамату на уровень тревожности стареющих мышей C57Bl/6 21
- Лобанов А.В., Захарова И.А., Лобанова Н.Н., Морозов С.Г.** Раннее соматическое и сенсомоторное развитие потомства от мышей с введением полного адьюванта Фрейнда до наступления беременности 29
- Счастливая Н.И., Жаворонок И.П., Доронкина А.С., Кукса М.С., Филатова Д.В., Чудиловская Е.Н., Лисовская М.В., Михальчук А.Л., Молчанова А.Ю.** Биологическое действие бутаноилэтанол амида и каприлоилэтанол амида у крыс: антиноцицептивный и побочные эффекты 39
- Фокин В.Ф., Шабалина А.А., Пономарева Н.В., Медведев Р.Б., Лагода О.В., Танашян М.М.** Кортизол, цитокины и вегетативные изменения при когнитивной нагрузке у больных хронической ишемией мозга 51
- Осиков М.В., Бойко М.С., Огнева О.И., Федосов А.А.** Этолого-иммунологические взаимосвязи при экспериментальном десинхронозе в условиях люминисцентного освещения 58
- Фефелов А.А., Цыбиков Н.Н., Терешков П.П., Фефелова Е.В.** Системные и локальные иммунологические эффекты плазмолифтинга в модели экспериментального пародонтита у крыс 68
- Яковлева М.А., Островский Д.С., Хубецова М.Х., Борзенков С.А., Фельдман Т.Б., Островский М.А.** Изучение цитотоксических свойств неокисленных и окисленных бисретиноидов липофусциновых гранул в клетках ретинального пигментного эпителия 76
- Донина Ж.А., Баранова Е.В.** Дозозависимая интенсивность гипоксической вентиляционной реакции в ранней фазе ЛПС-индуцированной эндотоксемии 88
- Иванов А.Н., Сахань М.А., Ермаков А.В., Ленгерт Е.В., Савкина А.А., Степанова Т.В., Кириязи Т.С., Лойко Д.Д.** Влияние полилактоидного микрокамерного раневого покрытия, загруженного таниновой кислотой, на состояние микроциркуляции в области экспериментальной острой эксцизионной кожной раны 97

ORIGINAL ARTICLES

- Pronina I.V., Gubenko M.S., Burdennyi A.M., Kazubskaya T.P., Braga E.A., Loginov V.I.** The role of methylation in regulating the expression of the *DAPK1* gene and associated microRNA genes in non-small cell lung cancer 5
- Kazakov O.V., Kabakov A.V., Poveshchenko A.F.** Relationship of pro-oncogenic miRNAs (-21, -221, -222) and tumor-suppressive miRNAs-429 lymph with the thymus structure during chemotherapy and surgical treatment of breast cancer 14
- Vetrile L.A., Zakharova I.A., Lobanov A.V., Davydova T.V.** Effects of glutamate antibodies and F(ab')₂ fragments of glutamate antibodies on the anxiety level in aging C57Bl/6 mice 21
- Lobanov A.V., Zakharova I.A., Lobanova N.N., Morozov S.G.** Early somatic and sensorimotor development of the offspring of mice administered with complete Freund's adjuvant before pregnancy 29
- Shchastnaya N.I., Zhavoronok I.P., Doronkina A.S., Kuksa M.S., Filatova D.V., Chudilovskaya E.N., Lisovskaya M.V., Mikhailchuk A.L., Molchanova A.Yu.** Biological effects of butanoyl ethanolamide and capryloyl ethanolamide in rats: antinociceptive and side effects 39
- Fokin V.F., Shabalina A.A., Ponomareva N.V., Medvedev R.B., Lagoda O.V., Tanashyan M.M.** Cortisol, cytokines and autonomic changes during cognitive load in patients with chronic cerebral ischemia 51
- Osikov M.V., Boyko M.S., Ogneva O.I., Fedosov A.A.** Ethological and immunological relationships in experimental desynchronization under fluorescent lighting conditions 58
- Fefelov A.A., Tsybikov N.N., Tereshkov P.P., Fefelova E.V.** Systemic and local immunological effects of plasmolifting in a rat model of periodontitis 68
- Yakovleva M.A., Ostrovsky D.S., Khubetsova M.Kh., Borzenok S.A., Feldman T.B., Ostrovsky M.A.** Study of the cytotoxic properties of non-oxidized and oxidized bisretinoids of lipofuscin granules in retinal pigment epithelial cells 76
- Donina Zh. A., Baranova E.V.** The dose-dependent intensity of hypoxic ventilatory response in the early phase of LPS-induced endotoxemia 88
- Ivanov A.N., Sahan M.A., Ermakov A.V., Lengert E.V., Savkina A.A., Stepanova T.V., Kiriyazi T.S., Loiko D.D.** The effect of polylactide microchamber wound dressing loaded with tannic acid on the microcirculation in the area of acute experimental excision skin wound defect 97

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Онищенко Н.А., Никольская А.О., Шагидулин М.Ю.** Прогрессирующая дисфункция иммунитета как фактор, препятствующий восстановительной регенерации печени при хронических фиброзирующих заболеваниях 109
- Геворкян Н.М.** Повышение эффективности терапии стволовыми клетками при содействии суммарных РНК лимфоцитов здоровых доноров 124
- Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б.** Сила кисти 137
- Громенко И.Д., Галимова Э.Ф., Громенко Р.И., Галимов Ш.Н., Громенко Д.Д., Галимов К.Ш., Литвицкий П.Ф.** Фрагментация ДНК сперматозоидов: связь с мужским бесплодием и методы коррекции 142

CONTENTS

REVIEW

- Onishchenko N.A., Nikolskaya A.O., Shagidulin M.Yu.** Progressive dysfunction of the immune system as a factor preventing recoverable regeneration of the liver in chronic fibrosing diseases 109
- Gevorgyan N.M.** Enhancing the effect of stem cell therapy by healthy donor total lymphocyte RNA support 124
- Paltsyn A.A., Sviridkina N.B.** Hand power 137
- Gromenko I.D., Galimova E.F., Gromenko R.I., Galimov Sh.N., Gromenko D.D., Galimov K.Sh., Litvitskiy P.F.** Sperm DNA fragmentation: association with infertility and methods of correction 142

Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092+575:599.9

Пронина И.В.¹, Губенко М.С.¹, Бурдённый А.М.^{1,2}, Казубская Т.П.³, Брага Э.А.^{1,4}, Логинов В.И.^{1,4}

Роль метилирования в регуляции экспрессии гена *DAPK1* и связанных с ним генов микроРНК при немелкоклеточном раке легкого

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

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

²ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» Российской академии наук,

119334, Москва, Россия, ул. Косыгина, д. 4;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,

115478, Москва, Каширское ш., д. 23;

⁴ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»,

115522, Москва, Россия, ул. Москворечье, д. 1

Актуальность. Одним из самых распространенных злокачественных новообразований является рак легкого. Его самой распространенной формой, более 85% всех случаев, является немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). Одним из генов, тесно связанным с возникновением и прогрессией этого вида рака, является ген *DAPK1*, эпигенетическая регуляция которого, происходит на разных уровнях, в частности, метилирование промоторного CpG-островка гена или же влияние изменения уровня экспрессии микроРНК, для которых ген *DAPK1* является геном-мишенью. Вопрос о влиянии метилирования и/или микроРНК на регуляцию экспрессии мРНК гена *DAPK1* при НМРЛ остается открытым.

Цель. Исследование изменений уровня экспрессии и/или метилирования микроРНК и их гена-мишени *DAPK1* при НМРЛ.

Методика. Образцы опухолей НМРЛ собраны и клинически охарактеризованы в НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Высокмолекулярную ДНК выделяли из ткани стандартным методом. Анализ уровня метилирования проводили с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метилспецифичной ПЦР (МС-ПЦР) с детекцией в реальном времени. Методом ОТ-ПЦР в реальном времени определены уровни экспрессии 4 микроРНК и их предполагаемого гена-мишени *DAPK1*. Статистический анализ выполнен с использованием программного пакета IBM SPSS 22. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

Результаты. С применением метилспецифичной ПЦР в реальном времени показано статистически значимое ($p < 0.05$) увеличение уровня метилирования гена *DAPK1* в образцах опухолей по сравнению с парной гистологически нормальной тканью легкого. Показано, что уровень экспрессии мРНК гена *DAPK1* статистически значимо ассоциирован как с изменением уровня метилирования промоторного CpG-островка гена *DAPK1* ($R_s = -0.517$, $p = 0.002$), так и с изменением уровня экспрессии исследованных микроРНК. В результате анализа уровней экспрессии *DAPK1* и микроРНК были составлены две пары miR-339-3p – *DAPK1* ($R_s = -0.476$, $p = 0.004$) и miR-375 – *DAPK1* ($R_s = -0.354$, $p = 0.037$), позволяющие говорить о существенном влиянии этих микроРНК на регуляцию активности гена *DAPK1*.

Заключение. Обнаруженные нами новые закономерности представляют интерес для понимания механизмов развития НМРЛ и могут лечь в основу диагностики и прогноза течения этой болезни, а также помочь скорректировать ход лечения с учетом патофизиологических особенностей опухоли.

Ключевые слова: метилирование; экспрессия; апоптоз; НМРЛ

Для цитирования: Пронина И.В., Губенко М.С., Бурдённый А.М., Казубская Т.П., Брага Э.А., Логинов В.И. Роль метилирования в регуляции экспрессии гена *DAPK1* и связанных с ним генов микроРНК при немелкоклеточном раке легкого. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(3): 5–13.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.5-13

Участие авторов: проведение исследования по экспрессии – Пронина И.В.; обработка материала, проведение исследования – Губенко М.С.; проведение исследования по метилированию – Бурдённый А.М.; сбор и описание материала – Казубская Т.П.; общее руководство исследованием – Брага Э.А.; концепция и дизайн исследования, подготовка иллюстративного материала, редактирование статьи – Логинов В.И. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

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

Финансирование. Работа выполнена за счет средств государственного задания № FGFU-2023-0001.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.07.2023

Принята к печати 12.07.2023

Опубликована 20.09.2023

Pronina I.V.¹, Gubenko M.S.¹, Burdenny A.M.^{1,2}, Kazubskaya T.P.³, Braga E.A.^{1,4}, Loginov V.I.^{1,4}**The role of methylation in regulation of the expression of the *DAPK1* gene and associated microRNA genes in non-small cell lung cancer**¹Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya St. 8, Moscow, 125315, Russian Federation;²Emanuel Institute for Biochemical Physics, Kosygina St. 4, Moscow, 119334, Russian Federation;³Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Kashirskoe Shosse 23, Moscow, 115478, Russian Federation;⁴Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moskvorechye 1, Moscow, 115522, Russian Federation

Background. Lung cancer is one of the most common malignant neoplasms. Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most prevalent form of lung cancer, that accounts for more than 85% for all cases. The *DAPK1* gene is one of the genes closely associated with the emergence and progression of this cancer. Epigenetic regulation of the *DAPK1* gene occurs at different levels, in particular, by CpG island gene promoter methylation or by changes in the expression level of microRNAs, for which the *DAPK1* gene is a target gene. The question of the effect of methylation and/or microRNAs on the regulation of the *DAPK1* gene mRNA expression in NSCLC remains open.

Aim. Detection of changes in the level of expression and/or methylation of microRNAs and their target gene *DAPK1* in NSCLC.

Methods. Samples of NSCLC tumors were collected and clinically characterized at the Research Institute of Clinical Oncology of the Blokhin National Research Center of Oncology. High-molecular DNA was isolated from the tissue by a standard method. The methylation level was determined using bisulfite DNA conversion and quantitative methyl-specific PCR (MS-PCR) with real-time detection. The levels of expression of 4 microRNAs and their putative target gene *DAPK1* were determined by real-time PCR (RT-PCR). Statistical analysis was performed using an IBM SPSS 22 software package. The differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results. The analysis with MS RT-PCR showed a statistically significant ($p < 0.05$) increase in the level of methylation of the *DAPK1* gene in tumor samples in comparison with paired histologically normal lung tissue. The level of the *DAPK1* gene mRNA expression was statistically significantly associated with both the change in the methylation level of the *DAPK1* gene promoter CpG island ($R_s = -0.517, p = 0.002$) and the change in the expression of studied microRNA. The analysis of expression levels of *DAPK1* and microRNAs allowed creation of two pairs, miR-339-3p – *DAPK1* ($R_s = -0.476, p = 0.004$) and miR-375 – *DAPK1* ($R_s = -0.354, p = 0.037$), which suggested a significant effect of these microRNAs on the regulation of *DAPK1* gene activity.

Conclusion. Thus, the newly discovered patterns are of interest for understanding the mechanisms of NSCLC development. They can form a basis for diagnosis and prognosis of this disease and also help adjustment of the treatment taking into account pathological features of the tumor.

Keywords: methylation; expression; apoptosis; NSCLC

For citation: Pronina I.V., Gubenko M.S., Burdenny A.M., Kazubskaya T.P., Braga E.A., Loginov V.I. The role of methylation in regulating the expression of the *DAPK1* gene and associated microRNA genes in non-small cell lung cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(3): 5–13. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.5-13

Author's contribution: conducting an expression study – Pronina I.V.; processing the material, conducting the study – Gubenko M.S.; conducting a methylation study – Burdenny A.M.; collecting and describing the material – Kazubskaya T.P., general management of the study – Braga E.A.; concept and design of the study, preparation of illustrative material, editing of the article – Loginov V.I. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: **Alexey M. Burdenny**, Candidate of Biological Sciences, L.S.S. lab. Pathogenomics and Transcriptomics of FSBSI IGPP, e-mail: burdenny@gmail.com

Information about the authors:Pronina I.V., <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>Burdenny A.M., <https://orcid.org/0000-0002-9398-8075>Kazubskaya T.P., <https://orcid.org/0000-0001-5856-0017>Braga E.A., <https://orcid.org/0000-0001-5188-4094>Loginov V.I., <https://orcid.org/0000-0003-2668-8096>

Financing. The work was funded by the Ministry of science and higher education of the Russian Federation, state assignment № FGFU-2023-0001 for 2023-2024.

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

Received 06.07.2023

Accepted 12.07.2023

Published 20.09.2023

Введение

Рак является одной из ведущих причин смерти во всем мире [1]. В российской популяции онкобольных в 2021 г. рак легкого диагностирован у 56 428 человек, в то же время у 46 792 человек диагностирован неблагоприятный исход [2]. Следует отметить, что механизмы образования и прогрессии опухоли связаны с нарушением динамической регуляции клеточных процессов, протекающих в нормальных тканях, в том числе и ткани легкого, и обусловлены как генетическими, так и эпигенетическими факторами, которые играют критическую роль в регуляции экспрессии генов-супрессоров опухоли [3, 4]. Одним из таких генов, участвующих в подавлении прогрессии опухоли разных локализаций, является ген DAPK1 (рис. 1) [5, 6].

Ген *DAPK1* (*Death-associated protein kinase*, ассоциированная с апоптозом протеинкиназа 1) был открыт

при изучении апоптоза индуцированного интерфероном- γ [8] и локализован в районе 9q21.33. DAPK1 представляет собой киназу Ser/Thr, белок с молекулярной массой 160 кДа, состоящий из 1430 аминокислот, объединенных в протеинкиназный домен, кальций-кальмодулин связывающий сайт, область связывания с цитоскелетом клетки и домен смерти [9], которая опосредует апоптоз, индуцированный различными стимулами [8]. Последующие исследования показали, что активация и/или сверхэкспрессия DAPK1 способствует каспазозависимому или – независимому апоптозу, аутофагии, некрозу и аноикс-подобной гибели клеток [8, 10]. Помимо роли, способствующей гибели клеток, DAPK1 играет важную роль в росте клеток, онкогенезе, воспалении [5, 6, 8]. Так, на ранней стадии рака DAPK1 может

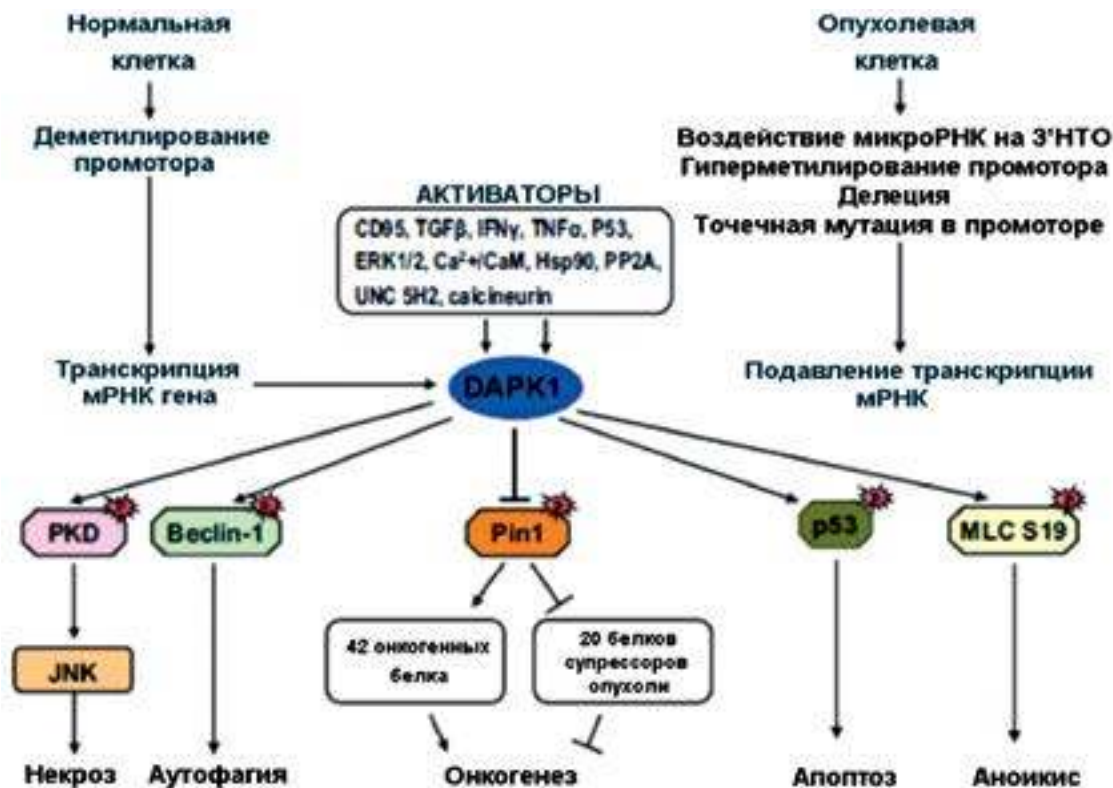


Рис. 1. Молекулярные механизмы, с помощью которых DAPK1 подавляет рак. Функция DAPK1 может быть снижена на нескольких уровнях, как за счет метилирования ДНК, так и воздействия ряда микроРНК-а на мРНК гена DAPK1. DAPK1 контролирует два основных регулятора сигнальных путей в клетке – активируя p53 и/или ингибируя Pin1, что приводит к остановке роста клеток и апоптозу. «р» в верхнем углу многоугольника – процесс фосфорилирования. 3'НТО – 3' нетранслируемая область (адаптирован из [7]).

Fig. 1. Molecular mechanisms of suppressing cancer by DAPK1. The functioning of DAPK1 can be reduced at several levels, both due to DNA methylation and the effect of a number of microRNAs -on the mRNA of the *DAPK1* gene. DAPK1 controls two main regulators of signaling pathways in the cell – activating p53 and/or inhibiting Pin1, which leads to cell growth arrest and apoptosis. The “p” in the upper corner of the polygon is the phosphorylation process. 3'NTO – 3' untranslated area (adapted from [7]).

подавлять рост опухоли и метастазирования за счет усиления апоптоза, а на поздних стадиях – может ингибировать движение и адгезию клеток, вмешиваясь в работу белков интегринов [11].

Впервые, связь между геном *DAPK1* и раком предположили, когда было выявлено снижение уровня его экспрессии в опухолевых тканях человека [6]. Эти наблюдения, впоследствии, были подтверждены, когда обнаружили, что промоторная область *DAPK1* значительно подвергалась метилированию в 30 различных типах опухолей человека по сравнению с соответствующей нормальной тканью, включая злокачественные новообразования легких, толстой кишки, груди, головы и шеи, почек, печени и В-клеток [5, 12, 13]. При этом, восстановление физиологических уровней *DAPK1*, в частности, при карциноме Льюиса, для которой показана высокая метастатическая активность, приводило к эффективному подавлению ее способности образовывать метастазы. Исследование было проведено на мышах [14]. Хотя гиперметилирование промоторного CpG-островка гена *DAPK1* часто указывается как основной механизм инактивации этого гена при раке, белок *DAPK1* все же может экспрессироваться и в присутствии гиперметилирования в первичных тканях и клеточных линиях. Неоднократно сообщалось и о потере экспрессии *DAPK1* в отсутствие гиперметилирования его промотора, что указывает на существование дополнительных уровней регуляции *DAPK1* в опухолях, включая посттранскрипционную регуляцию *DAPK1*. В небольшом числе исследований сообщалось о гомозиготных и аллельных делециях, точечных мутациях и однонуклеотидных полиморфизмах в гене *DAPK1* [5, 6, 15].

Одним из таких дополнительных уровней регуляции может выступать взаимодействие микроРНК с 3'Нетранслируемой областью (3'НТО) мРНК гена-мишени [16]. МикроРНК представляет собой семейство высококонсервативных некодирующих РНК, длиной 19–25 нуклеотидов. Основная функция микроРНК – участие в регуляции экспрессии белоккодирующих генов на посттранскрипционном уровне [17]. По данным базы miRWalk мРНК гена *DAPK1* может являться мишенью для 300 микроРНК. Для многих из них показано влияние на экспрессию гена *DAPK1* при различных видах онкозаболеваний. Так, например, miR-103 и miR-107 связываются с 3'НТО мРНК гена *DAPK1* и подавляют экспрессию р*DAPK1*, тем самым инактивируя интегрин В1, что приводит к увеличению подвижности клеток и снижению адгезии клеток к матриксу при колоректальном раке [18]. В то же время, влияние ряда микроРНК

на изменение уровня экспрессии *DAPK1* при НМРЛ еще до конца не изучено, например miR-124-3p, miR-129-5p, miR-339-3p, miR-375 и др. Следует отметить, что данных о взаимодействии мРНК гена *DAPK1* с этими микроРНК при НМРЛ не выявлено.

Целью данной работы являлось исследование изменений уровня экспрессии и/или метилирования микроРНК и их гена-мишени *DAPK1* при немелкоклеточном раке легкого.

Методика

Образцы опухолей НМРЛ собраны и клинически охарактеризованы в НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по системе TNM в соответствии с классификацией RUSSCO. Исследование проведено с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с принципами Хельсинкской декларации ВМА. В **таблице** приведены обобщенные данные по клинико-патоморфологическим характеристикам 35 исследованных парных образцов НМРЛ.

Высокомолекулярную ДНК и РНК выделяли из ткани стандартными методами. Анализ уровня метилирования промоторного CpG-островка гена *DAPK1* проводили с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метилспецифичной ПЦР (МС-ПЦР) с детекцией в реальном времени, как описано в работе [19]. Олигонуклеотиды для анализа уровня метилирования гена *DAPK1* взяты из работы [20].

Поиск предположительно взаимодействующих пар микроРНК – мРНК гена мишени проводили на основе анализа данных интернет-ресурса miRWalk2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/index.html>).

Анализ уровня экспрессии мРНК гена *DAPK1* проводили методом количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green I в составе набора qPCRmix-HS SYBR (5x) в соответствии с протоколом производителя (Евроген, Россия) на амплификаторе BioRad CFX96 qPCRSYSTEM (Bio-Rad, США). Уровень экспрессии miR-124-3p (ID: 001182), miR-129-5p (ID: 000590), miR-339-3p (ID: 002184), miR-375 (ID: 000564) анализировали с помощью TaqMan qPCR (TaqMan MicroRNA Assay; Applied Biosystems, США) и нормализовали по экспрессии RNU6 (ID: 001093). Олигонуклеотиды для анализа уровня экспрессии гена *DAPK1* и гена *B2M*, являющегося эндогенным внутренним контролем при анализе экспрессии, взяты

из работы [20]. Все ПЦР повторяли трижды. Данные анализировали с использованием относительной количественной оценки по $\Delta\Delta Ct$ -методу. Изменения уровня экспрессии менее, чем в 2 раза ($|\Delta\Delta Ct| \leq 2$) рассматривали как отсутствие изменений [20].

Статистический анализ. Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием пакета статистических программ «IBM SPSS Statistics 22», который включал определение медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q1–Q3). Для оценки статистической значимости различий применялся непараметрический критерий Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводили посредством расчета коэффициента корреляции Спирмена и уровня его значимости. Значение $p < 0.05$ были приняты в качестве критериев статистической значимости.

Результаты и обсуждение

В настоящей работе изучено влияние ряда механизмов эпигенетической регуляции экспрессии, затрагивающей изменение уровня мРНК гена *DAPK1* при

НМРЛ. К этим механизмам относится как метилирование промоторных CpG-островков самих генов, так и изменение уровня экспрессии миРНК, для которых эти гены являются мишенями.

Таким образом, методом количественной метил-специфичной ПЦР был проведен анализ изменения уровня метилирования гена *DAPK1* в опухолевой ткани НМРЛ и прилежащей к опухоли гистологически нормальной ткани легкого. Используя критерий Манна–Уитни для независимых выборок, было показано статистически значимое увеличение уровня метилирования гена *DAPK1* в опухолевой ткани НМРЛ (рис. 2, А). Полученные нами результаты дополняют полученные ранее в международных исследованиях данные о характере метилирования данного гена при НМРЛ [21, 22].

Следует отметить, что изменение уровня метилирования генов лежит в основе прогрессии любой опухоли, в том числе и НМРЛ. Поэтому, нами был проведен анализ изменения уровня метилирования промоторного района гена *DAPK1* в образцах опухоли в зависимости от патоморфологических характеристик,

Клинико-патоморфологические параметры больных НМРЛ

Clinical and pathomorphological parameters of NSCLC patients

Клинико-патоморфологический параметр Clinical and pathomorphological parameter		n, (%)
Гистологический диагноз Histological diagnosis	Плоскоклеточный рак легкого Squamous cell lung cancer	16, (45.7)
	Аденокарцинома легкого Adenocarcinoma of the lung	19, (54.3)
Стадия опухолевого процесс Tumour stage	I	11, (31.4)
	II	8, (22.9)
	III	13, (37.1)
	IV	3, (8.6)
Степень дифференцировки Degree of differentiation	G1	2, (5.7)
	G2	15, (42.9)
	G3	18, (51.4)
Размер первичной опухоли Primary tumour size	T1	4, (11.4)
	T2	19, (54.3)
	T3	5, (14.3)
	T4	7, (20.0)
Лимфогенное метастазирование Lymphogenic metastasis	N0	12, (34.3)
	N1-3	23, (65.7)
Статус курильщика Smoking status	Курит Smokes	17, (48.6)
	Не курит Doesn't smoke	18, (51.4)

таких как клиническая стадия опухолевого процесса, степень дифференцировки клеток опухоли, размер опухоли, наличие или отсутствие лимфогенного метастазирования. Было выявлено статистически значимое увеличение уровня метилирования гена в образцах полученных от пациентов с тяжелыми стадиями НМРЛ (III-IV стадии) по сравнению с образцами от пациентов с более ранними стадиями (I-II) легкими стадиями (рис. 2, Б). Также статистически значимо высокий уровень метилирования гена *DAPK1* был связан с увеличением размера опухоли (T3/T4 против T1/T2) и наличием лимфогенного метастазирования (N1 против N0) (рис. 2, Б). Что интересно, в ряде зарубежных исследований также отмечено увеличение уровня метилирования с прогрессией опухоли [23–25]. В частности, показано, что гиперметилирование промотора *DAPK1* коррелирует с лимфатическим метастазированием при раке желудка и плоскоклеточном раке ротоглотки [26, 27].

Далее методом ПЦР в реальном времени в образцах НМРЛ были исследованы профили экспрессии микроРНК miR-124-3p, miR-129-5p, miR-339-3p, miR-375 и мРНК их гена-мишени *DAPK1* (рис. 3). В результате было найдено статистически значимое снижение уровня экспрессии miR-375 у в опухолевых образцах НМРЛ по сравнению с парной гисто-

логически нормальной тканью. Для остальных изученных генов статистически значимых результатов получено не было.

С применением корреляционного анализа показана статистически значимая отрицательная корреляция между изменением уровня метилирования промоторного CpG-островка и уровнем экспрессии для гена *DAPK1* (рис. 4, А). Поэтому можно сказать, что гиперметилирование в опухоли является биологическим маркером изменения экспрессии этого гена. Следует подчеркнуть, что наши результаты согласуются как с данными мировых исследователей, так и нашими собственными, полученными для других видов онкологии [20, 28].

Хотя высокий уровень метилирования промоторных CpG-островков генов кодирующих белок часто признается основной причиной инактивации того или иного гена, часто белки, кодируемые этими генами, могут не экспрессироваться и при отсутствии метилирования в первичных тканях и клеточных линиях, что указывает на существование дополнительных уровней их регуляции в опухолях, включая посттранскрипционную регуляцию. Поэтому, нами было проведено сопоставление данных по изменению уровня экспрессии мРНК гена *DAPK1* и 4-х миРНК (miR-124-3p, miR-129-5p, miR-339-3p, miR-375), для кото-

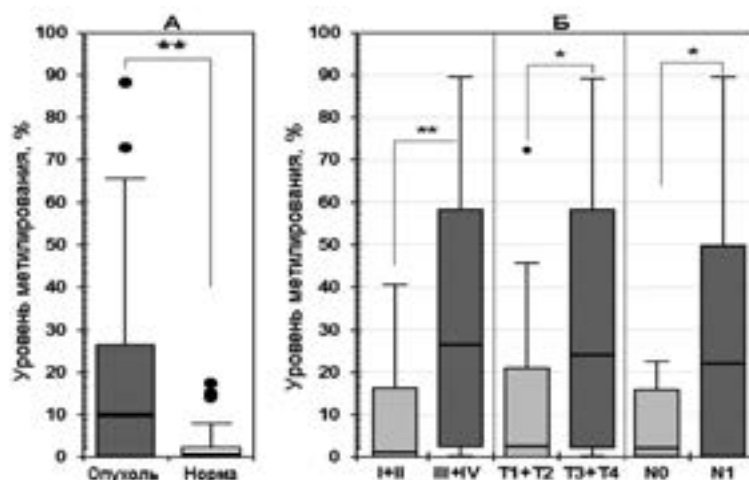


Рис. 2. Статус метилирования гена *DAPK1*: (А) в парных (опухоль/норма) образцах НМРЛ; (Б) связь с клинической стадией, размером опухоли, лимфогенным метастазированием при НМРЛ. Здесь и далее, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; верхняя и нижняя граница прямоугольников соответствуют Q1 и Q3. Линия внутри прямоугольника соответствует Me. Линиями сверху и снизу от прямоугольников отмечена «ограда», расположенная на 1.5 межквартильных расстояний (Q1-Q3) от нижней и верхней границ коробки. Все точки за пределами «ограды» помечались как «вылетающие» наблюдения, или «выбросы».

Fig. 2. The methylation status of the *DAPK1* gene: (A) in paired (tumor/norm) NSCLC samples; (B) the relationship with the clinical stage, tumor size, lymphogenic metastasis in NSCLC. Here and further, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; the upper and lower bounds of the rectangles correspond to Q1 and Q3. The line inside the rectangle corresponds to Me. The lines above and below the rectangles mark the «fence» located at 1.5 interquartile distances (Q1-Q3) from the lower and upper borders of the box. All points outside the «fence» were marked as «outgoing» observations, or «outliers».

рых этот ген является потенциальным геном-мишенью. Данные о возможной взаимосвязи между миРНК и белоккодирующими генами были получены по результатам анализа базы miRWalk (<https://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>).

В результате анализа полученных данных и оценки их конкордантности, с помощью коэффициента корреляции Спирмена, были сформированы 2 пары миРНК – мРНК ген-мишень: miR-339-3p – DAPK1 ($R_s = -0,476$, $p = 0,004$); miR-375 – DAPK1 ($R_s = -0,354$, $p = 0,037$) (рис. 4, Б). Полученные нами результаты позволяют предполагать прямое воздействие миРНК на изменение уровня экспрессии мРНК гена *DAPK1*, что согласуется с известным механизмом подавления экспрессии белоккодирующих генов под действием миРНК. В частности, в литературе при раке молочной железы для miR-191-5p отмечено взаимодействие с мРНК гена *DAPK1*, приводящее к инактивации гена и тем самым блокированию проведению сигналов «смерти клетки» и отключению митохондриального пути апоптоза. [29]. В другой работе, выполненной на образцах почечно-клеточного рака, экспрессия *DAPK1* была снижена из-за воздействия на нее miR-34a [30]. При восстановлении уровня экспрессии *DAPK1* происходило подавление пролиферации, миграции и инвазии клеток почечно-клеточного рака.

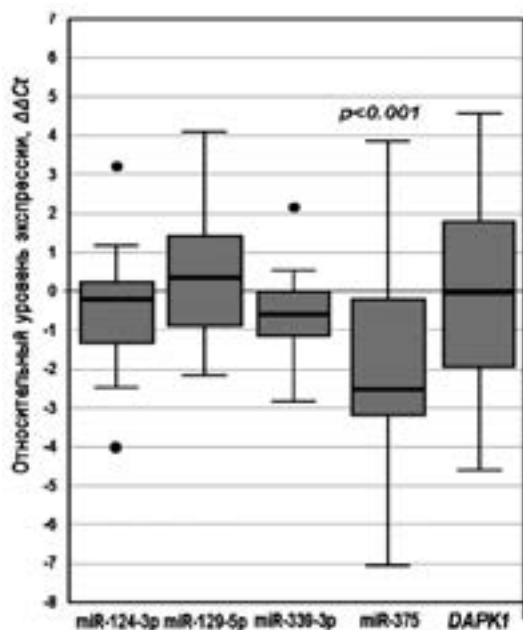


Рис. 3. Профиль экспрессии miR-124-3p, miR-129-5p, miR-339-3p, miR-375 и мРНК гена *DAPK1* при НМРЛ, выраженный в значениях $-\Delta\Delta C_t$.

Fig. 3. Expression profile of miR-124-3p, miR-129-5p, miR-339-3p, miR-375 and mRNA of the *DAPK1* gene in NSCLC, expressed in values $-\Delta\Delta C_t$.

Следует подчеркнуть, что данных о взаимодействии miR-339-3p и miR-375 с мРНК гена *DAPK1* при НМРЛ не выявлено (PubMed, апрель 2023). Однако, в ряде работ показано, что высокий уровень экспрессии miR-375 вносит существенный вклад в прогрессию рака легкого и показано ее взаимодействие с рядом генов-мишеней (*PAX6*, *RHOJ*, *IGF1R* и др.), которые играют важную роль при апоптозе, эпителиально-мезенхимальном переходе, миграции инвазии клеток [31]. Для миРНК miR-339 показана тесная связь изменения уровня экспрессии с инактивацией ферроптоза [32] при аденокарциноме легкого.

Таким образом, полученные нами взаимодействующие пары миРНК – мРНК ген-мишень, скорее всего с связаны с регуляцией процессов программируемой клеточной гибели, протекающими в нормальной и/или опухолевой клетке. Однако, эти результаты, требуют дополнительного подтверждения *in vitro* и *in vivo*.

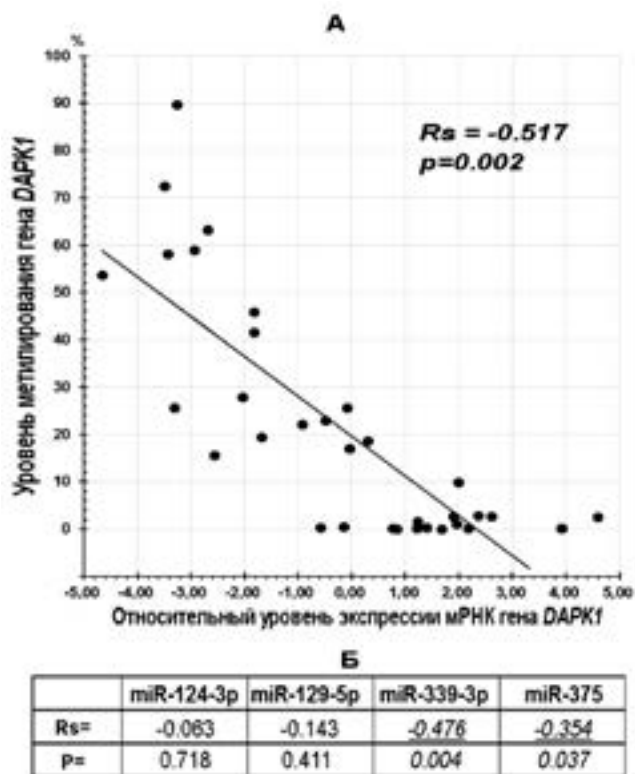


Рис. 4. Корреляционный анализ. (А) Связь между экспрессией мРНК и метилированием ДНК для гена *DAPK1*; (Б) Потенциально-взаимодействующие пары миРНК – ген-мишень при НМРЛ. Коэффициент корреляции Спирмена – R_s и p – значение (двустороннее) корреляции.

Fig. 4. Correlation analysis. (A) The relationship between mRNA expression and DNA methylation for the *DAPK1* gene; (B) Potentially interacting miRNA-target gene pairs in NSCLC. Spearman's correlation coefficient is R_s and p is the (two-way) correlation value.

Заключение

Известно, что DAPK1 играет важную роль в регуляции роста и гибели клеток, что имеет решающее значение для выживания как пролиферирующих, так и дифференцированных тканей. Нарушение регуляции экспрессии и/или активности DAPK1 может вызывать или способствовать развитию рака, в том числе и НМРЛ. Гиперметилирование или инактивация DAPK1, посредством изменения уровня экспрессии микроРНК, провоцируют рак через антиапоптотические пути, и эффективная активация DAPK1, нацеленная только на раковые клетки, может стать мощной противораковой терапией.

В настоящем исследовании показано, что метилирование промоторного CpG-островка гена *DAPK1* вносит существенный вклад в снижение уровня его экспрессии, что приводит к прогрессии НМРЛ, что также подтверждается высоким уровнем метилирования на поздних стадиях онкологического процесса. Следует отметить, что процесс регуляции уровня экспрессии данного гена также связан с изменением уровня экспрессии miR-339-3p и miR-375, для которых ген *DAPK1* является геном-мишенью.

Таким образом, выявленные нами особенности представляются важными для понимания патогенеза НМРЛ; а исследование уровня метилирования и/или экспрессии может найти применение при разработке персонализированных подходов к диагностике, прогнозу у больных НМРЛ.

Однако разработка модуляторов DAPK1 все еще находится на ранних стадиях и может быть сложной из-за специфичности, проблем с селективностью, нецелевых эффектов, побочных эффектов. Необходимы дополнительные исследования, чтобы лучше понять, как DAPK1 регулируется в определенных тканях и при онкологических заболеваниях и как DAPK1 взаимодействует со своими партнерами по связыванию.

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

Литература

(п.п. 1; 3-32 см. References)

2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. *Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность)*. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2022.

References

1. Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2022; 72(1): 7-33. doi: 10.3322/caac.21708
2. Kaprin A.D., Starinsky V.V., Shakhzadova A.O. *Malignant neoplasms in Russia in 2021 (morbidity and mortality)*. [Zlokachestvennyye novoobrazovaniya v Rossii v 2021 gody zabolevaemost i smertnost]. Moscow: MNIIOI named. P.A. Herzen – a branch of the Federal State Budgetary Institution “SMRC Radiology” of the Ministry of Health of Russia. 2022.
3. Morris L.G., Chan T.A. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer.* 2015; 121(9): 1357-68. doi: 10.1002/cncr.29140
4. Yang S., Huang Y., Zhao Q. Epigenetic Alterations and Inflammation as Emerging Use for the Advancement of Treatment in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Immunol.* 2022; 13: 878740. doi: 10.3389/fimmu.2022.878740
5. Chen H.Y., Lee Y.R., Chen R.H. The functions and regulations of DAPK in cancer metastasis. *Apoptosis.* 2014; 19(2): 364-70. doi: 10.1007/s10495-013-0923-6
6. Michie A.M., McCaig A.M., Nakagawa R., Vukovic M. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: regulation in cancer. *FEBS J.* 2010; 277(1): 74-80. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07414.x
7. Chen D., Zhou X.Z., Lee T.H. Death-Associated Protein Kinase 1 as a Promising Drug Target in Cancer and Alzheimer’s Disease. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2019; 14(2): 144-57. doi: 10.2174/1574892814666181218170257
8. Bialik S., Kimchi A. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annu Rev Biochem.* 2006; 75: 189-210. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142615
9. Singh P., Ravanan P., Talwar P. Death Associated Protein Kinase 1 (DAPK1): A Regulator of Apoptosis and Autophagy. *Front Mol Neurosci.* 2016; 23; 9: 46. doi: 10.3389/fnmol.2016.00046
10. Tian X., Shi Y., Liu N., Yan Y., Li T., Hua P., et al. Upregulation of DAPK contributes to homocysteine-induced endothelial apoptosis via the modulation of Bcl2/Bax and activation of caspase 3. *Mol Med Rep.* 2016; 14(5): 4173-79. doi: 10.3892/mmr.2016.5733
11. Kuo J.C., Wang W.J., Yao C.C., Wu P.R., Chen R.H. The tumor suppressor DAPK inhibits cell motility by blocking the integrin-mediated polarity pathway. *J Cell Biol.* 2006; 13; 172(4): 619-31. doi: 10.1083/jcb.200505138
12. Cai F., Xiao X., Niu X., Zhong Y. Association between promoter methylation of DAPK gene and HNSCC: A meta-analysis. *PLoS One.* 2017; 12(3): e0173194. doi: 10.1371/journal.pone.0173194
13. Steinmann S., Kunze P., Hampel C., Eckstein M., Bertram Bramsen J., Muenzner J.K., et al. DAPK1 loss triggers tumor invasion in colorectal tumor cells. *Cell Death Dis.* 2019; 10(12): 895. doi: 10.1038/s41419-019-2122-z
14. Inbal B., Cohen O., Polak-Charcon S., Kopolovic J., Vadai E., Eisenbach L., Kimchi A. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature.* 1997; 390(6656): 180-4. doi: 10.1038/36599
15. Benderska N., Schneider-Stock R. Transcription control of DAPK. *Apoptosis.* 2014; 19(2): 298-305. doi: 10.1007/s10495-013-0931-6
16. Michlewski G., Cáceres J.F. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA.* 2019; 25(1): 1-16. doi: 10.1261/rna.068692.118

17. Wang Y., Luo Z., Wang Z., You M., Xie S., Peng Y., et al. Effect of Curcumin-Loaded Nanoparticles on Mitochondrial Dysfunctions of Breast Cancer Cells. *J. Nanoparticle Res.* 2018; 20(10): 283-94. doi:10.1007/s11051-018-4382-4
18. Chen H.Y., Lin Y.M., Chung H.C., Lang Y.D., Lin C.J., Huang J., et al. miR-103/107 promote metastasis of colorectal cancer by targeting the metastasis suppressors DAPK and KLF4. *Cancer Res.* 2012; 72(14): 3631-41. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0667
19. Loginov V.I., Pronina I.V., Filippova E.A., Burdenny A.M., Lukina S.S., Kazubskaya T.P., et al. Aberrant methylation of 20 miRNA genes specifically involved in various steps of ovarian carcinoma spread: from primary tumors to peritoneal macroscopic metastases. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(3): 1300. doi: 10.3390/ijms23031300
20. Pronina I.V., Loginov V.I., Burdenny A.M., Fridman M.V., Senchenko V.N., Kazubskaya T.P., et al. DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene.* 2017; 604: 1-8. doi: 10.1016/j.gene.2016.12.018
21. Chen Z., Fan Y., Liu X., Shang X., Qi K., Zhang S. Clinicopathological significance of DAPK gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Int J Biol Markers.* 2022; 37(1): 47-57. doi: 10.1177/17246008211067552
22. Daniunaite K., Sestokaite A., Kubiliute R., Stuopelyte K., Kettunen E., Husgafvel-Pursiainen K., et al. S. Frequent DNA methylation changes in cancerous and noncancerous lung tissues from smokers with non-small cell lung cancer. *Mutagenesis.* 2020; geaa022. doi: 10.1093/mutage/geaa022
23. Ji M., Guan H., Gao C., Shi B., Hou P. Highly frequent promoter methylation and PIK3CA amplification in non-small cell lung cancer (NSCLC). *BMC Cancer.* 2011; 11: 147. doi: 10.1186/1471-2407-11-147
24. Ji M., Zhang Y., Shi B., Hou P. Association of promoter methylation with histologic type and pleural indentation in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Diagn Pathol.* 2011; 6: 48. doi: 10.1186/1746-1596-6-48
25. Yang X.Y., Zhang J., Yu X.L., Zheng G.F., Zhao F., Jia X.J. Death-associated protein kinase promoter methylation correlates with clinicopathological and prognostic features in nonsmall cell lung cancer patients: A cohort study. *J Cancer Res Ther.* 2018; 14(Supplement): S65-S71. doi: 10.4103/0973-1482.158197
26. Melchers L.J., Clausen M.J., Mastik M.F., Slagter-Menkema L., van der Wal J.E., Wisman G.B., et al. Identification of methylation markers for the prediction of nodal metastasis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Epigenetics.* 2015; 10(9): 850-60. doi: 10.1080/15592294.2015.1075689
27. Jia W., Yu T., Cao X., An Q., Yang H. Clinical effect of DAPK promoter methylation in gastric cancer: A systematic meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(43): e5040. doi: 10.1097/MD.0000000000005040
28. Li Y., Zhu M., Zhang X., Cheng D., Ma X. Clinical significance of DAPK promoter hypermethylation in lung cancer: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 1785-96. doi: 10.2147/DDDT.S78012
29. Majed S.O. RNA sequencing-based total RNA profiling: The Oncogenic MiR-191 identification as a novel biomarker for breast cancer. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2022; 68(1): 177-91. doi: 10.14715/cmb/2022.68.1.22
30. Jing Z.F., Bi J.B., Li Z., Liu X., Li J., Zhu Y., et al. Inhibition of miR-34a-5p can rescue disruption of the p53-DAPK axis to suppress progression of clear cell renal cell carcinoma. *Mol Oncol.* 2019; 13(10): 2079-97. doi: 10.1002/1878-0261.12545
31. Gan T.Q., Chen W.J., Qin H., Huang S.N., Yang L.H., Fang Y.Y., et al. Clinical value and prospective pathway signaling of MicroRNA-375 in lung adenocarcinoma: a study based on the cancer genome atlas (TCGA), gene expression omnibus (GEO) and bioinformatics analysis. *Med Sci Monit.* 2017; 23: 2453-64. doi: 10.12659/msm.901460
32. Zhang N., Huang J., Xu M., Wang Y. LncRNA T-UCR Uc.339/miR-339/SLC7A11 Axis Regulates the Metastasis of Ferroptosis-Induced Lung Adenocarcinoma. *J Cancer.* 2022; 13(6): 1945-57. doi: 10.7150/jca.65017

Сведения об авторах:

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

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

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

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

Брага Элеонора Александровна, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., и.о. зав. лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; вед. науч. сотр., «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»;

Логинов Виталий Игоревич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. патогеномики и транскриптомики ФГБНУ НИИОПП; ст. науч. сотр., «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова».

© Коллектив авторов, 2023

УДК 612.438:616-006.66:616-085:616-089:616-092.9

Казаков О.В., Кабаков А.В., Повещенко А.Ф.

Взаимосвязь проонкогенных микроРНК (-21, -221, -222) и опухоль-супрессирующей микроРНК-429 лимфы со структурой тимуса при химиотерапии и оперативном лечении рака молочной железы

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»

630060, Новосибирск, ул. Тимакова, д. 2

Введение. Изучение взаимосвязи уровня микроРНК в лимфе с функциональной активностью тимуса может иметь важное значение для понимания участия микроРНК в регуляции иммунного ответа. **Цель исследования** – выявление взаимосвязи структур тимуса с уровнями микроРНК (-21, -221, -222, -429) лимфы грудного протока крыс-самок Вистар при оперативном лечении рака молочной железы (РМЖ) и оперативном лечении РМЖ с последующей химиотерапией (по схеме ЦМФ). **Методика.** РМЖ моделировали 5-кратным с интервалом 7 сут подкожным введением N-метил-N-нитрозомочевины (Sigma). Прижизненный забор лимфы у животных осуществлялся (под наркозом) из цистерны грудного лимфатического протока. Тотальную РНК выделяли из лимфы с использованием набора реагентов «Вектор-Бест» по инструкции производителя. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию (ОТ) по матрице микроРНК. Для определения уровней проонкогенных микроРНК-21, микроРНК-221, микроРНК-222 и опухоль-супрессирующей микроРНК-429 в биологических образцах проводили ОТ-ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Lab), в качестве гена сравнения использовали малую РНК U6 («Вектор-Бест»). В разных структурных зонах тимуса подсчитывали абсолютное количество клеток на стандартной площади 2025 мкм². Взаимосвязь структуры тимуса с уровнями микроРНК (-21, -221, -222, -429) оценивали по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена.

Результаты. После оперативного лечения РМЖ уровни проонкогенных микроРНК (-21, -222) в лимфе уменьшаются, а опухоль-супрессирующей микроРНК-429 увеличивается по сравнению с РМЖ без лечения. Выявлена взаимосвязь микроРНК-221 с иммунобластами коркового вещества тимуса, где увеличено количество средних и малых лимфоцитов по сравнению с РМЖ без лечения. Установлена взаимосвязь микроРНК-21 со средними лимфоцитами кортико-медуллярной зоны. Во всех исследуемых зонах уменьшено количество клеток с пикнотичными ядрами и увеличено число макрофагов и эпителиоретикулярных клеток. После резекции РМЖ с ХТ уровни микроРНК-221 и микроРНК-429 снижены по сравнению с оперативным лечением РМЖ. Выявлены корреляции: в субкапсулярной зоне коркового вещества – малых лимфоцитов с микроРНК(-221, -429) и митотически делящихся клеток с микроРНК-429; в центральной части коркового вещества – малых лимфоцитов с микроРНК(-221, -429); клеток с пикнотичными ядрами с микроРНК-222; средних лимфоцитов с микроРНК-429; в кортико-медуллярной зоне – средних лимфоцитов с микроРНК(-21, -221); в центральной части мозгового вещества – малых лимфоцитов с микроРНК(-21, -429).

Заключение. После оперативного лечения РМЖ и химиотерапии, по сравнению только с резекцией РМЖ, выявленные взаимосвязи клеток структурных компонентов тимуса с проонкогенными и опухоль-супрессирующей микроРНК в корковом и мозговом веществе тимуса могут быть обусловлены повышенной пролиферативной активностью, миграцией Т-лимфоцитов из тимуса, усилением цитотоксических механизмов иммунного ответа, увеличением количества гибнущих клеток.

Ключевые слова: лимфа; вилочковая железа; рак молочной железы; микроРНК; оперативное лечение; терапевтические мероприятия

Для цитирования: Казаков О.В., Кабаков А.В., Повещенко А.Ф. Взаимосвязь проонкогенных микроРНК (-21, -221, -222) и опухоль-супрессирующей микроРНК-429 лимфы со структурой тимуса при химиотерапии и оперативном лечении рака молочной железы. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(3): 14–20.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.14-20

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Казаков О.В., Повещенко А.Ф.; сбор и обработка материала – Казаков О.В., Кабаков А.В.; статистическая обработка материала – Казаков О.В., Кабаков А.В.; написание текста – Казаков О.В., Повещенко А.Ф.; редактирование – Повещенко А.Ф. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Казаков Олег Васильевич, e-mail: kazakoff_oleg@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.04.2023

Принята к печати 12.07.2023

Опубликована 20.09.2023

Kazakov O.V., Kabakov A.V., Poveshchenko A.F.

Relationship of pro-oncogenic microRNAs (-21, -221, -222) and tumor-suppressive microRNA-429 lymph with the thymus structure during chemotherapy and surgical treatment of breast cancer

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division of the Russian Academy of Sciences,
Timakova St. 2, Novosibirsk, 630060, Russian Federation

Aim. To study the relationship between the thymus structure and concentrations of microRNAs (miRNAs-21, -221, -222, -429) in the lymph of female Wistar rats during surgical treatment of breast cancer and subsequent CMF (cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil) chemotherapy for chemically induced breast cancer (intramammary administration of N-methyl-N-nitrosourea).

Methods. BC was modeled by 5 subcutaneous injections of N-methyl-N-nitrosourea (Sigma) at 7-day intervals. Lymph samples were withdrawn from the cisterna chyli of the thoracic lymphatic duct of anesthetized animals. Total RNA was isolated from the lymph using a Vector-Best reagent kit according to the manufacturer's instructions. cDNA was obtained by microRNA reverse transcription (RT). Levels of the pro-oncogenic microRNA-21, microRNA-221, microRNA-222, and the tumor-suppressing microRNA-429 were measured in biological samples by real-time RT-PCR on a CFX96 amplifier (Bio-Rad Lab) with U6 small RNA (Vector-Best) as a reference gene. The absolute number of cells was counted in structural zones of the thymus on a standard area of 2025 μm^2 . The relationship between the thymus structure and microRNA (-21, -221, -222, -429) levels was assessed using the Spearman rank correlation coefficient.

Results. After the surgical treatment of breast cancer, concentrations of pro-oncogenic miRNAs (-21, -222) in the lymph were decreased and the concentration of tumor-suppressing miRNA-429 was increased compared to untreated breast cancer. A relationship of miRNA-221 with immunoblasts was observed in the thymic cortical substance, where the numbers of medium and small lymphocytes were increased compared to breast cancer without the treatment. A relationship was found between miRNA-21 and medium lymphocytes in the corticomedullary zone. In all the studied areas, the number of cells with pycnotic nuclei was reduced whereas the numbers of macrophages and epithelioreticular cells were increased. After resection of breast cancer and chemotherapy, the concentrations of miRNA-221 and miRNA-429 were reduced compared to the surgical treatment alone. In the cortical subcapsular region of the thymus, the number of small lymphocytes correlated with miRNA-221 and -429 and the number of mitotically dividing cells correlated with miRNA-429; in the central part of cortical substance, the number of small lymphocytes correlated with miRNAs -221 and -429, the number of cells with pycnotic nuclei correlated with miRNA-222, and the number of medium lymphocytes correlated with miRNA-429; in the cortico-medullary region, the number of medium lymphocytes correlated with miRNAs-21 and -221; and in the central medulla, the number of small lymphocytes correlated with miRNAs-21 and -429.

Conclusion. After the surgical treatment of breast cancer and chemotherapy vs. the tumor resection alone, along with the morphological differences, the relationships observed between cells of thymic structures and pro-oncogenic and tumor-suppressing miRNAs in the cortical substance and medullary substance of the thymus may be due to increased proliferative activity, migration of T-lymphocytes from the thymus, increased cytotoxic mechanisms of the immune response, and increased number of dying cells.

Keywords: lymph; thymus gland; breast cancer; microRNA; surgical treatment; therapeutic measures

For citation: Kazakov O.V., Kabakov A.V., Poveshchenko A.F. Relationship of pro-oncogenic miRNAs (-21, -221, -222) and tumor-suppressive miRNAs-429 lymph with the thymus structure during chemotherapy and surgical treatment of breast cancer. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(3): 14–20. (in Russian).
DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.14-20

Author's contribution: concept and design of the study – Kazakov O.V., Poveshchenko A.F.; collection and processing of material – Kazakov O.V., Kabakov A.V.; statistical processing – Kazakov O.V., Kabakov A.V.; writing the text – Kazakov O.V., Poveshchenko A.F.; editing the text – Poveshchenko A.F. Approval of the final version of the article – all authors.

For correspondence: **Oleg V. Kazakov**, Candidate of Biological Sciences, leading researcher, «Scientific institution of clinical and experimental lymphology – branch of federal state budgetary scientific institution "Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics Siberian Division of the Russian Academy of Sciences", 2 Timakova str., Novosibirsk, 630060, Russian Federation, e-mail: kazakoff_oleg@mail.ru

Information about the authors:

Kazakov O.V., <https://orcid.org/0000-0003-3947-4038>

Kabakov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-4741-6674>

Poveshchenko A.F., <https://orcid.org/0000-0002-4433-7110>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 03.04.2023

Accepted 12.07.2023

Published 20.09.2023

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований среди женщин во всем мире [1]. МикроРНК контролируют широкий спектр онтогенетических и физиологических путей, включая клеточную пролиферацию, дифференцировку и апоптоз, участвуют в развитии и прогрессировании опухолей, влияя на онкогенные или опухоль-супрессирующие механизмы [2]. МикроРНК играют важную роль в повышении чувствительности опухолевых клеток к воздействию химиотерапевтических препаратов [3]. Изучение взаимосвязей уровней микроРНК в лимфе с функциональной активностью тимуса, как центрального органа иммунной системы при РМЖ, оперативном лечении РМЖ и химиотерапии (ХТ) может иметь значение для понимания участия микроРНК в регуляции иммунного ответа, воздействии на процессы созревания, пролиферации, дифференцировки и активации клеток иммунной системы.

Цель исследования – сравнение уровней микроРНК (-21, -221, -222, -429) в лимфе с преобразованиями в тимусе при РМЖ, оперативном лечении РМЖ, оперативном лечении РМЖ и последующей ХТ.

Методика

Работа выполнена на половозрелых самках крыс Вистар ($n=80$) с соблюдением принципов надлежащей лабораторной практики и Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского (протокол №12 от 30.06.2022 года). Возраст крыс на начало эксперимента – 3 мес (масса 250–300 г). Было сформировано 4 группы животных: 1-я – контрольная (интактные крысы), 2-я – РМЖ без лечения, 3-я – резекция РМЖ, 4-я – резекция РМЖ + химиотерапия (ХТ). РМЖ моделировали 5-кратным подкожным введением N-метил-N-нитрозомочевины (Sigma) с интервалом 7 сут в область 2-й молочной железы справа. На основании результатов гистологического и иммуногистохимического исследования верифицировали аналог люминального В-типа РМЖ человека. Оперативное лечение РМЖ проводили через 6 мес от момента начала индукции РМЖ, операция под наркозом (нембутал, «Sigma», 40 мг/кг внутривенно). Курс ХТ проводили через 6 мес после индукции РМЖ, что включало в себя внутривенное введение 15 мг/кг 5-фторурацила и 2.5 мг/кг метотрексата («Ebewe»)

на 1-е и 8-е сут и 3 мг/кг циклофосфана («Биохимия») внутривенно ежедневно один раз в течение 14 сут. Прижизненный забор лимфы у животных осуществлялся (под наркозом) из цистерны грудного лимфатического протока. Тотальную РНК выделяли из лимфы с использованием набора реагентов «Вектор-Бест» по инструкции производителя. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию (ОТ) по матрице микроРНК. Для определения уровней проонкогенных микроРНК-21, микроРНК-221, микроРНК-222 и опухоль-супрессирующей микроРНК-429 в биологических образцах проводили ОТ-ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Lab), в качестве гена сравнения использовали малую РНК U6 («Вектор-Бест»). Всех животных из эксперимента выводили в возрасте 9.5 мес под наркозом – нембутал (Sigma), 40 мг/кг внутривенно. Гистологические препараты тимуса изучали в окулярной тестовой системе при увеличении $\times 32$, $\times 400$ и $\times 1000$. В разных структурных компонентах тимуса подсчитывали абсолютное количество клеток на стандартной площади 2025 μm^2 .

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.), меры центральной тенденции и рассеяния описаны медианой (Me), нижним (Q1) и верхним (Q3) квартилем; значимость различий рассчитывали по U критерию Манна–Уитни при значениях $p < 0.05$. Сопряженность между уровнями микроРНК(-21, -221, -222, -429) с клетками структурных зон тимуса оценивали по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена.

Результаты

После оперативного лечения РМЖ, по сравнению с РМЖ без лечения в лимфе снижаются уровни проонкогенных микроРНК-21 на 54%, микроРНК-222 на 71%, а опухоль-супрессирующей микроРНК-429 увеличивается в 18 раз (**табл. 1**). В корковом и мозговом веществе тимуса уменьшается количество иммунобластов, клеток с пикнотичными ядрами и увеличивается количество макрофагов и эпителиоретикулярных клеток В центральной части коркового вещества увеличивается количество средних (на 58,5%) и малых (на 24%) лимфоцитов (**табл. 2**). Выявлены взаимосвязи: в центральной части коркового вещества иммунобластов с микроРНК-221, в кортико-медуллярной зоне – средних лимфоцитов с микроРНК-21 (**табл. 3**).

После резекции опухоли с последующим курсом химиотерапии по сравнению с оперативным лечением РМЖ выявлено уменьшение уровня микроРНК-221

в лимфе на 75%, а микроРНК-429 – на 93% (табл. 1). В корковом и мозговом веществе тимуса увеличивается количество иммунобластов и митотически делящихся клеток. В корковом веществе возросло количество эпителиоретикулярных клеток. В центральной части коркового вещества увеличено количество клеток с пикнотичными ядрами (табл. 2). Выявлены взаимосвязи: в субкапсулярной зоне – малых лимфоцитов с микроРНК-221 и микроРНК-429; митотически делящихся клеток – с микроРНК-429; в центральной части коркового вещества – малых лимфоцитов с микроРНК-221 и микроРНК-429; средних лимфоцитов – с микроРНК-429; клеток с пикнотичными ядрами – с микроРНК-222 (табл. 3); в центральной части мозгового вещества – малых лимфоцитов с микроРНК-21 и микроРНК-429.

Обсуждение

Взаимосвязь микроРНК-221 с иммунобластами коркового вещества (табл. 3) может быть связана с повышенной пролиферативной активностью в корковом веществе тимуса. По данным литературы микроРНК-221 связываясь с р53-зависимым модулятором апоптоза (PUMA) блокирует индуцированный белком р53 апоптоз, влияя на трансформацию клетки и усиление клеточной пролиферации [4]. Онкогенный эффект микроРНК-21 связан с воздействием на опухолевые супрессоры такие как PTEN, PDCD4 и FBXO11 [5]. МикроРНК-21 влияет на процессы пролиферации и миграции раковых клеток путем ингибирования гена *Smad7*, который, в свою очередь, ингибирует

активацию сигнальных путей NF- κ B и TGF- β , ослабляет фиброз, апоптоз, воспаление и дифференцировку Т-лимфоцитов [6, 7], на что может указывать взаимосвязь средних лимфоцитов кортико-медулярной зоны с микроРНК-21 лимфы. Сохраняющийся повышенный уровень микроРНК-21 в лимфе может быть взаимосвязан с поглощением макрофагами (количество которых увеличено во всех зонах тимуса) апоптотических клеток [8], на что указывает уменьшение количества клеток с пикнотичными ядрами в корковом и мозговом веществе тимуса.

После оперативного лечения РМЖ и ХТ уменьшение уровня микроРНК-221 в лимфе как по сравнению с оперативным лечением РМЖ, так и с интактной группой, может влиять на механизм регулятора клеточного цикла p27 (Kip 1), который действует как супрессор опухоли, и является основным регулятором прогрессии G1 – фазы клеточного цикла и перехода G1→S. Он принимает участие в контроле продвижения G2 и завершения M-фазы/цитокinesis [9, 10]. При этом уровень микроРНК-429 в лимфе уменьшается по сравнению с резекцией РМЖ. МикроРНК-429 является важной опухоль-супрессирующей микроРНК входящей в состав семейства miR-200 [11]. По данным литературы после химиотерапии (на примере мышей с делецией) специфичной для В-клеток показано, что ICOSL в В-клетках повышает противоопухолевый иммунитет за счет увеличения соотношения эффекторных и регуляторных Т-клеток [12]. После химиотерапии тройного негативного рака молочной железы в биопсии отмечалось повышение уровня CD8⁺ Т-клеток [13].

Таблица 1/Table 1

Уровни микроРНК в лимфе у крыс-самок Вистар при химически индуцированном раке молочной железы (РМЖ) после оперативного лечения и химиотерапии (ХТ) (Ме (Q1-Q3); усл. ед.)

MicroRNA levels in lymph in female Wistar rats with chemically induced breast cancer (BC), after surgical treatment and chemotherapy (CT). (Me (Q1-Q3); conventional units)

Показатели Indicators	Интактная группа Intact group (1)	РМЖ Breast cancer (2)	Резекция РМЖ Resection of breast cancer (3)	Резекция РМЖ + ХТ Resection of breast cancer chemotherapy (4)
МикроРНК-21 miRNA-21	5.16 (3.16–5.25)	38.40 (24.25–85.4) ¹	17.97 (5.45–23.8) ^{1,2}	24.50 (12.7–35.0) ¹
МикроРНК-221 miRNA-221	0.47 (0.25–0.55)	0.88 (0.59–1.69) ¹	1.5 (0.6–5.38) ¹	0.37 (0.24–0.57) ^{2,3}
МикроРНК-222 miRNA-222	0.78 (0.53–1.87)	1.43 (1.29–2.08)	0.42 (0.08–0.81) ²	0.20 (0.05–0.28) ^{1,2}
МикроРНК-429 miRNA-429	1.71 (1.03–36.27)	0.60 (0.50–1.02) ¹	11.08 (4.33–48.27) ^{1,2}	0.78 (0.31–4.31) ³

Примечание. Цифрами 1, 2 и 3 обозначены статистически значимые отличия ($p < 0.05$) от величин соответствующих экспериментальных групп.
Note. Numbers 1, 2 and 3 indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) from the values of the corresponding experimental groups.

Таблица 2/ Table 2

Клеточный состав структурных компонентов тимуса в интактной группе, при химически индуцированном раке молочной железы (РМЖ), оперативном лечении РМЖ, оперативном лечении РМЖ с последующей химиотерапией (ХТ). (Ме (Q1-Q3); усл. ед.)

Cellular composition of the structural components of the thymus intact group, with chemically induced breast cancer (BC), surgical treatment (ST) of breast cancer, surgical treatment (ST) of BC followed by chemotherapy (CT). (Ме (Q1-Q3); conventional units)

Клетки / Cells	Интактная группа / Intact group(1)	РМЖ/ ВС (2)	Резекция РМЖ/ ST BC (3)	Резекция РМЖ +ХТ ST+CT (4)
Субкапсулярная зона коркового вещества Subcapsular zone of the cortical substance				
ИМ IM	11.0(9.0–12.0)	17.5(15.0–23.25) ¹	12.0(12.0–13.25) ²	18.0(17.0–19.0) ^{1,3}
СЛ ML	25.0(20.75–27.0)	36.5(35.5–45.75) ¹	44.0(41.5–47.0) ¹	40.0(34.0–41.0) ^{1,2}
МЛ SL	162.5(135.3–190.8)	115.0(110.0–130.0) ¹	132.5(126.5–141.3)	122.0(120.0–130.3) ¹
Мит Mit	2.0(1.75–3.0)	5.5(5.0–6.0) ¹	5.0(4.0–5.25) ¹	5.0(4.75–5.0) ¹
КПЯ CNP	1.0(1.0–2.0)	4.0(3.0–5.0) ¹	1.0(1.0–2.0) ²	2.5(2.0–3.0) ^{1,3}
МФ MF	2.0(1.0–2.0)	2.0(1.75–2.0)	5.0(4.0–5.0) ^{1,2}	4.0(3.75–4.0) ^{1,2,3}
ЭРК EC	5.0(4.0–6.0)	2.0(2.0–4.0) ¹	7.0(6.0–8.0) ^{1,2}	10.0(8.0–12.0) ^{1,2,3}
Центральная часть коркового вещества Central part of the cortical substance				
ИМ IM	8.0(6.0–8.0)	9.5(8.0–14.0) ¹	7.0(6.75–8.0) ²	15.0(13.0–15.25) ^{1,3}
СЛ ML	24.0(19.0–25.75)	32.5(24.5–42.5)	51.5(50.25–52.0) ^{1,2}	43.0(40.25–50.75) ¹
МЛ SL	215.0(176.0–226.5)	133.0(126.0–145.0) ¹	164.5(148.0–172.8) ²	142.0(127.3–150.0) ¹
Мит Mit	2.0(1.0–2.25)	3.0(2.0–4.0)	2.0(2.0–3.0)	5.0(4.0–5.0) ^{1,2,3}
КПЯ CNP	1.0(1.0–3.0)	4.0(3.0–4.0) ¹	1.0(0.0–1.0) ²	2.0(1.0–3.0) ^{2,3}
МФ MF	1.0(1.0–2.0)	1.0(1.0–2.0)	4.0(4.0–4.0) ^{1,2}	4.0(3.0–5.0) ^{1,2}
ЭРК EC	7.0(6.0–7.25)	3.0(2.0–4.0) ¹	8.5(7.0–9.0) ²	10.0(9.75–12.0) ^{1,2,3}
Кортико-медуллярная зона Cortico-medullary zone				
ИМ IM	7.0(5.0–9.0)	10.0(7.0–11.0)	9.0(7.0–10.0)	14.0(13.0–15.0) ^{1,2,3}
СЛ ML	18.0(18.0–22.75)	32.0(31.75–41.0) ¹	35.0(35.0–38.0) ¹	35.0(30.0–38.0) ¹
МЛ SL	189.5(171.0–193.8)	106.5(96.5–137.8) ¹	125.0(114.3–126.0) ¹	115.5(112.0–119.0) ¹
Мит Mit	2.0(2.0–3.0)	3.0(2.0–4.25)	3.0(3.0–4.0) ¹	4.0(4.0–5.25) ^{1,3}
КПЯ CNP	2.0(2.0–2.25)	2.5(2.0–3.0)	1.0(0.75–2.0) ^{1,2}	2.0(1.75–3.0)
МФ MF	2.0(1.0–2.0)	2.0(2.0–3.0)	5.0(4.0–5.0) ^{1,2}	5.0(4.0–5.0) ^{1,2}
ЭРК EC	9.0(9.0–10.0)	7.0(5.75–9.0)	10.0(9.0–12.0) ²	14.5(13.0–16.0) ^{1,2,3}
Центральная часть мозгового вещества Central part of the medulla substance				
ИМ IM	4.0(4.0–5.0)	2.0(1.0–4.25)	0.0(0.0–0.0) ^{1,2}	3.0(2.0–3.0) ^{1,3}
СЛ ML	17.5(17.0–20.0)	24.0(22.0–29.25) ¹	17.0(15.75–21.25) ²	24.0(21.5–24.0) ^{1,3}
МЛ SL	98.0(84.8–114.0)	76.0(72.5–84.5) ¹	72.0(67.25–81.0) ¹	59.0(52.0–62.25) ^{1,2,3}
Мит Mit	1.0(0.75–1.0)	1.0(1.0–2.0)	0.0(0.0–0.0) ^{1,2}	1.0(0.0–1.0) ³
КПЯ CNP	1.0(1.0–1.0)	2.0(1.0–3.0)	0.0(0.0–1.0) ^{1,2}	1.0(0.0–1.0) ²
МФ MF	1.0(1.0–2.0)	3.0(3.0–3.0) ¹	5.5(5.0–6.25) ^{1,2}	4.0(3.0–5.0) ^{1,2,3}
ЭРК EC	10.0(10.0–11.0)	10.0(9.0–12.0)	17.0(16.0–18.0) ^{1,2}	18.0(17.0–19.0) ^{1,2}

Примечание. ИМ – иммунобласты, СЛ – средние лимфоциты, МЛ – малые лимфоциты, Мит – митозы, КПЯ – клетки с пикнотичными ядрами, МФ – макрофаги, ЭРК – эпителиоретикулярные клетки. Цифрами 1, 2 и 3 – обозначены статистически значимые отличия ($p < 0.05$) от величин соответствующих экспериментальных групп.

Note. IM – immunoblasts, ML – medium lymphocytes, SL – small lymphocytes, Mit – Mitoses, CNP – cells with nuclear pycnosis, MF – macrophages, EC – epithelioreticular cells. Numbers 1, 2 and 3 indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) from the values of the corresponding experimental groups.

Взаимосвязи малых лимфоцитов в субкапсулярной и центральной части коркового вещества – с проонкогенной микроРНК-221 и с опухоль-супрессирующей микроРНК-429, а также микроРНК-429 – с митотически делящимися клетками субкапсулярной части коркового вещества, могут быть связаны с повышенной пролиферативной активностью Т-клеток в корковом веществе тимуса. Увеличение количества эпителиоретикулярных клеток в корковом веществе может быть связано как делимфатизацией морфофункциональных зон тимической паренхимы, так и со способностью эпителиоретикулоцитов участвовать в процессах как позитивной, так и негативной селекции [14]. На это указывает взаимосвязь средних, и, особенно, малых лимфоцитов коркового вещества тимуса с микроРНК-429 и малых

лимфоцитов – с микроРНК-221. При отрицательном отборе развивающиеся Т-клетки, несущие рецепторы к собственным антигенам (аутореактивные клетки), подвергаются апоптозу, на что может указывать увеличение количества клеток с пикнотичными ядрами в корковом веществе тимуса, а также сохраняющееся увеличенное количество макрофагов во всех зонах тимуса. В отличие от группы только с оперативным лечением РМЖ в переходной между корковым и мозговым веществом зоне прослеживается взаимосвязь средних лимфоцитов с микроРНК-21 и микроРНК-221 лимфы, что наряду с увеличением количества иммунобластов, митотически делящихся клеток, эпителиоретикулярных клеток может быть обусловлено повышенной миграцией Т-лимфоцитов из тимуса, усилением цитотоксических

Таблица 3/Table 3

Положительные взаимосвязи клеток структурно-функциональных зон тимуса с микро-РНК в лимфе крыс Вистар при химически индуцированном РМЖ, после оперативного лечения РМЖ и после химиотерапии РМЖ.

Приведен коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r)

Positive relationships between cells of the structural–functional zones of the thymus with microRNA in the lymph of Wistar rats with chemically induced breast cancer, after surgical treatment of breast cancer and after chemotherapy of breast cancer. Spearman's rank correlation coefficient (r) is given

Группы / Groups	Клетки / Cells	МикроРНК/ miRNA-21	МикроРНК/ miRNA-221	МикроРНК/ miRNA-222	МикроРНК/ miRNA-429
Субкапсулярная зона коркового вещества Subcapsular zone of the cortical substance					
РМЖ ВС	СЛ ML	-	0.641	-	-
	Мит Mit	-	-	-	0.804
Опер+ХТ / ST+СТ	МЛ SL	-	0.640	-	0.605
	Мит Mit	-	-	-	0.776
Центральная часть коркового вещества Central part of the cortical substance					
РМЖ / ВС	ИМ IM	-	0.708	-	-
	МФ MF	-	0.585	-	-
Опер / ST	ИМ IM	-	0.785	-	-
Опер+ХТ / ST+СТ	СЛ ML	-	-	-	0.736
	МЛ SL	-	0.580	-	0.788
	КПЯ CNP	-	-	0.663	-
Кортико-медуллярная зона Cortico-medullary zone					
Опер / ST	СЛ ML	0.754	-	-	-
Опер+ХТ / ST+СТ	СЛ ML	0.660	0.639	-	-
Центральная часть мозгового вещества Central part of the medulla substance					
РМЖ / ВС	СЛ ML	0.653	-	-	-
	МФ MF	-	-	-	0.622
Опер+ХТ / ST+СТ	МЛ SL	0.600	-	-	0.723

Примечание. ИМ – иммунобласты, СЛ – средние лимфоциты, МЛ – малые лимфоциты, Мит – митозы, КПЯ – клетки с пикнотическими ядрами, МФ – макрофаги; опер – оперативное лечение РМЖ; Опер+ХТ – оперативное лечение с последующей химиотерапией.

Note. IM – immunoblasts, ML – medium lymphocytes, SL – small lymphocytes, Mit – mitoses, CNP – cells with nuclear pycnosis, MF – macrophages. BC – breast cancer; ST – surgical treatment; ST+CT – surgical treatment + chemotherapy.

механизмов иммунного ответа. После резекции опухоли и ХТ на это могут указывать, взаимосвязи малых лимфоцитов в центральной части мозгового вещества тимуса с проонкогенной микроРНК-21 и опухоль-супрессирующей микроРНК-429 лимфы. При этом в центральной части мозгового вещества отмечается увеличение количества иммунобластов, средних лимфоцитов и митотически делящихся клеток, а также сохраняющееся повышенное количество макрофагов, которые принимают участие в процессах дифференцировки Т-лимфоцитов.

Заключение

После оперативного лечения РМЖ уровни проонкогенных микроРНК (-21, -222) в лимфе уменьшаются, а опухоль-супрессирующей микроРНК-429 увеличиваются по сравнению с РМЖ без лечения. Взаимосвязи микроРНК лимфы с морфологическими преобразованиями в тимусе свидетельствуют об активации процессов бласттрансформации в корковом веществе тимуса, делимфотизации морфофункциональных зон тимической паренхимы, макрофагальной реакции.

После оперативного лечения РМЖ и химиотерапии, по сравнению только с резекцией РМЖ, и наряду с морфологическими данными, выявленные взаимосвязи клеток структурных компонентов тимуса с проонкогенными и опухоль-супрессирующей микроРНК в корковом и мозговом веществе тимуса могут быть обусловлены повышенной пролиферативной активностью, миграцией Т-лимфоцитов из тимуса, усилением цитотоксических механизмов иммунного ответа, увеличением количества гибнущих клеток.

Литература/References

- DeSantis C.E., Ma J., Gaudet M.M., Newman L.A., Miller K.D., Goding Sauer A., et al. Breast cancer statistics, 2019. *CA A Cancer Journal for Clinicians*. 2019; 69(6): 438–51. doi: 10.3322/caac.21583
- Bertoli G., Cava C., Castiglioni I. MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics*. 2015; 5(10): 1122–43. doi: 10.7150/thno.11543
- Wengong Si., Jiaying S., Huilin Z., Weimin F. The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clinical Epigenetics*. 2019; 11(25): <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0587-8>
- Matsuzaki J., Suzuki H. Role of microRNAs-221/222 in digestive systems. *Journal of Clinical Medicine*. 2015; 4(8): 1566–77. doi: 10.3390/jcm4081566
- Yang C.H., Pfeffer S.R., Sims M., Yue J., Wang Y., Linga V.G., et al. The oncogenic microRNA-21 inhibits the tumor suppressive activity of FBXO11 to promote tumorigenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2015; 290(10): 6037–46. doi: 10.1074/jbc.M114.632125
- Han M., Wang F., Gu Y., Pei X., Guo G., Yu C., et al. MicroRNA-21 induces breast cancer cell invasion and migration by suppressing smad7 via EGF and TGF- β pathways. *Oncology Reports*. 2016; 35(1): 73–80. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4360>
- Hu Y., He J., He L., Xu B., Wang Q. Expression and function of Smad7 in autoimmune and inflammatory diseases. *Journal of Molecular Medicine*. 2021; 99: 1209–20 <https://doi.org/10.1007/s00109-021-02083-1>
- Das A., Ganesh K., Khanna S., Sen C.K., Roy S. Engulfment of Apoptotic Cells by Macrophages: A Role of microRNA-21 in the Resolution of Wound Inflammation. *Journal of Immunology*. 2014; 192(3): 1120–9. doi: 10.4049/jimmunol.1300613
- Bencivenga D., Stampone E., Roberti D., Ragione F.D. p27Kip1, an Intrinsically Unstructured Protein with Scaffold Properties. *Cells*. 2021; 10(9): 2254. doi:10.3390/cells10092254
- Serres M.P., Kossatz U., Chi Y., Roberts J.M., Malek N.P., Besson A. 27(Kip1) controls cytokinesis via the regulation of citron kinase activation. *Journal of Clinical Investigation*. 2012; 122(3): 844–58. doi: 10.1172/JCI60376
- Diaz-Riascos Z.V., Ginesta M.M., Fabregat J., Serrano T., Busquets J., Buscail L., et al. Expression and Role of MicroRNAs from the miR-200 Family in the Tumor Formation and Metastatic Propensity of Pancreatic Cancer. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*. 2019; 17: 491–503. doi.org/10.1016/j.omtn.2019.06.015
- Lu Y., Zhao Q., Liao J.-Y., Song E., Xia Q., Pan J., et al. Complement Signals Determine Opposite Effects of B Cells in Chemotherapy-Induced Immunity. *Cell*. 2020; 180(6): 1081–97.e24. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.015
- Brockwell N.K., Rautela J., Owen K.L., Gearing L.J., Deb S., Harvey K., et al. Tumor inherent interferon regulators as biomarkers of longterm chemotherapeutic response in TNBC. *Npj Precision Oncology*. 2019; 3(21). <https://doi.org/10.1038/s41698-019-0093-2>
- Shi. Y.Y., Ming Z.Z. Medullary thymic epithelial cells, the indispensable player in central tolerance. *Science China Life Sciences*. 2013; 56(5): 392–8. doi: 10.1007/s11427-013-4482-4

Сведения об авторах:

Казаков Олег Васильевич, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН;

Кабаков Алексей Васильевич, канд. мед. наук, науч. сотр., лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН;

Повещенко Александр Федорович, доктор мед. наук, руководитель лаб. физиологии протективной системы НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН.

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092

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

Влияние антител к глутамату и F(ab')₂ фрагментов антител к глутамату на уровень тревожности стареющих мышей C57Bl/6

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

125415, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

Введение. Высокая степень личностных тревожных расстройств выявляется у 96% пожилых и у 100% людей старческого возраста, а у 50% пожилых и 56% лиц старше 75 лет наблюдается повышение реактивной тревожности. Несмотря на наличие большого арсенала фармакологических средств для лечения тревожных расстройств, перспективным остается разработка лекарственных препаратов на основе антител и их фрагментов, благодаря таким свойствам, как специфичность, и метаболическая активность. Ранее в опытах на мышах BALB/C было показано снижение уровня тревожности при однократном внутрибрюшинном введении антител к глутамату. В опытах на стареющих мышах и на экспериментальных моделях болезни Альцгеймера, показан антиамнестический эффект при интраназальном введении аффинно-очищенных поликлональных антител к глутамату. Цель исследования – изучение влияния интраназального введения антител к глутамату и F(ab')₂ фрагментов антител к глутамату на уровень тревожности у стареющих мышей C57Bl/6.

Методика. Исследование выполнено на мышах линии C57Bl/6 в возрасте 12 мес. Мыши были разделены на три группы: две опытные группы получали интраназально растворенные в физиологическом растворе поликлональные моноспецифические антитела к глутамату (АТ-ГЛУ) и F(ab')₂ фрагменты АТ-ГЛУ соответственно в дозе 250 мкг/кг в объеме 4 мкл в ежедневно в течение 3 дней. Мыши контрольной группы получали интраназально физиологический раствор в том же объеме. Оценивали поведенческую активность мышей в тесте «Открытое поле» и уровень тревожности в условиях теста «приподнятый крестообразный лабиринт».

Результаты. Интраназальное введение стареющим мышам АТ-ГЛУ и F(ab')₂ фрагментов АТ-ГЛУ приводило к значимому увеличению количества посещений и времени пребывания в центре поля, к снижению времени пребывания в углах и увеличению количества стоек в углах открытого поля при сравнении с животными группы контроля. Анализ результатов тестирования в приподнятом крестообразном лабиринте показал, что мыши, получавшие интраназально АТ-ГЛУ и F(ab')₂ фрагменты АТ-ГЛУ, существенно увеличивали время, проведенное в открытых рукавах лабиринта, а также число реакций «свешивания» (заглядывание под лабиринт) по сравнению с мышами контрольной группы, что свидетельствует о снижении уровня тревожности и страха.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о снижении уровня тревожности и страха у стареющих мышей C57Bl/6, получавших антитела к глутамату и F(ab')₂ фрагменты антител к глутамату.

Ключевые слова: антитела к глутамату; F(ab')₂ фрагменты; тревожность; старение

Для цитирования: Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Лобанов А.В., Давыдова Т.В. Влияние антител к глутамату и F(ab')₂ фрагментов антител к глутамату на уровень тревожности стареющих мышей C57Bl/6. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(3): 21–28.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.21-28

Участие авторов: концепция и дизайн работы – Давыдова Т.В.; сбор материала – Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Лобанов А.В.; анализ и интерпретация данных – Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Лобанов А.В.; статистическая обработка – Ветрилэ Л.А.; написание статьи – Ветрилэ Л.А.; редактирование статьи – Давыдова Т.В. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все авторы.

Для корреспонденции: Ветрилэ Лучия Александровна, e-mail: Vetrile.l@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 08.06.2023

Принята в печать 12.07.2023

Опубликована 20.09.2023

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

Effects of glutamate antibodies and F(ab')₂ fragments of glutamate antibodies on the anxiety level in aging C57Bl/6 miceInstitute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltiyskaya St. 8, Moscow, 125415, Russian Federation

Introduction. Anxiety disorder occurs in approximately 15-25% of the adult population. A high degree of anxious personality disorders was found in 96% of old people and in 100% of very old people, whereas 50% of old people and 56% of people older than 75 had increased reactive anxiety. In persistent anxiety, production of β -amyloid increases and contributes to the development of neurodegenerative diseases of old age. Despite the availability of a large arsenal of pharmacological agents for the treatment of anxiety disorders, development of drugs based on antibodies and their fragments is promising due to their specificity, activity, and metabolic activity. Previous experiments on BALB/C mice showed a decrease in the anxiety level after a single intraperitoneal injection of glutamate antibodies. Experiments on aging mice and experimental models of Alzheimer's disease demonstrated an anti-amnesic effect of affinity-purified polyclonal glutamate antibodies administered intranasally. **The aim of the study** was to evaluate the effect of intranasal glutamate antibodies and F(ab')₂ fragments of glutamate antibodies on the level of anxiety in aging C57Bl/6 mice.

Methods. The study was performed on 12-month-old C57Bl/6 mice. Mice were divided into three groups: two experimental groups received polyclonal monospecific antibodies to glutamate (AT-GLU) and F(ab')₂ fragments of AT-GLU. The agents were dissolved in saline and administered intranasally at a dose of 250 μ g/kg in a volume of 4 μ l, daily for 3 days. Mice of the control group received intranasal saline in the same volume. The behavioral activity of mice was assessed by the open field test and the level of anxiety by the elevated plus maze test.

Results. Intranasal administration of AT-GLU and F(ab')₂ fragments of AT-GLU to aging mice resulted in a significant increase in the number of visits to and the time spent in the center of the open field, a decrease in the time spent in the corners, and an increase in the number of rears in the corners of the open field compared to the control group. The elevated plus maze test showed that mice treated with AT-GLU and F(ab')₂ fragments of AT-GLU significantly increased the time spent in the open arms of the maze, as well as the number of unprotected head dips compared to the control group, which indicated a decrease in anxiety and fear.

Conclusion. The study results indicated a possible decrease in the level of anxiety and fear in aging C57Bl/6 mice treated with glutamate antibodies and F(ab')₂ fragments of glutamate antibodies, which suggested an anxiolytic effect of glutamate antibodies and their F(ab')₂ fragments.

Keywords: glutamate antibodies; F(ab')₂ fragments; anxiety; aging

For citation: Vetrile L.A., Zakharova I.A., Lobanov A.V., Davydova T.V. Effects of glutamate antibodies and F(ab')₂ fragments of glutamate antibodies on the anxiety level in aging C57Bl/6 mice. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(3) 21–28. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.21-28

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

For correspondence: Lucia A. Vetrile, Candidate of Medical Sciences, leading researcher, e-mail: Vetrile.l@yandex.ru

Information about the authors:Vetrile L.A., <https://orcid.org/0000-0001-9783-4711>Lobanov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5159-3227>Zakharova I.A., <https://orcid.org/0000-0002-5648-4214>Davydova T.V., <https://orcid.org/0000-0002-3176-1035>**Financing.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 08.06.2023

Accepted 12.07.2023

Published 20.09.2023

Введение

Одной из актуальных проблем пожилых людей является повышенная тревожность. Тревожность относится к широко распространенному психологическому феномену с наиболее выраженными эмоциональными реакциями, возникающими в критические моменты, и которые являются причиной неврозов и функциональных психозов [1, 2]. Выделяют личностную тревожность (врожденное свойство личности) и ситуативную или реактивную (связанную с конкретной внешней ситуацией). Тревожные расстройства встречаются примерно у 15 – 25% взрослого населения и до 30-40% среди пациентов неврологических и терапевтических отделений поликлиник [3–5]. По мере старения организма наблюдаются усиление эмоционального напряжения и функциональные нарушения адаптивного ответа на стрессовые ситуации, что имеет повышенный риск возникновения неврозов, функциональных психозов и развития различных расстройств эмоциональной сферы личности [1, 5, 6]. Высокая степень личностных тревожных расстройств найдена у 96% пожилых и у 100% людей старческого возраста. У 50% пожилых и 56% лиц старше 75 лет наблюдается повышение реактивной тревожности [1]. Тревожные расстройства часто сочетаются с другими соматическими заболеваниями, в частности с депрессией, что рассматривается как предиктор неблагоприятного клинического течения и прогноза психосоматики [7]. Степень коморбидности меняется с возрастом, чем старше человек, тем коморбидность тревоги и депрессии выше [3, 8]. Длительная тревожность сама по себе способствует формированию и развитию психосоматической патологии, повышает риск злоупотребления психоактивными веществами, а также ухудшает течение и прогноз уже имеющихся соматических заболеваний [5, 7]. Показано, что при персистирующей тревоге повышается продукция β -амилоида, оказывающего нейротоксическое действие и способствующее развитию нейродегенеративной патологии и болезни Альцгеймера у пожилых людей. Считают, что тревога, это первое эмоциональное расстройство, которое развивается при нейродегенеративных заболеваниях [7]. В патогенез тревожных расстройств вовлечены преимущественно моноаминергические системы мозга (серотонин-, дофамин-, норадреналин-ергические) [4, 7]. В то же время данные литературы свидетельствуют о повышенной возбуждающей активности глутамат-ергической системы при тревожных нарушениях и снижении активности гаммааминомасляной кислоты (ГАМК). Возникает определенный патологиче-

ский замкнутый круг в связи с гиперактивацией глутамат-ергической нейротрансдачи и угнетением ГАМК-ергической системы [4, 7–10]. Было установлено, что блокирование глутамат-ергической нейротрансдачи приводило к восстановлению тревожно-подобного поведения животных, а антагонисты глутамата проявляли свойства анксиолитиков в экспериментальных условиях [4, 9]. Несмотря на наличие большого арсенала фармакологических средств для лечения тревожных расстройств (антидепрессанты различных фармакологических групп и бензодиазепины) [4, 7, 8, 10], в настоящее время изучаются анксиолитические эффекты антагонистов глутамата и блокаторов глутаматных рецепторов при лечении данной патологии [4, 5, 8, 9–13]. Многообещающим направлением в лечении нейродегенеративных заболеваний является разработка лекарственных препаратов на основе антител и их фрагментов благодаря таким свойствам, как специфичность и метаболическая активность [14–16]. Ранее в опытах на стресс чувствительных мышах Balb/c в тестах «черно-белая камера» и «подвешивание за хвост» нами была продемонстрирована возможность снижения уровня тревожности антителами к глутамату при однократном внутривнутрибрюшинном введении [17]. Протективный эффект антител к глутамату при их внутривнутрибрюшинном и интраназальном введении был продемонстрирован на моделях стресс-индуцированного синдрома у крыс [18], МФТП-индуцированного паркинсонического синдрома у мышей [19] и экспериментальной модели болезни Альцгеймера [20]. В опытах на стареющих мышах C57Bl/6 показан антиамнестический эффект аффинно-очищенных поликлональных антител к глутамату при их интраназальном введении [21]. Данные литературы свидетельствуют об усилении тревожного поведения у стареющих мышей [25].

Цель исследования – изучение влияния интраназального введения антител к глутамату и $F(ab')_2$ фрагментов антител к глутамату на уровень тревожности у стареющих мышей C57Bl/6.

Методика

Исследование выполнено на мышах линии C57Bl/6 ($n=46$, масса $24,0 \pm 1,0$ г, возраст 12 мес). Животные содержались в стандартных условиях вивария с естественным световым режимом при свободном доступе к воде и пище. Эксперименты проводились в соответствии с приказом Минздрава России №199 от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и регламентом декларации ЕС от 22 сентября 2010 г. об использовании лабо-

раторных животных в научных целях. Исследование одобрено локальным Этическим комитетом института (протокол №3 от 08.06.2023 г.).

Мыши были разделены на 3 группы: контрольная группа ($n=16$) получала интраназально физиологический раствор в объеме 4 мкл. 1-я опытная группа ($n=14$) в течение 3 сут ежедневно получала интраназально растворенные в физиологическом растворе поликлональные моноспецифические антитела к глутамату (АТ-ГЛУ, 250 мкг/кг) в объеме 4 мкл; 2-я опытная группа ($n=16$) получала интраназально по аналогичной схеме $F(ab')_2$ фрагменты АТ-ГЛУ в той же дозе по той же методике. Оценивали поведенческую активность мышей в тесте «Открытое поле» (ОП) и уровень тревожности с использованием приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ). Эксперименты на животных проводили с 10:00 до 15:00 ч.

Поликлональные моноспецифические антитела к глутамату получали по описанному ранее протоколу по стандартной схеме иммунизации самцов кроликов Шиншилла конъюгированным с бычьим сывороточным альбумином (БСА) глутамата [21]. Антитела в виде γ -глобулиновой фракции выделяли из сывороток крови осаждением сульфатом аммония (50%), с последующим диализом. γ -Глобулиновую фракцию очищали от примесей антител к БСА методом аффинной хроматографии с использованием в качестве сорбента CNBr-Sepharose (Sigma) с иммобилизованным на нем БСА, лиофилизировали и хранили при 4 °С.

$F(ab')_2$ фрагменты АТ-ГЛУ получали из аффинно-очищенных АТ-ГЛУ с использованием набора реактивов Pierce $F(ab')_2$ Preparation Kit («ThermoScientific», США) в соответствии с протоколом фирмы производителя. К оптимальному количеству пепсина, иммобилизованного на агарозе, добавляли 0,5 мл раствора АТ-ГЛУ (4,9 мг/мл), инкубировали 2 ч при 37 °С с перемешиванием. По окончании инкубации отделяли раствор расщепленных антител от иммобилизованного пепсина центрифугированием колонки при $5000 \times g$ в течение 1 мин. Для очистки от нерасщепленных антител полученный супернатант наносили на колонку с протеином А сефарозой, инкубировали при комнатной температуре с перемешиванием в течение 10 мин. Затем колонку центрифугировали при $1000 \times g$ в течение 1 мин и собирали раствор, содержащий $F(ab')_2$ и Fc фрагменты. Очистку раствора от Fc фрагментов осуществляли диализом (50 MWSO). Для проверки чистоты полученных $F(ab')_2$ фрагментов проводили электрофорез в 12% полиакриламидном геле по методу Лэммли [22].

Тест ОП проводили с использованием многофункциональной системы исследования поведения (TSE MultiConditioning, Германия) по программе «TSE MCS2 – Locomotor activity/Open field) в квадратной арене размером 40×40 см. Тестирование проводили в течение 10 мин при освещении 600 лк. Учитывали продолжительность отдыха (с), время передвижения (с), общую длину пробега (см), среднюю скорость передвижения (см/с), число стоек, число посещения центра поля, длительность пребывания в центре поля (с), число посещения углов и время нахождения в углах (с), число стоек в углах.

Исследование поведения мышей в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) проводили однократно на 6-е сут после последнего введения препаратов. ПКЛ представляет собой установку из пластика, состоящую из центральной площадки, от которой крестообразно расходятся 4 рукава размером 30×6 см каждый. Два противоположных рукава открытые (ОР) без стенок и два закрытых (ЗР) по бокам бортиками высотой 30 см. Высота лабиринта над полом 1 м, освещенность 24 лк. Мышь помещали на площадку в центр лабиринта головой в сторону одного из ОР. Учитывали общее время пребывания в открытых и закрытых рукавах (с), число стоек и число реакций заглядывания под лабиринт (свешиваний). Продолжительность тестирования для каждой мыши составляла 5 мин.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы Statistica 7.0. Учитывая, что показатели каждой из выборок не соответствуют закону нормального распределения по Колмогорову–Смирнову, для статистической обработки применяли однофакторные критерии непараметрической статистики Н-критерий Kruskal–Wallis ANOVA с последующим post-hoc анализом по U-критерию Mann–Whitney. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принимались равными 0,05. Данные представлены в виде медианы и границ квартилей [25;75%].

Результаты

Тестирование поведенческих реакций в ОП у мышей контрольной и опытных групп проводили на 5-е сут после последнего введения препаратов. Анализ полученных данных не выявил значимых различий между показателями локомоторной активности (пройденное расстояние, скорость движения, время отдыха, число стоек) между мышами опытных и контрольной групп (табл. 1). Дополнить поведенческий профиль исследуемых групп животных позволил ана-

лиз таких реакций, как число заходов и время нахождения в центре поля, число посещений и время, проведенное в углах поля, и число стоек в углах поля. Установлено, что первичное помещение животного в «открытое поле» вызывает в основном поведенческие реакции, опосредованные тревогой и страхом, животные избегают ярко освещенных и открытых участков поля [21]. Результаты, полученные при тестировании мышей в тесте «открытое поле», свидетельствуют о наличии значимых межгрупповых различий (контроль и опыт): число посещений центра поля [$H(2, N=22)=15,27625, p=0,0005$]; время, проведенное в центре поля [$H(2, N=22)=15,09088, p=0,0005$]; время, проведенное в углах [$H(2, N=22)=17,30244, p=0,0002$]; число стоек в углах поля [$H(2, N=22)=6,107205, p=0,047$].

Интраназальное введение стареющим мышам АТ-ГЛУ, как и $F(ab')_2$ фрагментов АТ-ГЛУ, приводило к существенному увеличению количества посещений и времени пребывания в центре поля при сравне-

нии с группой контроля (табл. 1). По количеству посещения углов «открытого поля» существенной разницы между исследуемыми группами животных не отмечено. В то же время мыши, получавшие интраназально АТ-ГЛУ и $F(ab')_2$ фрагменты АТ-ГЛУ, снизили время пребывания в углах поля в 1,6 ($p<0,01$) и 1,2 ($p<0,01$) раза и увеличивали количество стоек в углах поля в 1,6 ($p<0,05$) и 2 ($p<0,05$) раза, соответственно, при сравнении с животными контрольной группы (табл. 1). Полученные данные свидетельствуют о снижении уровня тревожности у стареющих мышей, получавших интраназально АТ-ГЛУ и $F(ab')_2$ фрагменты АТ-ГЛУ.

Приподнятый крестообразный лабиринт является одним из общепринятых тестов при оценке уровня тревожности у грызунов. Избегание светлых участков ПКЛ считается одним из наиболее надежным и устойчивым признаком уровня тревожности [23, 24]. При межгрупповом сравнении данных тестирования животных в ПКЛ установлены существенные межгрупповые различия (контроль и опыт):

Таблица 1/Table 1

Поведенческая активность мышей линии C57Bl/6 в тесте «Открытое поле»

Indicators of Behavioral Activity in C57Bl/6 Mice in the Open Field Test

Показатели/ Indicators	Группа мышей/ mice's group		
	Контроль / Control	Антитела к глутамату / Glutamate antibodies	$F(ab')_2$ фрагменты антител к глутамату / $F(ab')_2$ fragments of glutamate antibodies
Время отдыха, с / Rest time, s	341,30 [297,80; 358,40]	348,30 [308,00; 415,30]	351,40 [337,30; 355,10]
Время движения, с / Travel time, s	258,70 [241,60; 302,15]	300,85 [251,70; 367,40]	248,60 [244,90; 262,70]
Длина пробега, см / Run length, cm	8443,80 [6333,05; 9163,20]	9312,90 [4967,00; 11786,80]	6990,70 [6333,40; 8395,95]
Скорость движения, см/с / Movement speed, cm/s	28,15 [25,90; 31,95]	36,85 [30,80; 39,60]	27,30 [25,70; 30,00]
Количество стоек / Number of racks	5,50 [2,50; 9,50]	2,50 [1,00; 5,00]	5,5 [2,50; 9,50]
Количество посещений центра поля / Number of visits field center	0,60 [0,00; 1,00]	5,00 [3,00; 6,50]**	2,00 [1,00; 3,00]**
Время пребывания в центре поля, с / Time spent in the center of the field, s	5,60 [3,50; 7,90]	47,00 [42,00; 52,00]**	17,00 [12,00; 56,00]**
Количество посещений углов / Number of visits corners	19,00 [16,00; 22,00]	23,00 [21,50; 24,00]	19,00 [14,00; 27,00]
Время пребывания в углах, с / Time of stay in the corners, s	438,60 [402,00; 487,00]	265,00 [261,50; 271,50]**	368,00 [318,00; 372,00]**
Количество стоек в углах / Number of posts in the corners	3,57 [1,00; 8,00]	5,87 [3,00; 9,00]*	7,14 [3,00; 14,00]*

Примечание. Здесь и в табл. 2 * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$ при сравнении с группой контроля.

Note. Here and in Table 2 * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$ in comparison with the control group.

Таблица 2/Table 2

Влияние антител к глутамату и F(ab')₂ фрагментов антител к глутамату на поведение мышей в приподнятом крестообразном лабиринте
Effect of Glutamate Antibodies and F(ab')₂ Fragments Glutamate Antibodies on Behavioral of Mice in the Elevated Plus Maze

Группа/ Group	Показатели/Indicators			
	Время пребывания в открытом рукаве, с / Time spent in the open arm, s	Время пребывания в закрытом рукаве, с / Time spent in a closed sleeve, s	Число стоек/ Number of rears	Число свешиваний / Number of «hanging» reactions
Контроль/ Control	29,00 [19,00; 36,00]	271,00 [255,00; 281,00]	3,00 [1,00; 5,00]	3,00 [1,00; 3,00]
Антитела к глутамату/ Glutamate Antibodies	63,00 [51,00; 79,50]**	237,00 [220,50; 249,00]**	11,00 [4,00; 13,00]*	9,00 [3,5; 13,00]*
F(ab') ₂ фрагменты антител к глутамату / F(ab') ₂ fragments glutamate antibodies	58,00 [36,00; 69,00]***	242,00 [231,00; 264,00]*	7,00 [5,00; 8,00]**	7,00 [5,00; 8,00] **

время, проведенное в открытых рукавах лабиринта [H(2,N=22)=9,337861, p=0,0094]; время в закрытых рукавах [H(2,N=22)=7,838285 p=0,0199]; число стоек [H(2,N=22)=7,2809557, p=0,026]; число реакций «свешивания» [H(2, N= 22) =8,927835 p =0,0115].

Мыши, получавшие интраназально АТ-ГЛУ и F(ab')₂ фрагменты АТ-ГЛУ, увеличили в 2,2 (p<0,01) и 2,0 (p<0,01) раза время нахождения в открытых рукавах лабиринта (соответственно) при сравнении с животными группы контроля (табл. 2). У опытных групп мышей также наблюдали существенное в 3,7 (p<0,05) и в 2,3 (p<0,01) раза увеличение числа стоек (табл. 2). Заглядывание за край лабиринта («свешивание») отражает состояние тревоги и страха. Многие авторы связывают реакцию «свешивания» с когнитивными функциями мозга, такими как оценку риска перед принятием решения, что считается актуальным при изучении эффектов анксиолитических препаратов [23, 24]. В настоящем исследовании мыши, получившие интраназально АТ-ГЛУ и F(ab')₂ фрагменты АТ-ГЛУ, более чем в 3 и в 2 раза соответственно (p<0,01) увеличивали число заглядываний за край лабиринта при сравнении с группой контроля, что свидетельствует о снижении уровней страха и тревоги.

Значимых различий в эффектах АТ-ГЛУ и F(ab')₂ фрагментов АТ-ГЛУ на поведение мышей в тестах «открытое поле» и ПКЛ не выявлено.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о возможности снижения уровня тревожности и страха у стареющих мышей C57Bl/6, получавших интраназально антитела к глутамату и их F(ab')₂ фрагменты. Так, в тесте «открытое поле» у мышей, получавших

интраназально антитела к глутамату и F(ab')₂ фрагменты антител к глутамату отмечали увеличение частоты посещения и продолжительности пребывания в центре поля, снижение проведенного времени и увеличение исследовательской активности (числа стоек) в углах открытого поля, что свидетельствует о снижении уровня тревожности. В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт», который широко применяется для исследования уровня тревожности у животных [23, 24], было выявлено существенное увеличение времени нахождения в открытых рукавах лабиринта, увеличение числа стоек и «свешивания» (заглядывание под лабиринт) у мышей C57Bl/6, получавших антитела к глутамату и их F(ab')₂ фрагменты, что также свидетельствует о снижении уровня тревожности и страха. Таким образом, полученные данные позволяют предполагать наличие у антител к глутамату и их F(ab')₂ фрагментов анксиолитического эффекта.

Литература

(п.п. 5; 6; 8; 9; 13-16; 19; 22; 24; 25 см. References)

1. Горшунова Н.К., Григорьян М.Ф. Стрессочувствительность и стрессоустойчивость лиц пожилого и старческого возраста. *Геронтология*. 2014; 2(1): 82-91.
2. Левин О.С., Чимагомедова А.Ш. Тревога и агитация у пожилых. *Современная терапия в психиатрии и неврологии*. 2020; (3-4): 13-20.
3. Котова О.В., Беляев А.А., Акарачкова Е.С. Современные методы диагностики и лечения тревожных и депрессивных расстройств. *РМЖ. Медицинское обозрение*. 2021; 5(10): 648–53. <https://doi.org/10.32364/2587-6821-2021-5-10-648-653>
4. Сюняков Т.С., Сюняков С.А., Дорофеева О.А. Механизмы ангиогенеза и терапия тревоги. *Психиатрия и психофармакотерапия*. 2011; 13(6): 9-15.
5. Левин О.С., Чимагомедова А.Ш., Арефьева А.П. Тревожные расстройства в пожилом возрасте. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2019; 119(6): 113-8.

10. Дергачев В.Д., Яковлева Е.Е., Бычков Е.Р., Пиотровский Л.Б., Шабанов П.Д. Роль глутаматного рецепторного комплекса в организме. NMDA-лиганды при нейродегенеративных процессах — современное состояние проблемы. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2022; 20(1): 17–28. <https://doi.org/10.17816/RCF20117-28>
11. Белозор О.С., Шуваев А.Н., Фришлер Я.В., Шуваев А.Н. Антагонисты NMDA-рецепторов как потенциальные средства для лечения нейродегенеративных заболеваний мозга. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2022; 16(2): 58–69. <https://doi.org/10.54101/ACEN.2022.2.7>
12. Кудряшов Н.В., Устинова М.В., Калинина Г.С. Модуляторы NMDA рецепторов — перспективная группа антидепрессантов. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2018; 81(8): 26–36.
17. Трекова Н.А., Ветрилэ Л.А. Влияние системного введения антител к глутамату на показатели поведения мышей C57Bl/6 и BALB/C. *Журнал Высшей нервной деятельности*. 2004; 54(3): 405–9.
18. Ветрилэ Л.А., Захарова И.А., Кудрин В.С., Клодт П.М. Влияние антител к глутамату на развитие стресс-реакций и содержание нейромедиаторов в гиппокампе и гипоталамусе крыс с разной поведенческой активностью. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2013; 155(3): 293–8.
21. Давыдова Т.В., Ветрилэ Л.А., Захарова И.А. Влияние F(ab')₂ фрагментов антител к глутамату на изменения памяти у возрастных мышей линии C57Bl/6. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2023; 175(6): 2–5. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-175-6>
23. Левандовская А.А., Зайченко М.И., Мержанова Г.Х., Саложин С.В. Оценка исследовательской активности и тревожности крыс, различающихся по выраженности импульсивного поведения. *Журнал Высшей нервной деятельности*. 2013; 63(6): 719–29.
8. Nasir M., Trujillo D., Levine J., Dwyer J.B., Rupp Z.W., Bloch M.H. Glutamate Systems in DSM-5 Anxiety Disorders: Their Role and a Review of Glutamate and GABA. *Psychopharmacology*. 2020; 19(11): 548–05. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.548505>
9. Martin E.I., Ressler K.Jr., Binder E., Nemeroff F. The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. *Psychiatr Clin North Am*. 2020; 109(1): 74–103. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.05.031>
10. Dergachev V.D., Yakovleva E.E., Bychkov E.R., Piotrovskiy L.B., Shabanov P.D. The role of the glutamate receptor complex in the body. NMDA ligands in neurodegenerative processes — the current state of the problem. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2022; 20(1): 17–28. (in Russian). <https://doi.org/10.17816/RCF20117-28>
11. Belozor O.S., Shuvayev A.N., Fritsler YA.V., Shuvayev A.N. NMDA receptor antagonists as potential agents for the treatment of neurodegenerative diseases of the cerebellum *Annaly klinicheskoy i eksperimental'noy neurologii*. 2022; 16(2): 58–69. (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2022.2.7>
12. Kudryashov N.V., Ustinova M.V., Kalinina G.S. NMDA receptor modulators — a promising group of antidepressants. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2018; 81(8): 26–36. (in Russian)
13. Yun-Fang Jia, Katheryn Winger, Ada Man-Choi Ho, Lee Peyton, Matthew Baker, Doo-Sup Choi. Astrocytic Glutamate Transporter. *Front Behav Neurosci*. 2020; 22(14): 57. Doi: 10.3389/fnbeh.2020.00057
14. Vitek G.E., Decourt B., Sabbagh M.N. Lecanemab (BAN2401): an anti-beta-amyloid monoclonal antibody for the treatment of Alzheimer disease. *Expert Opin Investig Drug*. 2023; 32(2): 89–94. <https://doi.org/10.1080/13543784.2023.2178414>
15. Goulet Dennis R., Atkins William M. Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. *J Pharm Sci*. 2020; 109(1): 74–103. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.05.031>
16. Katsinelos Taxiarchis, Tuck Benjamin J., Mukada Aamir S., McEwan William A. The Role of Antibodies and Their Receptors in Protection Against Ordered Protein. *Front Immunol. Sec. Molecular Innate Immunity*. 2019; 2019; 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01139>
17. Trekova N.A., Vetrile L.A. The effect of systemic administration of antibodies to glutamate on the behavioral parameters of C57Bl/6 and BALB/C mice. *Zhurnal Vysshey nervnoy deyatelnosti*. 2004; 54(3): 405–9. (in Russian)
18. Vetrile L.A., Zakharova I.A., Kudrin V.S., Klodt P.M. The effect of antibodies to glutamate on the development of stress reactions and the content of neurotransmitters in the hippocampus and hypothalamus of rats with different behavioral activity. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2013; 155(3): 293–8. (in Russian)
19. Kucheryanu V.G., Vetrile L.A., Zakharova I.A., Voronina N.A. Effect of anti-Glutamate antibodies in modeled parkinsonian syndrome. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020; 169(4): 431–4.
20. Davydova T.V., Vetrile L.A., Zakharova I.A., Gruden M.A., Kudrin V.S., Narkevich V.B., et al. Antibodies to Glutamate facilitate spatial memory formation in the Morris water maze in aging C57Bl/6 mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020; 169 (1): 5–8.
21. Davydova T.V., Vetrile L.A., Zakharova I.A. Influence of F(ab')₂ fragments of anti-glutamate antibodies on memory changes in aged C57Bl/6 mice. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i medi-*

References

1. Gorshunova N.K., Grigor'yan M.F. Stress sensitivity and stress resistance of elderly and senile people. *Gerontologiya*. 2014; 2(1): 82–91. (in Russian)
2. Levin O.S., Chimagomedova A.Sh. Anxiety and agitation in the elderly. *Sovremennaya terapiya v psikiatrii i neurologii*. 2020; (3–4): 13–20. (in Russian)
3. Kotova O.V., Belyayev A.A., Akarachkova E.S. Modern methods of diagnosis and treatment of anxiety and depressive disorders. *RMZH. Meditsinskoye obozreniye*. 2021; 5(10): 648–53. (in Russian). <https://doi.org/10.32364/2587-6821-2021-5-10-648-653>
4. Syunyakov S.A., Dorofeyeva O.A. Mechanisms of anxiogenesis and anxiety therapy. *Psikhiatriya i psikhofarmakoterapiya*. 2011; 13(6): 9–15. (in Russian)
5. Frank D., Gruenbaum B.F., Shelef I., Zvenigorodsky V., Sevrynovska O., Fleidervish I., et al. Blood glutamate scavenging as a novel glutamate-based therapeutic approach for post-traumatic brain injury anxiety and social impairment. *Transl Psychiatry*. 2023; 13(1): 41. <https://doi.org/10.1038/s41398-023-02329-1>
6. Caldas C.P., Bertero C.M. Living as an oldest old in Rio de Janeiro: the lived experience told. *Nursing science quarterly*. 2007; 20(4): 376382.
7. Levin O.S., Chimagomedova A.Sh., Aref'yeva A.P. Anxiety disorders in the elderly. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsikova*. 2019; 119(6): 113–8. (in Russian)

- tsiny*. 2023; 175(6): 2-5. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2023-175-6>
22. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680–5.
23. Levandovskaya A.A., Zaychenko M.I., Merzhanova G.K.H., Salozhin S.V. Evaluation of exploratory activity and anxiety in rats that differ in the severity of impulsive behavior. *Zhurnal Vysshey nervnoy deyatel'nosti*. 2013; 63(6): 719–29. (in Russian)
24. Cholieris E., Thomas A.W., Kavaliers M., Prato F.S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2001; 25(3): 235–60. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00011-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00011-2)
25. Baumgartner N.E., Biraud M.C., Lucas E.K. Sex differences in socio-emotional behaviour and changes in ventral hippocampal transcription across aging in C57Bl/6 mice. *Neurobiol Aging*. 2023; 130: 141–53. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2023.05.015>

Сведения об авторах:

Ветрилэ Лучия Александровна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., ФГБНУ НИИОПП;

Захарова Ирина Александровна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., ФГБНУ НИИОПП;

Лобанов Александр Владимирович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., ФГБНУ НИИОПП;

Давыдова Татьяна Викторовна, доктор мед. наук, гл. науч. сотр., ФГБНУ НИИОПП.

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092.9

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

Раннее соматическое и сенсомоторное развитие потомства от мышей с введением полного адьюванта Фрейнда до наступления беременности

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

Введение. Полный адьювант Фрейнда используется при иммунизации животных различными антигенами. Адьювантный эффект связан с активацией гуморального и клеточно-опосредованного иммунитета. Воздействие полного адьюванта Фрейнда во время беременности у мышей может вызывать активацию иммунитета и влиять на развитие их потомства.

Цель исследования – изучение влияния иммунизации самок мышей полным адьювантом Фрейнда до наступления беременности на соматическое созревание и сенсомоторное развитие их потомства в первые три недели после рождения.

Методика. Самок мышей ICR подвергали однократной иммунизации полным и трехкратной реиммунизации неполным адьювантом Фрейнда. В таком протоколе введения основное иммуностимулирующее действие обеспечивалось полным адьювантом Фрейнда и не вызывало осложнений, вызываемых реиммунизацией этим адьювантом. У иммунизированных животных получали потомство, которое тестировали в батарее тестов для оценки развития потомства в течение трех недель гнездового периода с оценкой соматического и сенсомоторного развития.

Результаты. Иммунизация самок мышей вызывала отставание соматического и сенсомоторного развития их потомства. Нарушения соматического созревания были выявлены начиная с 3 сут постнатального развития и фиксировались на протяжении всего периода тестирования в течение 21 дня. Сенсомоторные нарушения были выявлены от самых простых координаций пальцев передних конечностей на 3 сут развития до самых сложных при спуске по вертикальному канату и прохождению по приподнятой планке в конце гнездового периода.

Заключение. Полученные результаты необходимо учитывать при моделировании аутоиммунных процессов у животных во время беременности с использованием адьювантов Фрейнда.

Ключевые слова: мыши; полный адьювант Фрейнда; активация материнского иммунитета; соматическое и сенсомоторное развитие

Для цитирования: Лобанов А.В., Захарова И.А., Лобанова Н.Н., Морозов С.Г. Раннее соматическое и сенсомоторное развитие потомства от мышей с введением полного адьюванта Фрейнда до наступления беременности. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67 (3): 29-38.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.29-38

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

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

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.06.2023

Принята к печати 12.07.2023

Опубликована 20.09.2023

Lobanov A.V., Zakharova I.A., Lobanova N.N., Morozov S.G.

Early somatic and sensorimotor development of the offspring of mice administered with complete Freund's adjuvant before pregnancy

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

Introduction. Freund's complete adjuvant is used for modeling autoimmune diseases in animals. The adjuvant effect is related with the activation of humoral and cellular immunity. Exposure of mice to complete Freund's adjuvant during pregnancy can induce immune activation and affect the development of the offspring.

Aim: to study the effect of female mouse immunization with complete Freund's adjuvant before pregnancy on the somatic maturation and sensorimotor development of their offspring in the first three weeks after birth.

Methods. Female ICR mice were subjected to a single immunization with complete Freund's adjuvant and a triple booster immunization with incomplete Freund's adjuvant. With this protocol, complete Freund's adjuvant provided the major immunostimulatory effect and did not cause complications observed in reimmunization with this adjuvant. Offspring of the immunized animals was tested in a developmental test battery during a three-week nesting period, including the assessment of somatic and sensorimotor development.

Results. Immunization of female mice caused a delay in the somatic and sensorimotor development of their offspring. Disorders of the somatic maturation were detected starting from the 3rd day of postnatal development and were observed throughout the entire testing period of 21 days. Sensorimotor disturbances ranged from the simplest coordination of the forelimb fingers on the 3rd day of development to the most complex ones, during descent along a vertical rope and passing along an elevated bar, at the end of the nesting period.

Conclusion. The results of this study should be taken into account in modeling autoimmune processes in animals during pregnancy with Freund's adjuvants.

Keywords: mice; complete Freund's adjuvant; activation of maternal immunity; somatic and sensorimotor development

For citation: Lobanov A.V., Zakharova I.A., Lobanova N.N., Morozov S.G. Early somatic and sensorimotor development of the offspring of mice administered with complete Freund's adjuvant before pregnancy. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(3): 29–38. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.29-38

Author's contribution: the concept and design of the study – Morozov S.G., Lobanov A.V.; collection and processing of material – Lobanov A.V., Zakharova I.A., Lobanova N.N.; preparation of illustrative material – Lobanova N.N., statistical processing – Lobanov A.V., text writing – Lobanov A.V., editing – Morozov S.G., Lobanov A.V. Approval of the final version of the article – all authors.

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

Information about the authors:

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

Zakharova I.A., <https://orcid.org/0000-0002-5648-4214>

Lobanova N.N., <https://orcid.org/0000-0001-5860-0453>

Morozov S.G., <https://orcid.org/0000-0001-5822-5729>

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

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

Received 21.06.2023

Accepted 12.07.2023

Published 20.09.2023

Адьюванты – это вещества, используемые для стимуляции гуморального и клеточно-опосредованного иммунного ответа [1]. Полный адьювант Фрейнда (ПАФ) широко используются при иммунизации животных различными антигенами [2, 3]. ПАФ в основном состоит из легкого минерального масла и убитых нагреванием микобактериальных клеток (авирулентные *M.tuberculosis* H37Ra) [3]. Масляный компонент адьюванта при смешивании с водным раствором образует эмульсию, которая сохраняется в месте введения, а также печени и селезенке до нескольких месяцев, куда попадает после фагоцитоза макрофагами [3]. Такое депо адьюванта в организме обеспечивает продолжительную активацию иммунитета. Основной адьювантный эффект ПАФ связан с инактивированными микобактериями и во многом аналогичен реакции иммунитета при заражении живыми патогенами [3]. В экспериментальных работах ПАФ обычно применяют только для начальной иммунизации животных, а последующие реиммунизации, если они необ-

ходимы, проводят с использованием неполного адьюванта Фрейнда (НАФ) без микобактерии, что снижает побочные эффекты ПАФ при повторном введении (гранулемы, язвенный некроз, стерильные абсцессы в месте инъекции) [3]. Однократной инъекции ПАФ достаточно для активации иммунитета и развития воспаления [4]. Установлено, что через 14 дней после введения ПАФ в подушечку лапы крысам у животных сохраняется повышенный уровень провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, and TNF- α в крови и мозговой ткани, активируется микроглия, возникает дисбаланс возбуждающих/тормозных рецепторов и нейротрансмиттеров в мозге, возникает тревожное поведение [5]. Через 28 дней после однократной иммунизацией ПАФ у животных формируется хронический воспалительный процесс [3]. Введение ПАФ с определенными антигенами беременным мышам используется для изучения влияния аутоиммунного гуморального ответа самки на развитие нервной системы ее потомства [2]. При этом воспалительный ответ, который индуциру-

ется адьювантом за счет микобактериального компонента у беременных животных, может влиять на развитие их потомства. Исследования причин возникновения нервно-психических заболеваний у детей выявили их взаимосвязь с активацией материнского иммунитета (АМИ) во время беременности при инфекциях [6]. Установлено, что нарушения нормального развития мозга нередко связаны с активацией иммунитета и воспаления в целом, а не с действием конкретного патогена [7], а тяжесть осложнений в большей степени зависит от сроков возникновения АМИ во время беременности [7, 8].

При АМИ провоспалительные цитокины, такие как IL-6, TNF α , IL-1 β и IL-17A, проникают в развивающийся мозг плода и активируют микроглию [7], которая сама начинает секретировать провоспалительные цитокины (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-23 и IL-18) [9], а также В1- белок с высокой электрофоретической подвижностью амфотерин, кальций связывающий белок S100B, нуклеозидтрифосфаты, белки компонента [10], активные формы кислорода [11]. С активацией микроглии в пренатальном периоде связаны: снижение числа нейрональных клеток-предшественников, дефицит дофаминергических и серотонинергических нейронов, изменение плотности синаптических контактов нейронов, дисбаланс в возбуждающе-тормозной синаптической функции нейронной сети, усиление апоптотической гибели нервных клеток [12]. Также установлено, что АМИ вызывает изменения экспрессии генов внутри зародыша, репрессию путей развития нервной системы и изменения в развитии мозга плода [13].

В большинстве современных экспериментальных работ с нарушениями развития нервной системы и поведения на животных, вызванных АМИ, используется синтетическая вирусная РНК полицитидиловой кислоты (Poly (I:C)) или липополисахарид бактериального эндотоксина (ЛПС) [13], которые вводят на различных сроках беременности животных. Воздействие ПАФ, как активатора иммунитета, во время беременности на развитие потомства животных менее изучено. Наибольший интерес представляют самые ранние изменения в развитии потомства после рождения, до того момента, когда эти нарушения компенсируются.

ПАФ используется при иммунизации самок мышей различными антигенами с целью изучения развития их потомства, при этом сам адьювант может оказывать воздействие на эмбрио и фетогенез за счет активации иммунитета и вызывать различные нарушения развития в постнатальном периоде. Поэтому целью дан-

ной работы являлось изучение влияния иммунизации самок мышей ПАФ до наступления беременности на соматическое созревание и сенсомоторное развитие их потомства в первые три недели после рождения.

Методика

В исследовании были использованы половозрелые самки и самцы мышей ICR, полученные из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, Пушкино. Эксперименты проводились в соответствии с приказом Минздрава России №199 от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и регламентом декларации ЕС от 22 сентября 2010 г. об использовании лабораторных животных в научных целях. Работы на животных проводили в лаборатории общей и перинатальной нейроиммунопатологии ФГБНУ «НИИОПП» Исследование одобрено локальным Этическим комитетом института (протокол №3 от 08.06.2023 г.)

В исследовании было сформировано 2 группы мышей: контрольная (интактная) и экспериментальная (ПАФ). Пять самок экспериментальной группы подвергали однократной иммунизации ПАФ и трехкратной реиммунизации НАФ, пять мышей контрольной группы воздействию не подвергались. Первую иммунизацию проводили в возрасте 8 нед, далее с интервалом 10 сут осуществляли вторую и третью иммунизации, четвертую иммунизацию проводили через месяц после третьей. Для иммунизации одного животного использовали эмульсию, полученную при смешивании 150 мкл физиологического раствора (ПанЭко, Россия) и 150 мкл ПАФ (Sigma, США) или 150 мкл НАФ (Sigma, США). Введение осуществляли подкожно в зоны лимфатических узлов в 4-5 точках. На следующий день после последнего введения НАФ мышей экспериментальной группы ссаживали с интактными самцами. Ссадку мышей интактной группы проводили с интактными самцами в эти же сроки.

После рождения детенышей тестировали с использованием батареи тестов для оценки развивающегося поведенческого фенотипа мышей, разработанный в Институте нормальной физиологии им. П.К. Анохина [14] с 1 по 21 постнатальные сутки (ПС). Соматическое развитие оценивали по динамике массы тела (1-21 ПС), появлению первичной шерсти (3-5 ПС), отхождению ушных раковин (3-5 ПС), появлению нижних резцов (7-11 ПС), смыканию шерсти на животе (10-14 ПС), открытию глаз (13-16 ПС). Сенсомоторное развитие изучали в тестах схватывания палочки пальцами при раздражении подушечки передних конечностей (3-6 ПС), схватывания палочки передними конечностями

стями при удержании животного за хвост (7-15 ПС), удержания передними конечностями при помещении животного на горизонтальный канат (5-12 ПС), координации передних конечностей в направлении палочки, которой раздражают вибриссы, при удержании животного за хвост (10-14 ПС), удерживания на вертикальной сетке (10-15 ПС), подъема по вертикальному канату (12-20 ПС), спуска по вертикальному канату (12-20 ПС), прохождения по приподнятой планке (дорожке) (13-21 ПС). Эксперименты на животных проводили с 15:00 до 20:00.

Динамику массы тела изучали у потомства пяти контрольных ($n=42$) и пяти экспериментальных самок ($n=40$). Потомство трех пометов каждой группы (контрольная группа $n=20$, группа ПАФ $n=22$), отобранные случайным образом, использовали для оценки соматического и сенсомоторного развития.

Все исследуемые параметры, кроме массы тела и числа разошедшихся пальцев на конечностях оценивали бинарно. Положительный результат тестов соматического или сенсомоторного развития оценивали как «1», отрицательный – как «0».

Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 7.1 (StatSoft, США). Для результатов, которые оценивались бинарно, вычисляли средние значения для группы в процентах. Для численных

экспериментальных данных рассчитывали средние значения и стандартные отклонения. Бинарные данные сравнивали по Фишеру с определением критерия χ^2 , численные данные – методом ANOVA 2 тест Дункана.

Результаты

Иммунизация самок мышей ПАФ в проведенном исследовании вызывала нарушения соматического созревания у их потомства по всем исследованным признакам. Различия в динамике массы тела у животных исследуемых групп были выявлены с 14-х по 21-е постнатальные сутки (ПС). Животные экспериментальной группы статистически значимо медленнее набирали массу тела в сравнении с интактной группой в этот период с максимальным отставанием на 21 ПС (рис. 1). В первые две недели после рождения различий в динамике массы тела между группами не отмечалось.

Результаты изучения созревания основных соматических параметров животных, представлены в таблице. Развитие животных экспериментальной группы отставало от развития интактной группы на 2-е сут по таким параметрам как отхождение ушных раковин, появление нижних резцов, смыкание шерсти на животе, а на 1-е сут – в появлении первичной шерсти и открытии глаз. Также у животных экспериментальной группы

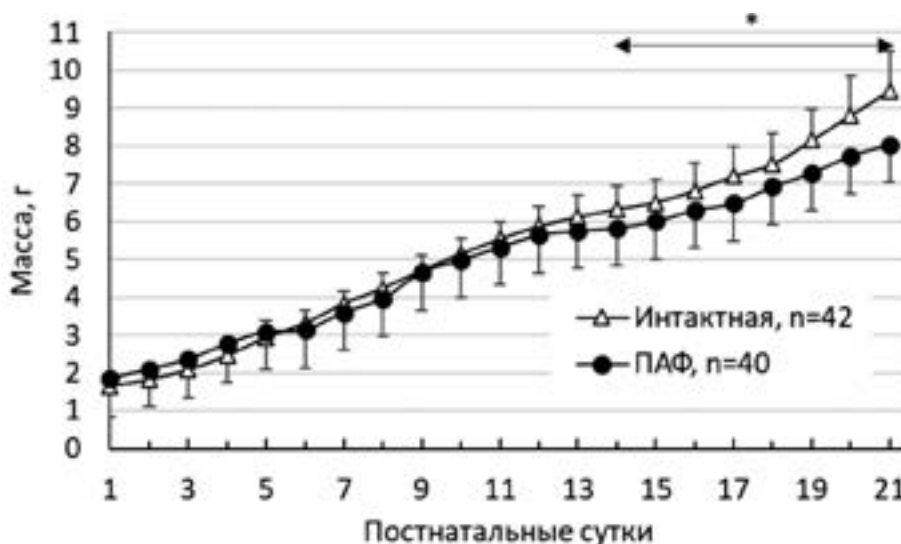


Рис. 1. Влияние введения ПАФ мышам до наступления беременности на динамику массы тела у их потомства в гнездовом периоде. Данные представлены как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение; n – количество животных в группе; * – $p < 0,05$ относительно контрольной группы (ANOVA 2, тест Дункана).

Fig. 1. The effect of CFA administration to mice before pregnancy on the dynamics of body weight in their offspring in the nesting period. Data are presented as arithmetic mean \pm standard deviation; n is the number of animals in the group; * – $p < 0.05$ significantly different from the control (ANOVA 2, Duncan's test).

было выявлено отставание в расхождении пальцев на передних и на задних конечностях на 4-е ПС в сравнении с развитием этих параметров у мышей интактной группы. Средние значения числа отделившихся пальцев у мышей интактной группы на передних конечностях и задних конечностях в этот период составляли $3,8 \pm 1,3$ и $2,0 \pm 1,1$, соответственно. У животных экспериментальной группы на 4-е ПС расхождения пальцев на передних и задних конечностях еще не начиналось (число отделившихся пальцев равнялось 0) и было значимо меньше, чем в контроле. Полностью пальцы передних конечностей в обеих группах расходились на 5-е ПС и задних конечностей на 6-е ПС.

Изучение формирования сенсомоторных координаций исследовалось от самых простых двигательных ответов на прикосновение палочки к передним конечностям до сложной двигательной деятельности на приподнятой планке. Прикосновение палочки к подушечке передней конечности вызывает сжатие пальцев у животных. Эта способность формируется в постнатальном онтогенезе в период с 3-х по 6-е ПС. У мышей экспериментальной группы полное развитие этой способности происходило на 6-е ПС, тогда как все мыши интактной группы реагировали на прикосновение начиная с 3-х ПС. Статистически значи-

мые различия между группами были выявлены на 3-и и 4-е ПС (рис. 2, А).

Развитие более сложной координации конечностей оценивалось по способности мышей схватывать палочку передними лапами при удержании животного за хвост и прикосновении палочкой к животу с 7-х по 12-е ПС. У мышей экспериментальной группы эта способность развивалась медленнее (на 7-9-е ПС), чем у мышей интактной группы (рис. 2, Б). Полностью развитие этой способности у мышей интактной группы завершалось на 10-е ПС, а у мышей экспериментальной группы – на 11-е.

Тестирование способности мышей схватываться за горизонтальный канат передними конечностями и удерживаться на нем изучалось с 5-х по 9-е ПС. В экспериментальной группе число животных, способных удержаться на канате передними конечностями было значимо меньше, чем в интактной группе с 5-х по 7-е ПС (рис. 2, В). Способность незрячих животных искать опору передними конечностями при удерживании за хвост и стимуляции вибрисс палочкой исследовалось с 10-х по 13-е ПС. На 10-е ПС в экспериментальной группе значимо меньшее число животных было способно координировать движения в направлении палочки в сравнении с контролем (рис. 2, Г).

Влияние введения ПАФ мышам до наступления беременности на соматическое развитие их потомства в постнатальном периоде

The effect of CFA administration to mice before pregnancy on the somatic development of their offspring in the postnatal period

Показатели соматического развития / Somatic development indicators	Группа / Group	Животные с проявлением соматического признака, % / Animals with somatic trait manifestation, %		
		3-и сут / 3 rd day	4-е сут / 4 th day	5-е сут / 4 th day
Появление первичной шерсти / Fur appearance primordial wool	Интактн/intact	25	100	100
	ПАФ / CFA	0 *	97	100
Отхождение ушных раковин / Ear separation	Интактн/intact	80	100	100
	ПАФ / GFA	5 *	80 *	100
		7-е сут / 7 th day	8-е сут / 8 th day	9-е сут / 9 th day
Появление нижних резцов / Appearance of the down incisors	Интактн/intact	100	100	100
	ПАФ / GFA	0 *	5 *	95
		10-е сут / 10 th day	11-е сут / 11 th day	12-е сут / 12 th day
Смыкание шерсти на животе / Fur closure in the ventral midline	Интактн/intact	100	100	100
	ПАФ / GFA	0 *	60 *	95
		13-е сутки / 13 th day	14-е сутки / 14 th day	15-е сутки / 15 th day
Открытие глаз / Eyes open	Интактн/intact	0	100	100
	ПАФ / GFA	0	0 *	95

Примечание. * – $p < 0,05$ относительно контрольной группы (по Фишеру, критерий χ^2). ПАФ – полный адьювант Фрейнда.

Note. * – $p < 0.05$ significantly different from the control (according to Fisher, Chi2 criterion). GFA Freund's complete adjuvant.

Возможность удержаться и развернуться на вертикальной сетке из положения головой вниз требует от животного способности к координации движений по поочередному перемещению передних и задних конечностей на сетке и избеганию падения. Тестирование показало, что развитие этой способности отставало у животных экспериментальной группы с 10-х по 13-е ПС в сравнении с контролем (рис. 3, А). Все животные интактной группы справились с удерживанием на сетке, начиная с 12-х ПС, а животные экспериментальной группы – с 14-х.

Подъем и спуск по канату возможен при формировании сложной координации движений конечностей. У мышей экспериментальной группы развитие спо-

собности подниматься и спускаться по канату происходило с отставанием от контроля. Значимо меньшее число животных экспериментальной группы было способно подниматься по канату на 15-е ПС и спускаться по канату на 15-17-е ПС в сравнении с животными интактной группы (рис. 3, Б, В).

С 14-х по 17-е ПС изучали способность мышей проходить по приподнятой планке. Отставание в формировании этой сложной двигательной координации у мышей экспериментальной группы в сравнении с контролем наблюдалось с 14-х по 16-е ПС. Полностью способность проходить по планке формировалась у мышей интактной группы на 16-е ПС, а у мышей группы ПАФ на 17-е ПС (рис. 3, Г).

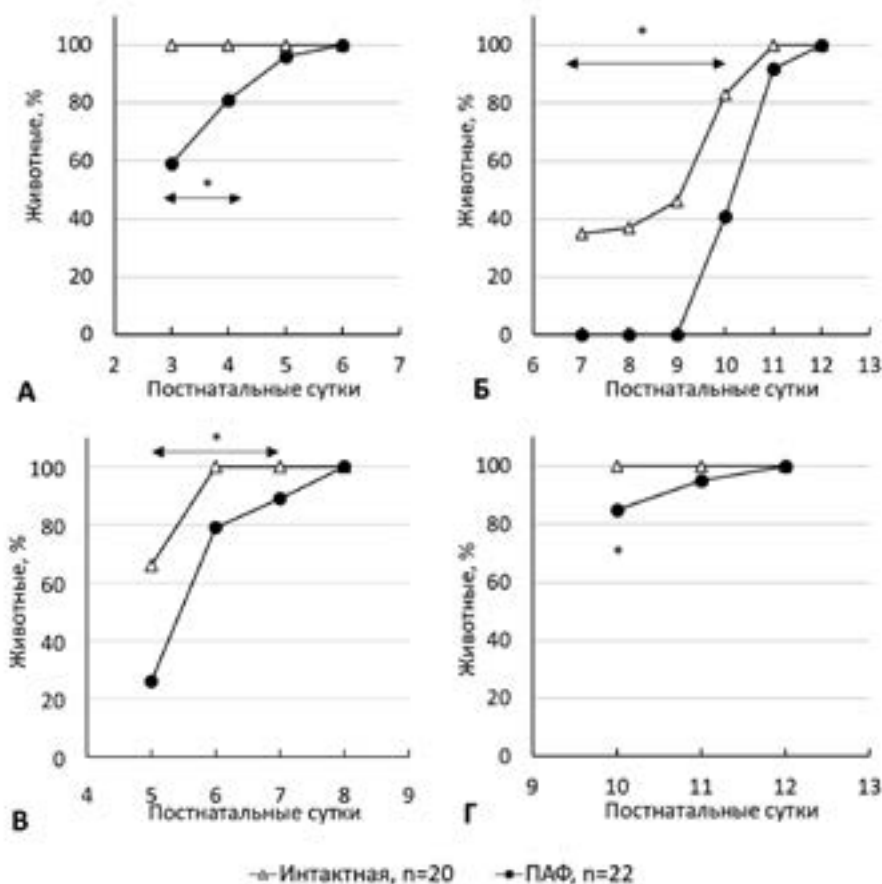


Рис. 2. Влияние введения ПАФ мышам до наступления беременности на формирование у их потомства способности: схватывать палочку пальцами передней конечности (А); схватывать палочку передними конечностями при удерживании животного за хвост (Б); удерживаться на горизонтальном канате передними конечностями (В); координировать передние конечности в направлении палочки, которой раздражают вибриссы животного (Г). Данные представлены в процентах количества животных с сформированными способностями; n – количество животных в группе; * – $p < 0,05$ относительно контрольной группы (по Фишеру, критерий χ^2).

Fig. 2. Influence of the administration of CFA to mice before pregnancy on the formation of the ability in their offspring: to grasp the stick with the fingers of the forelimb (A); grab the stick with the forelimbs while holding the animal by the tail (B); to be kept on a horizontal rope with the forelimbs (C); coordinate the forelimbs in the direction of the stick, which irritates the vibrissae of the animal (D). The data are presented as a percentage of the number of animals with developed abilities; n is the number of animals in the group; * – $p < 0.05$ significantly different from the control (according to Fisher, Chi2 criterion).

Таким образом, иммунизация ПАФ самок мышей вызывала отставание соматического и сенсомоторного созревания их потомства в гнездовом периоде развития. Нарушения физического развития были выявлены начиная с 3-х ПС и фиксировались на протяжении всего периода наблюдения в течение 21 сут. Отставания по каждому параметру развития компенсировались в течение 1-х или 2-х сут. Отставания в наборе массы тела возникали на 14-е сут и совпадали с переходом мышей на взрослое питание. Задержка в наборе массы тела не компенсировалась в гнездовом периоде,

а увеличивалась к 21 ПС. Нарушения созревания сенсомоторных координаций начинались с отставаний координации пальцев передних конечностей на 3 ПС. В дальнейшем онтогенезе нарушения сенсомоторных координаций были выявлены во всех используемых тестах. В простых задачах отставания составляли 1-2 суток, после чего происходила компенсация. В самых сложных тестах таких, как удержание на вертикальной сетке головой вниз, спуск по вертикальному канату и прохождение по приподнятой планке отставания составляли трое суток.

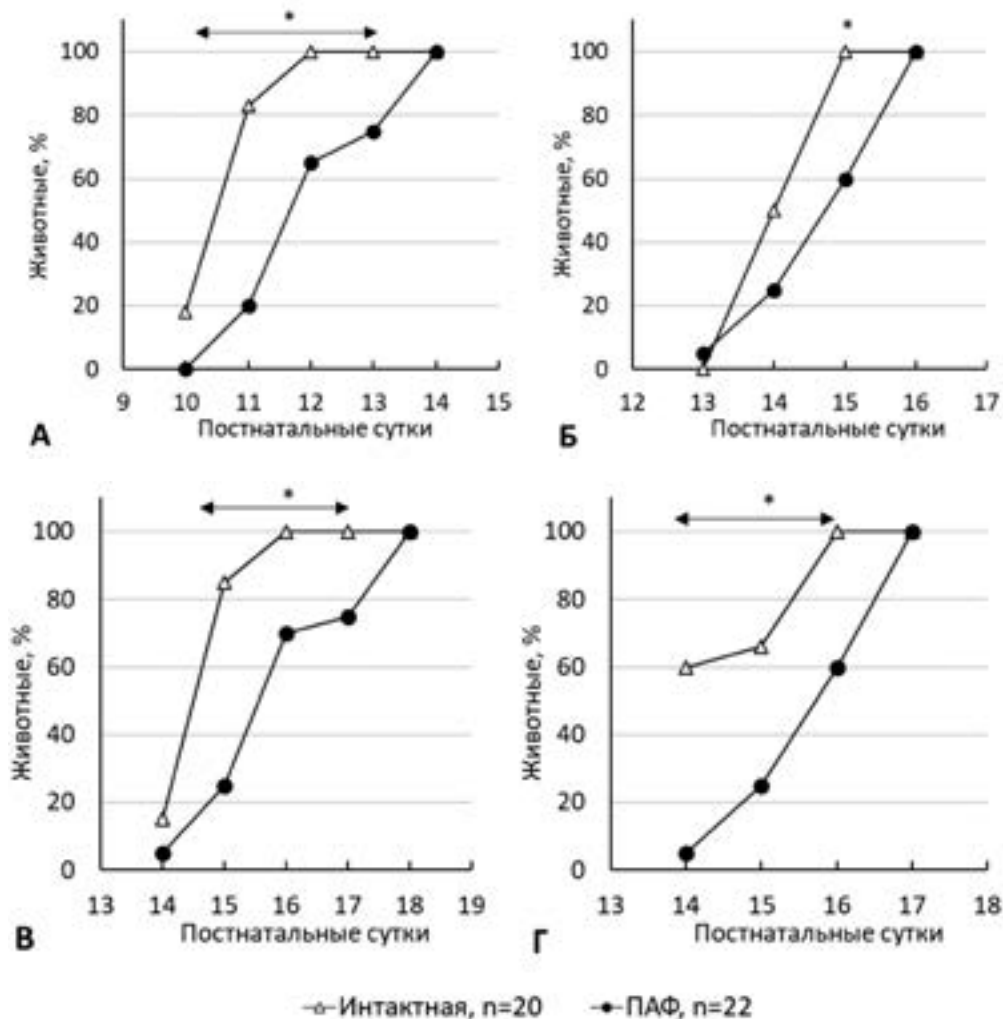


Рис. 3. Влияние введения ПАФ мышам до наступления беременности на формирование у их потомства способности: удерживаться на вертикальной сетке (А); подниматься по вертикальному канату (Б); спускаться по вертикальному канату (В); проходить по приподнятой планке (Г). Данные представлены в процентах количества животных, с сформированными способностями; n -- количество животных в группе; * – $p < 0,05$ относительно контрольной группы (по Фишеру, критерий χ^2).

Fig. 3. The effect of CFA administration to mice before pregnancy on the formation of the ability in their offspring: to stay on a vertical grid (A); climb the vertical rope (B); descend the vertical rope (C); walk along the raised bar (D). The data are presented as a percentage of the number of animals with developed abilities; n is the number of animals in the group; * – $p < 0.05$ significantly different from the control (according to Fisher, χ^2 criterion).

Обсуждение

В проведенном исследовании было изучено влияние однократной иммунизации самок мышей ICR ПАФ и дополнительной трехкратной реиммунизацией НАФ (последнее введение НАФ за 1 сут перед наступлением беременности) на постнатальное развитие их потомства в течение 3 нед гнездового периода. Известно, что ПАФ вызывает активацию гуморального и клеточного иммунитета и хроническое воспаление [15]. Поэтому введение ПАФ животным перед наступлением беременности способно вызывать АМИ, и полученные нами результаты нарушения соматического и сенсомоторного развития мышцей после рождения, вероятно, связаны с такой активацией иммунитета. Выявленное негативное действие ПАФ на соматическое развитие характеризовалось отставанием в наборе массы тела, замедлением формирования шерсти, прорезывания резцов, расхождения пальцев, открытия глаз. Отставание массы тела потомства иммунизированных самок мышей возникало в конце гнездового периода, что согласуется с данными по снижению массы тела у детенышей крыс, перенесших АМИ, вызванную введением Poly (I:C) во время беременности [16]. Клинические исследования также выявили взаимосвязь между перенесенной матерью инфекцией (грипп) во время беременности и отставанием в росте у их детей [17].

Возможными причинами замедления соматического созревания у потомства животных, иммунизированных ПАФ, могут быть различные факторы, вызванные иммунным ответом. Известно, что АМИ вызывает патологические воспалительные состояния плаценты [18], что может приводить к пренатальной гипоксии [19], снижению доступности незаменимых аминокислот [19] и являться одной из причин задержки соматического созревания в постнатальном онтогенезе [20]. Возникновение плацентарной недостаточности при АМИ обусловлено повышенной продукцией провоспалительных цитокинов [18], выработка которых, как известно, стимулируется введением ПАФ [21]. Взаимосвязь между воздействием ПАФ во время беременности с плацентарными нарушениями и задержкой соматического развития потомства предстоит еще изучить, особенно учитывая, что плод значительно устойчивее к гипоксии, чем взрослый организм [19].

Другими факторами, которые влияют на соматическое развитие потомства, могли быть нарушения развития внутренних органов, связанных с АМИ. Установлено, что введение ЛПС крысам во время беременности приводит к прогрессирующему воспалению легких у новорожденных крысят, измене-

нию экспрессии генов, регулирующих альвеологенез, и задержке морфологического созревания легких [22]. Воспаление легких в неонатальном периоде у мышей вызывает отставание в наборе массы тела начиная со 2-й недели постнатального развития [23], что аналогично нарушениям, наблюдаемым в нашем исследовании. Воздействие ПАФ на развитие легких, может быть более выражено, чем влияние ЛПС из-за специфических патоген-ассоциированных молекулярных образцов микобактерий. Известно, что введение ПАФ молодым крысам вызывает гранулематозное воспаление легких [24].

Выявленные отставания соматического развития в постнатальном периоде могут быть также связаны с нарушением формирования микробиоты и развития кишечника у животных в результате АМИ [25]. Известно, что ПАФ вызывает изменение общих микробных профилей и численности отдельных микроорганизмов в кишечнике мышцей [26]. Дизбиоз у самок мышцей во время беременности влияет на формирование микробиоты потомства [27]. Изменение постнатальной кишечной микрофлоры оказывает существенное воздействие на рост и функции кишечника [28]. Кроме того, АМИ у крыс способствует недоразвитию сосудистой системы кишечника и его воспалению [29].

Пренатальное воздействие ПАФ на соматическое развитие мышцей в раннем онтогенезе за счет индукции воспаления, нарушений в формировании внутренних органов и дисбиоза кишечника представляет интерес для будущих исследований.

В проведенной работе сенсомоторные нарушения были выявлены в течение всего гнездового периода. Формирование сложных моторных координаций в возрасте 2-3 нед происходило с более сильным отставанием, чем созревание простых двигательных ответов в течение 1-й нед постнатального развития. Сенсомоторные дисфункции в раннем постнатальном онтогенезе — известное осложнение при нарушении развития мозга, вызванного токсичным воздействием или гипоксией в пренатальном периоде [14, 30]. У потомства грызунов, которые подвергались АМИ, также возникают двигательные нарушения, но они описаны для более позднего подросткового возраста, характеризуются отставанием в формировании координации движений на вращающемся цилиндре и связаны с нарушениями формирования мозжечка [31].

Полученные нами результаты показали, что введение ПАФ до наступления беременности у мышцей, вызывало значительные отставания в формировании

сенсомоторных координаций в первые 3 нед после рождения. Эти результаты дополняют данные литературы по влиянию АМИ на созревание моторных форм поведения. Причинами выявленных нами задержек формирования сенсомоторных координаций, вероятно, являются нарушения получения и обработки сенсорной информации, планирования движений, эфферентного контроля движений, которые могут быть обусловлены нарушениями в различных областях головного мозга (соматосенсорной, моторной, ассоциативных), базальных ганглиях, таламусе, кортико-спинальных волокнах [32].

Отставания в развитии способности удержаться на сетке и спуститься по канату частично могли быть связаны с задержкой соматического развития, поскольку реализация поведения в этих тестах зависит от мышечной силы животных.

Характер выявленных нами нарушений согласуется с задержкой формирования координации движений, которые возникают при пренатальной и неонатальной гипоксии у грызунов [33] и связаны с нарушениями в моторной, сенсомоторной, зрительной, слуховой областях коры [33]. В нашем исследовании задержки развития компенсировались к 20-дневному возрасту, когда у мышей формируется большинство сенсомоторных координаций и двигательных навыков, характерных для взрослых животных. Предполагается, что нарушения в координации движений у животных, полученных от самок с введением ПАФ, будут возникать в более взрослом возрасте при реализации сложных двигательных задач.

Заключение

В результате проведенного исследования были выявлены значительные отставания в соматическом созревании и сенсомоторном развитии потомства мышей, иммунизированных ПАФ до наступления беременности и, вероятно, обусловленные активацией материнского иммунитета. Полученные результаты дополнили имеющиеся данные о влиянии АМИ на развитие поведения и когнитивных способностей у грызунов в ювенильном периоде развития. Выявленные задержки в развитии животных, вызванных пренатальным воздействием ПАФ необходимо учитывать при моделировании аутоиммунных процессов у животных с использованием адьювантов. Изучение влияния ПАФ на активацию материнского иммунитета, и механизмы такого воздействия на постнатальное развитие мышей представляют интерес для дальнейших исследований.

Литература

(п.п. 1-13; 15-18; 20-32 см. References)

14. Лобанов А.В., Хохлова О.Н., Зарайская И.Ю., Мурашев А.Н. Особенности соматического созревания и сенсомоторного развития у мышей в раннем онтогенезе при пренатальном воздействии цитозинарабинозы. *Журн. высш. нерв. деят.* 2008; 58(1): 98-110.
19. Тюлкова Е.И. Различные экспериментальные модели в изучении влияния пренатальной гипоксии на развитие мозга. *Интегративная физиология.* 2022; 3(4): 432-54.
33. Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ватаева Л.А. Влияние гипоксии в раннем перинатальном онтогенезе на поведение и структурные характеристики мозга крысы. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии.* 2012; 48(5): 467-73.

References

1. Stills H.F. Jr. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J.* 2005; 46(3): 280-93.
2. Jones K.L., Pride M.C., Edmiston E., Yang M., Silverman J.L., Crawley J.N., et al. Autism-specific maternal autoantibodies produce behavioral abnormalities in an endogenous antigen-driven mouse model of autism. *Mol Psychiatry.* 2020; 25(11): 2994-3009.
3. Billiau A., Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 2001; 70(6): 849-60.
4. Mortaz E., Adcock I.M., Tabarsi P., Masjedi M.R., Mansouri D., Velayati A.A., et al. Interaction of Pattern Recognition Receptors with Mycobacterium Tuberculosis. *J Clin Immunol.* 2015; 35(1): 1-10.
5. Rusznak K., Horvath A.I., Pohli-Toth K., Futacs A., Kemeny A., Kiss G., et al. Experimental Arthritis Inhibits Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice. *Cells.* 2022; 11(5):791.
6. Smolders S., Notter T., Smolders S.T., Rigo J.M., Brone B. Controversies and prospects about microglia in maternal immune activation models for neurodevelopmental disorders. *Brain Behav Immun.* 2018; 73: 51-65.
7. Zawadzka A., Cieslik M., Adamczyk A. The Role of Maternal Immune Activation in the Pathogenesis of Autism: A Review of the Evidence, Proposed Mechanisms and Implications for Treatment. *Int JMol Sci.* 202; 22(21): 11516.
8. Cordeiro C.N., Tsimis M., Burd I. Infections and Brain Development. *Obstet Gynecol Surv.* 2015; 70(10): 644-55.
9. Prinz M., Jung S., Priller J. Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell.* 2019; 179(2): 292-311.
10. Arcuri C., Mecca C., Bianchi R., Giambanco I., Donato R. The Pathophysiological Role of Microglia in Dynamic Surveillance, Phagocytosis and Structural Remodeling of the Developing CN S. *Front Mol Neurosci.* 2017; 10: 191.
11. Pangrazzi L., Balasco L., Bozzi Y. Oxidative Stress and Immune System Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(9): 3293.
12. Solek C.M., Farooqi N., Verly M., Lim T.K., Ruthazer E.S. Maternal immune activation in neurodevelopmental disorders. *Dev Dyn.* 2018; 247(4): 588-619.
13. Baines K.J., Hillier D.M., Haddad F.L., Rajakumar N., Schmid S., Renaud S.J. Maternal immune activation alters fetal brain development and enhances proliferation of neural precursor cells in rats. *Front Immunol.* 2020; 11: 1145.

14. Lobanov A.V., Khokhlova O.N., Zaraiskaia I.Yu., Murashev A.N. Somatic maturation and sensorimotor development of C57BL/6 mice prenatally exposed to cytosine arabinoside. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova*. 2008; 58(1): 98-110. (in Russian)
15. Kubota M., Iizasa E., Chuuma Y., Kiyohara H., Hara H., Yoshida H. Adjuvant activity of *Mycobacteria*-derived mycolic acids. *Heliyon*. 2020; 6(5): e04064.
16. Murray K.N., Edey M.E., Manca M., Vernon A.C., Oladipo J.M., Fasolino V., et al. Evolution of a maternal immune activation (mIA) model in rats: Early developmental effects. *Brain Behav Immun*. 2019; 75: 48-59.
17. Ogasawara K. The long-run effects of pandemic influenza on the development of children from elite backgrounds: Evidence from industrializing Japan. *Econ Hum Biol*. 2018; 31: 125-37.
18. Yan X., Managlia E., Tan X.D., De Plaen I.G. Prenatal inflammation impairs intestinal microvascular development through a TNF-dependent mechanism and predisposes newborn mice to necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2019; 317(1): G57-G66.
19. Tyulkova E.I. Various experimental models in studying the effect of prenatal hypoxia on brain development. *Integrativnaya fiziologiya*. 2022; 3(4): 432-54. (in Russian)
20. Piesova M., Koprdoва M., Ujhazy E., Krskova L., Olexova L., Morova M., et al. Impact of prenatal hypoxia on the development and behavior of the rat offspring. *Physiol Res*. 2020; 69(4): S649-S659.
21. Zhao Y., Chen Y., Wang Z., Peng C., Li Q., Wu J., et al. The method of Yiqi Yangyin Tongluo can attenuate the pyroptosis of rheumatoid arthritis chondrocytes through the ASIC1a/NLRP3 signaling pathway. *Ann Transl Med*. 2022; 10(3): 145.
22. Cao L., Wang J., Tseu I., Luo D. Maternal exposure to endotoxin delays alveolarization during postnatal rat lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009; 296(5): L726-37.
23. You Y., Guo C., Zhang H., Deng S., Tang J., Xu L., et al. Effect of intranasal instillation of lipopolysaccharide on lung development and its related mechanism in newborn mice. *J Interferon Cytokine Res*. 2019; 39(11): 684-93.
24. Malengier-Devlies B., Decaestecker T., Dekoster K., Vanstapel A., Ahmadzadeh K., Poosti F., et al. Lung functioning and inflammation in a mouse model of systemic juvenile idiopathic arthritis. *Front Immunol*. 2021; 12: 642778.
25. Tadros J.S., Llerena A., Sarkar A., Johnson R., Miller E.M., Gray H.L., et al. Postnatal growth and gut microbiota development influenced early childhood growth in preterm infants. *Front Pediatr*. 2022; 10: 850629.
26. Khadka S., Omura S., Sato F., Tsunoda I. Adjuvant Injections Altered the Ileal and Fecal Microbiota Differently with Changes in Immunoglobulin Isotypes and Antimycobacterial Antibody Responses. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(3): 2818.
27. Zhang Z., Xue C., Ju M., Guo J., Wang M., Yi S., Yi X. Maternal Gut Dysbiosis Alters Offspring Microbiota and Social Interactions. *Microorganisms*. 2021; 9(8): 1742.
28. Fak F., Ahrne S., Molin G., Jeppsson B., Westrom B. Microbial manipulation of the rat dam changes bacterial colonization and alters properties of the gut in her offspring. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; 294(1): G148-54.
29. Yan X., Managlia E., Tan X.D., De Plaen I.G. Prenatal inflammation impairs intestinal microvascular development through a TNF-dependent mechanism and predisposes newborn mice to necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2019; 317(1): G57-G66.
30. Girard S., Kadhim H., Beaudet N., Sarret P., Sebire G. Developmental motor deficits induced by combined fetal exposure to lipopolysaccharide and early neonatal hypoxia/ischemia: a novel animal model for cerebral palsy in very premature infants. *Neuroscience*. 2009; 158(2): 673-82.
31. Aavani T., Rana S.A., Hawkes R., Pittman Q.J. Maternal immune activation produces cerebellar hyperplasia and alterations in motor and social behaviors in male and female mice. *Cerebellum*. 2015; 14(5): 491-505.
32. Bayer S.A., Altman J. *Neocortical development*. New York: Raven Press 1991.
33. Otellin V.A., Khozhay L.I., Vataeva L.A. The influence of hypoxia in early perinatal ontogenesis on the behavior and structural characteristics of the rat brain. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii*. 2012; 48(5): 467-73. (in Russian)

Сведения об авторах:

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

Захарова Ирина Александровна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., ФГБНУ НИИОПП;

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

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

© Коллектив авторов, 2023

УДК 547.327:612.884

Счастливая Н.И.¹, Жаворонок И.П.¹, Доронькина А.С.¹, Кукса М.С.¹, Филатова Д.В.¹,
Чудиловская Е.Н.¹, Лисовская М.В.², Михальчук А.Л.², Молчанова А.Ю.¹

Биологическое действие бутаноилэтананоламида и каприлоилэтананоламида у крыс: антиноцицептивный и побочные эффекты

¹ГНУ «Институт физиологии» Национальной академии наук Беларуси,

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

²ГНУ «Институт биоорганической химии» Национальной академии наук Беларуси,

220084, Минск, Беларусь, ул. акад. В.Ф. Купревича, д. 5

Введение. Одним из перспективных направлений разработки новых фармакологических препаратов для купирования боли и воспаления является изучение биологического действия липидных молекул, в том числе и этаноламидов жирных кислот.

Цель исследования – изучение влияния бутаноилэтананоламида (butanoylethanamide, BEA) и каприлоилэтананоламида (caprinoylethanamide, CEA) на ноцицептивные реакции, биохимические и гистологические изменения у здоровых животных и на уровень болевой чувствительности при моделировании нейропатии и артрита.

Методика. Исследование выполнено на крысах-самцах Wistar ($n=71$). Ноцицептивную чувствительность оценивали по изменению показателей порога ноцицептивной реакции (ПНР) и по динамике латентного периода ноцицептивной реакции (ЛПНР). Общий анализ крови выполняли с использованием гематологического ветеринарного анализатора Nihon MEK 6450K (Япония). Биохимические исследования проводили с помощью биохимического анализатора BS-200 (MINDRAY, Китай) с применением коммерческих наборов фирмы Диасенс (Беларусь).

Результаты. Внутривенное введение BEA здоровым животным во всех исследуемых дозах не приводило к статистически значимым изменениям ПНР и ЛПНР по сравнению с их начальными значениями ($p>0,05$). CEA в дозе 100 мг/кг вызывал снижение ноцицептивной чувствительности на механическое воздействие ($p<0,05$). Биохимические показатели крови и результаты гистологического исследования свидетельствуют о побочном действии указанных соединений на структуру печени и почек. При моделировании нейропатии и артрита BEA и CEA в дозе 100 мг/кг снижали болевую чувствительность, как к механическому, так и термическому стимулам.

Заключение. Однократное внутривенное введение BEA во всех тестируемых дозах не влияет на чувствительность к ноцицептивному стимулам. CEA в дозе 100 мг/кг вызывает слабый антиноцицептивный эффект в ответ на механическое воздействие. Выраженность изменений функциональной активности печени и почек у экспериментальных животных зависит от дозы исследуемых субстанций. При моделировании нейропатии и артрита отмечен анальгетический эффект BEA и CEA в дозе 100 мг/кг.

Ключевые слова: бутаноилэтананоламид; каприлоилэтананоламид; порог ноцицептивной реакции; латентный период ноцицептивной реакции; нейропатия; артрит

Для цитирования: Счастливая Н.И., Жаворонок И.П., Доронькина А.С., Кукса М.С., Филатова Д.В., Чудиловская Е.Н., Лисовская М.В., Михальчук А.Л., Молчанова А.Ю. Биологическое действие бутаноилэтананоламида и каприлоилэтананоламида у крыс: антиноцицептивный и побочные эффекты. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(3): 39–50.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.39-50

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Молчанова А.Ю., Михальчук А.Л.; сбор и обработка материала – Счастливая Н.И., Жаворонок И.П., Доронькина А.С., Филатова Д.В., Чудиловская Е.Н., Кукса М.С., Лисовская М.В.; подготовка иллюстративного материала – Доронькина А.С., Филатова Д.В.; статистическая обработка материала – Счастливая Н.И., Чудиловская Е.Н.; написание текста – Счастливая Н.И.; редактирование – Молчанова А.Ю., Михальчук А.Л. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Счастливая Надежда Ивановна, e-mail: nadezhda.schastnaya@yandex.by

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке государственной программы научных исследований № 2.3.5.2.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 04.05.2023

Принята к печати 12.07.2023

Опубликована 20.09.2023

Schastnaya N.I.¹, Zhavoronok I.P.¹, Doronkina A.S.¹, Kuksa M.S.¹, Filatova D.V.¹,
Chudilovskaya E.N.¹, Lisovskaya M.V.², Mikhailchuk A.L.², Molchanova A.Yu.¹

Biological effects of butanoyl ethanolamide and capryloyl ethanolamide in rats: antinociceptive and side effects

¹Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus,
Academicheskaya St. 28, Minsk, 220072, Belarus;

²Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,
Akademika Kuprevicha St. 5, Minsk, 220084, Belarus

Background. A promising direction in the development of new pharmacological drugs for relief of pain and inflammation is studying the biological effect of lipid molecules, including fatty acid ethanolamides.

The aim of the study was to investigate the effects of butanoyl ethanolamide (BEA) and capryloyl ethanolamide (CEA) on nociceptive reactions, biochemical and histological changes in healthy animals, as well as on pain sensitivity in models of neuropathy and arthritis.

Methods. The study was performed on Wistar male rats ($n=71$). Nociceptive sensitivity was assessed by changes in the nociceptive response threshold (NRT) and latent period of nociceptive response (LPNR). Blood cell count was performed with a Nihon MEK 6450K (Japan) hematological veterinary analyzer. Biochemical tests were performed using a BS-200 (MINDRAY, China) biochemical analyzer with Diasens (Belarus) commercial kits.

Results. Intragastric administration of BEA to healthy animals in any studied dose caused no statistically significant changes in NRT and LPNR compared to their background values ($p>0.05$). CEA at a dose of 100 mg/kg caused a decrease in nociceptive sensitivity to mechanical action ($p<0.05$). Blood biochemistry values and results of a histological study indicated side effects of these compounds on the structure of the liver and kidneys. In modeling neuropathy and arthritis, BEA and CEA at a dose of 100 mg/kg reduced the pain sensitivity to both mechanical and thermal stimuli.

Conclusion. A single intragastric administration of any tested dose of BEA had no effect on the sensitivity to nociceptive stimuli. CEA 100 mg/kg produced a weak antinociceptive effect in response to mechanical stimulation. The severity of changes in the functional activity of the liver and kidneys depended on the drug dose. In models of neuropathy and arthritis, BEA and CEA at a dose of 100 mg/kg produced an analgesic effect.

Keywords: butanoyl ethanolamide; capryloyl ethanolamide; nociceptive response threshold; latent period of nociceptive response; neuropathy; arthritis

For citation: Shchastnaya N.I., Zhavoronok I.P., Doronkina A.S., Kuksa M.S., Filatova D.V., Chudilovskaya E.N., Lisovskaya M.V., Mikhailchuk A.L., Molchanova A.Yu. Biological effects of butanoyl ethanolamide and capryloyl ethanolamide in rats: antinociceptive and side effects. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(3): 39–50. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.39-50

Author's contribution: the concept and design of the study – Molchanova A.Yu., Mikhailchuk A.L.; collection and processing of the material – Schastnaya N.I., Zhavoronok I.P., Doronkina A.S., Kuksa M.S., Filatova D.V.; statistical processing of the material – Schastnaya N.I., Chudilovskaya E.N.; writing the text – Schastnaya N.I.; editing – Molchanova A.Yu., Mikhailchuk A.L. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

For correspondence: *Nadezhda I. Schastnaya*, e-mail: nadezhda.schastnaya@yandex.by

Financing. The work was supported financially by the State Research Program № 2.3.5.2.

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

Information about the authors:

Schastnaya N.I., <https://orcid.org/0000-0003-1786-5185>

Zhavoronok I.P., <https://orcid.org/0000-0001-9982-0719>

Doronkina A.S., <https://orcid.org/0000-0003-8914-5166>

Received 04.05.2023

Accepted 12.07.2023

Published 20.09.2023

Введение

Изучение биологической активности липидных молекул, и в частности аутокоидов ряда этаноламидов жирных кислот (fatty acid ethanolamides – FAEAs) являются одним из наиболее перспективных направлений современной фармакологии. Липидные моле-

кулы входят в состав компонентов клеток (мембраны, жировые включения, миелиновая оболочка), активно участвуют в межклеточной и внутриклеточной коммуникации, а также обеспечивают организм человека и животных энергией, необходимой для осуществления

других жизненно важных процессов. Первые сообщения о FAEAs появились в 50-е годы 20 века. Открытие анандамида как естественного эндогенного лиганда к рецепторам, взаимодействующим с каннабиноидами (1992–95 гг.) стимулировало интерес к амидам жирных кислот (fatty acid amides – FAAs). Наиболее изученными ацилэтаноламидами (acylethanolamides – AEAs) или N-ацилэтаноламидами (N-acylethanolamines – N-AEAs) являются насыщенные аналоги анандамида – пальмитоилэтаноламид (palmitoylethanolamide – PEA или N-palmitoylethanolamine – N-PEA) и стеароилэтаноламид (stearoylethanolamide – SEA или N-stearoylethanolamine – N-SEA). Эти AEAs являются наиболее распространенными FAAs в тканях млекопитающих. PEA является аутокоидом (биологическая сигнальная молекула локального действия), присутствует во всех тканях и биологических жидкостях – в мозге, печени, скелетной мускулатуре и обладает противовоспалительным, обезболивающим, антиоксидантным и рядом других свойств. SEA, как и PEA также обнаруживается в большинстве тканей и органов, включая центральную нервную систему, и опосредует широкий спектр биологических эффектов. Результаты экспериментальных исследований показали, что SEA способствует купированию воспалительной боли и снижению отека, оказывает противосудорожный эффект и ускоряет заживление ран [1–3]. Известно, что эти соединения по своим физиологическим свойствам схожи с физиологическими эффектами каннабиноидов. Они обладают каннабимиметической активностью, однако непосредственно не взаимодействуют со специфическими рецепторами, взаимодействующими с каннабиноидами. Основными клеточными мишенями PEA являются ядерные рецепторы, которые активируются пролифераторами пероксисом (PPAR- α) – группа рецепторов, функционирующих в качестве фактора транскрипции и вовлеченных в регуляцию и контроль метаболизма липидов, а также воспаления и боли. Влияние PEA на дегрануляцию тучных клеток посредством «аутокоидного антагонизма локальному воспалению» (Autacoid Local Inflammation Antagonism – ALIA) рассматривают как один из механизмов противовоспалительного и антиноцицептивного действия этого амида [4, 5].

На сегодняшний день физиологические эффекты FAAs определены более подробно, тогда как коротко- и среднецепочечные мало изучены. Поэтому на первом этапе исследования изучали влияние однократного введения бутаноилэтаноламида (butanoylethanolamide, BEA) и каприлоилэтаноламида (caprinoylethanolamide, SEA) на ноцицептивные реакции, биохимические

и гистологические изменения у здоровых животных. На втором этапе оценивали действие тестируемых веществ на уровень болевой чувствительности крыс при периферической нейропатии и индуцированном мимозаном артрите.

Методика

Исследуемые FAEAs синтезированы в лаборатории химии липидов Института биоорганической химии НАН Беларуси. Эксперименты проведены на крысах-самцах стока Wistar массой 220–230 г ($n=71$). Крысы содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище. Эксперименты проведены с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными в соответствии с национальными и международными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных [6, 7]. Протокол экспериментов одобрен на заседании комиссии по биоэтике при Институте физиологии НАН Беларуси (протокол №1 от 22.01.21 г).

Животные были разделены на экспериментальные группы в зависимости от вводимой дозы веществ. BEA вводили внутривенно однократно в дозах 5 мг/кг ($n=6$), 20 мг/кг ($n=6$) и 100 мг/кг ($n=6$). SEA животные получали в дозах 20 мг/кг ($n=5$) и 100 мг/кг ($n=5$).

Ноцицептивную чувствительность регистрировали до и через 60 мин после введения указанных соединений с помощью теста «Randall Selitto» с использованием анальгезиметра (PanLab, Испания), который обеспечивает плавное увеличение нагрузки (в граммах) до появления реакции, оцениваемой по отдергиванию лапки, либо вокализации. Порог ноцицептивной реакции (ПНР) определяли трехкратно с интервалом 5–7 мин [8].

С помощью теста «Hot plate» («горячая пластина») измеряли латентный период ноцицептивной реакции (ЛПНР, с) – время с момента помещения животного на горячую пластину (50 °C) до осуществления ноцицептивной реакции (облизывание задней лапы, вокализация, выпрыгивание из камеры). Измерения проводили трехкратно с интервалом 15–20 мин [9].

На 14-е сут после введения исследуемых субстанций осуществляли забор крови для гематологического и биохимического анализов и проводили патоморфологическое исследование для выявления макроскопически различимых признаков патологии внутренних органов. Для микроскопического анализа забивали печень и почки.

Общий анализ крови выполняли с использованием гематологического ветеринарного анализатора Nihon MEK 6450K (Япония). Определяли количество лейкоцитов (WBC), эритроцитов (RBC), тромбоци-

тов (PLT), уровень гемоглобина (HGB) и гематокрит (HCT). Биохимические исследования проводили на автоматическом биохимическом анализаторе BS-200 (MINDRAY, Китай) с использованием коммерческих наборов фирмы Диасенс (Беларусь). В сыворотке крови определяли: общий белок (TP), мочевины (Ureal), креатинин (Creat), общий билирубин (T.bil), активность аланинаминотрансферазы (АЛТ/ALT), аспаратаминотрансферазы (АСТ/AST) и щелочной фосфатазы (ЩФ/ALP). Контролем служили интактные животные, которым ничего не вводили ($n=9$).

Периферическую нейропатию моделировали путем аксотомии седалищного нерва левой задней конечности крыс под общей анестезией (тиопентал натрия) и местным обезболиванием (1% раствор лидокаина гидрохлорида). С наружной стороны бедра, в области прохождения седалищного нерва, делали разрез кожи (1,5-2 см), выделяли нерв и выполняли иссечение его участка длиной 1 см. Рану ушивали с использованием шовного материала «Сургикрол» (Футберг, Беларусь) [10].

Экспериментальный артрит вызывали введением в полость голенопредплюсневой сустава задней правой лапы 4 мг зимозана А из *Saccharomyces cerevisiae*, растворенного в 50 мкл апиrogenного физиологического раствора [11].

Крысы с экспериментальной нейропатией ($n=12$) и артритом ($n=16$) исследуемые вещества получали на 7-е сут (100 мг/кг) после моделирования патологии.

Анализ полученных данных выполняли с помощью программы *Microsoft Excel* и представляли в виде среднего арифметического значения и его стандартной ошибки ($M \pm m$). Графическую обработку прово-

дили в программе *OriginPro 7.0* (OriginLab Corp., США). Для сравнения двух зависимых выборок использовали тест Вилкоксона, а для двух и более независимых групп – непараметрический критерий Краскела-Уоллеса (Statistica 10.0). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Внутрижелудочное введение ВЕА здоровым животным во всех исследуемых дозах не приводило к статистически значимым изменениям показателей ПНР ($p > 0,05$). Значимых изменений ЛПНР у этих животных также не выявлено ($p > 0,05$) (табл. 1).

СЕА в дозе 100 мг/кг вызывал снижение ноцицептивной чувствительности к механическому стимулу, что выражалось повышением ПНР с $135,33 \pm 1,58$ до $144,13 \pm 1,18$ г ($p = 0,043$) для левой конечности, и с $133,00 \pm 1,68$ до $141,20 \pm 1,75$ г ($p = 0,041$) – для правой. При этом чувствительность к действию термического стимула не выявлена ни для одной из изученных доз (табл. 2).

Результаты гематологических исследований показали, что однократное введение ВЕА и СЕА в тестируемых дозах здоровым животным не вызывает статистически значимых изменений изучаемых показателей крови по сравнению с группой животных, не получавших эти соединения.

При изучении биохимических показателей крови определено увеличение концентрации общего белка (TP) на 14-е сут после введения крысам ВЕА в дозах 5 мг/кг, 20 мг/кг и 100 мг/кг на 21,5% ($p = 0,019$), 20,5% ($p = 0,006$) и 24,6% ($p = 0,003$) соответственно по сравнению с контрольной группой живот-

Таблица 1/Table 1

Изменение показателей ноцицептивной чувствительности задних конечностей у здоровых животных через 1 ч после введения ВЕА, ($M \pm m$)
Changes in nociceptive sensitivity of the hind limbs in healthy animals one hour after the introduction of BEA, ($M \pm m$)

Группа/ Group	5 мг/кг/5 mg/kg		20 мг/кг/20 mg/kg		100 мг/кг/100 mg/kg	
	До введения/ Before introduction	После введения/ After the introduction	До введения/ Before introduction	После введе- ния/ After the introduction	До введения/ Before introduction	После введения/ After the introduction
ПНР (г)/TNR(g) левая лапа/left paw	132,78±0,75	138,94±1,97	136,67±1,73	143,39±1,43	130,61±1,20	134,94±0,90
ПНР (г)/TNR (g) правая лапа/ right paw	135,11±1,67	141,00±1,40	139,28±2,06	146,11±1,88	137,33±1,46	134,28±1,38
ЛПНР (с)/ LPNR (s)	24,55±1,61	27,54±1,05	25,91±2,98	25,38±2,36	26,77±0,99	27,93±1,81

Примечание. ПНР – порог ноцицептивной реакции; ЛПНР – латентный период ноцицептивной реакции.

Note. TNR – threshold of nociceptive reaction; LPNR – latent period of nociceptive response.

ных. Активность щелочной фосфатазы (ALP) по отношению к контролю снизилась в 1,9 раз ($p=0,039$) при введении ВЕА в дозе 5 мг/кг и в 1,8 раз ($p=0,037$) – в дозе 20 мг/кг. СЕА в дозе 100 мг/кг способствовал увеличению общего билирубина (Т.бil) в 1,9 раз ($p=0,040$) и снижению уровня ALP в 2,4 раза ($p=0,003$), активность алананинаминотрансферазы (ALT) при этом уменьшилась на 30,4% ($p=0,018$) по отношению к их показателям в контроле. Остальные биохимические показатели крови при однократном введении исследуемых соединений не показали заметных отклонений по сравнению с контрольной группой животных (табл. 3).

Гиперпротеинемия и статистически значимое снижение активности ALP по сравнению с контролем у животных, получавших ВЕА во всех исследуемых дозах, а также повышение уровня общего билирубина, снижение активности ALT и ALP при однократном применении СЕА в дозе 100 мг/кг могут свидетельствовать о побочном действии исследуемых соединений на функциональную активность печени и почек. Последнее также подтверждено результатами гистологического исследования этих органов.

В печени крыс, получавших ВЕА в дозе 5 мг/кг, отмечено обычное строение без признаков дискомплексации балок, однако в цитоплазме клеток цен-

Таблица 2/Table 2

Изменение показателей ноцицептивной чувствительности задних конечностей у здоровых животных через 1 ч после введения СЕА, (M ± m)
Change in indicators of nociceptive sensitivity of the hind limbs in healthy animals one hour after injection of СЕА, (M ± m)

Группа/Group	20 мг/кг/20 mg/kg		100 мг/кг/100 mg/kg	
	До введения/ Before introduction	После введения/ After the introduction	До введения/ Before introduction	После введения/ After the introduction
ПНР (г)/TNR (g) левая лапа/left paw	136,40±1,71	138,13±0,84	135,33±1,58	144,13±1,18*
ПНР (г)/TNR (g) правая лапа/ right paw	136,87±2,66	136,53±1,49	133,00±1,68	141,20±1,75*
ЛПНР (с)/ LPNR (s)	21,70±1,61	23,20±1,11	20,80±1,19	23,27±1,19

Примечание. * – $p<0,05$ по сравнению с показателями до введения вещества.

Note. * – $p<0.05$ compared to the values before the administration of the substance.

Таблица 3/Table 3

Биохимические показатели крови разных групп здоровых животных после однократного введения ВЕА и СЕА, (M ± m)
Biochemical blood parameters of different groups of healthy animals after a single injection of ВЕА and СЕА, (M ± m)

Группа Group	Общий белок, г/л TP, g/l	Мочевина, ммоль/л Urea, mmol/l	Креатинин, ммоль/л Creat., mmol/l	Общий билирубин, ммоль/л T.bil, mmol/l	АСТ, Е/л AST, E/l	ЩФ, Е/л ALP, E/l	АЛТ, Е/л ALT, E/l
Контроль/ control (n=9)	51,44±0,83	6,03±0,30	29,33±2,09	2,54±0,07	175,11±6,44	765,22±73,19	81,00±5,35
ВЕА 5 мг/кг, (n=6)	62,50±1,73*↑	6,88±0,28	36,67±0,49	2,22±0,15	162,33±6,48	408,67±39,05*↓	68,00±3,74
ВЕА 20 мг/кг, (n=6)	62,00±1,18*↑	6,14±0,17	34,83±0,70	2,85±0,17	147,17±9,72*	415,67±40,35*↓	63,50±2,53
ВЕА 100 мг/кг, (n=6)	64,17±0,75*↑	6,72±0,18	36,67±1,54	2,52±0,09	162,17±12,99	482,17±36,46	68,50±2,75
СЕА 20 мг/кг, (n=5)	56,00±1,30	5,13±0,17	30,00±1,10	4,66±0,91	182,00±9,78	419,80±22,57	58,80±3,76
СЕА 100 мг/кг, (n=5)	53,00±0,71	5,28±0,36	30,40±1,08	4,98±0,33*↑	175,60±9,36	315,80±20,68*↓	56,40±4,08*↓

Примечание. * – $p<0,05$ по сравнению с контрольной группой. ВЕА – бутаноилэтаноламид; СЕА – каприлоилэтаноламид

Note. * – $p<0,05$ compared to the control group. ВЕА – butanoylethanolamide, СЕА – caprinoylethanolamide.

тра долек выявлена незначительная зернистая дистрофия. В отдельных случаях отмечали кровенаполнение синусоидов (рис. 1, А) и незначительное количество инфильтрата вокруг триад (рис. 1, Б). В почках обнаружена диффузная зернистая дистрофия эпителия проксимальных канальцев, при этом воспалительных изменений не выявлено (рис. 1, В, Г).

В анализируемых органах крыс после введения ВЕА в дозе 20 мг/кг выявлена незначительная зернистая дистрофия печени и диффузная белковая дистрофия эпителия проксимальных канальцев почек. На отдельных препаратах определяли уменьшение полости клубочков вплоть до спадения капилляров. После применения ВЕА в дозе 100 мг/кг, также отмечена зернистая дистрофия печени (рис. 2, А, Б). В почках обнаружена диффузная белковая дистрофия эпителия проксимальных канальцев и увеличение клубочков за счет утолщения базальной мембраны капилляров (рис. 2, В, Г)

После внутрижелудочного введения СЕА в дозе 20 мг/кг печень имела обычное строение, в цито-

плазме клеток центра долек определены незначительные изменения в виде зернистой дистрофии и инфильтрата вокруг триад. В почках отмечена диффузная зернистая дистрофия эпителия проксимальных канальцев. При увеличении дозы СЕА до 100 мг/кг в цитоплазме клеток печени отмечали очагово-диффузную мелкокапельную дистрофию гепатоцитов в сочетании с умеренно выраженной гиалиново-капельной дистрофией. Также выявлено незначительное количество инфильтрата вокруг триад и в расширенных синусоидах центральных частей долек (рис. 3, А, Б). В почках крыс этой группы большинство клубочков были средних размеров, полнокровны, некоторые увеличены в размерах за счет утолщения базальных мембран (пролиферация мезангиальных клеток) на светооптическом уровне, в просвете отдельных проксимальных канальцев определяли эозинофильные (розовые) гомогенные массы (рис. 3, В, Г).

Таким образом, однократное внутрижелудочное введение ВЕА независимо от дозы и СЕА

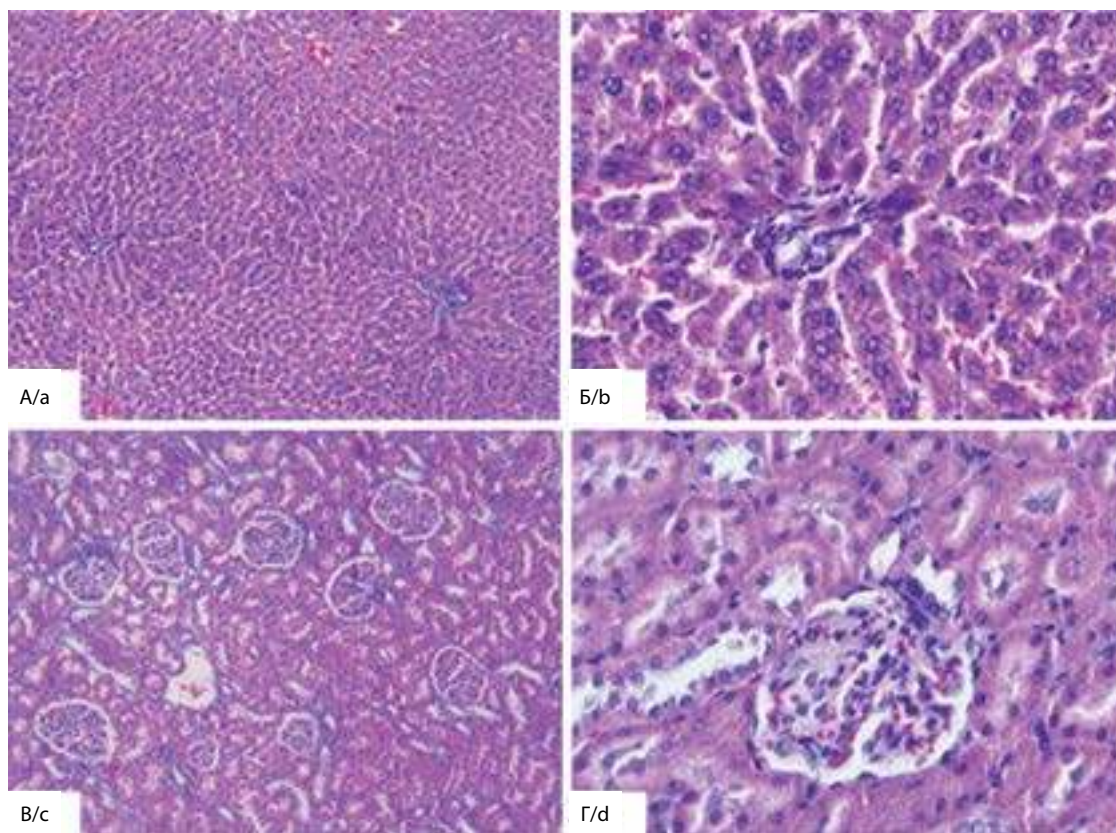


Рис. 1. Гистологическая картина печени (А, Б) и почек (В, Г) животных, получавших ВЕА в дозе 5 мг/кг. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 100 (А, В), ув. 400 (Б, Г); ВЕА — butanoylethanamide.

Fig. 1. Histological picture of the liver (a, b) and kidneys (c, d) of animals treated with BEA at a dose of 5 mg/kg. Hematoxylin and eosin staining, magn. ×100 (a, c), ×400 (b, d); BEA — butanoylethanamide.

в дозе 20 мг/кг вызывает слабые дистрофические изменения в печени и почках, однако увеличение дозы СЕА до 100 мг/кг приводит к умеренной степени выраженности данных изменений, что может свидетельствовать о дозозависимом побочном влиянии этих субстанций на структуру печени и почек, при этом воспалительных изменений в анализируемых органах не отмечено.

Перезрезка седалищного нерва способствовала развитию выраженной механической гипералгезии, что подтверждалось снижением значений ПНР ипсилатеральной конечности на 45,4% (с $133,60 \pm 1,41$ г до $72,93 \pm 3,62$ г; $p=0,043$) к 7-м сут после операции (рис. 4). Показатели ПНР контралатеральной конечности, которая служила контролем, практически не изменились (с $134,20 \pm 1,67$ г до $134,07 \pm 1,95$ г; $p=0,893$). Через 60 мин после введения ВЕА в дозе 100 мг/кг значения ПНР ипсилатеральной конечности повысились на 38,9% (до $101,33 \pm 0,55$ г, $p=0,0431$), а контралатеральной – не изменились.

Достоверных изменений ноцицептивной чувствительности к термическому стимулу не отмечено ($p>0,05$) (рис. 5).

В группе животных с нейропатией, получавших СЕА в дозе 100 мг/кг, через 60 мин после введения ПНР ипсилатеральной конечности повысился на 16,8% (до $110,38 \pm 1,99$ г, $p=0,018$). Статистически значимых изменений ПНР контралатеральной конечности не выявлено ($p>0,05$) (рис. 4).

ЛПНР у крыс этой группы на 7-е сутки после операции снизился на 33,1% (с $25,72 \pm 1,92$ до $17,20 \pm 0,98$ с, $p=0,0179$), а введение СЕА на этом фоне способствовало увеличению его значений на 27,2% (до $21,88 \pm 0,97$ г, $p=0,0425$) (рис. 5).

Введение зимозана в полость голеностопного сустава правой лапы вызвало развитие отека, гиперемии сустава и стопы в целом и привело к увеличению чувствительности к механическому и термическому стимулам. Показатели ПНР ипсилатераль-

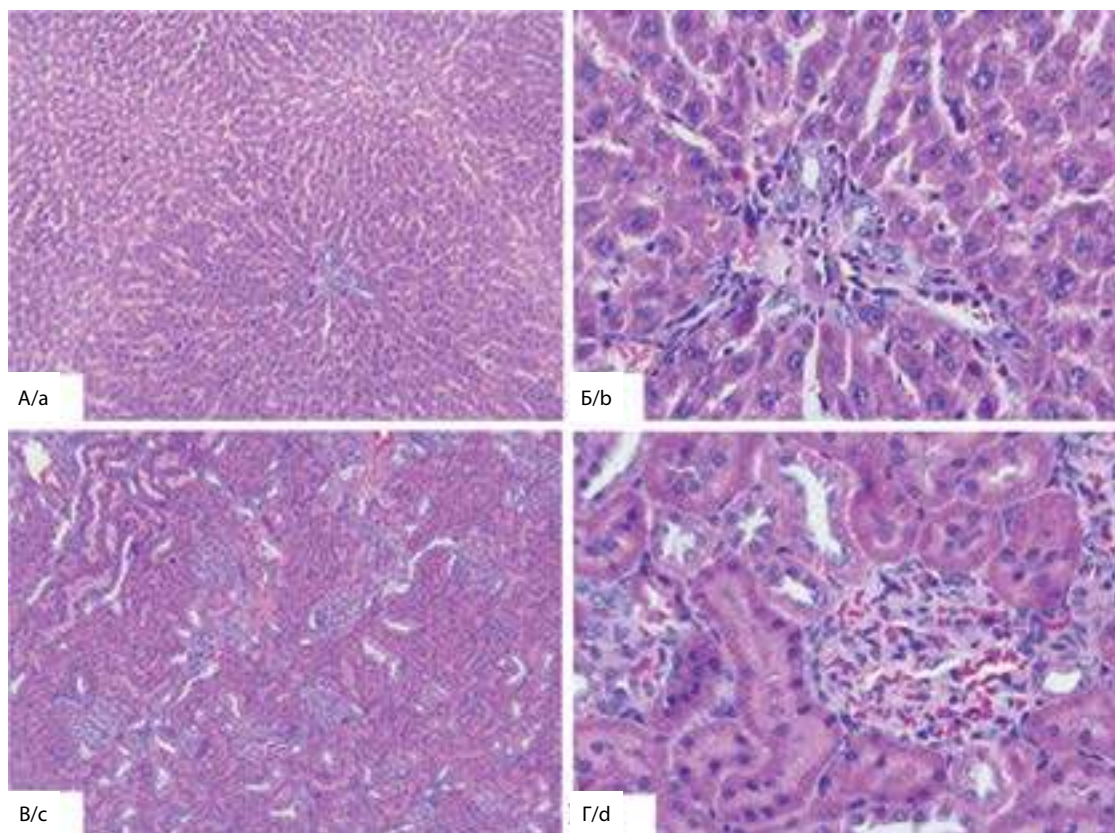


Рис. 2. Гистологическая картина печени (А, Б) и почек (В, Г) животных, получавших ВЕА в дозе 100 мг/кг; окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$ (А, В), $\times 400$ (Б, Г).

Fig. 2. Histological picture of the liver (a, b) and kidneys (c, d) of animals treated with BEA at a dose of 100 mg/kg; hematoxylin and eosin staining, $\times 100$ (a, c), $\times 400$ (b, d).

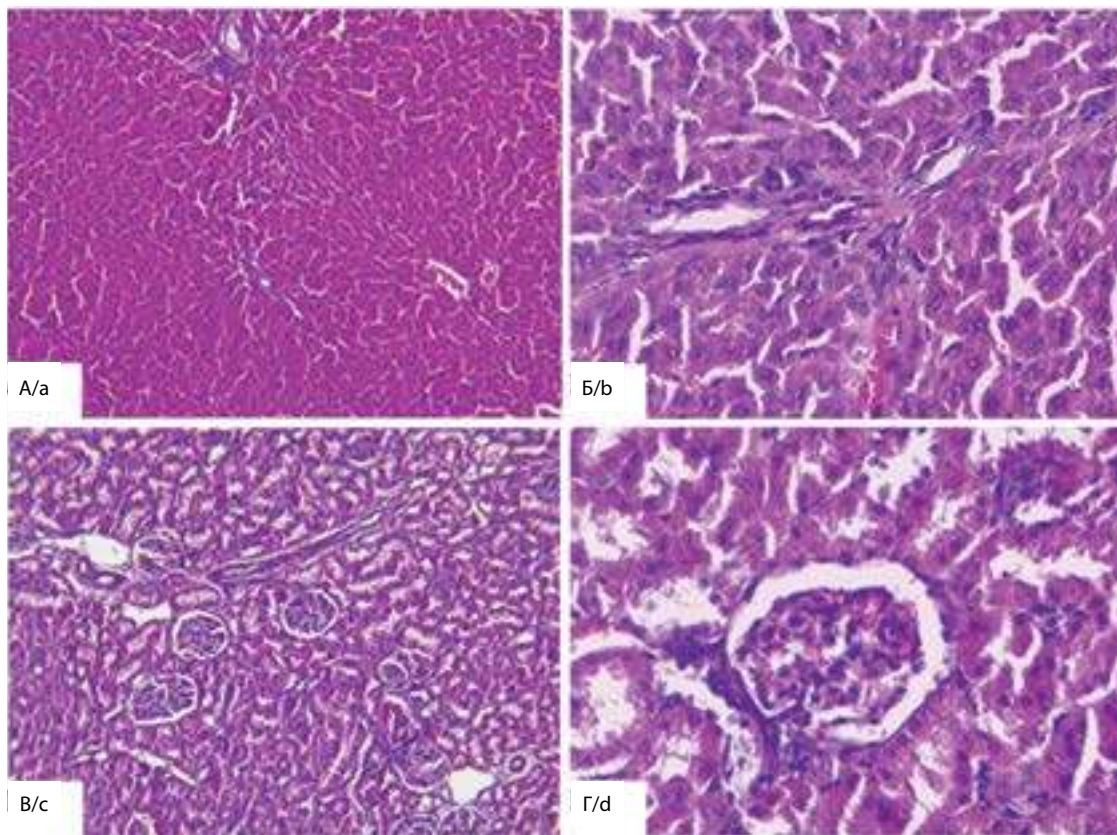


Рис. 3. Гистологическая картина печени (А, Б) и почек (В, Г) животных, получавших СЕА в дозе 100 мг/кг; окраска гематоксилином и эозином, ×100 (А, В), ×400 (Б, Г); СЕА – caprinylethanolamide.

Fig. 3. Histologic picture of the liver (a, b) and kidneys (c, d) of animals treated with CEA at a dose of 100 mg/kg; hematoxylin and eosin staining, ×100 (a, c), ×400 (b, d); CEA – caprinylethanolamide.

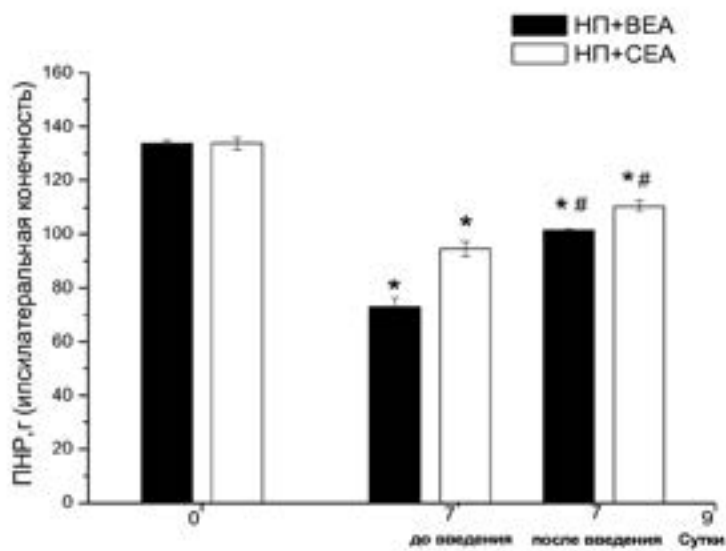


Рис. 4. Изменение ноцицептивной чувствительности ипсилатеральной конечности у животных с нейропатией после введения ВЕА и СЕА. * – $p < 0,05$ по сравнению с показателями до моделирования нейропатии (0 сутки); # – $p < 0,05$ по сравнению с моделью нейропатии (до введения субстанций); ВЕА – butanylethanolamide; СЕА – caprinylethanolamide.

Fig. 4. Changes in nociceptive sensitivity of the ipsilateral limb in animals with neuropathy after administration of BEA and CEA. * – $p < 0.05$ compared to the values before the modeling of neuropathy (0 day); # – $p < 0.05$ compared to the model of neuropathy (before substance administration); BEA — butanylethanolamide; CEA — caprinylethanolamide.

ной конечности в этой группе на 7-е сут уменьшились на 32,4% (с $128,25 \pm 0,75$ г до $86,71 \pm 2,58$ г, $p=0,012$), а контралатеральной – на 10,8% (с $128,71 \pm 1,28$ г до $114,83 \pm 1,39$ г, $p=0,011$). Через 60 мин после введения ВЕА ПНР ипсилатеральной конечности повысился на 17,0% (до $101,41 \pm 1,71$ г, $p=0,012$). Значения ПНР контралатеральной конечности при этом снизились до $116,33 \pm 2,03$ г ($p=0,779$) (рис. 6).

Показатели ЛПНР у этих животных на 7-е сут после индукции артрита снизились на 18,2% (с $20,43 \pm 0,45$ с до $16,71 \pm 0,47$ с, $p=0,011$), введение ВЕА не вызвало достоверных изменений исследуемого показателя (снижение до $17,66 \pm 0,59$, $p=0,67$) по сравнению с его значениями до введения вещества (рис. 7).

В экспериментальной группе животных, получавших СЕА, ПНР ипсилатеральной конечности

на 7-е сутки после индукции артрита снизился на 44,7% (с $127,75 \pm 1,33$ г до $70,67 \pm 1,47$ г, $p=0,012$), а контралатеральной – на 25,0% (с $128,28 \pm 1,34$ г до $95,54 \pm 2,10$ г, $p=0,011$). Введения СЕА способствовало повышению ПНР ипсилатеральной конечности на 38,4% (до $97,83 \pm 1,55$ г, $p=0,012$), а контралатеральной – до $110,13 \pm 2,67$ г, $p=0,012$) (рис. 8).

ЛПНР в данной группе животных на 7-е сут снизился на 18,8% (с $20,33 \pm 1,09$ до $16,50 \pm 1,23$; $p=0,069$) по сравнению с показателями до инъекции зимозана, а через 60 мин после введения СЕА его значения увеличились на 43,9% (до $23,74 \pm 1,29$, $p=0,012$) (рис. 7).

Обсуждение

Исследуемые субстанции (ВЕА и СЕА) являются производными РЕА – эндогенного амида жирных кис-

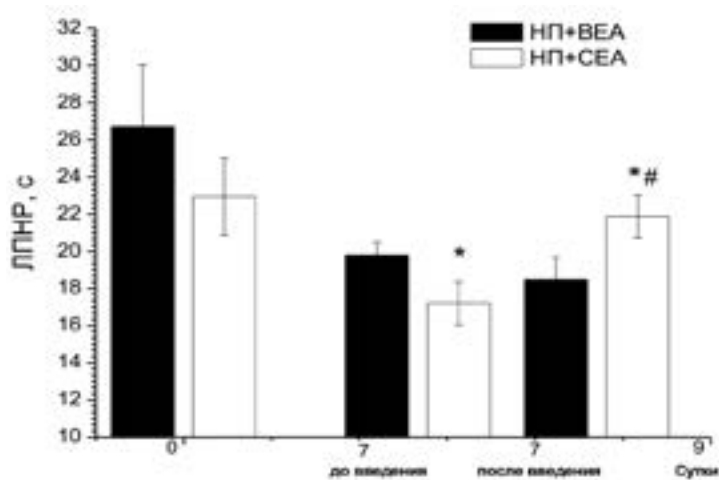


Рис. 5. Изменение значений ЛПНР у животных с нейропатией после введения ВЕА и СЕА. * – $p<0,05$ по сравнению с показателями до моделирования артрита; # – $p<0,05$ по сравнению с артритом (до введения субстанций).

Fig. 5. Changes in LPNR values in animals with neuropathy after administration of BEA and CEА. * – $p<0.05$ compared to the values before the modeling of arthritis; # – $p<0.05$ compared with arthritis (before substance administration).

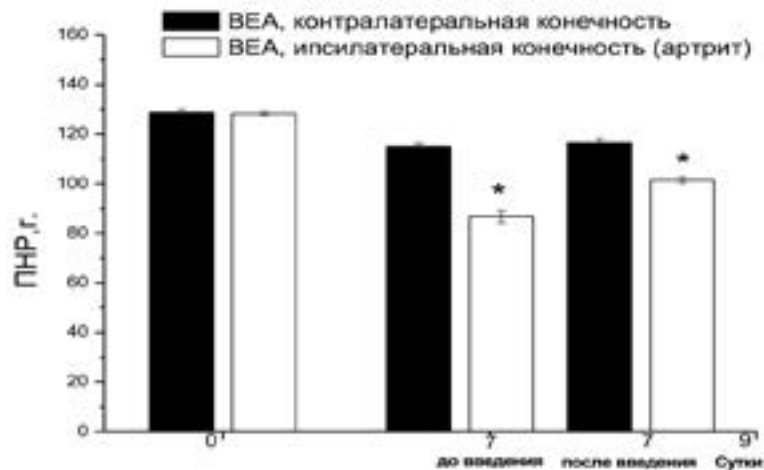


Рис. 6. Изменение ПНР у животных с артритом после введения ВЕА. * – $p<0,05$ по сравнению с показателями до моделирования артрита.

Fig. 6. Changes in NRT in animals with arthritis after BEA administration. * – $p<0.05$ compared to the values before the modeling of arthritis.

лот, терапевтические эффекты и механизмы действия которого изучены и описаны в научной литературе [1, 2, 4, 5]. Сведения о путях реализации лечебного потенциала изучаемых нами соединений в литературе практически отсутствуют. Поэтому интерпретировать полученные результаты возможно опираясь на доступные в литературе данные и сходство исследуемых субстанций с РЕА.

Установленные противовоспалительный и антиноцицептивный эффекты БЕА и СЕА, по аналогии с РЕА, могут быть обусловлены несколькими механизмами действия. Исследуемые соединения, вероятно, могут снижать миграцию и дегрануляцию тучных клеток, а также подавлять активность провоспалительных цитокинов, COX-2, TNF- α и iNOS, тем самым

понижая повышенную за счет воспалительных каскадов ноцицептивную чувствительность.

Кроме того, изучаемые нами субстанции, подобно РЕА, способны опосредованно активировать каннабиноидные рецепторы (CB1 и CB2) путем ингибирования деградации (РЕА является субстратным конкурентом АЕА для гидролазы амидов жирных кислот) анандамида – эндогенного лиганда с доказанными анальгезирующим и антиинфламаторным эффектами.

Реализация антиноцицептивного действия БЕА и СЕА, также возможна путем прямого влияния на ядерные PPAR- α рецепторы либо связанные с G-белком орфанные рецепторы (GPR55), или за счёт активации ваниллоидных рецепторов 1 типа (TPRV1).

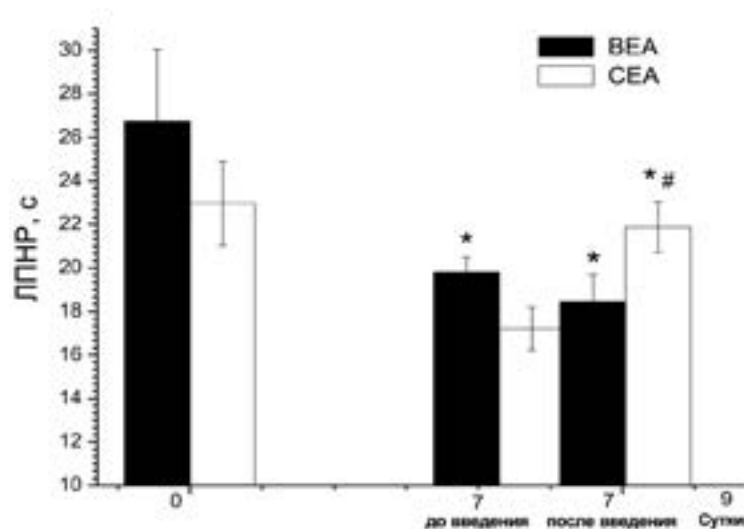


Рис. 7. Изменение ЛПНР у животных с артритом после введения БЕА и СЕА. * – $p < 0,05$ по сравнению с показателями до моделирования артрита; # – $p < 0,05$ по сравнению с артритом (до введения субстанций).

Fig. 7. Changes in LPNR in animals with arthritis after administration of BEA and CEA. * – $p < 0.05$ compared to the values before the modeling of arthritis; # – $p < 0.05$ compared to arthritis (before substance administration).

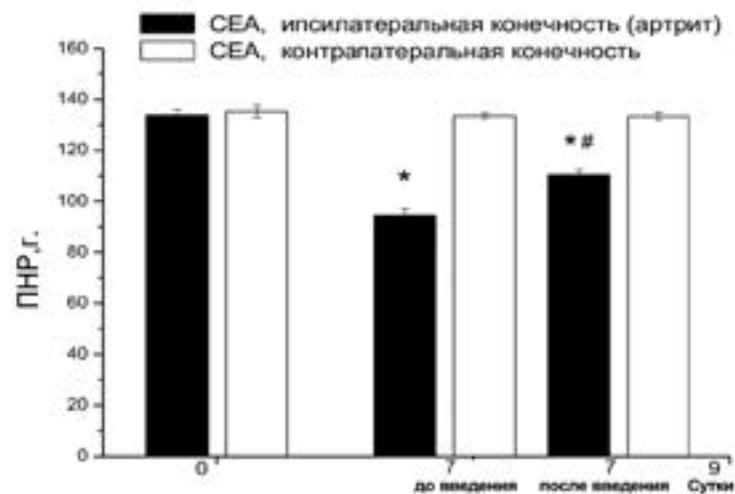


Рис. 8. Изменение ПНР у животных с артритом после введения СЕА. * – $p < 0,05$ по сравнению с показателями до моделирования артрита; # – $p < 0,05$ по сравнению с моделью артрита (до введения вещества).

Fig. 8. Changes of NRT in animals with arthritis after CEA injection. * – $p < 0.05$ compared to the values before the modeling of arthritis; # – $p < 0.05$ compared to the arthritis model (before substance administration).

Экспрессия болевых рецепторов усиливается при патологических процессах и состояниях, а исследуемые субстанции являются производными эндогенных амидов жирных кислот, которые синтезируются «по требованию» в ответ на повреждение, что объясняет способность ВЕА и СЕА подавлять гипералгезию при моделировании воспалительной и нейропатической боли и отсутствие влияния указанных соединений на показатели ноцицепции у здоровых животных.

Заклучение

Исследование на здоровых животных показало, что внутрижелудочное однократное введение бутаноилэтаноламида во всех тестируемых дозах не влияет на чувствительность к ноцицептивным стимулам. Каприлоилэтаноламид в дозе 100 мг/кг вызывает слабый антиноцицептивный эффект в ответ на механическое воздействие. Биохимические показатели крови и результаты гистологического исследования свидетельствуют о наличии изменений функциональной активности печени и почек у экспериментальных животных в зависимости от дозы исследуемых субстанций.

Исследования, проведенные при моделировании нейропатии и артрита, указывают на анальгетический эффект бутаноилэтаноламида и каприлоилэтаноламида в дозе 100 мг/кг, который, предположительно, может реализовываться посредством либо прямого действия на рецепторы PPAR- α и GPR55, либо опосредованного влияния на рецепторы CB1, CB2 и TRPV1, а также ингибирования активации тучных клеток — аутоагонистического локального воспалительного антагонизма.

Таким образом, полученные результаты позволяют рассматривать изучаемые субстанции в качестве новых перспективных компонентов анальгетических средств, альтернативных РЕА.

Литература

(п.п. 1-2; 5; 8-11 см. References)

3. Молчанова А.Ю., Жаворонок И.П., Пехтерева Е.И., Антипова О.А., Мелик-Касумов Т.Б., Павлють Т.О. и др. Антиноцицептивный эффект системного введения пальмитоилэтаноламида, стеарилоилэтаноламида и диклофенака натрия у крыс с экспериментальным нейрогенным болевым синдромом. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук*. 2018; 15(3): 331-8. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2018-15-3-331>
4. Молчанова А. Ю. *Эндоканнабиноидная система: физиология, патофизиология, терапевтический потенциал*. Минск: Беларуская навука. 2015.
6. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Пер. с англ. под ред. И.В. Белозерцевой,

Д.В. Блинова, М.С. Красильщиковой. 8-е изд. М.: ИРБИС; 2017. DOI: 10.17226/12910

7. Об утверждении ветеринарно-санитарных правил по приему, уходу и вскрытию подопытных животных в вивариях научно-исследовательских институтов, станциях, лабораториях, учебных заведениях, а также в питомниках: постановление М-ва сельск. х-ва и продовольствия Респ. Беларусь, 21 мая 2010 г., № 36. Available at: <https://mshp.gov.by/documents/technical-acts/cb5d27ea51a49bea.html> (Accessed 22 September 2022).

References

1. Ezzili C., Otrubova K., Boger D.L. Fatty acid amide signaling molecule. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010; 20 (20): 5959-68. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.08.048>
2. Esposito E., Cuzzocrea S. Palmitoylethanolamide is a new possible pharmacological treatment for the inflammation associated with trauma. *Mini Rev Med Chem.* 2013; 13(2): 237-55. DOI:10.2174/1389557511313020006
3. Molchanova A.Ju., Zhavoronok I.P., Pehtereva E.I., Antipova O.A., Melik-Kasumov T.B., Pavljut' T.O., et al. Antinociceptive effect of systemic administration of palmitoylethanolamide, stearoylethanolamide and sodium diclofenac in rats with experimental neurogenic pain syndrome. *Izvestiya Natsional'noy akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh nauk.* 2018; 15(3): 331-8. (in Russian) <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2018-15-3-331>
4. Molchanova A.Ju. *Endocannabinoid system: physiology, pathophysiology, therapeutic potential. [Endokannabinojdная sistema: fiziologiya, patofiziologiya, terapevticheskiy potentsial]*. Minsk: Belaruskaya navuka. 2015. (in Russian)
5. Lambert D.M., Vandevoorde S., Jonsson K.O., Fowler C.J. The palmitoylethanolamide family: a new class of anti-inflammatory agents? *Curr Med Chem.* 2002; 9(6): 663-74. DOI: 10.2174/0929867023370707
6. *Guidelines for the maintenance and use of laboratory animals. [Rukovodstvo po sodержaniyu i ispol'zovaniyu laboratornykh zhivotnykh]*. Transl. from Engl., ed. I.V. Belozercevoj, D.V. Blinova, M.S. Krasil'shnikovoj. 8-e izd. M.: IRBIS; 2017. DOI: 10.17226/12910
7. On the approval of the veterinary and sanitary rules for the reception, care and dissection of experimental animals in vivariums of research institutes, stations, laboratories, educational institutions, as well as in nurseries: resolution of the Ministry of Agriculture. x-va and food Rep. Belarus, 21 May 2010, № 36. Available at: <https://mshp.gov.by/documents/technical-acts/cb5d27ea51a49bea.html> (Accessed 22 September 2022).
8. Santos-Nogueira E., Castro E.R., Mancuso R., Navarro X. Randall-Selitto test: a new approach for the detection of neuropathic pain after spinal cord injury. *J. Neurotrauma.* 2012; 29(5): 898-904. DOI: 10.1089/neu.2010.1700
9. Menendez L., Lastra A., Hidalgo A., Baamonde A. Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. *J. of Neurosci. Meth.* 2002; 113(1): 91-7. DOI: 10.1016/s0165-0270(01)00483-6
10. Jaggi A.S., Jain V., Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2011; 25(1): 1-28. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00801.x
11. Castano A.P., Dai T., Yaroslavsky I., et al. Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time. *Lasers Surg Med.* 2007; 39(6): 543-50. DOI: 10.1002/lsm.20516

Сведения об авторах:

Счастливая Надежда Ивановна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаб. модуляции функций организма Института физиологии НАН Беларуси, e-mail: nadezhda.schastnaya@yandex.by;

Жаворонок Ирина Петровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаб. модуляции функций организма Института физиологии НАН Беларуси, e-mail: iri8308@yandex.ru;

Доронкина Анастасия Сергеевна, аспирант, мл. науч. сотр., лаб. модуляции функций организма Института физиологии НАН Беларуси e-mail: doronkina_nastasya1995@mail.ru;

Кукса Марина Сергеевна, мл. науч. сотр., лаб. модуляции функций организма Института физиологии НАН Беларуси;

Филатова Дарья Владимировна, аспирант, мл. науч. сотр., лаб. «Центр световой и электронной микроскопии» Института физиологии НАН Беларуси;

Чудиловская Екатерина Николаевна, науч. сотр., многопрофильная диагностическая лаб. Института физиологии НАН Беларуси, e-mail: e.chudilovskaya@gmail.com;

Лисовская Марина Владимировна, мл. науч. сотр., лаб. химии липидов Института биоорганической химии НАН Беларуси;

Михальчук Александр Леонидович, канд. хим. наук, вед. науч. сотр., зав. лаб. химии липидов Института биоорганической химии НАН Беларуси, e-mail: lipmal@iboch.by;

Молчанова Алла Юрьевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., зав. лаб. модуляции функций организма Института физиологии НАН Беларуси, e-mail: alla@fizio.bas-net.by

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092.9

Фокин В.Ф., Шабалина А.А., Пономарева Н.В., Медведев Р.Б., Лагода О.В., Танащян М.М.

Кортизол, цитокины и вегетативные изменения при когнитивной нагрузке у больных хронической ишемией мозга

ФГБНУ «Научный центр неврологии»

125367, Москва, Россия, Волоколамское шоссе, д. 80

Воспалительные процессы принимают участие в когнитивном снижении и развитии деменций при широко распространенных церебральных сосудистых и нейродегенеративных заболеваниях.

Методика. У 92 женщин (возраст 50 – 85 лет) с хронической ишемией мозга (ХИМ), исследовали уровни кортизола и провоспалительных цитокинов (ИЛ1-β, ФНО-α, ИЛ-6, ИЛ-10) в слюне, измеряли артериальное давление и частоту сердечных сокращений до и после когнитивной нагрузки.

Цель исследования – изучение влияния когнитивной нагрузки на корреляционную зависимость между кортизолом, воспалительными интерлейкинами и вегетативными реакциями у больных хронической ишемией мозга.

Результаты. Уровень кортизола, содержание провоспалительных интерлейкинов, а также артериальное давление и пульс увеличивались под влиянием когнитивной нагрузки. При выполнении когнитивных тестов изменение содержания кортизола коррелировало с динамикой ИЛ1-β. Изменение артериального давления и пульса отрицательно коррелировали с динамикой уровня всех исследованных цитокинов. Выявленные взаимосвязи, вероятно, связаны с активацией симпатoadrenalовой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систем в период когнитивной нагрузки.

Заключение. Переход от состояния покоя к выполнению когнитивных тестов характеризуется созданием единой функциональной системы, объединяющей гормон стресса кортизол, воспалительные интерлейкины и вегетативные реакции.

Ключевые слова: хроническая ишемия мозга; когнитивная нагрузка; кортизол; ИЛ1-β; ФНО-α; ИЛ-6; ИЛ-10; слюна; артериальное давление; частота сердечных сокращений

Для цитирования: Фокин В.Ф., Шабалина А.А., Пономарева Н.В., Медведев Р.Б., Лагода О.В., Танащян М.М. Кортизол, цитокины и вегетативные изменения при когнитивной нагрузке у больных хронической ишемией мозга. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(3): 51–57.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.51-57

Участие авторов: концепция исследования, написание текста статьи – Фокин В.Ф.; биохимические исследования – Шабалина А.А.; дизайн исследования, редактирование текста – Пономарева Н.В.; клинический анализ – Медведев Р.Б., Лагода О.В.; дизайн исследования – Танащян М.М. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Фокин Виталий Федорович, e-mail: fvf@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.05.2022

Принята к печати 12.07.2023

Опубликована 20.09.2023

Fokin V.F., Shabalina A.A., Ponomareva N.V., Medvedev R.B., Lagoda O.V., Tanashyan M.M.

Cortisol, cytokines, and autonomic changes during a cognitive load in patients with chronic cerebral ischemia

Research Center of Neurology,

Volokolamskoe Shosse 80, Moscow, 125367, Russian Federation

Inflammatory processes are involved in cognitive decline and the development of dementias in common cerebral vascular and neurodegenerative diseases.

Methods. In 92 women with chronic cerebral ischemia (CCI) from 50 to 85 years old, mean age 67.6±0.8 years, salivary concentrations of cortisol and inflammatory interleukins (IL-1β, TNF α, IL6, IL10), blood pressure and heart rate were measured before and after a cognitive load. **Aim.** To study the effect of cognitive load on correlations between cortisol, inflammatory interleukins, and autonomic responses in patients with CCI.

Results. Concentrations of cortisol and pro-inflammatory interleukins, as well as blood pressure and heart rate increased under the influence of the cognitive load. During the cognitive tests, changes in cortisol correlated with changes in IL-1β. Changes in blood

pressure and heart rate negatively correlated with changes in all studied interleukins. These relationships were likely related with the activation of the sympathetic-adrenal and hypothalamic-pituitary-adrenal systems during the cognitive load.

Conclusion. The transition from rest to performing cognitive tests is associated with formation of a single functional system that combines the stress hormone cortisol, inflammatory interleukins, and autonomic reactions.

Keywords: chronic cerebral ischemia; cognitive load; cortisol; IL-1 β ; TNF- α ; IL-6; IL-10; saliva; blood pressure; heart rate

For citation: Fokin V.F., Shabalina A.A., Ponomareva N.V., Medvedev R.B., Lagoda O.V., Tanashyan M.M. Cortisol, cytokines and autonomic changes during cognitive load in patients with chronic cerebral ischemia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(3): 51–57. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.51-57

Author's contribution: the concept of the study, writing the text of the article – Fokin V.F.;

biochemical research – Shabalina A.A.; research design, text editing – Ponomareva N.V.;

clinical analysis – Medvedev R.B., Lagoda O.V.; study design – Tanashyan M.M. Approval of the final version of the article – all authors.

For correspondence: Vitaly F. Fokin, Doctor of Biol. sciences, prof. scientific collaborator lab. age physiology and neurocybernetics, e-mail: fvf@mail.ru

Information about the authors:

Fokin V.F., <https://orcid.org/0000-0003-2915-9384>

Shabalina A.A., <https://orcid.org/0000-0001-9604-7775>

Ponomareva N.V., <https://orcid.org/0000-0002-9771-0775>

Lagoda O.V., <https://orcid.org/0000-0001-7562-4991>

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 12.05.2022

Accepted 12.07.2023

Published 20.09.2023

Введение

Процессам воспаления отводится важная роль в когнитивном снижении и развитии деменций при широко распространенных церебральных сосудистых и нейродегенеративных заболеваниях [1]. Многие исследователи указывали на неуклонное повышение чувствительности к стрессу, вызванному психологическими факторами и когнитивной нагрузкой, при нормальном и патологическом старении. В связи с этим большой интерес вызывает исследование когнитивной нагрузки у больных с хронической ишемией мозга (ХИМ), у которых сосудистая недостаточность характерна для лиц пожилого и старческого возраста, значительно усилена вплоть до стабилизации хронической ишемии. При когнитивной нагрузке у больных ХИМ наблюдается повышение артериального давления и рост частоты сердечных сокращений (ЧСС), что указывает на активацию симпатoadренальной системы и, вероятное развитие стрессовой реакции [2]. Значительна роль кортизола в когнитивном снижении, который через рецепторы к глюкокортикоидам в гиппокампе и некоторых других структурах способствует развитию нейродегенеративных процессов [3]. Это может быть связано как с активацией симпатoadренальной системы, включающейся на первой стадии стресса, так и с возрастанием уровня кортизола при

развитии адаптационного синдрома. В соответствии с классическими представлениями кортизол участвует в регуляции артериального давления, тормозит процессы воспаления, а также вовлечен в регуляцию механизмов памяти [4]. Во многих работах показано, иммуносупрессивное влияние кортизола на иммунную систему, вместе с тем более детальное исследование влияния кортизола выявило, что кортизол может обладать и иммуномодулирующим действием [5, 6]. Например, при психологическом стрессе наблюдается рост уровня кортизола, коррелирующего с уровнем С-реактивного белка, а также отсутствие корреляции уровня кортизола с увеличением содержания интерлейкина (ИЛ)1 β [7]. Однократное введение ИЛ6 сопровождалось длительным повышением содержания кортизола и ИЛ-6 в крови, что свидетельствует о сопряженном характере взаимоотношений между ними [8]. Ограничение сна и физические нагрузки вызывают однонаправленные положительные сдвиги уровня кортизола и ИЛ-6, сдвинутые во времени, по отношению друг к другу [5]. В настоящее время точные физиологические механизмы, лежащие в основе отношений кортизола и воспалительных интерлейкинов, полностью не изучены. Можно предполагать, что на первом этапе под влиянием стрессора усили-

вается синтез провоспалительных цитокинов, который приводит к активации кортизола и включению петли отрицательной обратной связи, подавляющей эту секрецию, что приводит к сохранению гомеостаза иммунной системы. При кратковременном и, особенно при легком стрессе супрессорный механизм кортизола, может не включаться и тогда возможен синхронизированный рост уровней кортизола и воспалительных цитокинов, при более длительном стрессе включается механизм супрессии, что приводит к снижению содержания интерлейкинов. И наконец, при некоторых обстоятельствах, [5], могут происходить сбои при функционировании петли обратной связи, при которых можно наблюдать и рост уровня кортизола, и увеличение содержания провоспалительных цитокинов развивающиеся с определенным сдвигом по отношению к друг другу. Во многом, заранее сложно предсказать соотношение между содержанием кортизола и воспалительными цитокинами при выполнении той или иной напряженной нагрузки. Динамика интерлейкинов под влиянием когнитивной нагрузки связана с успешностью выполнения когнитивных тестов [9].

Цель исследования – изучение влияния когнитивной нагрузки на корреляционную взаимосвязь между кортизолом, воспалительными интерлейкинами (ИЛ1 β , фактор некроза опухоли (ФНО) α , ИЛ6, ИЛ10) и вегетативными реакциями (артериальное давление и ЧСС) у больных ХИМ.

Методика

Пациенты и методы. В обследовании участвовали 92 женщины больные с хронической ишемией мозга от 50 и до 85 лет. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации 1964, 2004) при добровольном информированном согласии всех пациентов.

Критерии включения пациентов в исследование: соответствие I и II стадии дисциркуляторной энцефалопатии (стадии начальных проявлений и субкомпенсации по критериям О.С. Левина [10–11]); праворукость; оценка по шкале MoCa 26 и более баллов. При оценке менее 26 баллов для дальнейшей работы отбирали пациентов без признаков деменции, не нуждающихся в постоянной опеке со стороны окружающих. Критерии исключения: деменция выраженностью 1 балл и более по клинически рейтинговой шкале деменции (Clinical Dementia Rating Scale); наличие в анамнезе острых нарушений мозгового кровообращения; черепно-мозговая травма; тяжелая кардиальная, метаболическая (сахарный диабет 2-го типа)

патология; почечная недостаточность; некомпенсированные нарушения функций щитовидной железы. Патоморфологические основы когнитивных нарушений при ХИМ кратко изложены ранее [8].

Когнитивная нагрузка состояла в выполнении больными следующих тестов: корректурной пробы Кирчнера, пробы вербальной беглости и теста Лурия на вербальную память. Длительность когнитивной нагрузки не превышала 20–25 мин. До, во время и после выполнения когнитивных тестов измеряли артериальное давление и ЧСС. [8]. Для общей оценки когнитивных функций использовали также Монреальскую шкалу оценки.

Уровень интерлейкинов и кортизола в образцах слюны исследовали до и после выполнения когнитивных тестов у больных с отсутствием патологии ротовой полости и санированной рото/носоглоткой. Работа выполнялась по международным правилам работы с биоматериалом людей. Определение цитокинов и кортизола проводили твердофазным иммуноферментным методом (ELISA) сэндвич-типа. Использовались наборы реагентов R&D Systems (США, Китай), Вектор-Бест (Россия) и АлкорБио (Россия). При всех исследованиях использовались калибраторы фирм производителей реагентов с дополнительно приобретенными калибраторами. Определение проводилось в дублях на плащечном ридере VICTOR 2 (Perkin Elmer, США) с использованием контрольных образцов с низким и высоким содержанием исследуемых параметров.

Больные не употребляли алкоголь в течение недели, не пили чай или кофе за 1 ч до начала тестирования, за 10 мин до взятия слюны на исследование прополаскивали рот водой. Слюну собирали в пробирку типа эппендорф объемом не менее 1,5 мл за 10 мин до проведения когнитивных тестов, и не позднее 10 мин после их выполнения. Образцы слюны с присутствием примесей (в том числе крови) исключали из исследования.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета Statistica 12. Использовался анализ средних, корреляционный и однофакторный (ANOVA) анализ.

Результаты

До когнитивной нагрузки уровень провоспалительных цитокинов не коррелирует с уровнем кортизола или выраженностью вегетативных реакций (**рис. 1**).

На **рис. 1** видно, что гормон стресса кортизол в состоянии покоя не синхронизирован с цитокиновой сетью, а также с вегетативными реакциями.

При когнитивной нагрузке уровни кортизола, провоспалительных цитокинов, а также артериальное давление и ЧСС статистически значимо возрас-тали. Концентрация противовоспалительного цито-кина Ил-10 не менялась (таблица).

Как видно из таблицы повышение уровня кор-тизола, провоспалительных цитокинов и показате-лей артериального давления и ЧСС демонстри-рует высокий уровень значимости. Можно предпо-лагать, что между показателями уровней кортизола и провоспалительных цитокинов имеет место зна-чимая корреляция. Однако, значимая корреляция

между изменениями кортизола и динамикой цито-кинов наблюдалась только по отношению к интер-лейкину 1 β (рис. 2).

В целом, сопряженность уровня провоспалитель-ных цитокинов с Ил10 нивелировалась, но проя-вилась с уровнем кортизола и вегетативными реак-циями (рис. 3).

После завершения когнитивного тестирования корреляционные связи между кортизолом, вегета-тивными реакциями и составляющими цитокино-вой сети разрушаются, и система связей возвра-щается в исходное положение.

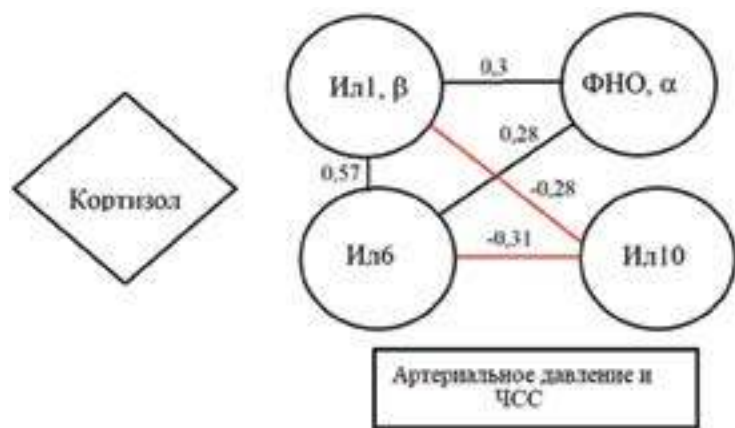


Рис. 1. Уровень провоспалительных цитокинов, кортизола и вегетативные показатели до когнитивной нагрузки. Цифры рядом с прямыми линиями – коэффициенты корреляции. Красные линии – указывают на отрицательную корреляцию, черные – на положительную. Все указанные значения коэффициентов корреляции значимо ($p < 0,05$) отличны от нуля.

Fig. 1. Level of pro-inflammatory cytokines, cortisol and autonomic indices before cognitive load. Numbers next to straight lines are correlation coefficients. Red lines indicate negative correlation and black lines indicate positive correlation. All indicated values of correlation coefficients are significantly ($p < 0.05$) different from zero.

Изменение уровня кортизола, воспалительных цитокинов в слюне и вегетативных реакций при когнитивной нагрузке
Changes in cortisol levels, inflammatory cytokines in saliva and autonomic responses during cognitive load

Показатели Indicators	Среднее Average	Ст.откл. St.deviation	N	Ст. ошибка St.error	T-критерий t-criterion	p
Кортизол, нмоль/л Cortisol, nmol/l	11,61957	23,0092	92	2,39888	4,84375	0,000005
ФНО α, пг/мл TNF α, pg/ml	18,02075	48,5768	53	6,67253	2,70074	0,009316
ИЛ β, пг/мл IL β, pg/ml	83,32075	175,8816	53	24,15920	3,44882	0,001124
ИЛ6, пг/мл IL6, pg/ml	31,29057	46,4309	53	6,37777	4,90619	0,000010
ИЛ10, пг/мл IL10, pg/ml	-0,04132	0,2038	53	0,02799	-1,47632	0,145888
Систолическое давление, мм рт ст Systolic pressure, mm Hg	6,30435	12,10189	92	1,261710	4,99667	0,000003
Диастолическое давление, мм рт ст Diastolic pressure, mm Hg	3,96739	10,95892	92	1,142546	3,47241	0,000791
ЧСС, уд/мин HR, bpm	4,19565	7,29028	92	0,760064	5,52013	0,000000

Примечание. Ст. откл. – стандартное отклонение, ст. ошибка – стандартная ошибка, N – количество переменных, p – уровень значимости.
Note. St.deviation. – standard deviation, standard error – standard error, N – number of subjects, p – significance level.

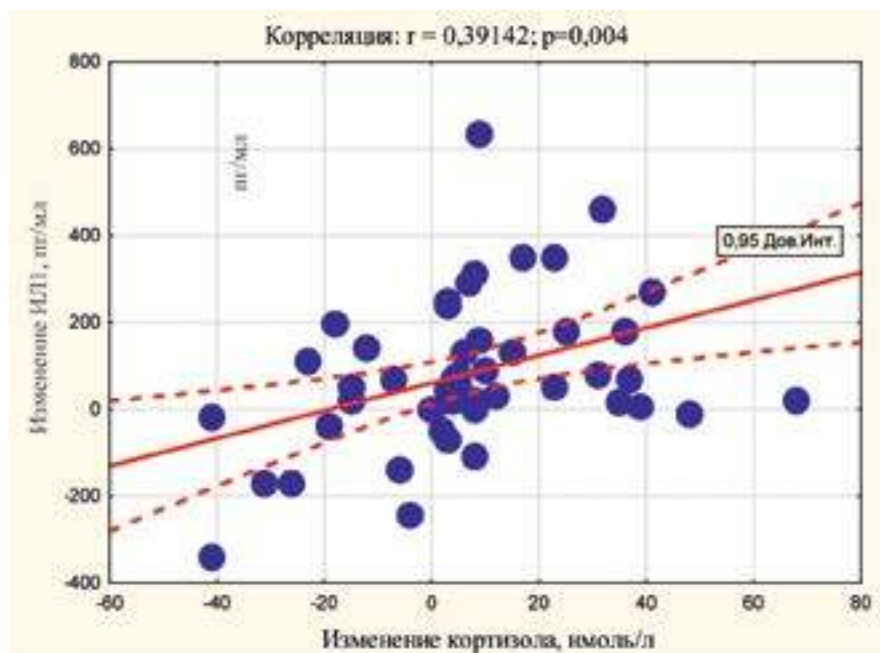


Рис. 2. Корреляция между динамикой уровня кортизола и интерлейкином 1 β в слюне при когнитивной нагрузке.

Примечание. Вверху – значения коэффициента корреляции (r) и уровня значимости (p).

Fig. 2. Correlation between the dynamics of cortisol and interleukin 1 β levels in saliva during cognitive load.

Note. Top – values of correlation coefficient (r) and significance level (p).

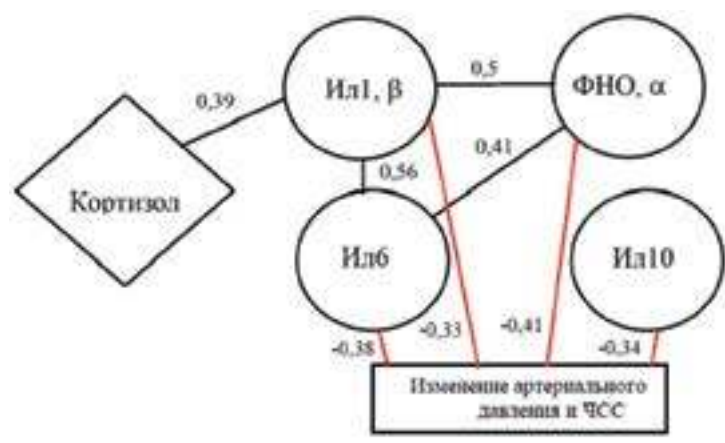


Рис. 3. Сопряженность сдвигов содержания интерлейкинов и кортизола в слюне и вегетативных показателей под влиянием когнитивной нагрузки у больных ХИМ. Цифры на рисунке – статистически значимые коэффициенты корреляции, $p < 0,05$. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

Fig. 3. Concomitant shifts of interleukin and cortisol content in saliva and autonomic indices under the influence of cognitive load in CHEM patients. Figures in the figure are statistically significant correlation coefficients, $p < 0,05$. Other designations are the same as in Fig. 1.

Таким образом, синхронизация содержания кортизола с сетью провоспалительных цитокинов возникает на короткое время в переходный период под влиянием когнитивной нагрузки – реактивное возрастание уровня кортизола сопровождается ростом провоспалительных интерлейкинов (табл.).

Обсуждение

При легком стрессе, вызванном когнитивной нагрузкой, характер взаимосвязей между провоспалительными цитокинами сохраняется, повышая стабильность иммунной системы, что находит подтверждение в данных литературы [12]. Переходный период

от состояния покоя к выполнению когнитивных функций характеризуется ростом уровня провоспалительных интерлейкинов, кортизола и вегетативных реакций. При этом, обращает внимание что при увеличении концентрации интерлейкинов возрастают также показатели артериального давления и пульса. Это при том, что между уровнем интерлейкинов и характеристиками вегетативных реакций существует отрицательная корреляция. Это свидетельствует о том, что существуют независимые каналы, приводящие к росту вегетативных показателей и воспалительных цитокинов. Если бы канал был один, например подъем кортизола, приводящий к росту интерлейкинов, то роста

вегетативных показателей не было бы, из-за отрицательной связи между интерлейкинами и вегетативными реакциями. Поэтому вероятно, что основной причиной подъема артериального давления и возрастания ЧСС является относительно независимая симпатoadренальная активация, которая по времени несколько раньше «запускает» подъем артериального давления и увеличение ЧСС, чем начинается подъем уровня кортизола и цитокинов. По данным литературы интерлейкины 1 β и 6 и другие провоспалительные цитокины связаны с активацией вегетативной нервной системы [13]. Тем не менее, чрезмерный рост артериального давления и ЧСС корректируется с помощью отрицательной обратной связи между основными исследованными цитокинами и вегетативными показателями. Ранее нами показано, что когнитивный стресс сопровождается ростом уровня провоспалительных интерлейкинов 1 β и 6, которые негативно влияли на ряд когнитивных характеристик, в частности, на результаты теста Лурия [9]. Показатели сильного стресса (дистресса) отрицательно коррелировали с уровнем кортизола слюны и положительно с интерлейкином-1бета [14]. В настоящем исследовании было показано, что рост уровня провоспалительных интерлейкинов сопровождался увеличением в среднем уровня саливарного кортизола и провоспалительных интерлейкинов (ФНО α ; ИЛ1 β ; ИЛ6). При этом фоновые значения интерлейкинов, также как их уровни после нагрузки, не коррелировали с уровнем гормона стресса кортизолом. Это может быть по двум причинам: истинная корреляция действительно отсутствует или в стационарные периоды концентрации этих веществ находятся под влиянием некоторых дополнительных неучтенных факторов, например, биоритмов, тогда как реактивные изменения свободны, в значительной мере, от этих влияний.

Вероятно, что фактором, меняющим синхронизацию вегетативных реакций с уровнем цитокинов является активация под влиянием когнитивной нагрузки симпатoadренальной системы. При этом усиливается тормозное воздействие интерлейкинов на вегетативные процессы, что ограничивает чрезмерную реактивность артериального давления и ЧСС.

Таким образом, когнитивная нагрузка сопровождается значимыми сдвигами уровней кортизола, провоспалительных цитокинов, а также подъемом артериального давления и учащением пульса. Очевидно, что в этом процессе наряду с иммунной системой принимают участие симпатoadренальная и возможно гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая системы.

Заключение

Переход от состояния покоя к выполнению когнитивных тестов характеризуется созданием единой функциональной системы, объединяющей гормон стресса кортизол, воспалительные интерлейкины и вегетативные реакции.

Литература

(п.п. 1; 3–8; 12–14 см. References)

2. Фокин В.Ф., Пономарева Н.В., Клопов В.И., Танащян М.М., Лагода О.В. Кардиоваскулярная реактивность, вызванная когнитивной нагрузкой, у больных дисциркуляторной энцефалопатией. Асимметрия. 2014; 8(3): 4–22. (www.j-asymmetry.com)
9. Фокин В.Ф., Шабалина А.А., Пономарева Н.В., Медведев Р.Б., Лагода О.В., Танащян М.М. Изменчивость интерлейкинов при когнитивной нагрузке у больных с хронической ишемией мозга. Вестник РГМУ. 2020; (6): 142–8. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.085
10. Левин О.С. Дисциркуляторная энцефалопатия: современные представления о механизмах развития и лечении. *Consilium medicum*. 2007; 8: 72–9.
11. Танащян М.М., Максимова М.Ю., Домашенко М.А. Дисциркуляторная энцефалопатия. *Путеводитель врачей назначений*. 2015; 2: 1–25.

References

1. Bowman G.L., Dayon L., Kirkland R., Wojcik J., Peyratout G., Severin I.C., et al. Blood-brain barrier breakdown, neuroinflammation, and cognitive decline in older adults. *Alzheimers Dement*. 2018 Dec; 14(12): 1640–50. doi: 10.1016/j.jalz.2018.06.2857
2. Fokin V.F., Ponomareva N.V., Klopov V.I., Tanashyan M.M., Lagoda O.V. Cardiovascular reactivity induced by cognitive load in patients with dyscirculatory encephalopathy. *Asimetriya*. 2014; 8(3): 4–22. (www.j-asymmetry.com). In Russian
3. Tsui A., Richards M., Singh-Manoux A., Udeh-Momoh C., Davis D. Longitudinal associations between diurnal cortisol variation and later-life cognitive impairment. *Neurology*. 2020 Jan 14; 94(2): e133-e141. doi: 10.1212/WNL.0000000000008729
4. Glienke K., Piefke M. Stress-related cortisol responsivity modulates prospective memory. *J Neuroendocrinol*. 2017 Dec; 29(12): e1254–60. doi: 10.1111/jne.12544
5. Elenkov I.J., Chrousos G.P. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Jun; 966: 290–303. doi: 10.1111/j.1749–6632.2002.tb04229.x
6. Wolkow A., Aisbett B., Reynolds J., Ferguson S.A., Main L.C. Relationships between inflammatory cytokine and cortisol responses in firefighters exposed to simulated wildfire suppression work and sleep restriction. *Physiol Rep*. 2015 Nov; 3(11): e12604–10. doi: 10.14814/phy2.12604
7. Dugué B., Leppänen E.A., Teppo A.M., Fyhrquist F., Gräsbeck R. Effects of psychological stress on plasma interleukins-1 beta and 6, C-reactive protein, tumour necrosis factor alpha, anti-diuretic hormone and serum cortisol. *Scand J Clin Lab Invest*. 1993 Oct; 53(6): 555–61.

8. Späth-Schwalbe E., Born J., Schrezenmeier H., Bornstein S.R., Stromeyer P., Drechsler S., et al. Interleukin-6 stimulates the hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Oct; 79(4): 1212–4. doi: 10.1210/jcem.79.4.7962296
9. Fokin V.F., SHabalina A.A., Ponomareva N.V., Medvedev R.B., Lagoda O.V., Tanashyan M.M. Variability of interleukins during cognitive load in patients with chronic cerebral ischemia. *Bulletin RGMU.* 2020; (6): 142–8. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.085. (In Russian)
10. Levin O.S. Dyscirculatory encephalopathy: modern ideas about the mechanisms of development and treatment. *Consilium medicum.* 2007; 8: 72–9. (In Russian)
11. Tanashyan M.M., Maksimova M.Yu., Domashenko M.A. Dyscirculatory encephalopathy. *Putevoditel' vrachebnykh naznacheny.* 2015; 2: 1–25. (In Russian)
12. Ye L., Gao L., Cheng H. Inflammatory Profiles of the Interleukin Family and Network in Cerebral Hemorrhage. *Cell Mol Neurobiol.* 2018 Oct; 38(7): 1321–33. doi: 10.1007/s10571-018-0601-x
13. Alen N.V., Deer L.K., Hostinar C.E. Autonomic nervous system activity predicts increasing serum cytokines in children. *Psychoneuroendocrinology.* 2020; 119: 104745–51. doi: 10.1016/j.psyneuen.2020.104745
14. Buzgoova K., Balagova L., Marko M., Kapsdorfer D., Riecaný I., Jezova D. Higher perceived stress is associated with lower cortisol concentrations but higher salivary interleukin-1beta in socially evaluated cold pressor test. *Stress.* 2020; 23(3): 248–55. doi: 10.1080/10253890.2019.1660872

Сведения об авторах:

Фокин Виталий Федорович, доктор биол. наук, гл. науч. сотр., лаб. возрастной физиологии и нейрокибернетики, ФГБНУ Научный центр неврологии, e-mail: fvff@mail.ru;

Шабалина Алла Анатольевна, ФГБНУ Научный центр неврологии, доктор мед. наук, вед. науч. сотр., зав. отделом лабораторной диагностики Института клинической и профилактической неврологии;

Пonomareva Наталья Васильевна, ФГБНУ Научный центр неврологии, доктор мед. наук, гл. науч. сотр., зав. лаб. возрастной физиологии мозга и нейрокибернетики Института мозга;

Медведев Роман Борисович, ФГБНУ Научный центр неврологии, канд. мед. наук, науч. сотр. 1-го неврологического отд-ния Института клинической и профилактической неврологии;

Лагода Ольга Викторовна, ФГБНУ Научный центр неврологии, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. 1-го неврологического отд-ния Института клинической и профилактической неврологии;

Танашян Маринэ Мовсесовна, ФГБНУ Научный центр неврологии, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, зам. директора по научной работе, руководитель 1-го неврологического отд-ния Института клинической и профилактической неврологии.

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092

Осиков М.В.^{1,2}, Бойко М.С.¹, Огнева О.И.¹, Федосов А.А.^{3,4}

Этолого-иммунологические взаимосвязи при экспериментальном десинхронозе в условиях люминисцентного освещения

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

²ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», 454092, Челябинск, Россия, ул. Воровского, д. 70;

³ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва, Россия, ул. Островитянова, д. 1;

⁴ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

Цель – изучение особенностей иммунного статуса и поведенческой активности при экспериментальном десинхронозе в условиях люминисцентного освещения.

Методы. Световой десинхроноз создавали у морских свинок круглосуточным (24 ч) содержанием в условиях люминисцентного освещения. Для анализа этологического статуса использовали: тест открытое поле, водный «лабиринт» Морриса, определяли в крови содержание интерлейкина-4 (IL-4), интерферона-γ (INF-γ), концентрацию мелатонина и кортизола.

Результаты. При экспериментальном десинхронозе в условиях круглосуточного люминисцентного освещения зафиксировано снижение концентрации в крови IL-4, INF-γ и мелатонина и увеличение концентрации кортизола на 10-е, 20-е и 30-е сутки. Корреляционный анализ показал, что при экспериментальном десинхронозе в условиях люминисцентного освещения появляется чувство тревоги, нарастает угнетение ориентировочно-исследовательской активности по мере снижения концентрации мелатонина и повышения уровня кортизола в периферической крови.

Заключение. Изменения этологического и иммунного статуса при экспериментальном десинхронозе в условиях люминисцентного освещения прогрессируют по мере снижения концентрации мелатонина и повышения уровня кортизола в крови.

Ключевые слова: этология; десинхроноз; люминисцентное освещение; мелатонин; кортизол; интерлейкин-4 (IL-4); интерферон-γ (INF-γ).

Для цитирования: Осиков М.В., Бойко М.С., Огнева О.И., Федосов А.А. Этолого-иммунологические взаимосвязи при экспериментальном десинхронозе в условиях люминисцентного освещения. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(3): 58–67.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.58-67

Участие авторов: разработка идеи, концепции и дизайна работы, критическая редакция текста статьи, утверждение окончательного варианта статьи – Осиков М.В.; анализ полученных данных, заготовка статьи и последующая редакция – Бойко М.С.; проведение экспериментальной части работы, статистическая обработка данных, интерпретация полученных данных, заготовка статьи, редактирование – Огнева О.И.; анализ полученных данных, редактирование – Федосов А.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Бойко Маргарита Сергеевна, e-mail: ritkaboyko@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.05.2023

Принята к печати 12.07.2023

Опубликована 20.09.2023

Osikov M.V.^{1,2}, Boyko M.S.¹, Ogneva O.I.¹, Fedosov A.A.^{3,4}

Ethological and immunological interrelations in experimental desynchronization under fluorescent lighting conditions

¹South Ural State Medical University, Vorovskogo St. 64, Chelyabinsk, 454092, Russian Federation;

²Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Vorovskogo St. 70, Chelyabinsk, 454092, Russian Federation;

³Pirogov Russian National Research Medical University, Ostroityanova St. 1, Moscow, 117997, Russian Federation;

⁴Friendship University of Russia, Miklukho-Maklaya 6, Moscow, 117198, Russian Federation

Aim. To identify changes in immune status and behavioral activity during experimental desynchronization under conditions of fluorescent lighting.

Methods. Light desynchronization was created by exposing guinea pigs to 24 hr of fluorescent light. To analyze the ethological status, we used an open field test, a Morris water maze, and the concentrations of IL-4, IFN- γ , melatonin, and cortisol in the blood were measured.

Results. During experimental desynchronization under fluorescent light, blood IL-4, IFN- γ decreased and melatonin increased. There was an increase in the concentration of cortisol on days 10, 20 and 30. Correlation analysis revealed that in experimental desynchronization, anxiety and depression of research activity increased as the concentration of melatonin decreased and as the concentration of blood cortisol increased.

Conclusions. Changes in the ethological and immune status during experimental desynchronization under fluorescent light progress as the concentration of melatonin decreases and the concentration of cortisol in the blood increases.

Keywords: etiology; desynchronization; fluorescent lighting; melatonin; cortisol; IL-4; IFN- γ

For citation: Osikov M.V., Boyko M.S., Ogneva O.I., Fedosov A.A. Ecological and immunological relationships in experimental desynchronization under fluorescent lighting conditions. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(3) 58–67. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.58-67

Author's contribution: development of the idea, concept and design of the work, critical editing of the text of the article, approval of the final version of the article – Osikov M.V.; analysis of the data obtained, preparation of the article and subsequent editing – Boyko M.S.; carrying out the experimental part of the work, statistical data processing, interpretation of the data obtained, preparation of the article, editing – Ogneva O.I.; analysis of the obtained data, editing – Fedosov A.A. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

For correspondence: *Margarita S. Boyko*, assistant department pathophysiology South Ural State Medical University, e-mail: ritkaboyko@yandex.ru

Information about the authors:

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

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 09.05.2023

Accepted 12.07.2023

Published 20.09.2023

Введение

В настоящее время все большее число людей находится в ситуациях, когда их привычный жизненный уклад полностью или частично перестраивается: это перемещения через несколько часовых поясов за короткий промежуток времени, работа в условиях вахтовой организации труда в приполярных областях и на Крайнем Севере, работа в ночные смены или по «скользящему» графику и другие обстоятельства, частично или полностью ломающие привычный уклад жизни [1]. Сменный труд, особенно у работников умственного труда с высокой степенью нервно-эмоционального напряжения, рассматривается как стресс-фактор, приводящий к нарушениям фазовой

архитектоники циркадианной системы организма [2]. Десинхроноз характеризуется нарушением соотношения фаз суточных ритмов различных физиологических систем как между собой, так и с внешними физическими и социальными датчиками времени, что влияет на продолжительность и качество сна, ведет к развитию хронической усталости, головной боли, потери внимания, ухудшению когнитивной функции, умственной деятельности, снижению способности к обучению и повышению тревожного компонента поведения [3]. Показано, что у людей, часто попадающих в условия изменения циркадианных ритмов (пилоты международных рейсов, медицинские работники, опе-

раторы, машинисты, полицейские, обслуживающий персонал), увеличивается риск развития иммунодефицитных состояний, аллергических и онкологических заболеваний, сахарного диабета, метаболического синдрома, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, артериальной гипертензии, дефицита внимания и психических заболеваний [4, 5].

В патогенезе последствий нарушений циркадианных ритмов одним из звеньев может выступать нарушение работы нейромедиаторных систем, обеспечивающих передачу нервного импульса. Дисбаланс в продукции и секреции нейромедиаторов приводит к нарушению функциональной активности нейронов. Еще одним звеном патогенеза может выступать дисфункция иммунной системы. Механизмы иммунных нарушений, возникающие при десинхронозе, связаны с рассогласованием суточных биоритмов функциональной активности иммунокомпетентных клеток, среди которых основными являются пролиферация, продукция цитокинов, что приводит к дизрегуляции иммунного ответа [6]. В литературе представлены единичные сведения о взаимосвязи изменений неврологического статуса и иммунного статуса при десинхронозе.

Цель работы – выявление изменений иммунного статуса и поведенческой активности при экспериментальном десинхронозе в условиях люминесцентного освещения.

Методика

Работа выполнена на 114 половозрелых морских свинок массой 300 ± 50 г. Животных содержали в стандартных помещениях вивария и случайным образом распределили на 3 группы: 1 группа ($n = 32$) – интактные, содержались в условиях естественного освещения, 2 группа – (СФЛО) в условиях стандартного фиксированного люминесцентного освещения, 3-я группа – десинхроноз – в условиях круглосуточного (24 ч) люминесцентного освещения – ДЕСЛО ($n = 82$). Эксперименты проводились в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными европейским научным фондом и Хельсинкской декларацией о гуманном отношении к животным. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом университета. Длительность эксперимента составила 30 сут. Анализировались результаты тестирования регистрируемые на 10-е, 20-е и 30-е сут эксперимента. Десинхроноз моделировали содержанием животных в условиях круглосуточного люминесцентного освещения. Поведенческое фенотипирование оценивали с помощью тестов «открытое поле» и «водный лабиринт Морриса».

Поведенческую активность исследовали в тесте «открытое поле», регистрировали горизонтальную активность, вертикальную активность, исследовательскую активность, подсчитывали число актов груминга, количество фекальных болюсов. Водный «лабиринт» Морриса предназначен для оценки когнитивной функции. В тесте со скрытой платформой регистрировали среднее время поиска скрытой под водой платформы и среднюю (2 попытки) длину траектории достижения платформы. В тесте на зрительное восприятие регистрировали время нахождения платформы. В тесте без платформы регистрировали время пребывания животного в каждом секторе, рассчитывали процент времени присутствия животного в области расположения платформы.

Методом иммуноферментного анализа на аппарате «Иммулайт 2000» (США) определяли в периферической крови концентрацию интерлейкина 4 (IL-4), интерферона- γ (INF- γ) с помощью специфических для морских свинок тест-систем производителя «Uscn. Life Science Inc.» (Китай), концентрацию мелатонина и кортизола – с помощью специфических для морских свинок тест-систем производителя «Cusabio» (Китай). Уровень IL-4 и INF- γ выражали в пг/мл, уровень мелатонина, кортизола – в нг/мл.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica v. 10.0 for Windows». Характеристика выборок представлена в формате « $M \pm m$ », где M – среднее арифметическое значение признака, m – стандартная ошибка среднего. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев (U – Манна–Уитни, WW – Вальда–Вольфовитца). Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Анализ показателей концентрации IL-4, INF- γ , мелатонина и кортизола в периферической крови у животных в условиях стандартного фиксированного люминесцентного освещения (СФЛО) не выявил значимых различий на 10-е 20-е и 30-е сут эксперимента при сравнении с естественным освещением (табл. 1).

Анализ поведения животных в тесте «открытое поле» при люминесцентном освещении на 10-е сут эксперимента выявил статистически значимое повышение горизонтальной и вертикальной активности, на 20-е сут – снижение количества актов груминга, на 30-е сут повышение горизонтальной активности и снижение

Таблица 1/ Table 1

Концентрация цитокинов, мелатонина и кортизола в периферической крови при десинхронозе в условиях люминесцентного освещения, (M±m)

Concentrations of cytokines, melatonin and cortisol in peripheral blood in desynchronosis under fluorescent lighting conditions, (M±m)

Показатели Indicators	Группа 1 ЕО (n=8) Group 1 ЕО (n=8)	10-е сут Day 10		20-е сут Day 20		30-е сут Day 30	
		Группа 2 СФЛО (n=6) Group 2 SFLO (n=6)	Группа 3 ДЕСЛО (n=6) Group 4 DESLO (n=6)	Группа 2 СФЛО (n=8) Group 2 SFLO (n=8)	Группа 3 ДЕСЛО (n=8) Group 4 DESLO (n=8)	Группа 2 СФЛО (n=6) Group 2 SFLO (n=6)	Группа 3 ДЕСЛО (n=8) Group 4 DESLO (n=8)
		ИФН-γ, пг/мл IFN-γ, pg/mL	8,86±2,52	8,57±2,80	5,24±1,65	9,76±2,17	5,11±0,92*
ИЛ-4, пг/мл IL-4, pg/mL	25,20±7,49	26,24±3,56	16,00±2,86*	21,75±1,99	15,23±3,02*	18,02±1,06	14,18±1,71*
Мелатонин, нг/мл Melatonin, ng/mL	5,22±0,43	4,63±0,16	4,04±0,22*	4,34±0,09	3,88±0,33*	4,21±0,03	3,40±0,20*
Кортизол, нг/мл Cortisol, ng/mL	171,11±5,19	177,92±1,71	187,40±1,61*	183,08±4,27	188,00±2,17*	179,52±3,79	190,42±2,67*

Примечание. * – значимые (p<0,05) различия с группой СФЛО.

Note. * – significant (p<0.05) differences with SFLO group.

Таблица 2 / Table 2

Показатели теста «открытое поле» при десинхронозе в условиях люминесцентного освещения, (M±m)

Open field test scores in desynchronosis under fluorescent lighting conditions, (M±m)

Показатели Indicators	Группа 1 ЕО (n=8) Group 1 ЕО (n=8)	10-е сутки Day 10		20-е сутки Day 20		30-е сутки Day 30	
		Группа 2 СФЛО (n=6) Group 2 SFLO (n=6)	Группа 3 ДЕСЛО (n=6) Group 4 DESLO (n=6)	Группа 2 СФЛО (n=8) Group 2 SFLO (n=8)	Группа 3 ДЕСЛО (n=8) Group 4 DESLO (n=8)	Группа 2 СФЛО (n=6) Group 2 SFLO (n=6)	Группа 3 ДЕСЛО (n=8) Group 4 DESLO (n=8)
		ГА, количество актов GA, number of acts	19,25±4,96	29,67±2,79*	30,67±3,90	23,00±3,11	50,75±5,80* #
ВА, количество актов VA, number of acts	1,50±0,18	2,67±0,21*	2,00±0,37	1,67±0,42	1,50±0,19	2,00±0,37	2,25±0,49
ИА, количество актов IA, number of acts	3,50±0,62	5,00±0,97	2,33±0,21*	2,67±0,21	1,25±0,16* #	3,33±0,21	1,50±0,19* #
ГР, количество актов GR, number of acts	3,37±0,46	1,67±0,42	3,33±0,21*	1,33±0,21*	1,75±0,31	2,67±0,76	2,00±0,46
ФБ, количество актов FB, number of acts	7,37±0,80	5,00±1,32	7,83±1,08*	5,33±0,76	8,00±1,28*	4,33±0,42*	8,25±0,86*

Примечание. * – значимые (p<0,05) различия с группой СФЛО; # – значимые (p<0,05) различия с 10-ми сутками в группе ДЕСЛО; & – значимые (p<0,05) различия с 20-ми сутками в группе ДЕСЛО. ГА – горизонтальная активность, ВА – вертикальная активность, ИА – исследовательская активность, ГР – груминг, ФБ – фекальные болюсы.

Note. * – significant (p<0.05) differences with SFLO group; # – significant (p<0.05) differences with 10 days in DESLO group; & – significant (p<0.05) differences with 20 days in DESLO group. GA – horizontal activity, VA – vertical activity, IA – exploratory activity, GR – grooming, FB – fecal boluses.

количества фекальных болюсов (табл. 2). При оценке когнитивной функции животных в тесте со скрытой платформой в водном «лабиринте Морриса» время нахождения скрытой под водой платформы на 10-е и 20-е сут не отличается от регистрируемого в группе содержавшейся в условиях естественного освещения в дни проведения данного исследования (табл. 3).

На 30-е сут время от запуска животных в бассейн до нахождения ими платформы статистически значимо уменьшается со 2-го по 4-й день проведения тестирования. При исследовании длины траектории поиска скрытой платформы не обнаружено отличий на 10-е и 20-е сут от группы естественного освещения во все дни проведения методики тестирования

Таблица 3 / Table 3

**Тест водного «лабиринта» Морриса при десинхронизации в условиях люминесцентного освещения, (M±m)
Morris water “maze” test in desynchronization under fluorescent lighting conditions, (M±m)**

Показатели Indicators	Группа 1 ЕО Group 1 ЕО (n=8)	10-е сутки Day 10		20-е сутки Day 20		30 -е сутки Day 30	
		Группа 2 СФЛО (n=6)	Группа 3 ДЕСЛО (n=6)	Группа 2 СФЛО (n=8)	Группа 3 ДЕСЛО (n=8)	Группа 2 СФЛО (n=6)	Группа 3 ДЕСЛО (n=8)
		Group 2 SFLO (n=6)	Group 4 DESLO (n=6)	Group 2 SFLO (n=8)	Group 4 DESLO (n=8)	Group 2 SFLO (n=6)	Group 4 DESLO (n=8)
Время нахождения платформы Platform dwell time							
1 день, с Day 1, s	86,38±1,71	86,83±1,10	78,83±5,84	75,25±5,13	81,37±2,29*	84,33±3,58	76,13±5,54
2 день, с Day 2, s	76,81±4,06	78,83±5,64	75,00±6,80	59,63±7,15	78,00±4,81*	64,00±3,18*	65,28±5,63
3 день, с Day 3, s	58,31±6,16	60,33±5,24	62,17±8,88	60,13±5,57	72,88±9,64*	46,67±5,57*	51,38±7,86
4 день, с Day 4, s	35,19±5,45	22,50±2,69	51,67±4,51*	46,87±3,92	51,87±4,05	18,17±2,89*	23,13±1,85
Длина траектории поиска платформы Length of the platform search path							
1 день, м Day 1, m	19,62±1,25	20,03±1,92	19,90±0,54	18,48±1,88	22,66±0,64*	22,22±1,73	25,62±0,76* # &
2 день, м Day 2, m	17,49±0,87	18,09±1,13	17,43±0,23	17,53±1,31	21,21±0,77* #	19,23±1,11	21,75±1,49* #
3 день, м Day 3, m	14,68±1,04	14,36±1,42	15,35±1,55	13,89±0,94	21,12±0,38* #	13,15±1,11	21,18±0,50* # &
4 день, м Day 4, m	13,54±0,39	14,30±1,27	14,24±1,19	12,80±0,75	14,94±0,82	11,27±0,30	18,34±0,81* # &
Время нахождения видимой платформы Time to locate visible platform							
Время, с Time, s	68,63±6,59	55,67±3,55	69,67±9,92	49,75±3,52*	73,00±7,53*	53,67±5,32*	86,00±7,44* #
Доля времени нахождения животного в области расположения подводной платформы Percentage of time the animal is in the area where the underwater platform is located							
Доля времени, % Proportion of time, %	69,30±5,88	71,33±2,56	56,00±2,90*	70,25±3,71	53,75±2,69*	71,33±3,04	45,50±2,47* # &

Примечание. * – значимые (p<0,05) различия с группой СФЛО; # – значимые (p<0,05) различия с 10-ми сутками в группе ДЕСЛО; & – значимые (p<0,05) различия с 20-ми сутками в группе ДЕСЛО.

Note. * – significant (p<0.05) differences with the SFLO group; # – significant (p<0.05) differences with 10 days in the DESLO group; & – significant (p<0.05) differences with 20 days in the DESLO group.

(табл. 3). На 30-е сут эксперимента отмечено уменьшение длины траектории только в 4-й день проведения тестирования. При тестировании на зрительное восприятие время нахождения видимой платформы укорачивается на 20-е и 30-е сут по сравнению с группой естественного освещения (табл. 3). Это свидетельствует о лучшем восприятии объекта, освещаемого искусственным источником света, что способствует улучшению пространственной ориентации по наружным ориентирам. При оценке теста без платформы доля времени нахождения животного в той области, где ранее располагалась скрытая платформа на 10-е, 20-е и 30-е сут не отличается от группы естественного освещения (табл. 3).

При экспериментальном десинхронозе в условиях круглосуточного люминесцентного освещения (ДЕСЛО) снижается концентрация IL-4 и INF- γ в периферической крови на 20-е и 30-е сут при сравнении с данными группы СФЛО – стандартного фиксированного люминесцентного освещения (табл. 1). При оценке концентрации цитокинов в динамике 10-е – 30-е сут десинхроноза не обнаружено значимых отличий на 20-е сут по сравнению с 10-ми и на 30-е сут по сравнению с 10-ми и 20-ми.

При десинхронозе в условиях люминесцентного освещения концентрация мелатонина в периферической крови снижается на 10-, 20- и 30-е сут (табл. 1). Концентрация кортизола в периферической крови повышается на 10-, 20- и 30-е сутки. При оценке концентрации мелатонина и кортизола в динамике 10–30-е сут десинхроноза не обнаружено значимых различий.

При экспериментальном десинхронозе в условиях люминесцентного освещения в тесте «открытое поле» установлено, что исследовательская активность животных снижается на 10, 20 и 30-е сут, горизонтальная активность повышается на 20-е сут и снижается на 30-е сут наблюдения, вертикальная активность значимо не изменяется во все сроки наблюдения; количество фекальных болюсов увеличивается на 20-е и 30-е сут, количество актов груминга увеличивается только на 10-е сут эксперимента (табл. 2). В тесте со скрытой платформой водного «лабиринта» Морриса наблюдается увеличение времени нахождения животными платформы на 20-е и 30-е сут эксперимента, увеличение длины траектории поиска платформы – на 20-е и 30-е сут (табл. 3). При проведении теста на зрительное восприятие отмечено увеличение времени нахождения видимой платформы на 20-е и 30-е сут эксперимента (табл. 3). В тесте без платформы уменьшается доля времени нахождения животного в области рас-

положения подводной платформы на 10, 20 и 30-е сут эксперимента (табл. 3).

Далее был проведен корреляционный анализ (табл. 4). Результаты корреляционного анализа показали присутствие сильной положительной связи между концентрацией IL-4 в периферической крови и горизонтальной активностью на 30-е сут эксперимента, средней силы положительной связи с исследовательской активностью на 20-е сут, сильной положительной связи на 30-е сут эксперимента. Продемонстрирована сильная положительная связь между концентрацией IL-4 и вертикальной активностью на 30-е сут, сильная отрицательная связь с количеством фекальных болюсов на 30-е сут. Имеется средней силы положительная связь между концентрацией INF- γ и горизонтальной активностью на 10-е и 20-е сут, сильная положительная связь с исследовательской активностью на 10-е и 20-е сут, сильная положительная связь с вертикальной активностью на 10-е сут. Показано наличие средней силы отрицательной связи между концентрацией IL-4 и длиной траектории нахождения платформы на 20-е сут в 1-й, 3-й и 4-й день тестирования, сильной отрицательной связи на 30-е сут в 1-й и 3-й дни, средней силы отрицательной связи в 4-й день проведения методики. Отмечено присутствие сильной отрицательной связи концентрации IL-4 с временем нахождения видимой платформы в тесте на зрительное восприятие на 10-е сут, средней силы отрицательной связи на 30-е сут. Имеется сильная положительная связь с долей времени нахождения животного в области расположения подводной платформы на 30-е сут эксперимента. Продемонстрировано наличие сильной отрицательной связи между концентрацией INF- γ в периферической крови и длиной траектории нахождения платформы на 20-е сут в 1-й день проведения тестирования по методике, средней силы отрицательной связи в 3-й и 4-й дни проведения тестирования по этой методике, средней силы отрицательной связи на 30-е сут во 2-й и 4-й дни тестирования. Не обнаружено связи между концентрацией INF- γ в периферической крови и временем нахождения видимой платформы в тесте на зрительное восприятие на всех сроках эксперимента. Продемонстрирована средней силы положительная связь между концентрацией INF- γ и долей времени нахождения животного в области расположения подводной платформы на 10-е сут эксперимента. Следовательно, снижение долговременной памяти усугубляется по мере снижения концентрации IL-4, снижение способности к обучению, нарушение пространственной ориентации нарастают по мере снижения концентрации IL-4 и INF- γ в периферической крови.

Таблица 4 / Table 4

Корреляционная матрица между иммунным статусом и показателями этологического статуса, концентрацией мелатонина и кортизола при десинхронозе в условиях люминесцентного освещения
Correlation matrix between immune status and indices of ethological status, melatonin and cortisol concentrations in desynchronization under fluorescent lighting conditions

Показатели Indicators	ИЛ-4 IL-4			ИФН-γ IFN-γ		
	10-е сутки Day 10	20-е сутки Day 20	30-е сутки Day 30	10-е сутки Day 10	20-е сутки Day 20	30-е сутки Day 30
Горизонтальная активность Horizontal activity	R=0,02	R= - 0,05	R=0,36	R=0,36	R= - 0,32	R=0,58
Исследовательская активность Research activity	R=0,98	R=0,44	R=0,49	R=0,65	R=0,76	R=0,36
Вертикальная активность Vertical activity	R=0,49	R=0,14	R=0,19	R=0,14	R=0,17	R=0,04
Фекальные болюсы Fecal boluses	R= - 0,24	R= - 0,43	R= - 0,82	R= - 0,80	R= - 0,15	R= - 0,69
Груминг Grooming	R=0,25	R=0,22	R=0,28	R= - 0,18	R= - 0,15	R= - 0,13
Длина траектории 1 день, м Trajectory length day 1, m	R= - 0,09	R= - 0,60	R= - 0,40	R= - 0,18	R= - 0,71	R= - 0,13
Длина траектории 2 день, м Trajectory length day 2, m	R=0,28	R= - 0,76	R= - 0,03	R= - 0,09	R= - 0,83	R= - 0,69
Длина траектории 3 день, м Trajectory length day 3, m	R= - 0,39	R= - 0,35	R= - 0,84	R= - 0,12	R= - 0,64	R= - 0,36
Длина траектории 4 день, м Trajectory length day 4, m	R= - 0,28	R= - 0,39	R= - 0,39	R= - 0,18	R= - 0,68	R= - 0,38
Время нахождения видимой платформы, с Time of finding the visible platform, s	R= - 0,28	R= - 0,31	R= - 0,54	R= - 0,98	R= - 0,19	R= - 0,66
Доля времени нахождения животного в области расположения подводной платформы, % Percentage of time the animal is in the area where the underwater platform is located, %	R=0,74	R=0,18	R=0,76	R=0,74	R=0,05	R=0,57
Мелатонин Melatonin	R=0,39	R=0,05	R=0,93	R=0,08	R=0,36	R=0,56
Кортизол Cortisol	R= - 0,95	R= - 0,83	R= - 0,96	R= - 0,93	R= - 0,56	R= - 0,63

Примечание. R – коэффициент корреляции Спирмена, полужирным выделена достоверная связь ($p < 0,05$).

Note. R – Spearman’s correlation coefficient, bold indicates reliable relationship ($p < 0.05$).

Признаки тревоги усиливаются по мере снижения концентрации ИЛ-4, признаки угнетения ориентировочно-исследовательской активности нарастают по мере снижения концентрации ИЛ-4 и ИФН-γ в периферической крови. Снижение концентрации цитокинов в крови, с одной стороны, может быть связано с угнетением их продукции лимфоцитами вследствие уменьшения количества последних. С другой стороны, снижение концентрации в крови ИЛ-4 и ИФН-γ имеет значение в снижении количества лимфоцитов, так как они являются факторами роста для лимфоцитов.

Обсуждение

Полагаем, что изменения этологического статуса при десинхронозе у животных являются отражением стресс-реакции. Стресс может иметь разрушительные последствия для поведения, познания и мотивации [7]. Лимбическая система, в том числе гиппокамп, а также ретикулярная формация контролируют проявление эмоций и ориентировочно-исследовательское поведение [7]. Полагают, что стресс-индуцированная гиперсекреция глюкокортикоидов вызывает

атрофические изменения в гиппокампе через специфическое взаимодействие глюкокортикоидов с рецепторами на нейронах, что приводит к дефициту внимания и памяти [8, 9]. Гормоны стресса, в частности кортизол, оказывают специфическое влияние на долговременную память: повышение их концентрации способствует формированию новых воспоминаний, ингибируя использование старой информации [9]. Кортизол-индуцированное нарушение рабочей памяти связывают с активацией двух видов кортико-стероидных ядерных рецепторов, которые экспрессируются в гиппокампе: I тип (минералокортикоидные), II тип (глюкокортикоидные) [10]. Действие адреналина на нейроны ретикулярной формации способствует угнетению у животных ориентировочно-исследовательского поведения [11].

При десинхронозе снижение концентрации мелатонина приводит к отмене его нейропротекторных и антиоксидантных эффектов в ЦНС и способствует развитию дефицита когнитивной функции [12]. Снижение уровня мелатонина при десинхронозе напрямую снижает активность ГАМК-ергической системы, что вызывает недостаточность функционирования тормозных систем мозга. Снижение активности ГАМК-ергической системы может влиять на угнетение исследовательской активности и развитие тревожно-фобического состояния экспериментальных животных, снижение памяти [13].

Снижение двигательной активности и исследовательского поведения у морских свинок при десинхронозе, в том числе, связано с ингибированием дофаминовой передачи нервных импульсов в головном мозге. Длительная световая экспозиция вызывает нарушение функционирования дофаминергической системы мозга [14]. Блокада дофаминовых рецепторов или низкая продукция дофамина сопровождается выраженным снижением двигательной активности, исследовательской мотивации, нарушением памяти и внимания [14, 15].

Кроме того, повышение концентрации глутамата в плазме приводит к появлению признаков тревоги при десинхронозе. Повышение концентрации глутамата в ЦНС и усиление передачи сигнала в глутаматергических синапсах нейронов гиппокампа при десинхронозе могут приводить к повышенной тревожности, угнетению процессов формирования памяти [16].

Угнетение пространственной ориентации животных при десинхронозе может быть обусловлено нарушением функционирования системы позиционирования мозга с участием «клеток места», «клеток направления» в гиппокампе, «клеток координатной сетки» в энторинальной коре [14–16].

Таким образом, прогрессирующее усиление тревоги, угнетение ориентировочно-исследовательского поведения, снижение способности к обучению, снижение долговременной памяти, нарушение ориентации в пространстве у животных при десинхронозе можно объяснить снижением уровня мелатонина, приводящего к отмене его эффектов на межнейрональную передачу импульсов в гиппокампе с участием ГАМК, дофамина, глутамата и повышением уровня кортизола, вызывающего атрофические изменения в нейронах гиппокампа.

Механизм депрессии адаптивного иммунитета при десинхронозе является многофакторным. Во-первых, имеет значение лимфоцитопения, снижение количества эффекторов гуморального и клеточного иммунного ответа. Во-вторых, имеет значение дизрегуляция иммунного ответа в связи с уменьшением концентрации в крови IL-4 и INF- γ . Снижение концентрации цитокинов в крови, с одной стороны, связано с угнетением их продукции лимфоцитами вследствие уменьшения количества последних, с другой – снижение концентрации мелатонина в крови вносит вклад в ограничение продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками [7, 8]. В-третьих, изменения адаптивного иммунитета могут быть обусловлены отменой стимулирующего влияния мелатонина на функциональную активность лимфоцитов, реализующегося через специфические к нему рецепторы [17].

Полагаем, что изменения этологического статуса при десинхронозе, в определенной мере, связаны с изменениями иммунного статуса. В настоящее время функция иммунной системы рассматривается в совокупности с функцией нервной и эндокринной систем в составе многофункциональной, многокомпонентной нейро-иммунно-эндокринной системы регуляции гомеостаза [18]. Установлено, что кора больших полушарий, базальные ядра, задние и передние гипоталамические поля, лимбическая система, ретикулярная формация, ядра шва, миндалевидный комплекс участвуют в регуляции иммунного ответа [19, 20]. ГАМК, серотонин, дофамин, глутамат, бета-эндорфин, энкефалины, цитомедины через взаимодействие со специфическими рецепторами на иммунокомпетентных клетках регулируют функциональную активность, пролиферацию и дифференцировку иммунокомпетентных клеток [21]. Медиаторы вегетативной нервной системы (адреналин, норадреналин, ацетилхолин) обладают способностью модулировать иммунные реакции [17, 20]. Установлено регулирующее влияние иммунной системы на синтез нейромедиаторов [22].

Анализ представленных данных позволяет сделать заключение, что чувство тревоги, угнетение ори-

ентировочно-исследовательской активности, снижение долговременной памяти, снижение способности к обучению, нарушение пространственной ориентации нарастают по мере снижения концентрации IL-4, снижения концентрации INF- γ в периферической крови, депрессии Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа.

Большинство исследований нейро-иммунных взаимодействий проведены при инфекционных, аутоиммунных заболеваниях, травматических повреждениях. Отмечено, что они реализуются преимущественно за счет гуморальных влияний [20, 22]. Клетки микроглии астроциты являются основными иммунными эффекторными клетками мозга и наряду с цитотоксическими Т-клетками играют важную роль в нейрогенезе и формировании пространственной памяти [23]. В присутствии активирующего стимула клетки микроглии модулируют иммунный ответ, через секрецию фактора некроза опухоли- α (TNF- α), IL-1, IL-4, IL-6, INF- γ [19, 21, 24].

Эффекты цитокинов реализуются через рецепторы на астроцитах, олигодендроцитах, нейронах, эндотелиальных клетках в ЦНС, что способствует нейрогенеративным расстройствам, нарушению памяти, процессов познания. В частности, повышение уровня TNF- α сопряжено с нейродегенеративными процессами в гиппокампе через стимуляцию специфических рецепторов TNFR1, что приводит к формированию депрессии. Введение IL- β непосредственно в дорсальную область гиппокампа приводит к нарушению памяти [24]. Повышение продукции IL-1 β и TNF- α сглаживает суточный ритм поведенческой активности путем снижения экспрессии мРНК для часовых генов, контролирующей амплитуду ритмов активности [21]. Отмечено, что повышенный уровень в плазме IL-4 способствует улучшению пространственного обучения, а TNF- γ обладает нейропротекторными свойствами по отношению к нейронам гиппокампа [21]. Цитокины изменяют поведенческие реакции путем снижения обратного захвата серотонина, снижения экспрессии рецептора серотонина 1A, снижения синтеза и обратного захвата дофамина, стимуляции высвобождения глутамата и уменьшения его обратного захвата, что приводит к эксайтотоксичности и снижению производства трофических факторов [19]. IL-1 β и - α активируют стресс-реализующую систему. IL-1 β непосредственно воздействует на нейросекреторные клетки гипоталамуса, стимулируя выработку кортиколиберина, что в последующем приводит к повышению концентрации кортизола в периферической крови.

Источником цитокинов в головном мозге могут быть периферические клетки иммунной системы

(моноциты, макрофаги, Th17 и другие Т-клетки) [18]. Воздействие цитокинов на нервные клетки обеспечивается, во-первых, активным транспортом цитокинов через гематоэнцефалический барьер, во-вторых, передачей цитокиновых сигналов через афферентные нервные волокна, в частности блуждающего нерва, в-третьих, эффектами цитокинов *in situ* [19]. Цитокины способны повышать собственное проникновение в ЦНС через увеличение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [17]. Активированные Т-лимфоциты мигрируют через ГЭБ, секретируют цитокины регулирующие нейрогенез в гиппокампе и молекулярно-клеточные механизмы, ответственные за процессы обучения, памяти и познания [20].

Заключение

При экспериментальном десинхронозе в условиях круглосуточного люминесцентного освещения в динамике 10-30 сут наблюдений снижается концентрация в крови IL-4 и TNF- γ , концентрация кортизола повышается, а мелатонина снижается, появляются признаки тревоги, угнетения ориентировочно-исследовательского поведения, ухудшения долговременной памяти и способности к обучению, нарушения пространственной ориентации. Изменения этиологического и иммунного статуса при экспериментальном десинхронозе в условиях люминесцентного освещения прогрессируют по мере снижения концентрации мелатонина и повышения концентрации кортизола в крови.

Литература/References

1. Marqueze E.C., Nogueira L. FR., Vetter C., Skene D.J., Cipolla-Neto J., Moreno C.R.C. Exogenous melatonin decreases circadian misalignment and body weight among early types. *J Pineal Res.* 2021; 71(2): e12750. doi: 10.1111/jpi.12750
2. Ishihara A., Courville A.B., Chen K.Y. The Complex Effects of Light on Metabolism in Humans. *Nutrients.* 2023; 15(6): 1391. doi: 10.3390/nu15061391
3. Boivin D.B., Boudreau P., Kosmadopoulos A. Disturbance of the Circadian System in Shift Work and Its Health Impact. *J Biol Rhythms.* 2022 Feb; 37 (1): 3-28. doi: 10.1177/07487304211064218
4. Zielinski M.R., Systrom D.M., Rose N.R. Fatigue, Sleep, and Autoimmune and Related Disorders. *Front Immunol.* 2019 Aug 6; 10: 1827. doi: 10.3389/fimmu.2019.01827
5. Xiang K., Xu Z., Hu Y.Q., He Y.S., Wu G.C., Li T.Y., et al. Circadian clock genes as promising therapeutic targets for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2021 Aug; 20(8): 102866. doi: 10.1016/j.autrev.2021.102866
6. Klimina K.M., Batotsyrenova E.G., Yunes R.A., Gilyaeva E.H., Poluektova E.U., Kostrova T.A., et al. The effects of desynchronization on the gut microbiota composition and physiological parameters of rats. *BMC Microbiol.* 2019 Jul 12; 19(1): 160. doi: 10.1186/s12866-019-1535-2

7. Bazhanova E.D. Desynchronization: Types, Main Mechanisms, Role in the Pathogenesis of Epilepsy and Other Diseases: A Literature Review. *Life (Basel)*. 2022 Aug 11; 12(8): 1218. doi: 10.3390/life12081218
8. Ayuob N.N., El Wahab M. GA., Ali S.S., Abdel-Tawab H.S. Ocimum basilicum improve chronic stress-induced neurodegenerative changes in mice hippocampus. *Metab Brain Dis*. 2018 Jun; 33(3): 795-804. doi: 10.1007/s11011-017-0173-3
9. Duman R.S., Sanacora G., Krystal J.H. Altered Connectivity in Depression: GABA and Glutamate Neurotransmitter Deficits and Reversal by Novel Treatments. *Neuron*. 2019 Apr 3; 102(1): 75-90. doi: 10.1016/j.neuron.2019.03.013
10. Dufour B.D., McBride J.L. Normalizing glucocorticoid levels attenuates metabolic and neuropathological symptoms in the R6/2 mouse model of huntington's disease. *Neurobiol Dis*. 2019 Jan; 121: 214-29. doi: 10.1016/j.nbd.2018.09.025
11. Moraes L.J., Miranda M.B., Loures L.F., Mainieri A.G., Marmora C.H.C. A systematic review of psychoneuroimmunology-based interventions. *Psychol Health Med*. 2018 Jul; 23(6): 635-52. doi: 10.1080/13548506.2017.1417607
12. Michurina S.V., Ishchenko I.Y., Arkhipov S.A., Letyagin A.Y., Korolev M.A., Zavjalov E.L. The expression of apoptosis-regulating proteins Bcl-2 and Bad in liver cells of C57Bl/6 mice under light-induced functional pinealectomy and after correction with melatonin. *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektii*. 2021 May; 25(3): 310-7. doi: 10.18699/VJ21.034
13. Olsen R.W. GABA_A receptor: Positive and negative allosteric modulators. *Neuropharmacology*. 2018 Jul 1; 136(Pt A): 10-22. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.01.036
14. Dresch-Langley B. Children's Health in the Digital Age. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 May 6; 17(9): 3240. doi: 10.3390/ijerph17093240
15. Van Ombergen A., Rossiter A., Ngo-Anh T.J. 'White Mars' – nearly two decades of biomedical research at the Antarctic Concordia station. *Exp Physiol*. 2021 Jan; 106(1): 6-17. doi: 10.1113/EP088352
16. Wichmann C., Kuner T. Heterogeneity of glutamatergic synapses: cellular mechanisms and network consequences. *Physiol Rev*. 2022 Jan 1; 102(1): 269-318. doi: 10.1152/physrev.00039.2020
17. Hoekstra M.M., Jan M., Katsioudi G., Emmenegger Y., Franken P. The sleep-wake distribution contributes to the peripheral rhythms in PERIOD-2. *Elife*. 2021 Dec 13; 10: e69773. doi: 10.7554/eLife.69773
18. Ma S., Wang Z., Cao J., Dong Y., Chen Y. BMAL1 but not CLOCK is associated with monochromatic green light-induced circadian rhythm of melatonin in chick pinealocytes. *Endocr Connect*. 2019 Jan 1; 8(1): 57-68. doi: 10.1530/EC-18-0377
19. Martyniuk K., Hanuszewska M., Lewczuk B. Metabolism of Melatonin Synthesis-Related Indoles in the Turkey Pineal Organ and Its Modification by Monochromatic Light. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 21; 21(24): 9750. doi: 10.3390/ijms21249750
20. Song C., Wang Z., Cao J., Dong Y., Chen Y. Role of Melatonin in Daily Variations of Plasma Insulin Level and Pancreatic Clock Gene Expression in Chick Exposed to Monochromatic Light. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 25; 24(3): 2368. doi: 10.3390/ijms24032368
21. Rodríguez-Santana C., Florido J., Martínez-Ruiz L., López-Rodríguez A., Acuña-Castroviejo D., Escames G. Role of Melatonin in Cancer: Effect on Clock Genes. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 18; 24(3): 1919. doi: 10.3390/ijms24031919
22. Brzezinski A., Rai S., Purohit A., Pandi-Perumal S.R. Melatonin, Clock Genes, and Mammalian Reproduction: What Is the Link? *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 8; 22(24): 13240. doi: 10.3390/ijms222413240
23. Faria V.S., Manchado-Gobatto F.B., Scariot P. PM., Zagatto A.M., Beck W.R. Melatonin Potentiates Exercise-Induced Increases in Skeletal Muscle PGC-1 α and Optimizes Glycogen Replenishment. *Front Physiol*. 2022 Apr 26; 13: 803126. doi: 10.3389/fphys.2022.803126
24. Bhatt S.P., Guleria R., Kabra S.K. Metabolic alterations and systemic inflammation in overweight/obese children with obstructive sleep apnea. *PLoS One*. 2021 Jun 4; 16(6): e0252353. doi: 10.1371/journal.pone.0252353

Сведения об авторах:

Осиков Михаил Владимирович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ, руководитель отдела научной работы ГБУЗ ЧОКБ;

Бойко Маргарита Сергеевна, ассистент каф. патофизиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ, e-mail: ritkaboiko@yandex.ru;

Огнева Ольга Игоревна, канд. мед. наук, доцент каф. патофизиологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ;

Федосов Алексей Анатольевич, канд. мед. наук, доцент каф. анатомии человека, «Институт анатомии и морфологии им. акад. Ю.М. Лопухина» ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»; доцент каф. гистологии, цитологии и эмбриологии Медицинского института ФГАОУ ВО РУДН.

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616.311-08-092.9

Фефелов А.А.¹, Цыбиков Н.Н.², Терешков П.П.², Фефелова Е.В.²

Системные и локальные иммунологические эффекты плазмолифтинга в модели экспериментального пародонтита у крыс

¹ ГАУЗ «Краевая стоматологическая поликлиника»,

672027, Чита, Россия, ул. Угданская, д. 8;

² ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия»,

672000, Чита, Россия, ул. Горького, д. 39А

Введение. Выяснение механизмов, ответственных за восстановление иммунного ответа при проведении плазмолифтинга у больных, страдающих хроническим пародонтитом, позволит профилактировать и раннее развитие атеросклероза, и ревматоидного артрита, и ряда других патологических процессов, имеющих сходное с пародонтитом основное звено патогенеза. **Цель:** оценка системных и локальных иммунологических эффектов плазмолифтинга в модели экспериментального пародонтита у крыс.

Методика. У самцов крыс Wistar (возраст 18–20 нед, начальная масса тела 200,0±31,5 г.) моделировали экспериментальный пародонтит путем отслойки десны концом копьевидного скальпеля (№ 11) в сочетании с инъекциями 10% раствора этилового спирта с 0,25% раствором новокаином в течении 7 сут. Сформированы 4 группы по 10 особей в каждой: одна контрольная группа и 3 опытные: 1-я опытная группа – животные с экспериментальным пародонтитом, не получающие терапии; 2-я – крысы с экспериментальным пародонтитом, получающие инъекции плазмы. Плазму, в объеме 50 мкл, вводили микрошприцем локально в область альвеолярной кости, на 2 мм ниже десневого края, между правой стороной 1-го и 2-го моляров верхней челюсти (3 инъекции через 3 сут каждая); 3-я группа – животные с индуцированным пародонтитом, леченные пленками фирмы «Диплен» с активными действующими компонентами «Метронидазолом» и «Хлоргексидином» (курс процедур составил 10 сут).

Результаты. На 10-е сут индуцированного пародонтита клинически и гистологически регистрировался воспалительный процесс, сопровождающийся резким подъемом уровня цитокинов, более выраженным в гомогенатах тканей. Применение процедуры плазмолифтинга, а также стандартной терапии проявлялось уменьшением фибринозных наложений, санацией пародонтального кармана, формированием вторичного пародонтального прикрепления. Отмечалось ограничение зоны инфильтрации, снижался уровень цитокинов. При этом, терапевтический эффект плазмолифтинга был более выраженным.

Заключение. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что плазмолифтинг не только снижает местную воспалительную реакцию тканей при экспериментальном пародонтите, но и уменьшает напряженность системного воспалительного процесса.

Ключевые слова: экспериментальный пародонтит; плазмолифтинг; цитокины; системный и локальный иммунный ответ

Для цитирования: Фефелов А.А., Цыбиков Н.Н., Терешков П.П., Фефелова Е.В. Системные и локальные иммунологические эффекты плазмолифтинга в модели экспериментального пародонтита у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(3): 68–75.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.68-75

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Цыбиков Н.Н.; сбор и обработка материала – Фефелов А.А., Терешков П.П.; подготовка иллюстративного материала – Фефелова Е.В.; статистическая обработка – Фефелова Е.В.; написания текста – Фефелов А.А. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Фефелов Александр Александрович, e-mail: thedantists@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 26.03.2023

Принята к печати 12.07.2023

Опубликована 20.09.2023

Fefelov A.A.¹, Tsybikov N.N.², Tereshkov P.P.², Fefelova E.V.²**Systemic and local immunological effects of plasmolifting in a rat model of periodontitis**¹Regional Dental Polyclinic,
Ugdanskaya St. 8, Chita, 672027, Russian Federation;²Chita State Medical Academy,
Gorkogo St. 39a, Chita, 672000, Russian Federation

Introduction. Elucidation of the mechanisms that contribute to restoration of the immune response following plasmolifting in patients with chronic periodontitis will allow prevention of early atherosclerosis, rheumatoid arthritis, and other pathological processes that share the main pathogenetic component with periodontitis.

Aim: evaluating systemic and local immune effects of plasmolifting in a rat model of periodontitis.

Methods. Experimental periodontitis was induced in male Wistar rats aged 18-20 weeks and weighing 200.0±31.5 g at baseline. Periodontitis was modeled by detaching the gums with a spear-headed scalpel tip (sz. 11) in combination with injections of 10% ethanol with 0.25% Novocain for 7 days. Four groups (a control group and 3 experimental groups) of 10 rats each were used: group 1, rats with experimental periodontitis not receiving therapy; group 2, rats with experimental periodontitis injected with plasma (three 50- μ l microinjections every third day, locally, into the alveolar bone area, 2 mm below the gingival margin between the right side of the maxillary first and second molars); group 3, rats with experimental periodontitis treated by application of Diplon films with metronidazole and chlorhexidine active ingredients for 10 days.

Results. On day 10 of experimental periodontitis, the inflammatory process was clinically and histologically detected. The inflammation was associated with a sharp increase in cytokines that was more pronounced in tissue homogenates. The use of the plasmolifting procedure as well as a standard therapy was manifested by a decrease in fibrin deposits, sanitation of the periodontal pocket, and formation of a secondary periodontal attachment. A restriction of the infiltration zone, and a decrease in cytokines were noted. Also, the therapeutic effect of plasmolifting was more pronounced.

Conclusions. Experimental periodontitis is accompanied by the clinical and morphological picture of inflammation and increases in concentrations of both pro- and anti-inflammatory cytokines, that are more pronounced in tissue homogenates. Plasmolifting not only reduces the local inflammatory response of tissues to experimental periodontitis, but also alleviates the intensity of the systemic inflammatory process. However, none of the therapies provided achievement of the intact animal status.

Keywords: experimental periodontitis; plasmolifting; cytokines; systemic and local immune response

For citation: Fefelov A.A., Tsybikov N.N., Tereshkov P.P., Fefelova E.V. Systemic and local immunological effects of plasmolifting in a rat model of periodontitis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(3): 68–75. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.68-75

Author's contribution: concept and design of the study – Tsybikov N.N.; collection and processing of material – Fefelov A.A., Tereshkov P.P.; preparation of illustrative material – Fefelova E.V.; statistical processing – Fefelova E.V.; text writing – Fefelov A.A. Approval of the final version of the article – all authors.

For correspondence: **Aleksandr A. Fefelov**, dentist, surgeon, periodontist, Regional Dental Polyclinic, Ugdanskaya St. 8, Chita, 672027, Russian Federation, e-mail: thedentists@mail.ru

Information about the authors:Fefelov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-1272-5610>Tsybikov N.N., <https://orcid.org/0000-0002-0975-2351>Tereshkov P.P., <https://orcid.org/0000-0002-8601-3499>Fefelova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-0724-0352>**Financing.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 26.03.2023

Accepted 12.07.2023

Published 20.09.2023

Хронический пародонтит считается остеоиммунным заболеванием полости рта, клинически проявляющимся поражением пародонтального аппарата зуба, с прогрессирующей деструкцией и потерей зубов [1]. Показано, что и хронический воспалительный процесс, и агрессивное течение заболевания обусловлены извращенной иммунологической реакцией

[2]. Поэтому необходимым компонентом в составе комплексного пародонтологического лечения многие авторы называют коррекцию местного и общего иммунитета у больных хроническим пародонтитом [3].

Основная цель нехирургического лечения пародонтита состоит не только в достижении длительного контроля над воспалительным процессом, но и восстанов-

ление тканей пародонта, за счет формирования нового соединительнотканного прикрепления [4].

Knighton D.R. и соавторы в 1986 г. показали эффективность использования тромбоцитарной массы для лечения труднозаживающих кожных язв [5]. Это легло в основу лечения плазмой, содержащей тромбоциты (PRP). Однако, кроме тромбоцитов, плазма содержит лейкоциты, огромное количество биологически активных веществ, в том числе и факторов роста регулирующих пролиферацию, адгезию, миграцию и клеточную дифференцировку ряда клеток пародонта [6].

Выяснение механизмов, ответственных за восстановление иммунного ответа при проведении плазмолифтинга у больных, страдающих хроническим пародонтитом, относится к первоочередной задаче, так как позволит профилактировать и раннее развитие атеросклероза, и ревматоидного артрита, и других патологических процессов, имеющих сходное с пародонтитом основное звено патогенеза.

Цель исследования: оценить системные и локальные иммунологические эффекты плазмолифтинга в модели экспериментального пародонтита у крыс.

Методика

У самцов крыс Wistar в возрасте 18–20 нед (начальная средняя масса 200,0±31,5) моделировали пародонтит. Животные находились в условиях 12-часового цикла свет-темнота при 23 ± 3 °C и свободном доступе к пище и воде. Эксперимент проводился в соответствии с национальными рекомендациями для ухода и использования лабораторных животных. Исследование одобрено этическим Комитетом ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия».

Были сформированы 4 группы по 10 особей в каждой: одна контрольная группа и 3 опытные:

В 1-ю опытную группу были включены животные с экспериментальным пародонтитом, не получающие терапии. 2-ю – крысы с экспериментальным пародонтитом, получающие инъекции плазмы (3 инъекции через 3 сут каждая). У животных брали кровь из подключичной вены в количестве 1 мл, с последующим центрифугированием 10 мин при 1500 об/мин и получением плазмы, содержащей тромбоциты. Плазму, в объеме 50 мкл, вводили, используя микрошприц, локально в область альвеолярной кости, на 2 мм ниже десневого края между правой стороной первого и второго моляров верхней челюсти. Группа 3-я – животные с индуцированным пародонтитом, леченным пленками фирмы «Диплен» с активными действующими компонентами «Метронидазолом» и «Хлоргексидином» (курс процедур 10 сут).

Для исключения влияния стресса, вызванного процедурой взятия крови или введения плазмы, у животных контрольной группы, 2-й и 3-й опытных групп была взята кровь, а в пародонт инъектировали физиологический раствор с использованием той же техники и дозировки, что и у крыс 2-й опытной группы.

Пародонтит моделировали путем отслойки десны концом копьевидного скальпеля (№ 11) в сочетании с инъекциями 10% раствора этилового спирта с 0,25% раствором новокаина в течении 7 сут [7].

Состояние пародонта оценивали в баллах:

0 – здоровая десна;

1 балл – воспаление легкой степени тяжести, сопровождающееся небольшим отеком, незначительным изменением цвета и отсутствием кровотечения при зондировании;

2 балла – воспаление средней степени тяжести, проявляющееся отеком, шелушением и покраснением, а также кровоточивостью при зондировании;

3 балла – воспаление тяжелой степени с выраженной гиперемией, наличием язв и отека пародонта, а также сильного кровотечения при зондировании.

Ткани экспериментальных животных использовались для оценки уровня цитокинов в гомогенатах тканей, а также для проведения гистологического и иммуногистохимического исследования. Для приготовления парафиновых срезов ткани после фиксации в 4% формальдегиде (pH 7,5) декальцинировали в 0,5 М растворе ЭДТА-Na (pH 7,5–8,0) в течении 4 нед и после стандартной обработки заливали в парафин и готовили срезы на уровне резцов обеих челюстей, окрашивали гематоксилин-эозином. или Для иммуногистохимического исследования применяли стрептавидин-биотин-пероксидазный метод [8] с использованием кроличьих моноклональных антител (SP7) (abcam, 16669, Кембридж, Великобритания) в разведении 1:100.

Оценка гистологической картины воспалительного процесса в пародонте также осуществлялась в баллах:

Оценка	Степень поражения
0 баллов	Отсутствуют признаки воспаления
1 балл	Отмечается лишь незначительная гиперплазия десневого эпителия и воспалительная клеточная инфильтрация.
2 балла	Присутствует легкая гиперплазия десневого эпителия, отек, воспалительная клеточная инфильтрация, небольшое нарушение пародонтальной связки.
3 балла	Регистрируются эрозии и изъязвления десневого эпителия, умеренная инфильтрация тканей пародонта воспалительными клетками.
4 балла	Наблюдаются эрозии и изъязвления десневого эпителия, сильная воспалительная реакция.

Для оценки уровня цитокинов, забранные образцы тканей взвешивали, добавляли к ним фосфатный буфер в соотношении 1:10, затем гомогенизировали ультразвуком и центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Супернатант хранили при температуре -80°C .

Концентрации цитокинов (IL 1β , IL 17α , IL 10, IL 6, TNF α , INF γ) определяли в сыворотке крови и гомогенатах тканей пародонта с помощью системы мультиплексного анализа «Rat Inflammation Panel» соответствующих аналитов для крыс («Biolegend» (США).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием однофакторного дисперсионного анализа Крускал-Уоллисса. Результаты в таблицах представлены как медиана (Me) и (25; 75) процентиль. Статистическую значимость различий между группами (p) оценивали при помощи попарных сравнений Двасса-Стила-Кричлоу-Флигнера. Значимыми считали данные при количественной характеристике случайностей (p -значение) не более 0,05.

Результаты

В контрольной группе животных отсутствовали как клинические проявления пародонтита, так и гистологические признаки воспаления в тканях пародонта (рис. 1).

В 1-е сут индуцированного пародонтита ткани полости рта экспериментальных групп сохраняли здоровый вид, гладкую консистенцию и светло-розовый цвет. Свободный край десны имел четкий, повторяющийся цементно-эмалевое соединение соседних зубов, контур, а прикрепленная десна была прочно соеди-

нена с подлежащими структурами. На 10-е сут в месте хронической механической травмы пародонт приобрел цианотичный оттенок, со значительным отеком в очаге повреждения. Свободный край десны при этом приобрел неровные очертания, между зубами появились остатки пищи.

Гистологическая картина соответствовала клинической – отмечалось наличие пародонтального кармана, выраженная инфильтрация тканей лейкоцитами, макрофагами, фибробластами. Обращало внимание утолщение слоя эпителия десны, разрушение пародонта и резорбция костных балок альвеол (рис. 2).

Применение процедуры плазмолифтинга, а также стандартной терапии проявлялось уменьшением фибриновых наложений, санацией пародонтального кармана, формированием вторичного пародонтального прикрепления. Отмечалось ограничение зоны инфильтрации [9]. Однако терапевтический эффект плазмолифтинга был более выраженным (табл. 1).

Для оценки изменения системной воспалительной реакции нами проводилась оценка уровней про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови (табл. 2) и гомогенатах ткани (табл. 3).

Показатели биологически активных веществ в сыворотке крови и гомогенатах тканей у интактных животных в целом совпадают. При развитии патологического процесса уровень изучаемых веществ значимо растет, причем в тканях он превышает показатели сыворотки крови. Так, максимальный рост как в сыворотке крови, так и тканях зафиксирован со

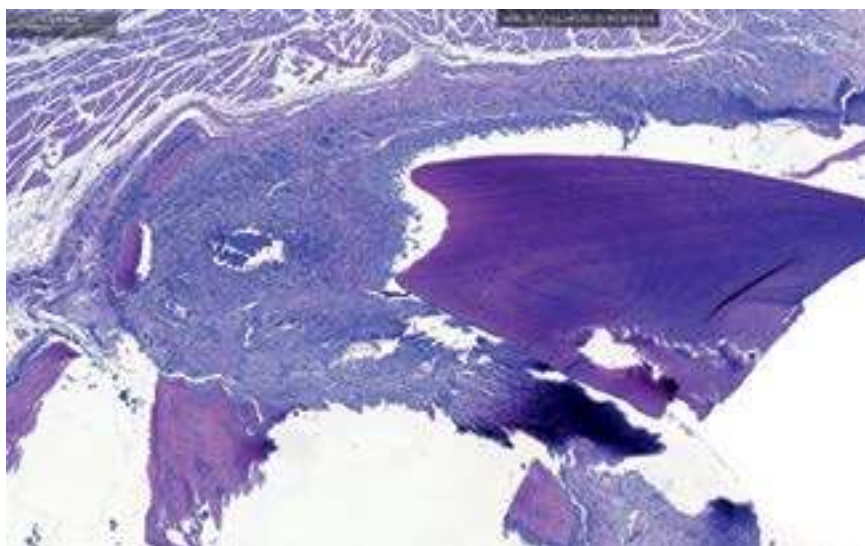


Рис. 1. Пародонт 1-е сут эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином; ув. 400. Фото автора.

Fig. 1. Periodontium on the 1st day of the experiment. Hematoxylin-eosin staining; magnification 400. Author's photo.

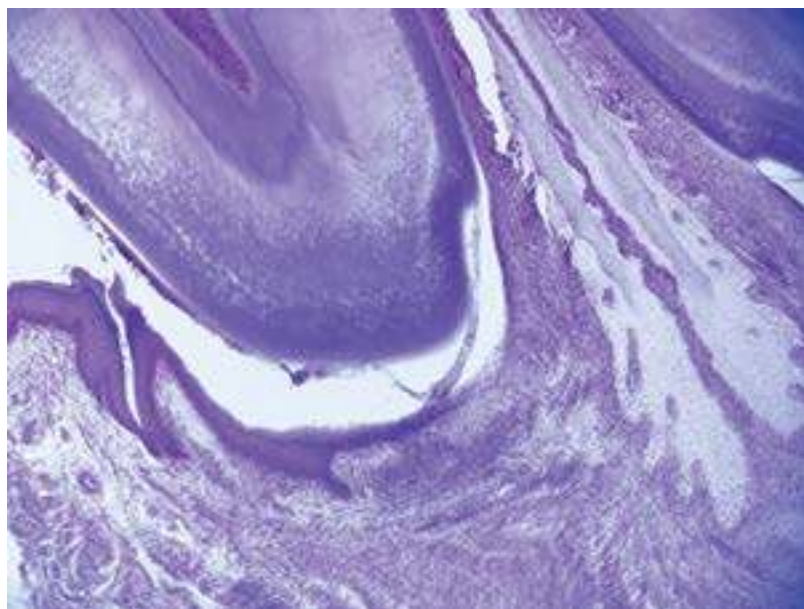


Рис. 2. Пародонт на 10-е сут эксперимента. Окраска гематоксилин-эозином; ув. 400.

Fig. 2. Periodontium on the 10th day of the experiment. Hematoxylin-eosin staining; magnification 400.

Таблица 1/Table 1

Оценка воспалительного процесса у крыс с индуцированным пародонтитом на фоне терапии

Evaluation of the inflammatory process in rats with induced periodontitis during therapy

Показатели/группы Indicators, groups	Клиническая оценка воспалительного процесса, баллы Clinical assessment of the inflammatory process, scores	Подвижность зубов, баллы Tooth mobility, scores	Гистологическая оценка воспалительного процесса, баллы Histologic evaluation of the inflammatory process, scores
Контрольная группа Control group	0±0	0±0	0±0
1-я опытная группа 1 st experimental group	2,89±0,61 <i>p</i> 1=0,016	1,82±0,20 <i>p</i> 1=0,016	2,95±0,22 <i>p</i> 1=0,015
2-я опытная группа до начала терапии 2 nd experimental group before therapy	2,90±0,57 <i>p</i> 1=0,016	1,82±0,21 <i>p</i> 1=0,016	2,97±0,20 <i>p</i> 1=0,016
2-я опытная группа через 10 сут от начала терапии 2 nd experimental group after 10 days from the beginning of therapy	0,19±0,13 <i>p</i> 1=0,011 <i>p</i> 3=0,005	0,79±0,52 <i>p</i> 1=0,011 <i>p</i> 3=0,005	1,05±0,32 <i>p</i> 1=0,01 <i>p</i> 3=0,005
3-я опытная группа до начала терапии 3 rd experimental group before therapy	2,87±0,67 <i>p</i> 1=0,016	1,85±0,23 <i>p</i> 1=0,016	2,31±0,21 <i>p</i> 1=0,016
3-я опытная группа через 10 сут от начала терапии 3 rd experimental group after 10 days from the beginning of therapy	1,88±0,22 <i>p</i> 1=0,012 <i>p</i> 2=0,003 <i>p</i> 3=0,016	1,51±0,17 <i>p</i> 1=0,013 <i>p</i> 2=0,008 <i>p</i> 3=0,076	1,46±0,23 <i>p</i> 1=0,011 <i>p</i> 2=0,084 <i>p</i> 3=0,007
Тест Крускал-Уоллиса	X ² =40,1, <i>p</i> <0,001	X ² =37,1, <i>p</i> <0,001	X ² =40,7, <i>p</i> <0,001

Примечание. *p*1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой контроля, *p*2 – по сравнению с группой животных с экспериментальным пародонтитом, получающих плазмолифтинг, *p*3 – по сравнению с началом и окончанием терапии.

Note. *p*1 – the level of statistical significance of differences compared with the control group, *p*2 – compared with the group of animals with experimental periodontitis receiving plasmolifting, *p*3 – compared with the beginning and end of therapy.

стороны TNF α – в 163 ($p=0,0001$) и 479 ($p=0,0001$) раз, IFN γ – в 167 ($p=0,0001$) и 200 раз ($p=0,0001$), IL 1 β – в 61 ($p=0,0001$) и 440 раз ($p=0,0001$), IL 10 – в 53 ($p=0,0001$) и 330 ($p=0,0001$), IL 17 α – в 47 ($p=0,0001$) и 75 раз ($p=0,001$) соответственно. Содержание IL 6 также возросло в сыворотке крови – в 11,6 раз ($p=0,0001$) и в 40 раз в тканях крыс с индуцированным пародонтитом ($p=0,0001$). Полученные данные свидетельствуют о превалировании местных признаков воспаления над системными у крыс с индуцированным пародонтитом. Однако, высокие показатели цитокинов в кровотоке являются не просто свидетелями типового патологического процесса, а мощными стимуляторами иммунного ответа, факторами, вызывающими повреждение эндотелия, индукторами коагуляционных каскадов, активаторами апоптоза и т.д., что в результате может привести к полиорганному поражению [11-12].

Обсуждение

На фоне проводимой терапии наблюдается снижение концентрации изучаемых веществ одновременно и в сыворотке крови, и гомогенатах тканей. Однако ни один вид терапии не сопровождается достижением цифр интактных животных, что свидетельствует о наличии не разрешившегося воспалительного процесса. Более выраженное снижение уровней цитокинов отмечено при лечении экспериментальных животных методом плазмолифтинга.

J. Hudgens и соавт. в 2016 г. продемонстрировали, что в богатой тромбоцитами плазме из 34 проанализированных ими белков, играющих роль в процессе воспаления, 26 имели значительно более высокий уровень, включая CCL2, CCL20, CXCL5, IL1 α , IL1 β , IL6, IL10, PDGF-AA и TNF α [10]. S. Luo и соавт. убе-

Таблица 2/Table 2

Оценка уровней цитокинов в сыворотке крови у крыс с индуцированным пародонтитом на фоне терапии

Assessment of serum cytokine levels in rats with induced periodontitis during therapy

Показатели/группы Indicators, groups	IL 1 β , пг/мл IL 1 β , pg/mL	IL 6, пг/мл IL 6 β , pg/mL	IL 10, пг/мл IL 10, pg/mL	IL 17 α , пг/мл IL 17 α pg/mL	TNF α , пг/мл TNF α , pg/mL	IFN γ , пг/мл pg/mL
Контрольная группа Control group	23,8 (22,8;24,7)	191,0 (167,0;204,4)	37,8 (34,9; 39,1)	25,2 (21,3;35,9)	11,9 (11,2;12,5)	11,1 (10,3;11,6)
1-я опытная группа в начале эксперимента 1 st experimental group at the beginning of the experiment	1460,0 (1005,0;3488,1) $p1=0,0001$	2208,1 (1451,1;2851,1) $p1=0,0001$	2010,0 (806,0; 4492,0) $p1=0,0001$	1205,1 (898,1; 1883,2) $p1=0,0001$	1948,2 (1733,0; 2677,1) $p1=0,0001$	1862,4 (1589,6; 2310,6) $p1=0,0001$
1-я опытная группа через 10 сут. от начала эксперимента 1 st experimental group after 10 days from the beginning of the experiment	1399,0 (986,3;3488,1) $p1=0,0001$ $p3=0,9$	2111,1 (1352,1;2981,1) $p1=0,0001$ $p3=0,89$	1987,0 (815,01 3297,0) $p1=0,0001$ $p3=0,88$	1186,1 (908,1; 2133,4) $p1=0,0001$ $p3=0,9$	1762,6 (1234,0; 2985,1) $p1=0,0001$ $p3=0,8$	1635,4 (1432,6; 2516,7) $p1=0,0001$ $p3=0,8$
2-я опытная группа через 10 сут. от начала терапии 2 nd experimental group after 10 days from the beginning of therapy	57,3 (38,8;67,2) $p1=0,0001$ $p3=0,0001$	244,0 (225,0; 250,0) $p1=0,0001$ $p3=0,0001$	40,7 (39,4;50,9) $p1=0,01$ $p3=0,0001$	49,2 (43,6;51,4) $p1=0,0001$ $p3=0,0001$	41,8 (29,9;51,0) $p1=0,0001$ $p3=0,0001$	38,9 (26,3;50,8) $p1=0,0001$ $p3=0,0001$
3-я опытная группа через 10 сут от начала терапии 3 rd experimental group after 10 days from the beginning of therapy	223,0 (169,0; 307,0) $p1=0,0001$ $p2=0,0001$ $p3=0,001$	257,0 (242,0; 279,0) $p1=0,0001$ $p2=0,064$ $p3=0,002$	115,0 (99,0; 157,0) $p1=0,014$ $p2=0,0001$ $p3=0,02$	202,0 (179,0; 230,0) $p1=0,0001$ $p2=0,0001$ $p3=0,003$	173 (104,0; 237,0) $p1=0,0001$ $p2=0,0001$ $p3=0,001$	137,0 (73,7; 182,0) $p1=0,0001$ $p2=0,0001$ $p3=0,001$
Тест Крускал-Уоллиса Kruskal-Wallis test	$X^2=72,3$ $p<0,001$	$X^2=68,2$ $p<0,001$	$X^2=68,4$ $p<0,001$	$X^2=72,0$ $p<0,001$	$X^2=74,0$ $p<0,001$	$X^2=72,0$ $p<0,001$

Примечание. $p1$ – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой контроля, $p2$ – по сравнению с группой животных с экспериментальным пародонтитом, получающих плазмолифтинг, $p3$ – по сравнению с началом и окончанием терапии.

Note. $p1$ – the level of statistical significance of differences compared with the control group, $p2$ – compared with the group of animals with experimental periodontitis receiving plasmolifting, $p3$ – compared with the beginning and end of therapy.

Таблица 3 / Table 3

Оценка уровней цитокинов в гомогенатах ткани крыс с индуцированным пародонтитом на фоне терапии

Evaluation of cytokine levels in tissue homogenates of rats with induced periodontitis during therapy

Показатели, группы Indicators, groups	IL 1 β, пг/мл IL 1 β, pg/mL	IL 6, пг/мл IL 6 β, pg/mL	IL 10, пг/мл IL 10, pg/mL	IL 17α, пг/мл IL 17α pg/mL	TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	IFN γ, пг/мл pg/mL
Контрольная группа Control group	22,4 (21,2;23,7)	207,0 (199,0;214,0)	38,0 (34,9;40,2)	41,4 (36,8;46,0)	11,7 (11,0;12,1)	10,6 (8,62;11,6)
1-я опытная группа в начале эксперимента 1 st experimental group at the beginning of the experiment	9870,0 (5710,0;15800,0) <i>p</i> 1=0,0001	7920,1 (5230,0;11610,0) <i>p</i> 1=0,0001	12670,0 (7770,0;34400,0) <i>p</i> 1=0,0001	3110,0 (2430,0;4170,0) <i>p</i> 1=0,0001	5600,0 (4930,0;6020,0) <i>p</i> 1=0,0001	2080,0 (1480,0;6020,0) <i>p</i> 1=0,0001
1-я опытная группа через 10 сут. от начала эксперимента 1 st experimental group after 10 days from the beginning of the experiment	10090,0 (5891,0;14832,0) <i>p</i> 1=0,0001 <i>p</i> 3=0,9	8090,1 (5671,0;12038,1) <i>p</i> 1=0,0001 <i>p</i> 3=0,89	13000,0 (8190,1;29976,0) <i>p</i> 1=0,0001 <i>p</i> 3=0,88	3120,1 (2514,1;4356,0) <i>p</i> 1=0,0001 <i>p</i> 3=0,9	5680,2 (5092,2;6212,2) <i>p</i> 1=0,0001 <i>p</i> 3=0,8	2100,3 (1345,3; 7103,3) <i>p</i> 1=0,0001 <i>p</i> 3=0,8
2-я опытная группа через 10 сут. от начала терапии 2 nd experimental group after 10 days f rom the beginning of therapy	67,0 (52,4;96,0) <i>p</i> 1=0,0001 <i>p</i> 3=0,0001	239,0 (232,0; 257,0) <i>p</i> 1=0,0001 <i>p</i> 3=0,0001	40,5 (38,5;46,7) <i>p</i> 1=0,04 <i>p</i> 3=0,0001	49,8 (47,2;52,4) <i>p</i> 1=0,0001 <i>p</i> 3=0,0001	46,3 (34,6;62,8) <i>p</i> 1=0,0001 <i>p</i> 3=0,0001	32,3 (24,7;49,3) <i>p</i> 1=0,0001 <i>p</i> 3=0,0001
3-я опытная группа через 10 сут от начала терапии 3 rd experimental group after 10 days from the beginning of therapy	215,0 (154,0; 342,0) <i>p</i> 1=0,0001 <i>p</i> 2=0,0001 <i>p</i> 3=0,001	261,0 (251,0; 409,0) <i>p</i> 1=0,0001 <i>p</i> 2=0,064 <i>p</i> 3=0,005	156,0 (107,0; 153,0) <i>p</i> 1=0,037 <i>p</i> 2=0,0001 <i>p</i> 3=0,02	202,0 (182,0; 237,0) <i>p</i> 1=0,0001 <i>p</i> 2=0,0001 <i>p</i> 3=0,003	174,0 (92,1; 257,0) <i>p</i> 1=0,0001 <i>p</i> 2=0,0001 <i>p</i> 3=0,001	130,0 (77,9; 145,0) <i>p</i> 1=0,0001 <i>p</i> 2=0,0001 <i>p</i> 3=0,001
Тест Крускал-Уоллиса Kruskal-Wallis test	X ² =73,7 <i>p</i> <0,001	X ² =65,8 <i>p</i> <0,001	X ² =68,2 <i>p</i> <0,001	X ² =68,7 <i>p</i> <0,001	X ² =71,6 <i>p</i> <0,001	X ² =69,9 <i>p</i> <0,001

Примечание. *p*1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с группой контроля, *p*2 – по сравнению с группой животных с экспериментальным пародонтитом, получающих плазмолифтинг, *p*3 – по сравнению с началом и окончанием терапии.

Note. *p*1 – the level of statistical significance of differences compared with the control group, *p*2 – compared with the group of animals with experimental periodontitis receiving plasmolifting, *p*3 – compared with the beginning and end of therapy.

дительно продемонстрировали, что введение в зону воспаления тромбоцитов, уменьшает выраженность воспалительный процесс [13]. Известно, что число тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме может превышать 3 000 000 в 1 мкл, при этом их количество в периферической крови составляет в среднем 550 тыс. в 1 мкл [14]. Белые кровяные тельца в системном воспалительном процессе выступают как посредники между сосудистой системой, гемостазом и иммунной системой, снижая степень его выраженности.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что плазмолифтинг не только ослабляет местную воспалительную реакцию тканей при

экспериментальном пародонтите, но и снижает напряженность системного воспалительного процесса.

Выводы

1. Индуцированный пародонтит сопровождается развитием клинической и морфологической картины воспаления, а также ростом концентраций цитокинов – как про-, так и противовоспалительных биологически активных веществ, более выраженным в гомогенатах тканей.

2. Проводимая терапия приводит к снижению клинической картины воспаления, уменьшению напряженности и локального, и системного иммунного статуса,

проявляющееся снижением концентрации изучаемых веществ одновременно и в сыворотке крови и в гомогенатах тканей. Однако, ни один из видов терапии не обеспечивал достижения статуса интактных животных.

Литература

(п.п. 1; 5-6; 8; 10, 13-14 см. References)

2. Фефелова Е.В., Терешков П.П., Дутов А.А., Цыбиков Н.Н. Некоторые показатели иммунной системы при экспериментальной гипергомоцистеинемии. *Иммунология*. 2015; 36(5): 280-3.
3. Румянцев В.А., Авакова Д.Р., Блинова А.В. Модуляция иммунного ответа в пародонтологии и имплантологии: потенциал противовоспалительной, антибактериальной терапии и перспективные лекарственные формы. Обзор литературы. *Пародонтология*. 2019; 24(4): 372-7.
4. Шишкова Ю.С., Филимонова О.И., Емелина А.С. и др. Изучение влияния богатой тромбоцитами аутоплазмы на иммунный статус полости рта пациентов с несъемными зубными протезами. *Российский иммунологический журнал*. 2017; 20(3): 577-9.
7. Кривошеева Е.М., Фефелова Е.В., Сепп А.В., Бородулина И.И., Бородулина Н.В. Эффективность адаптогенов при экспериментальном пародонтите на фоне гипергомоцистеинемии. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2010; 3(73): 221-5.
9. Фефелов А.А., Цыбиков Н.Н., Фефелова Е.В. Оценка эффективность плазмолифтинга в модели экспериментального пародонтита. В сборнике: *Актуальные проблемы патофизиологии. Сборник научных статей Международной научно-практической конференции. Под общей редакцией Н.В. Ларёвой*. Чита, 2022: 152-7.
11. Цыбиков Н.Н., Фефелова Е.В., Терешков П.П., Измestьев С.В. Дисфункция эндотелия при экспериментальной гипергомоцистеинемии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2016; 60(3): 42-6.
12. Путнева А.С., Караваяева Т.М., Фефелова Е.В., Цыбиков Н.Н., Мищенко М.Н., Максимиеня М.В. и др. Содержание некоторых противомикробных и регуляторных пептидов в смешанной слюне у лиц с кариесом в зависимости от уровня витамина D. *Забайкальский медицинский вестник*. 2021; (3): 19-26.
3. Rumyantsev V.A., Avakova D.R., Blinova A.V. Modulation of the immune response in periodontology and implantology: the potential of anti-inflammatory, antibacterial therapy and promising dosage forms. Literature review. *Parodontologiya*. 2019; 24(4): 372-7. (in Russian)
4. Shishkova Yu.S., Filimonova O.I., Emelina A.S., et al. Study of the effect of platelet-rich autoplasm on the immune status of the oral cavity of patients with fixed dentures. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal*. 2017; 20(3): 577-9. (in Russian)
5. Knighton D.R., Ciresi K.F., Fiegel V.D., Austin L.L., Butler E.L. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg*. 1986; 204(3): 322-30. doi: 10.1097/0000658-198609000-00011
6. Crisci A., De Crescenzo U., Crisci M. Platelet-rich concentrates (L-PRF, PRP) in tissue regeneration: Control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *J. Clin. Mol. Med*. 2018, 1, 1000116.
7. Krivosheeva E.M., Fefelova E.V., Sepp A.V., Borodulina I.I., Borodulina N.V. The effectiveness of adaptogens in experimental periodontitis against the background of hyperhomocysteinemia. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2010; 3(73): 221-5. (in Russian)
8. Bancroft J.D., Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques; Elsevier Health Sciences: Amsterdam, The Netherlands. *Immunohistochemical techniques*. 2008; 433-72.
9. Fefelov A.A., Tsybikov N.N., Fefelova E.V. Evaluation of the effectiveness of plasmolifting in the model of experimental periodontitis. In the collection: Actual problems of pathophysiology. *Collection of scientific articles of the International scientific-practical conference. [Sbornik nauchnykh statey Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii]*. Under the general editorship of N.V. Lareva. Chita, 2022: 152-7. (in Russian)
10. Hudgens J.L., Sugg K.B., Grekin J.A., Gumucio J.P., Bedi A., Mendias C.L. Platelet-Rich Plasma Activates Proinflammatory Signaling Pathways and Induces Oxidative Stress in Tendon Fibroblasts. *Am J Sports Med*. 2016 Aug;44(8):1931-40. doi: 10.1177/0363546516637176
11. Tsybikov N.N., Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Izmestiev S.V. Endothelial dysfunction in experimental hyperhomocysteinemia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2016; 60(3): 42-6. (in Russian)
12. Putneva A.S., Karavaeva T.M., Fefelova E.V., Tsybikov N.N., Mishchenko M.N., Maksimenya M.V., Tereshkov P.P. The content of some antimicrobial and regulatory peptides in mixed saliva in persons with caries depending on the level of vitamin D. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik*. 2021; 3: 19-26. (in Russian)
13. Luo S., Wang Y., An Q., Chen H., Zhao J., Zhang J., et al. Platelets protect lung from injury induced by systemic inflammatory response. *Sci rep*. 2017 Feb 3; 7: 42080. doi: 10.1038/srep42080
14. Carmagnola D., Pellegrini G., Dellavia C., Rimondini L., Varoni E. Tissue engineering in periodontology: Biological mediators for periodontal regeneration. *Int J Artif Organs*. 2019; 42(5): 241-57. doi: 10.1177/0391398819828558

References

1. Kinane D.F., Stathopoulou P.G., Papapanou P.N. periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3: 17038. 10.1038/nrdp.2017.38
2. Fefelova E.V., Tereshkov P.P., Dutov A.A., Tsybikov N.N. Some indicators of the immune system in experimental hyperhomocysteinemia. *Immunologiya*. 2015; 36(5): 280-3. (in Russian)

Сведения об авторах:

Фефелов Александр Александрович, врач-стоматолог, хирург, пародонтолог, ГАУЗ «Краевая стоматологическая поликлиника», e-mail: thedantists@mail.ru;

Цыбиков Намжил Намзатович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: thybikov@mail.ru;

Терешков Павел Петрович, канд. мед. наук, зав. лаб. экспериментальной и клинической биохимии и иммунологии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: tpp6915@mail.ru;

Фефелова Елена Викторовна, доктор мед. наук, доцент, проф., каф. патофизиологии ФГБОУ ВО ЧГМА, e-mail: fefelova.elena@mail.ru

© Коллектив авторов, 2023

УДК 576.32/.36

Яковлева М.А.¹, Островский Д.С.², Хубецова М.Х.², Борзенко С.А.², Фельдман Т.Б.^{1,3}, Островский М.А.^{1,3}

Изучение цитотоксичных свойств неокисленных и окисленных бисретиноидов липофусциновых гранул в клетках ретинального пигментного эпителия

¹ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля», РАН, 119334, Москва, Россия, ул. Косыгина, д. 4;

²ФГАУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. С.Н. Федорова, 127486, Москва, Россия, Бескудниковский бульвар, д. 59 а;

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119234, Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1

Введение. Липофусциновые гранулы (ЛГ) в клетках ретинального пигментного эпителия (РПЭ) глаза человека содержат бисретиноиды – флуорофоры, способные при поглощении видимого света генерировать активные формы кислорода с образованием, в конечном итоге, окисленных продуктов (окси-БисРет). В состав окси-БисРет входят альдегиды и кетоны, способные диффундировать из ЛГ в цитоплазму клетки РПЭ и оказывать на неё токсическое действие уже в отсутствие света.

Цель исследования – изучение механизмов развития апоптоза при цитотоксическом воздействии активных соединений, входящих в составе ЛГ на клетки РПЭ после их облучения видимым светом и последующей темновой адаптации.

Методика. Были проведены эксперименты по исследованию цитотоксичных свойств окси-БисРет в темновых условиях с использованием клеточной культуры АРПЭ-19, нагруженной ЛГ. Для поставленной цели применяли следующие методы – определение жизнеспособности, МТТ-тест, ДНК-кометы, флуоресцентный анализ, ВЭЖХ-анализ, проведение иммуногистохимии (апоптоз: каспаза7, каспаза8, BAX).

Результаты. Сравнительный анализ исходных и предварительно облученных видимым светом образцов показал, что в обоих случаях в клетках РПЭ после темновой адаптации в течение 4 сут запускается апоптоз. Он проходит как по митохондриальному, так и по каспазному пути, однако в случае предварительно облученных образцов с более высоким содержанием окси-БисРет этот процесс проходит заметно интенсивнее.

Заключение. Таким образом, можно предположить, что окси-БисРет оказывают цитотоксическое воздействие на клетку РПЭ в отсутствие света и могут рассматриваться как усугубляющий фактор прогрессирования возрастной макулярной дегенерации.

Ключевые слова: липофусциновые гранулы; культура клеток АРПЭ-19; бисретиноиды; продукты фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов; апоптоз

Для цитирования: Яковлева М.А., Островский Д.С., Хубецова М.Х., Борзенко С.А., Фельдман Т.Б., Островский М.А. Изучение цитотоксичных свойств неокисленных и окисленных бисретиноидов липофусциновых гранул в клетках ретинального пигментного эпителия. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(3): 76–87.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.76-87

Участие авторов: подготовка образцов, проведение хроматографического анализа, участие в обсуждении результатов и написании статьи – Яковлева М.А.; проведение экспериментов на клетках, участие в обсуждении результатов и написании статьи – Островский Д.С.; подготовка биологических объектов кадаверных глаз человека для дальнейшего анализа – Хубецова М.Х.; участие в обсуждении планирования эксперимента, обсуждение результатов и написании статьи – Борзенко С.А.; участие в обсуждении планирования эксперимента, обсуждение результатов и написании статьи – Фельдман Т.Б.; участие в обсуждении планирования эксперимента, обсуждение результатов и написании статьи – Островский М.А. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Яковлева Марина Андреевна, e-mail: lina.invers@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22–24–00549).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.05.2023

Принята к печати 12.07.2023

Опубликована 20.09.2023

Yakovleva M.A.¹, Ostrovsky D.S.², Khubetsova M.Kh.², Borzenok S.A.², Feldman T.B.^{1,3}, Ostrovsky M.A.^{1,3}

Study of the cytotoxic properties of non-oxidized and oxidized bisretinoids of lipofuscin granules in retinal pigment epithelial cells

¹Emanuel Institute of Biochemical Physics, Kosygina St. 4, Moscow, 119334, Russian Federation;

²Fedorov National Medical Research Center «Eye Microsurgery», Beskudnikovskiy Blvd. 59a, Moscow, 127486, Russian Federation;

³Biology School, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1, Moscow, 119234, Russian Federation

Lipofuscin granules (LG) in the cells of the human retinal pigment epithelium (RPE) contain bisretinoids. These fluorophores are capable of generating reactive oxygen species upon absorption of visible light, and this results ultimately in the formation of oxidized products (oxy-BisRet). Oxy-BisRet contains aldehydes and ketones, which can diffuse from the LG into the RPE cell cytoplasm and there have a toxic effect, even in the absence of light.

The aim of this study was to determine the mechanisms of apoptosis that results from the cytotoxic effect of active compounds included into LG on RPE cells following their irradiation with visible light and subsequent dark adaptation.

Methods. Experiments were carried out to study the cytotoxic properties of oxy-BisRet under dark conditions by using cultured ARPE-19 cells loaded with LG. The following methods were used: determination of viability, MTT test, DNA comets, fluorescent analysis, HPLC analysis, immunohistochemistry for apoptosis, caspase 7, caspase 8, and BAX.

Results. A comparative analysis of the control samples and those pre-irradiated with visible light showed that in both cases, apoptosis was triggered in RPE cells after dark adaptation within 4 days. Apoptosis took either the mitochondrial or caspase pathways; however, in pre-irradiated samples with a higher content of oxy-BisRet, this process was noticeably more intense.

Conclusion. Thus, oxy-BisRet has a cytotoxic effect on RPE cells in the absence of light and can be considered an aggravating factor in the progression of age-related macular degeneration.

Keywords: lipofuscin granules; ARPE-19 cell culture; bisretinoids; products of photooxidation and photodegradation of bisretinoids; apoptosis

For citation: Yakovleva M.A., Ostrovsky D.S., Khubetsova M.Kh., Borzenok S.A., Feldman T.B., Ostrovsky M.A. Study of the cytotoxic properties of non-oxidized and oxidized bisretinoids of lipofuscin granules in retinal pigment epithelial cells. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(3): 76–87. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.76-87

Author's contribution: sample preparation, chromatographic analysis, participation in discussion of results and writing of the article – Yakovleva M.A.; conducting experiments on cells, participating in the discussion of the results and writing the article – Ostrovsky D.S.; preparation of biological objects of human cadaver eyes for further analysis – Khubetsova M.Kh.; participation in the discussion of experiment planning, discussion of results and writing of the article – Borzenok S.A.; participation in the discussion of experiment planning, discussion of results and writing of the article – Feldman T.B.; participation in the discussion of experiment planning, discussion of results and writing of the article – Ostrovsky M.A. Approval of the final version of the article – all authors.

For correspondence: Marina A. Yakovleva, Ph.D. biol. Sci., Senior Researcher, Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, e-mail: lina.invers@gmail.com

Information about the authors:

Yakovleva M.A., <https://orcid.org/0000-0003-4243-2787>

Ostrovsky M.A., <https://orcid.org/0000-0003-4350-2812>

Feldman T.B., <https://orcid.org/0000-0003-2613-056X>

Financing. This work was supported financially by the Russian Science Foundation (grant no. 22–24–00549).

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

Received 29.05.2023

Accepted 12.07.2023

Published 20.09.2023

Введение

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) является одним из наиболее распространенных заболеваний среди пожилых людей [1]. Одним из маркеров развития патологии сетчатки, ВМД в том числе, является более интенсивное накопление липофуциновых гранул (ЛГ) в клетках ретиального пигментного эпителия (РПЭ) по сравнению с нормой [2–4]. ЛГ являются про-

дуктами неполной лизосомальной деградации обломков наружных сегментов палочек сетчатки (НСП) [5]. В состав ЛГ входят бисретиноиды (БисРет) – продукты модификации полностью-*транс*-ретиная (ПТР) [6]. Наиболее изученным из них является N-ретинилиден-N-ретилилэтаноламин (A2E) [7]. БисРет в ЛГ являются фотоиндуцируемыми генераторами активных форм

кислорода (АФК) [8], которые, в свою очередь, могут окислять БисРет (окси-БисРет) с образованием высоко реактивных альдегидов и кетонов [9, 10]. Окси-БисРет обладают гидрофильными и амфифильными свойствами, что позволяет им диффундировать через мембрану ЛГ в цитоплазму клетки РПЭ [11]. Поскольку карбонильные продукты являются долгоживущими, они могут прочно связываться с долгоживущими белками, такими как коллаген [12] или гемоглобин [13], что приводит к образованию конечных продуктов гликирования, которые могут активировать воспалительные процессы. Результаты наших экспериментов *in vitro* [14–15] показали, что водорастворимые карбонильные продукты, образующиеся при фотоокислении БисРет, приводят к образованию модифицированных белков. Этот факт указывает на то, что окси-БисРет могут приводить к повреждению клеточных структур и, в конечном итоге, к гибели клетки РПЭ. Ранее нами было показано, что после воздействия света на клетки АРПЭ-19 с ЛГ и последующей темновой адаптацией происходит их гибель [16]. Можно предположить, что одним из механизмов клеточной гибели является развитие апоптоза. Известно 2 основных пути развития апоптоза клеток РПЭ – митохондриальный и каспазный.

Целью данной работы было выяснение механизмов цитотоксического воздействия окси-БисРет на клетку РПЭ. Эксперименты проводили с использованием клеточной культуры АРПЭ-19, нагруженной ЛГ, полученных из клеток РПЭ кадаверных глаз человека. Для выяснения механизма развития апоптоза в качестве стандартных маркеров каспазного пути использовали каспазы 7 (экзекуторная) и 8 (инициирующая), а митохондриального – BAX [17].

Методика

Реактивы. В работе были использованы реактивы производства «Sigma-Aldrich», «Fluka», «Компонент-реактив». Для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) использовали растворители производства «Sigma-Aldrich» и «Fluka» хроматографической чистоты. Для культивирования клеток использовали реактивы «Thermo Fisher Scientific» и культуральный пластик «Corning». Для проведения иммуногистохимического анализа использовали реактивы «Abcam», МТТ-тест производитель компания «ПанЭко» для электронно-сканирующей микроскопии «SPI».

Материал. Кадаверные глаза человека были получены Глазным тканевым банком ФГАУ «НМИЦ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова»

от доноров из танатологических отделений московского бюро судебно-медицинской экспертизы на основании действующего договора между московским бюро судебно-медицинской экспертизы и ФГАУ НМИЦ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова», а также договора о научном сотрудничестве между ИБХФ РАН и ФГАУ НМИЦ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» [18]. На данное исследование было получено одобрение со стороны локального этического комитета. Все исследования выполнялись по международным правилам работы с биоматериалом людей. Кадаверные глаза человека поступали на исследование не позднее 10 ч после смерти донора после удаления роговицы для трансплантации. Каждый кадаверный глаз подвергался вскрытию офтальмологом. После удаления хрусталика, стекловидного тела и сетчатки проводилось детальное описание глазного дна. Анализ и скрининговый отбор донорского материала проводили по клиническим, половым и возрастным признакам. Исследование образцов проводили при приглушенном освещении.

Выделение липофусциновых гранул и получение хлороформных экстрактов бисретиноидов и их производных. ЛГ были выделены из РПЭ 100 кадаверных глаз доноров (возраст 50–75 лет) без признаков патологии согласно методике, описанной в работе [19] и суспендированы в растворе 0.1 М К-фосфатного буфера, pH=7.3. Концентрацию гранул определяли по стандартной методике в камере Горяева. Исходная концентрация гранул составляла 3×10^8 гранул/мл. Содержание продуктов фотоокисления и фотодегградации бисретиноидов контролировали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Приготовление хлороформных экстрактов из ЛГ. Бисретиноиды и их производные экстрагировали из ЛГ по методу Фолча смесью хлороформ – метанол (1:1) [20]. К суспензии ЛГ добавляли 2-кратный избыток смеси хлороформ: метанол (2:1 v/v). Смесью перемешивали на электрической мешалке в течение 2 мин и инкубировали 10 мин при 4 °С. Смесью центрифугировали при 680 g в течение 10 мин при 4 °С. Нижнюю фазу хлороформа отбирали шприцем, переносили в колбу и упаривали с помощью вакуумного насоса (Vacuubrand MZ 2CNT + AK + M + D, Германия). Для дальнейшего хроматографического анализа каждый высушенный образец ресуспендировали в 200 мкл метанола.

ВЭЖХ-анализ. Хроматографическое разделение бисретиноидов, продуктов их фотоокисления и фотодегградации в хлороформных экстрактах ЛГ из РПЭ проводили на хроматографе фирмы

«Кнауер» (Германия) с колонкой «Kromasil-100–5–C18» (4×250 мм, размер сорбента 5 мкм). Разделение осуществляли путем линейного градиентного элюирования в системе: от 80% ацетонитрила + 20% воды (+ 0.05% трифторуксусной кислоты) до 100% ацетонитрила за 20 мин; скорость потока 1.0 мл/мин [10]. Продукты хроматографического разделения измеряли при помощи фотометрического детектора «Кнауер К-2501».

Измерение спектров поглощения и флуоресценции.

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 (Япония). Сбор данных по флуоресценции осуществляли с помощью флуориметра RF-5301 PC (Shimadzu, Киото, Япония), оборудованного детектором на фотоэлектронных умножителях R955 (Hamamatsu, Сидзуока, Япония). Программное обеспечение RFPC версии 2.0 (Shimadzu) использовалось для компиляции данных. Спектры излучения регистрировали при возбуждении 488 нм с интервалом дискретизации 1 нм. Спектры флуоресценции корректировались с учетом интенсивности возбуждения с помощью спектрального отклика (квантовой эффективности) детектора с фотоумножителем R955. Все спектры флуоресценции нормированы на длину волны 592 нм.

Синтез А2Е. В качестве стандарта использовали синтезированный А2Е. А2Е получали из полностью транс-ретинала и этаноламина в уксусной кислоте и этаноле, как описано в работе [21]. Чистоту А2Е контролировали методом ВЭЖХ на хроматографе фирмы «Кнауер» (Германия). А2Е идентифицировали с помощью масс-спектрометра 7T LTQ FT (Thermo Electron Corp., Германия), оборудованного источником ионов с электрораспылением, как описано в [10]. Масс-спектры обрабатывали и анализировали с помощью программы Qual Browser 1.4.

Культура клеток АРПЭ-19. Была использована клеточная линия АРПЭ-19, предоставленная УНУ «Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления)» Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. На всех этапах работы культивирование проводили в полной ростовой среде (ПРС) согласно стандартной методике (<https://www.atcc.org/products/crl-2302>). Фагоцитоз ЛГ клетками АРПЭ-19 осуществляли по методике, описанной в работе [22].

Для изучения цитотоксического воздействия ЛГ на культуру клеток АРПЭ-19 было сформировано 2 группы образцов: 1-я группа содержалась в темноте в течение всего эксперимента, 2-я была облу-

чена видимым светом в течение 18 ч, а затем содержалась 3 сут в темноте после воздействия света. Облучение образцов осуществляли видимым светом (430–570 нм) лампой Led15w – 4000К (0,38 мВт/см², определенная фотометром Spectra-Physics 407A, США). В каждой группе был контрольный образец культуры клеток АРПЭ-19 без ЛГ и образец культуры клеток АРПЭ-19, нагруженных ЛГ.

Для анализа на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США) клетки обрабатывали раствором ацетазы по стандартному протоколу. Анализ образцов на электронном сканирующем микроскопе проводили со следующими параметрами: высокий вакуум, ускоряющее напряжение 15kV, увеличение ×1000. Для изучения образцов на конфокальном лазерно-сканирующем микроскопе образцы фиксировались 10% раствором формалина в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. Анализ на конфокальном микроскопе Olympus FV10i (Olympus, Япония) производили при использовании каналов Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 594.

Тесты на жизнеспособность клеток

Тест «Живые и мертвые». Для качественного и количественного анализа все образцы клеток АРПЭ-19 окрашивали флуоресцентным красителем Live and Dead (ab 115347 Abcam, Кембридж, Великобритания) по протоколу производителя. Для количественного анализа суспензию клеток РПЭ получали путем ферментативного удаления клеток с последующим анализом на проточном цитофлуориметре (CytoFlex, Beckman Coulter, Калифорния, США) с использованием канала обнаружения FITC (Ex 493 нм/Em 528 нм) и Су3 (Ex 550 нм/Em 615 нм).

МТТ-тест. Анализ МТТ проводили в соответствии с протоколом (<https://www.abcam.com/mtt-assay-kit-cell-пролиферация-ab211091.html>) на спектрофотометре Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, США). Поглощение измеряли на длине волны 570 нм и нормализовали по отношению к поглощению контрольного образца (клетки РПЭ без ЛГ) и выражали как жизнеспособность в процентах от поглощения контроля.

Аноптоз. Для определения путей развития апоптоза были использованы антитела к каспазе 8, 7 и ВАХ, по стандартному протоколу окрашивания с последующим анализом на проточном цитофлуориметре. Для этого к суспензии клеток было добавлено по 10 мкл каждого вида антитела, время экспозиция составило 10 мин, далее клетки 3-кратно отмывались раствором PBS. Для детекции антител были использованы вторичные антитела

Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 594, инкубация составила 30 мин. Далее клетки 3-кратно промывали раствором PBS, добавляли 200 мкр BD CellWash и анализировали на проточном цитофлуориметре.

ДНК-кометы. Клеточную культуру готовили по стандартной методике. Отрицательный контроль – клетки АРПЭ-19 без ЛГ после облучения УФ-светом согласно стандартной методике. Данный метод включал в себя подготовку предметных стекол с нанесением слоя агарозы. Клеточную культуру промывали раствором Версена, далее добавляли 0,25% раствор Трипсина-Версена 1:1, инкубировали 10 мин при +37 °С. Полученную суспензию центрифугировали 1100 об/мин 5 мин, осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (рН-7.4), забирали пробу объемом 10 мкл (концентрация клеток 1×10^4) и переносили в пробирки типа Эппендорф с 1% раствором легкоплавкой агарозы объемом 75 мкл. Полученную суспензию помещали на предметные стекла с агарозным покрытием и охлаждали в течение 10 мин при +4 °С. Далее переносили в лизирующий раствор (10 мМ Триса, 2,5 М NaCl, 100мМ ЭДТА) и инкубировали 1 ч при +4 °С.

Полученные препараты переносили в щелочной раствор (рН>13) для проведения электрофореза 1В на 1 см, 20 мин, нейтрализацию проводили используя фосфатно-солевой буфер (рН-7.4). Для окрашивания использовали раствор этидиума бромид в дистиллированной воде, экспозиция составила 2 ч при +4 °С в темноте. Анализ препаратов проводили при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа Olympus FV10i. Полученные изображения

анализировали при помощи встроенного программного обеспечения микроскопа.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных в ходе эксперимента данных осуществляли на персональном компьютере с программным обеспечением Prisma 6 (GraphPad Software Inc., Ла-Хойя, Калифорния, США). Для оценки полученных данных использовали методы параметрической описательной статистики с определением средней арифметической величины (М) и стандартного отклонения ($\pm\sigma$). Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Различия сравниваемых показателей считали статистически значимыми при уровне $p < 0.05$.

Результаты

Для изучения цитотоксического воздействия ЛГ на культуру клеток АРПЭ-19 было сформировано 2 группы образцов: 1-я группа содержалась в темноте в течение всего эксперимента, а вторая была облучена видимым светом в течение 18 ч, а затем содержалась 3 сут в темноте. В каждой группе был контрольный образец культуры клеток АРПЭ-19 без ЛГ и образец культуры клеток АРПЭ-19, нагруженных ЛГ.

МТТ анализ жизнеспособности клеток. Анализ МТТ показал, что во всех случаях, независимо от условий эксперимента, относительный уровень живых клеток был заметно ниже в образцах РПЭ с липофусцином (в среднем на 30%) по сравнению с контрольным образцом РПЭ без ЛГ (табл. 1). При этом, в случае предварительного облучения образцов РПЭ с ЛГ

Таблица 1/Table 1

Сравнительный МТТ анализ жизнеспособности клеток РПЭ темноадаптированных и предварительно облученных видимым светом
Comparative MTT cell viability assay when RPE samples maintained in the dark or after irradiation of RPE samples by visible light

Время инкубации в темноте Time of dark incubation	Первая группа First group		Время инкубации в темноте Time of dark incubation	Вторая группа Second group	
	Образцы, содержащиеся в темноте (%) Samples maintained in the dark (%)			Образцы, облученные видимым светом 18 часов (%) Samples irradiated with visible light for 18 hours (%)	
	Контроль РПЭ без ЛГ Control RPE without LGs	ЛГ-РПЭ LG-fed RPE		Контроль РПЭ без ЛГ Control RPE without LGs	ЛГ-РПЭ LG-fed RPE
18 часов 18 hours	100.0±28.3	71.8±16.0	0 сут 0 days	100.0±33.4	67.8±16.4
4 сут 4 days	100.0±24.9	77.4±17.8	4 сут 4 days	100.0±15.3	53.8±15.9

Примечание. * Данные представлены как среднее±SD от трех независимых экспериментов, $p < 0.05$.

Note. * The data are presented as means ± SD from three independent experiments, $p < 0.05$.

степень гибели клеток РПЭ заметно возрастала (примерно на 14%, $p < 0.05$) (табл 1). Таким образом, фотоокисление ЛГ в составе РПЭ приводит к росту гибели клеток даже после завершения облучения. Это значит, что окисленные продукты ЛГ повреждают клетки РПЭ уже в темноте за счет их токсического воздействия на клеточные структуры.

Таким образом, наибольшую цитотоксичность в отношении клеток РПЭ проявляли образцы РПЭ, содержащие липофусцин и выдерживаемые в темноте после облучения. Эти результаты подтверждают

наше предположение [14, 15] о том, что окси-БисРет с гидрофильными и амфифильными свойствами могут оказывать цитотоксическое действие на клетки РПЭ. Результаты наших экспериментов коррелируют с данными, полученными другими авторами [23–25].

Пролиферативная активность. Исходная пролиферативная активность клеток в 1-е сут, как контрольных, так и после добавления ЛГ и воздействия светом, была сходной во всех образцах (рис. 1, табл. 2, 3). Однако, через 4 сут после фагоцитирования клетками АРПЭ-19 ЛГ в темноте или после воздействия све-

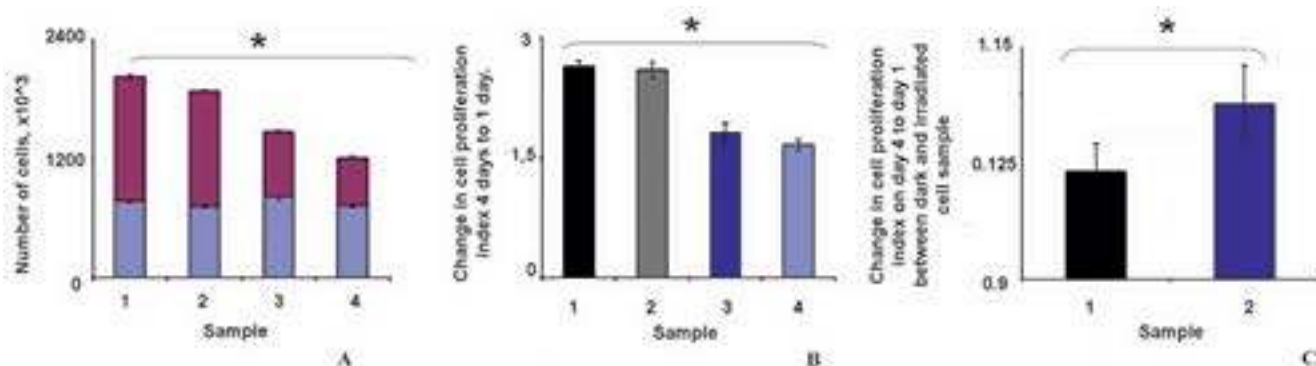


Рис. 1. А – совокупная пролиферативная активность по подгруппам эксперимента. На оси ординат отмечено количество клеток $\times 10^3$ /мл, 1 – контроль РПЭ без ЛГ, 2 – контроль РПЭ без ЛГ+свет, 3 – ЛГ-РПЭ, 4 – ЛГ-РПЭ+свет, **Б** – Динамическое отношение изменения пролиферативной активности от 4 дня к 1, 1 – контроль РПЭ без ЛГ, 2 – контроль РПЭ без ЛГ+свет, 3 – ЛГ-РПЭ, 4 – ЛГ-РПЭ+свет, **В** – Динамическое отношение изменения пролиферативной активности в группах сравнения под воздействием света и без него. 1 – контроль РПЭ без ЛГ, 2 – РПЭ-ЛГ. Данные представлены как среднее значение \pm SD от 3-х независимых экспериментов (по 20 повторов на эксперимент). * Значения $P < 0.05$ считались значимыми.

Fig. 1. A – Cumulative proliferative activity by subgroups of the experiment. The y-axis shows the number of cells $\times 10^3$ /ml, 1 – RPE control without LG, 2 – RPE control without LG + light, 3 – LG-RPE, 4 – LG-RPE + light, **B** – Dynamic ratio of changes in proliferative activity from day 4 to 1, 1 – RPE control without LG, 2 – RPE control without LG + light, 3 – LG-RPE, 4 – LG-RPE + light, **B** – Dynamic ratio of changes in proliferative activity in the comparison groups under the influence of light and without it. 1 – control RPE without LG, 2 – RPE-LG. Data are presented as mean \pm SD from 3 independent experiments (20 replicates per experiment). * $P < 0.05$ were considered significant.

Таблица 2/Table 2

Количество клеток (посевная концентрация 1.5×10^5 клеток)

Number of cells (inoculation concentration 1.5×10^5 cells)

Время инкубации в темноте Time of dark incubation	Первая группа First group		Время инкубации в темноте Time of dark incubation	Вторая группа Second group	
	Образцы, содержащиеся в темноте Samples maintained in the dark			Образцы, облученные видимым светом 18 часов Samples irradiated with visible light for 18 hours	
	Контроль РПЭ без ЛГ Control RPE without LGs	ЛГ-РПЭ LG-fed RPE		Контроль РПЭ без ЛГ Control RPE without LGs	ЛГ-РПЭ LG-fed RPE
18 часов 18 hours	$7.75 \times 10^5 \pm 0.11 \times 10^5$	$8.10 \times 10^5 \pm 0.18 \times 10^5$	0 сут 0 days	$7.25 \times 10^5 \pm 0.14 \times 10^5$	$7.27 \times 10^5 \pm 0.11 \times 10^5$
4 сут 4 days	$2.03 \times 10^6 \pm 0.04 \times 10^6$	$1.47 \times 10^6 \pm 0.05 \times 10^6$	4 сут 4 days	$1.88 \times 10^6 \pm 0.01 \times 10^6$	$1.21 \times 10^6 \pm 0.01 \times 10^6$

Примечание. * Данные представлены как среднее \pm SD от трех независимых экспериментов, $p < 0.05$.

Note. * The data are presented as means \pm SD from three independent experiments, $p < 0.05$.

том было отмечено заметное снижение пролиферативной активности клеток во всех подгруппах кроме контрольных (табл. 3). Также стоит отметить, что наи-

меньшую –1.66 ед (для сравнения в контроле 2.64 ед, рис. 1, Б) пролиферативную активность на 4-е сут показала группа клеток АРПЭ-19 с ЛГ после облучения светом.

Итак, можно сделать предположение о том, что исходно ЛГ обладают выраженной фототоксичностью. Кроме того, полученные нами данные говорят о том, что эффект от наличия ЛГ в составе клеток АРПЭ-19 имеет пролонгированное влияние (рис. 1, Б, В). Наибольший эффект на пролиферацию клеток оказывает исходные ЛГ после облучения светом. Присутствие в клетках РПЭ ЛГ способствуют замедлению пролиферативной активности клеток, содержащихся, как в темноте, так и после облучения (на 3.7 и 5.5, соответственно) (табл. 3).

Анализ повреждения клеточных структур методом ДНК-комет. Методом ДНК-комет был определен уровень повреждения ДНК в единичных клетках и рассчитан коэффициент повреждения (табл. 4). На рисунке 2 представлены данные для каждого образца в виде соотношения количества повреждений в клетках на 4-е сут темновой адаптации к 1-м сут. Из полученных результатов видно, что присутствие ЛГ в клетках АРПЭ-19 увеличивает количество повреждений ДНК (в среднем в 1.15 раз). При этом наибольший эффект наблюдается в образцах, предварительно облученных видимым светом в течение 18 ч (в 1.18 раз) (рис. 2). Другими словами, в клетках с повышенным содержанием Оксис-БисРет через 4 сут темновой адаптации наблюдается самый высокий процент повреждения ДНК (0.96±0.01). Полученные результаты коррелируют с данными работы [26] о темновом повреждении ДНК продуктами окисления А2Е. Также они подтверждают наши предполо-

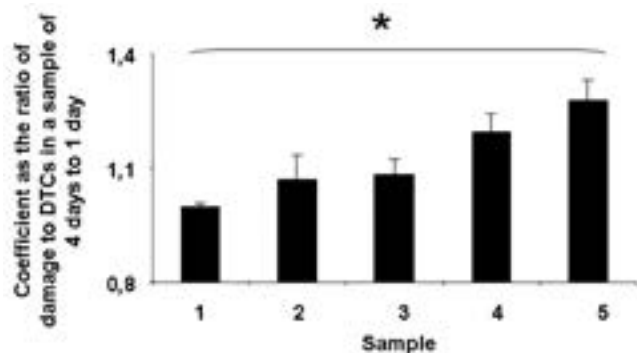


Рис. 2. Диаграмма распределения индекса ДНК-комет в образцах на 4-е сут темной адаптации по сравнению с исходным состоянием. 1 – отрицательный контроль (АРПЭ-19 без ЛГ+UV свет); 2 – контроль (АРПЭ-19 без ЛГ) после 4 сут темновой адаптации; 3 – контроль (АРПЭ-19 без ЛГ), предварительно облученный в течение 18 ч видимым светом, а затем темной адаптированный в течение еще 3 сут; 4 – образец АРПЭ-19 с ЛГ после 4 сут темновой адаптации; 5 – образец АРПЭ-19 с ЛГ, предварительно облученный в течение 18 ч видимым светом, а затем темной адаптированный в течение еще 3 сут. Данные представлены как среднее значение ± SD от 3 независимых экспериментов (по 20 повторов на эксперимент). * – p < 0.05

Fig. 2. Diagram of the distribution of the DNA comet index in samples on the 4th day of dark adaptation compared to the initial state. 1 – negative control (ARPE-19 without LG+UV light); 2 – control (ARPE-19 without LG) after 4 days of dark adaptation; 3 – control (ARPE-19 without LG), pre-irradiated for 18 hours with visible light, and then dark-adapted for another 3 days; 4 – ARPE-19 sample with LG after 4 days of dark adaptation; 5 – sample of ARPE-19 with LG preliminarily irradiated for 18 hours with visible light and then dark-adapted for another 3 days. Data are presented as mean ± SD from 3 independent experiments (20 replicates per experiment). * – p < 0.05 were considered significant.

Таблица 3/Table 3

Индекс пролиферации клеточной культуры

Cell culture proliferation index

Время инкубации в темноте Time of dark incubation	Первая группа First group		Время инкубации в темноте Time of dark incubation	Вторая группа Second group	
	Образцы, содержащиеся в темноте Samples maintained in the dark			Образцы, облученные видимым светом 18 часов Samples irradiated with visible light for 18 hours	
	Контроль РПЭ без ЛГ Control RPE without LGs	ЛГ-РПЭ LG-fed RPE		Контроль РПЭ без ЛГ Control RPE without LGs	ЛГ-РПЭ LG-fed RPE
18 часов 18 hours	5.1±0.07	5.4±0.12	0 сут 0 days	4.8±0.09	4.8±0.07
4 сут 4 days	13.5±0.28	9.8±0.32	4 сут 4 days	12.5±0.08	8.0±0.09

Примечание. * Данные представлены как среднее ± SD от трех независимых экспериментов, p<0.05.

Note. * The data are presented as means ± SD from three independent experiments, p<0.05.

жения о том, что альдегиды, образующиеся при окислении БисРет, будучи гидрофильными соединениями, диффундируют из ЛГ в цитоплазму клетки АРПЭ-19 и повреждают клеточные структуры уже без участия АФК и света, проявляя цитотоксичные свойства.

Анализ процесса апоптоза. Полученные данные свидетельствуют о повышении интенсивности процесса апоптоза в клетках РПЭ, нагруженных ЛГ, по сравнению с контрольными клетками в среднем на 7.5% (табл. 5). Облучение клеток РПЭ, нагруженных ЛГ,

по сравнению с клетками, содержащимися в темноте, приводит к усилению запрограммированной гибели клеток --апоптозу в среднем на 3.8%. Таким образом, присутствие в клетках РПЭ ЛГ приводит к запуску апоптоза, а облучение светом, даже с последующей темновой адаптацией, усиливает этот процесс.

Анализ путей апоптоза. Для определения механизма развития апоптоза в клетках АРПЭ-19 после цитотоксического воздействия окси-БисРет было проанализировано наличие маркеров двух путей апоп-

Таблица 4/Table 4

Индекс ДНК-комет

Comet DNA Index

Время инкубации в темноте Time of dark incubation	Отрицательный контроль Negative control	Первая группа First group		Время инкубации в темноте Time of dark incubation	Вторая группа Second group	
		Образцы, содержащиеся в темноте Samples maintained in the dark			Образцы, облученные видимым светом 18 часов Samples irradiated with visible light for 18 hours	
		Контроль РПЭ без ЛГ Control RPE without LGs	ЛГ-РПЭ LG-fed RPE		Контроль РПЭ без ЛГ Control RPE without LGs	ЛГ-РПЭ LG-fed RPE
18 часов 18 hours	3.5±0.03	0.56±0.03	0.67±0.01	0 дней 0 days	0.6±0.01	0.75±0.02
4 дня 4 days	3.5±0.02	0.6±0.01	0.8±0.03	4 дня 4 days	0.65±0.02	0.96±0.01

Примечание. * Данные представлены как среднее±SD от трех независимых экспериментов, *p* <0.05.

Note. * The data are presented as means ± SD from three independent experiments, *p* <0.05.

Таблица 5/Table 5

Сравнительный анализ апоптоза в клетках РПЭ, темноадаптированных и предварительно облученных видимым светом

Comparative analysis of apoptosis in RPE cells, dark-adapted and pre-irradiated with visible light

Клетки Cells	Контроль АРПЭ-19 без ЛГ в темноте, % ARPE-19 without LG in the dark, %	Контроль АРПЭ-19 без ЛГ с облучением 18 часов, % Control ARPE-19 without LG with irradiation for 18 hours, %	Клетки АРПЭ-19 с ЛГ, % with LG, %	Клетки АРПЭ-19 с ЛГ с облучением 18 часов, % with LG with irradiation for 18 hours, %
Живые – 1-е сут live – 1 day	98.44±0.83	97.76±0.86	84.9±3.31	79.72±6.36
Живые – 4-е сут live – 4 day	98.28±0.87	96.34±0.91	80.46±4.13	74.76±4.30
апоптотные – 1-е сут apoptotic – 1 day	0.58±0.26	0.86±0.32	7.64±1.28	12.14±2.98
апоптотные – 4-е сут apoptotic – 4 day	0.70±0.27	1.5±1.29	8.58±1.48	12.06±2.01
мертвые – 1-е сут dead – 1 day	0.98±0.54	1.38±0.58	7.46±2.40	8.14±3.52
мертвые – 4-е сут dead – 4 day	1.02±0.61	2.18±0.46	10.96±2.68	13.18±2.51

Примечание. * Данные представлены как среднее±SD от трех независимых экспериментов, *p* <0.05.

Note. * The data are presented as means ± SD from three independent experiments, *p* <0.05.

тоза – каспазного (каспаза 7 и 8) и митохондриального (BAХ). Показано, что уже на 1-е сут темновой адаптации в подгруппе клеток АРПЭ-19 с ЛГ наблюдается увеличение активности каспазы 8 (на 41%), а в предварительно облученных образцах наблюдается увеличение количества каспазы 7 и белков субсемейства ВАХ (на 22 и 28% соответственно) (рис. 3, табл. 6). В случае воздействия светом на клетки АРПЭ-19 с ЛГ каспаза 7 присутствует сразу в большом количестве (23%), а на 3-и сут темновой адаптации уровень сохраняется (23%) на фоне небольшого снижения числа апоптозных клеток (на 1%). Кроме того, при действии света относительный вклад каспазы 7 также увеличивается во всех образцах, но с ЛГ значимо больше (в 2–4 раза), чем в контрольном образце клеток АРПЭ-19 без ЛГ.

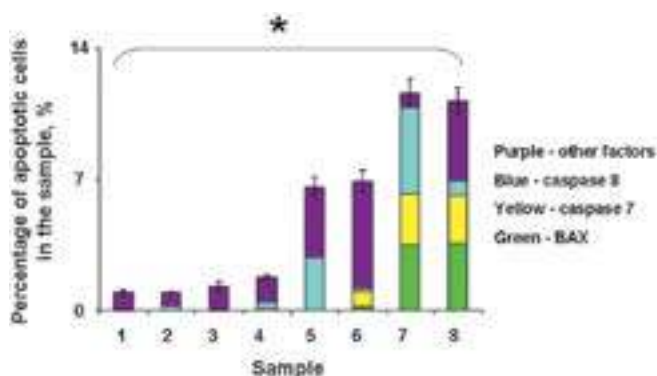


Рис. 3. Диаграмма распределения факторов апоптоза в клетках АРПЭ-19 до и после добавления ЛГ и влияния светового воздействия. На оси ординат – процент апоптозных клеток в образце (суммарная высота столбика). Цветом в столбике указан процентный вклад различных факторов апоптоза в данном образце. 1 – контроль клеток в темноте 1 сут; 2 – контроль клеток в темноте 4-е сут; 3 – контроль клеток, облученных 18 ч; 4 – контроль клеток, облученных 18 ч, и затем инкубированных еще 3 сут в темноте, 5 – клетки со встроенными ЛГ в темноте 0 сут; 6 – клетки со встроенными ЛГ в темноте 4 сут, 7 – клетки со встроенными ЛГ, предварительно облученные 18 ч; 8 – клетки со встроенными ЛГ, предварительно облученные 18 ч и затем инкубированные еще 3 сут в темноте. Данные представлены как среднее значение ± SD от 3 независимых экспериментов (по 20 повторов на эксперимент); * – $p < 0.05$ считались значимыми.

Fig. 3. Diagram of the distribution of apoptosis factors in ARPE-19 cells before and after the addition of LG and the effect of light exposure. The y-axis indicates the percentage of apoptotic cells in the sample (total bar height). The color in the column indicates the percentage contribution of various apoptosis factors in this sample. 1 – control of cells in the dark on 1 day, 2 – control of cells in the dark on 4 days, 3 – control of cells irradiated for 18 hours, 4 – control of cells irradiated for 18 hours and then incubated for another 3 days in the dark, 5 – cells with built-in LG in the dark on 0 day, 6 – cells with built-in LG in the dark on 4 days, 7 – cells with built-in LG, irradiated for 18 hours, 8 – cells with built-in LG, irradiated for 18 hours, and then incubated for another 3 days in the dark. Data are presented as mean ± SD from 3 independent experiments (20 replicates per experiment). * $P < 0.05$ were considered significant.

Через 4 сут темновой адаптации в контрольных образцах (АРПЭ-19 без ЛГ) отмечается увеличение вклада каспазы 8 (на 23%), а в контрольной подгруппе после облучения еще и появление каспазы 7 в незначительном количестве (6,5%). Однако в образцах клеток АРПЭ-19 с ЛГ, отмечается снижение уровня каспазы 8 (на 41%) и увеличение эффекторного белка каспазы 7 (на 12%). Такой результат может свидетельствовать о запуске необратимого апоптоза в клетках АРПЭ-19, особенно в образцах клеток АРПЭ-19 с ЛГ, предварительно облученных в течение 18 ч видимым светом (рис. 3).

Обсуждение

Полученные результаты показали, что сразу после воздействия видимым светом в течении 18 ч нарушения в жизнеспособности клеток были незначительными. Однако результат, полученный через 4 сут темновой адаптации, показал, что в образцах клеток РПЭ с ЛГ, цитотоксический эффект от ЛГ на клетки РПЭ даже в темновых образцах, без воздействия света, весьма значителен (снижение жизнеспособности на 29% по сравнению с контролем). При этом в предварительно облученных видимым светом процент гибели клеток значительно выше (снижение жизнеспособности на 50% по сравнению с контролем). Можно предположить, что окси-БисРет в составе ЛГ, которые образовались в результате воздействия света, в течение последующих 4 сут темновой адаптации диффундируют из ЛГ в цитоплазму клетки РПЭ и проявляют свои цитотоксичные свойства в отношении клеточных структур и макромолекул, инициируя развитие апоптоза. Таким образом, мы делаем вывод о том, что цитотоксический эффект от ЛГ имеет пролонгированное влияние на клетки РПЭ. Кроме того, исходные неокисленные бисретиноиды ЛГ обладают в основном фототоксическим эффектом, а уже окси-БисРет обладают темновым цитотоксическим влиянием на клетки РПЭ.

На примере повреждения ДНК показано, что наиболее выраженное повреждение было детектировано в образцах клеток РПЭ с ЛГ, предварительно облученных видимым светом (0,96). Эксперименты по исследованию путей апоптоза показали, что спустя 4 сут темновой адаптации в контрольных образцах клеток АРПЭ-19 без ЛГ увеличивается количество каспазы 8 (на 23%), а в случае предварительного облучения – еще и каспазы 7 (на 6,5%). Однако в образцах клеток АРПЭ-19 с ЛГ, отмечается снижение уровня каспазы 8 (на 41%) и увеличение эффекторного белка каспазы 7 (на 12%). Увеличение уровня эффекторного белка каспазы 7 может свидетельствовать о запу-

Распределение процентного содержания факторов апоптоза в клетках АРПЭ-1

Distribution of the percentage of apoptosis factors in ARPE-19 cells

Фактор апоптоза Apoptosis factor	Контроль АРПЭ-19 без ЛГ в темноте, % Control ARPE-19 without LG in the dark, %	Контроль АРПЭ-19 без ЛГ с облучением 18 часов, % Control ARPE-19 without LG with irradiation for 18 hours, %	Клетки АРПЭ-19 с ЛГ, % ARPE-19 cells with LG, %	Клетки АРПЭ-19 с ЛГ с облучением 18 часов, % ARPE-19 cells with LG with irradiation for 18 hours, %
Вах – 1-е сут BAX – 1 day	0±0	2±0.15	0±0	30.5±1.21
Вах – 4-е сут BAX – 4 day	0±0	0±0	3±0.92	32±0.51
каспаза 8 – 1-е сут caspase 8 – 1 day	1.2±0.17	4±0.57	43±1.71	40±1.41
каспаза 8 – 4-е сут caspase 8 – 4 day	25±2.01	20±1.29	2±0.75	6.8±0.08
каспаза 7 – 1-е сут caspase 7 – 1 day	1±0.05	0±0	0±0	23±2.01
каспаза 7 – 4-е сут caspase 7 – 4 day	0±0	6.5±0.65	12±0.85	23±1.25

Примечание. * Данные представлены как среднее±SD от 3 независимых экспериментов, $p<0.05$.

Note. * The data are presented as means ± SD from three independent experiments, $p<0.05$.

ске необратимого апоптоза в клетках АРПЭ-19, особенно в образцах, содержащих ЛГ и предварительно облученных видимым светом (рис. 2).

Таким образом, присутствие ЛГ в клетках АРПЭ-19 само по себе вызывает клеточные повреждения в темноте, которые запускают механизм апоптоза (8%), а после воздействия светом степень развития апоптоза значительно увеличивается (до 12%). Можно предположить, что это связано с образованием окси-БисРет, содержащих высоко реактивные альдегиды и кетоны. Обладая гидрофильными свойствами, окси-БисРет могут диффундировать из ЛГ в цитоплазму клетки АРПЭ-19 и вызывать повреждение клеточных структур, инициируя запуск необратимого апоптоза. Полученные результаты указывают на развитие нескольких путей апоптоза. Первый путь инициируется при воздействии света, в результате чего активируются семейство Bcl-белков и белки субсемейства Вах, которые воздействуют на митохондрии. Далее происходит активация каспазы-7, что может привести в свою очередь к фрагментации ДНК и апоптозу. Данный путь апоптоза возникает также при повреждении ДНК. Второй путь развития апоптоза связан с активацией ранней инициаторной каспазы-8, которая обеспечивает прямую связь между рецепторами клеточной гибели и каспазами. Активация каспазы -8 происходит по так называемому внешнему пути через рецепторы клеточной

гибели. Мы проанализировали динамику 3 белков, отвечающих за апоптоз: митохондриальный – Вах, каспазный – каспаза 7 и 8. При анализе данных было выявлено, что на первый день преобладает экспрессия каспазы 8 во всех группах исследования. После четырех суток наблюдения в группах с добавлением ЛГ при темновой адаптации содержание каспазы 8 уменьшается, а каспазы 7 и Вах увеличивается. Исходя из вышесказанных результатов мы можем предположить, что липофусциновые гранулы в клетках АРЭ-19 активируют в основном каспазный путь апоптоза – каспаза 8 инициировала запуск митохондриального пути апоптоза через белок Вах и дальнейший каспазный путь через каспазу 7.

Таким образом, в данной работе показано, что ЛГ в клетках РПЭ в темноте запускают процессы апоптоза, причем, этот процесс усиливается, если на клетки РПЭ, нагруженные ЛГ предварительно воздействовать видимым светом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российским научным фондом (грант № 22–24–00549). Клеточная линия АРПЭ-19 любезно предоставлена УНУ «Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления)» Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Литература

(п.п. 1–7; 9–16; 18–26 см. References)

8. Островский М.А., Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Боултон М., Джарвис-Эванс Дж. Способность липофусциновых гранул из ретиального пигментного эпителия глаза человека фотосенсибилизировать окисление липидов при действии видимого света. <https://elibrary.ru/contents.asp?titleid=8212> *Сенсорные системы*. 1992; 6(3): 51–2.
17. Фрешни Р.Я. *Культура животной клетки: практическое руководство*. Бином. Лаборатория знаний. 2010.

References

1. Sentation to pathology. *Optom Vis Sci* 2014; 91: 832–848. DOI: 10.1097/OPX.0000000000000281
2. Nivison-Smith L., Milston R., Madigan M., et al. Age-related macular degeneration: linking clinical preKennedy C.J., Rakoczy P.E., Constable I.J. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye* 1995; 9: 763–71. DOI: 10.1038/eye.1995.192
3. Holz F.G., Pauleikhoff D., Klein R., Bird A.C. Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. *Am. J. Ophthalmol.* 2004; 137: 504–10. DOI: 10.1016/j.ajo.2003.11.026
4. Sparrow J.R., Boulton M.E. RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp. Eye. Res.* 2005, 80, 595–606. DOI: 10.1016/j.exer.2005.01.007
5. Feeney-Burns L., Eldred G.E. The fate of the phagosome: conversion to ‘age-pigment’ and impact in human retinal pigment epithelium. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1983; 103: 416–21. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6589859/>
6. Adler IV. L., Chen C., Koutalos Y. All-trans retinal levels and formation of lipofuscin precursors after bleaching in rod photoreceptors from wild type and Abca4 -/- mice. *Exp Eye Res.* 2017; 155: 121–7. DOI: 10.1016/j.exer.2017.02.007
7. Sakai N., Decatur J., Nakanishi K., & Eldred G., et al. Ocular age pigment «A2-E»: an unprecedented pyridinium bisretinoid. *J. Am. Chem. Soc.* 1996; 118, 1559–1560. <https://doi.org/10.1021/ja953480g>
8. Ostrovsky M.A., Dontsov A.E., Sakina N.L., et al. The ability of lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium of the human eye a photosensitized peroxidation lipid by the action of visible light. *Sensor Systems* 1992; 6: 51–4. (in Russian)
9. Wu Y., Yanase E., Feng X., Siegel M.M., et al. Structural characterization of bisretinoid A2E photocleavage products and implications for age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107: 7275–80. DOI: 10.1073/pnas.0913112107
10. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Arbukhanova P.M., et al. Changes in spectral properties and composition of lipofuscin fluorophores from human retinal pigment epithelium with age and pathology. *Anal Bioanal Chem* 2015; 407: 1075–88. DOI: 10.1007/s00216-014-8353-z
11. Dontsov A.E., Sakina N.L., Golubkov A.M., Ostrovsky M.A. Light-induced release of A2E photooxidation toxic products from lipofuscin granules of human retinal pigment epithelium. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2009; 425: 98–101. DOI: 10.1134/s1607672909020112
12. Munch G., Schickanz D., Behme A., Gerlach M., Riederer P., Palm D., et al. Amino acid specificity of glycation and protein-AGE cross-linking reactivities determined with a dipeptide SPOT library. *Nat. Biotechnol.* 1999; 17: 1006–10. DOI: 10.1038/13704
13. Ott C., Jacobs K., Haucke E., Navarrete Santos A., Grune T., Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox. Biol.* 2014, 2, 411–29. DOI: 10.1016/j.redox.2013.12.016
14. Yakovleva M., Dontsov A., Trofimova N., Sakina N., Kononikhin A., Aybush A., et al. Lipofuscin granule bisretinoid oxidation in the human retinal pigment epithelium forms cytotoxic carbonyls. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23: 222. DOI: 10.3390/ijms23010222
15. Dontsov A., Yakovleva M., Trofimova N., Sakina N., Gulina A., Aybush A., et al. Water-soluble products of photooxidative destruction of the bisretinoid A2E cause proteins modification in the dark. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23: 1534. DOI: 10.3390/ijms23031534
16. Feldman T., Ostrovskiy D., Yakovleva M., Dontsov A., Borzenok S., Ostrovsky M. Lipofuscin-mediated photic stress induces a dark toxic effect on ARPE-19 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23: 12234. DOI: 10.3390/ijms232012234
17. Freshni R.Ya. *Animal Cell Culture: A Practical Guide. [Kultura zhivotnoy kletki]*. Binom. Laboratoriya znaniy. Moscow: 2010. (in Russian)
18. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Larichev A.V., Arbukhanova P.M., Radchenko A.Sh., Borzenok S.A., et al. Spectral analysis of fundus autofluorescence pattern as a tool to detect early stages of degeneration in the retina and retinal pigment epithelium. *Eye.* 2018; 32(9): 1440–8. DOI: 10.1038/s41433-018-0109-0
19. Boulton M., Dontsov A., Jarvis-Evans J., Ostrovsky M., Svistunenko D. Lipofuscin is a photoinducible free radical generator. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 1993; 19: 201–4. DOI: 10.1016/1011-1344(93)87085-2
20. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957, 226, 497–509. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13428781/>
21. Parish C.A., Hashimoto M., Nakanishi K., Dillon J., Sparrow J. Isolation and one-step preparation of A2E and iso-A2E, fluorophores from human retinal pigment epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 14609–13. DOI: 10.1073/pnas.95.25.14609
22. Farrukh A. Shamsi and Mike Boulton. Inhibition of RPE Lysosomal and Antioxidant Activity by the Age Pigment Lipofuscin, Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2001; 42(12): 3041–6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11687553/>
23. Godley B.F., Shamsi F.A., Liang F.-Q., Jarrett S.G., Davies S., Boulton M. Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 21061–6. DOI: 10.1074/jbc.M502194200
24. Shamsi F.A., Boulton M. Inhibition of RPE lysosomal and antioxidant activity by the age pigment lipofuscin. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001; 42: 3041–6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11687553/>
25. Alaimo A., Liñares G.G., Bujjamer J.M., Gorjod R.M., Alcon S.P., Martínez J.H., et al. Toxicity of blue led light and A2E is associated to mitochondrial dynamics impairment in ARPE-19 cells: Implications for age-related macular degeneration. *Arch. Toxicol.* 2019; 93: 1401–15. DOI: 10.1007/s00204-019-02409-6
26. Sparrow J.R., Vollmer-Snarr H.R., Zhou J., Jang Y.P., Jockusch S., Itagaki Y., et al. A2E-epoxides damage DNA in retinal pigment epithelial cells. Vitamin E and other antioxidants inhibit A2E-epoxide formation. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 18207–13. DOI: 10.1074/jbc.M300457200

Сведения об авторах:

Яковлева Марина Андреевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН, e-mail: lina.invers@gmail.com;

Островский Дмитрий Сергеевич, зав. лаб., ФГАУ МНТК «Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, e-mail: dmitriy.ostrovskiy@gmail.com;

Хубецова Мадина Хетаговна, врач-офтальмолог, ФГАУ МНТК «Микрохирургии глаза» им акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, e-mail: rogorina@inbox.ru;

Борзенко Сергей Анатольевич, проф. каф., акад. РАЕН, ФГАУ МНТК «Микрохирургии глаза» им акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, e-mail: MDBorzenok@yandex.ru;

Фельдман Татьяна Борисовна, вед. науч. сотр., ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», e-mail: feldmantb@mail.ru;

Островский Михаил Аркадьевич, зав. лаб., ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», e-mail: ostrovsky3535@mail.ru

© Доница Ж.А., Баранова Е.В., 2023

УДК 612.1+612.2+612.55

Доница Ж.А., Баранова Е.В.

Дозозависимая интенсивность гипоксической вентиляционной реакции в ранней фазе ЛПС-индуцированной эндотоксемии

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

Введение. Системная воспалительная реакция, обусловленная массивным поступлением в организм грамотрицательных бактерий, выделяющих эндотоксин (липополисахарид, ЛПС) при тяжелом течении нередко осложняется острым респираторным дистресс синдромом (ОРДС) с сопутствующей гипоксемией, что является причиной высокой летальности пациентов в критических состояниях. Известно, что ЛПС вызывает комплекс реакций, характерных для острой фазы воспаления. Однако вопрос о временной точке начальных проявлений дыхательной недостаточности, направленности острофазовых реакций отдельных компонентов паттерна дыхания и оксигенации в зависимости от дозы ЛПС остается открытым. **Цель исследования** – изучение влияния низких (0,7 мг/кг) и высоких (7,0 мг/кг) доз ЛПС на интенсивность гипоксической вентиляционной реакции в раннем периоде инфекционного процесса.

Методика. Опыты проведены на 24 наркотизированных уретаном (ООО Вектон, Россия, 1000 мг/кг) крысах, гипоксическое воздействие создавали методом возвратного дыхания (от нормоксии до апноэ), с последующим анализом на уровне тяжелой гипоксии (FiO₂ 8%). С использованием пневмотахографического метода регистрировали основные показатели внешнего дыхания: частоту дыхания, дыхательный объем, минутную вентиляцию легких, сатурацию. Фиксировали выживаемость крыс после гипоксического апноэ.

Результаты. В условиях нормоксии на ранней стадии инфекционного процесса установлены разнонаправленные изменения параметров, формирующих паттерн дыхания. При тяжелой гипоксии низкая доза ЛПС вызывала угнетение легочной вентиляции, при высокой дозе, напротив, интенсивность компенсаторной вентиляционной реакции соответствовала контрольному уровню. Выживаемость животных после гипоксического апноэ имела прямую зависимость от высокой дозы ЛПС, несмотря на отсутствие дыхательной недостаточности.

Заключение. Предполагается, что при эндотоксемии экспрессия медиаторов острой фазы в сочетании с гипоксией приводит к инверсии физиологических реакций в результате диспропорциональной активации структур нейроиммунных взаимодействий, вовлеченных в периферические и центральные механизмы регуляции дыхания.

Ключевые слова: эндотоксемия; цитокины; гипоксия; вентиляционная реакция; нейроиммунные взаимодействия; регуляция дыхания

Для цитирования: Доница Ж.А., Баранова Е.В. Дозозависимая интенсивность гипоксической вентиляционной реакции в ранней фазе ЛПС-индуцированной эндотоксемии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(3): 88–96.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.88-96

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Доница Ж.А., Баранова Е. В; сбор и обработка материала – Баранова Е.В., Доница Ж.А.; статистическая обработка – Баранова Е.В., Доница Ж.А.; написание текста – Доница Ж.А.; редактирование – Доница Ж.А. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Доница Жанна Альбертовна, e-mail: zdonina@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019-2030), тема 0134-2019-0001.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 22.04.2022

Принята к печати 12.07.2023

Опубликована 20.09.2023

Donina Zh.A., Baranova E.V.

The dose-dependent intensity of hypoxic ventilatory response in the early phase of LPS-induced endotoxemia

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

Introduction. Systemic inflammation induced by massive administration of gram-negative bacterial endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) is often complicated by acute respiratory distress syndrome (ARDS) with concomitant hypoxemia, which causes high mortality of critically ill patients. LPS is known to induce a reaction complex characteristic of the acute phase of inflammation, depending on the dose and time of exposure. However, the dependence of timing of initial manifestations of respiratory insufficiency, direction of acute-phase reactions of individual components in the breathing pattern, and oxygenation on the LPS dose remains unstudied. **The aim** of this work was to study the effects of low (0.7 mg/kg) and high (7.0 mg/kg) LPS doses on the intensity of hypoxic ventilatory response in the early period of infectious process.

Methods. Experiments were conducted on 24 rats anesthetized with urethan (OOO Vekton, Russia, 1000 mg/kg). Hypoxia was produced by the rebreathing method (from normoxia to apnea) with a subsequent analysis performed for severe hypoxia (FiO₂ 8%). Major respiratory parameters, including breathing rate, tidal volume, minute ventilation, and saturation were recorded with a pneumotachograph. Survival rate was studied after hypoxic apnea.

Results. During normoxia at the early stage of infectious process, multidirectional changes in breathing pattern parameters were observed. In severe hypoxia, a low LPS dose induced inhibition of the ventilatory response while with a high dose, on the contrary, the intensity of the compensatory ventilatory response was similar to the control value. Mortality after hypoxic apnea was directly related with the high dose of LPS despite the absence of respiratory failure.

Conclusion. The results suggest that in endotoxemia, the expression of acute phase mediators in combination with hypoxia results in the inversion of physiological reactions due to disproportional activation of the neuroimmune interaction components involved in peripheral and central mechanisms of respiratory control.

Keywords: endotoxemia; cytokines; hypoxia; ventilatory response; neuroimmune interactions; respiratory control

For citation: Donina Zh.A., Baranova E.V. The dose-dependent intensity of hypoxic ventilatory response in the early phase of LPS-induced endotoxemia. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(3): 88–96. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.88-96

Author's contribution: concept and design of the study – Donina Zh.A., Baranova E.V.; collection and processing of material – Baranova E.V., Donina Zh.A.; statistical processing – Baranova E.V., Donina Zh.A.; writing the text – Donina Zh.A.; editing – Donina Zh.A. Approval of the final version of the article – all authors.

For correspondence: Zhanna A. Donina, Doctor of Biol. Sciences, Ved. scientific associate, lab. physiology of breathing, I.P. Pavlov Institute of Physiology the Russian Academy of Sciences, e-mail: zdonina@mail.ru

Information about the authors:

Donina Zh.A., <https://orcid.org/0000-0002-4451-1270>

Baranova E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1234-4575>

Financing. The work was carried out with the support of the State Program 47 GP «Scientific and technological development of the Russian Federation» (2019-2030), topic 0134-2019-0001.

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

Received 22.04.2023

Accepted 12.07.2023

Published 20.09.2023

Введение

Системная воспалительная реакция, обусловленная массивным поступлением в организм грамотрицательных бактерий, выделяющих эндотоксин (липолисахарид, ЛПС) при тяжелом течении осложняется бактериальным сепсисом, септическим шоком, что является причиной высокой смертности пациентов в критическом состоянии [1–3].

Патогенез этого патологического состояния до конца не изучен, однако, установлено, что ключевую роль в развитии воспалительного процесса и сепсиса играет взаимодействие ЛПС с липидным компонентом клеточных мембран и инициирование каскадных реакций последовательных молекулярно-клеточных механизмов, вызывающих неконтро-

лируемую продукцию провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и др.), активизацию ферментов, образующих монооксид азота (NO) и простагландинов (PGE1 и PGE2) [4-6]. Усиленный выброс цитокинов («цитокиновый шторм») ассоциируется с развитием синдрома полиорганной недостаточности, где одним из ведущих компонентов является острая дыхательная недостаточность – острый респираторный дистресс синдром (ОРДС).

Имеется достаточно данных о том, что развитие септической реакции сопутствует развивающаяся в этих условиях гипоксия, усугубляющая ЛПС-вызванный воспалительный эффект [7, 8]. Нарастающая дыхательная недостаточность обусловлена пневмонией, диффузным повреждением альвеоло-капиллярной стенки и легочной ткани, ухудшением вентиляционно-перфузионных отношений в легких, гипоксемией и гиперкапнией, изменением кислород-связывающих свойств крови, повышением всех компонентов сопротивления дыхательных путей и др. [9-12]. Прогрессирование воспалительного процесса в сочетании с гипоксемией повышает риск необратимых нарушений респираторной системы, вызывает апноэ и ослабляет способность к аутореанимации (выживание) после острой аноксии [8, 13, 14].

Считается, что ЛПС вызывает комплекс реакций, характерных для острой фазы воспаления в зависимости от дозы и времени воздействия. По данным R. Fodor и соавт. [15] прогрессивно нарастающие дозы эндотоксина коррелировали с тяжестью септических состояний, что было подтверждено клиническими проявлениями, лабораторными и гистопатологическими анализами. Результаты других исследований, напротив, показали, что малые дозы эндотоксина вызывают более тяжелые повреждения легких, чем большие дозы [16], а слабое и умеренное воспаление приводит к наибольшим нарушениям дыхания [14]. Введение низких доз ЛПС усиливали аллергическое воспаление дыхательных путей, тогда как высокая доза не вызывала повышенного образования мокроты в дыхательных путях [17].

Изучение септических реакций в большинстве экспериментальных моделей эндотоксемии преимущественно сосредоточено на отдаленных временных периодах воздействия ЛПС: 2, 4, 6, 12, 24 ч и более [18, 19], поэтому информации о ранней фазе воспаления очень мало. Вместе с тем было показано, что повышение уровня ФНО- α индуцированное влиянием ЛПС начинается уже через 30 мин после инъекции, достигая пиковых значений в течение 6 ч [20]. Кроме того, установлено, что парциальное давление кислорода, кото-

рое является мощным иммуномодулирующим сигналом снижается в альвеолярном газе сразу же после введения ЛПС и усиливает процесс воспаления в легких при ОРДС [21].

Приведенные данные, указывают на то, что проявления эндотоксин-индуцированных нарушений респираторной системы развиваются на ранней стадии воспалительного процесса и не имеют линейной зависимости от дозы ЛПС, а его вклад в отдельные компоненты острофазовой реакции до сих пор неясен. В то же время, в предыдущем исследовании нами была установлена прямая зависимость гипотензивной реакции и сатурации только в условиях нормоксии, увеличение летальности крыс после тяжелой гипоксии от увеличения дозы ЛПС [22].

Мы предположили, что неоднозначные физиологические реакции могут быть следствием нарушения баланса множественных компонентов нейроиммунных взаимодействий и их модулирующим влиянием на деятельность кардиореспираторной системы, и в том числе, на компенсаторную гипоксическую вентиляторную реакцию, эффективность которой зависит от суммарной активности периферических и центральных звеньев регуляции дыхания.

Цель работы – исследование дозозависимой интенсивности гипоксической вентиляционной реакции в ранней фазе ЛПС-индуцированной эндотоксемии.

Методика

Животные были получены из Биокolleкции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН и содержались в лабораторных условиях при свободном доступе к воде и пище. При проведении экспериментов соблюдались требования, утвержденные Приказом Минздрава РФ от 01.04.16 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и директивами Совета Европы 2010/63EU Европейского парламента о защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях. Протоколы опытов были утверждены комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Эксперименты проведены на 24 крысах самцах Вистар массой 280-300 г наркотизированных уретаном (ООО Вектон, Россия, 1000 мг/кг) и I-й и экспериментальных групп трахеостомированных. Животные были распределены на 3 группы по 8 особей в каждой. В условиях нормоксии регистрировали фоновые значения, затем вводили изучаемые препараты в бедренную вену (*v.femoralis*): контрольной группе – 1 мл изотонического физиологического раствора (NaCl); экс-

периментальным группам: I-й (ЛПС-1) и II-й (ЛПС-2) – раствор липополисахарида *Escherchia coli* (производства НИИ ЭМ им.Гамалеи, Россия) в количестве 0,7 мг/кг и 7 мг/кг (0,2 и 2 мг на крысу) соответственно. При выборе дозировок ЛПС мы руководствовались данными литературы и нашего предыдущего исследования [22], из которых следует, что применяемые нами дозы бактериального эндотоксина обладают относительно малым и средним сублетальным эффектом.

Через 40 мин, после регистрации фоновых значений проводили гипоксическое тестирование, используя метод «возвратного дыхания» [23]. Дыхание осуществлялось из/в замкнутой емкости, гипоксия нарастала прогрессивно от нормоксии вплоть до остановки дыхания (апноэ). Непрерывно фиксировали фракционное содержание O_2 (F_1O_2), время наступления апноэ, время спонтанного возобновления дыхания и летальность в постгипоксическом периоде в процентах по отношению к контролю. Регистрацию параметров проводили на протяжении всего эксперимента, сравнительный анализ после окончания эксперимента на уровне F_1O_2 8%. Прекращение дыхательной активности в течение 1 мин приравнивали к гибели животных.

В ходе эксперимента пневмотахографическим методом регистрировали объемную скорость инспираторного потока (V_i); автоматическая интеграция кривой пневмотахограммы позволяла вычислить дыхательный объем (ДО) и частоту дыхания (ЧД), рассчитывали минутный объем дыхания (МОД). Регистрация внутригрудного давления (ВГД) – давление в пищеводе (аналог внутриплеврального) осуществлялась методом баллонографии. Оксигенацию крови ($SpO_2\%$) определяли, используя ветеринарный пульсоксиметр типа UT (Zoomed, Россия). Фракционное содержание O_2 (F_1O_2) в процессе гипоксического воздействия регистрировали кислородным анализатором ПГК-06 («Инсвот», Санкт-Петербург). Обработку сигналов пневмотахограммы и внутригрудного давления проводили с помощью аппаратно-программного комплекса сбора биологических данных Biograf-7 (ГУАП, Санкт-Петербург, Россия).

Для статистического анализа данных использовали программы Statistica 10.0 (Windows) и Microsoft Office Excel 2020. Для проверки выборки на нормальность распределения использовали тест Колмогорова-Смирнова, уровень значимости составлял $p < 0,2$, что свидетельствовало о том, что групповые выборки данных подчинялись закону нормального распределения. Затем оценивали значения до и после инъекции препаратов, используя парный критерий Стьюдента и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA)

для факторов «контроль-LPS-I», «контроль-LPS-II» и «LPS-I–LPS-II. Различия принимали за статистически значимые при $p < 0,05$. Данные представлены в виде среднего значения и ошибки средней ($M \pm SE$).

Результаты

Через 30 мин после введения ЛПС в условиях нормоксии наблюдались изменения показателей внешнего дыхания у крыс I-й и II-й экспериментальных групп по сравнению с контрольными (таблица). Низкая доза ЛПС вызывала увеличение ДО на $123 \pm 14\%$ ($p < 0,05$), высокая – на $89 \pm 9\%$ ($p < 0,05$). ЧД в большей степени увеличилась у крыс II-й группы, МОД возрастал на $150 \pm 11\%$ ($p < 0,05$) независимо от дозы ЛПС. ВГД в группе с низкой дозой увеличилось на $180 \pm 14\%$, у крыс с высокой дозой на $120 \pm 10\%$ ($p < 0,05$, соответственно). Сатурация в большей степени снизилась у животных II-й группы. Наиболее выраженные межгрупповые различия в зависимости от дозы ЛПС наблюдались в сдвигах внутригрудного давления, влияние низкой дозы ЛПС вызывало более значимое увеличение ВГД. Полученные данные показали, что в нормоксических условиях введение ЛПС в различных дозах вызывало непропорциональный характер реакций показателей, формирующих паттерн дыхания, что выражалось в отсутствии прямой корреляции между дозой и эффектом. Зависимость от дозы ЛПС наблюдалась в насыщении артериальной крови кислородом – увеличение дозы сопровождалось снижением $SpO_2\%$.

Гипоксическое воздействие при F_1O_2 8% у крыс контрольных и экспериментальных групп сопровождалось изменением параметров, формирующих вентиляторную реакцию на гипоксию (рис. 1, a, b, c, d). Однако и в этом случае также не наблюдалось прямой корреляции величин показателей и дозы ЛПС. Так, приросты ВГД на гипоксическое воздействие у крыс с низкой и высокой дозой были значительно меньше по сравнению с контролем, однако межгрупповые различия не достигали статистической значимости (рис. 1, d). Обращает на себя внимание тот факт, что менее значимые по сравнению с контролем приросты ДО, МОД и снижение ЧД у крыс I-й и II-й групп зависели от дозы ЛПС, различия между группами были значимыми. При этом, как видно из рис. 1, с меньшей дозой ЛПС (0,7 мг/кг) угнеталась вентиляционную реакцию на гипоксию в более значимой степени, чем большая доза (7 мг/кг). Так прирост МОД на гипоксию по сравнению с нормоксическим дыханием у контрольных крыс с введением физиологического раствора составлял $97 \pm 12\%$, в I-й экспериментальной группе $22 \pm 3\%$, и $53 \pm 7\%$ во II-й. Компенсаторные реак-

ции параметров вентиляционной реакции на гипоксию (8%) в зависимости от дозы ЛПС представлены на рисунке 1.

При действии гипоксии 8%O₂ у всех групп животных насыщение артериальной крови кислородом оказалось значимо ниже контрольных значений при нормоксии (рис. 2). Наибольшее падение SpO₂ (до 60%) было зарегистрировано у контрольных крыс с введением физиологического раствора, в группах с малой и большой дозой ЛПС SpO₂ снижалось в меньшей степени, чем у контрольных, но не носило дозозависимого характера.

Дальнейшее нарастание гипоксии (< 8%O₂) сопровождалось остановкой дыхания (апноэ) у всех групп животных. Причем продолжительность дыхания гипоксической газовой смесью до наступления апноэ как у контрольных животных, так и с малой и высокой дозой ЛПС была примерно одинаковой, что составляло 8-9 мин, однако степень гипоксии во вдыхаемой газовой смеси

в точке апноэ была различной. Так, у контрольной группы животных апноэ наступало при F₁O₂ 3-4%, у крыс с низкой дозой ЛПС при 4-5%, с высокой – при 7-8%. Длительность остановки дыхания в группах I-я и II-я были сходны (27,0±3,1 и 26,4±2,2 с), существенное различие проявлялось в количестве случаев спонтанного восстановления дыхания (выживаемость) в постгипоксическом периоде. Число выживших крыс с малой дозой ЛПС составляло 100%, что не отличалось от контроля, а в группе с введением большей дозы возобновление дыхания происходило только в 12% случаев.

Обсуждение

Выявленные изменения параметров внешнего дыхания через 30 мин после инфузии низкой и высокой дозы ЛПС в условиях нормоксии, позволяют сделать вывод об адекватности используемой нами модели начальной фазы развивающегося сепсиса у крыс, наиболее полно соответствующей клинической ситуации

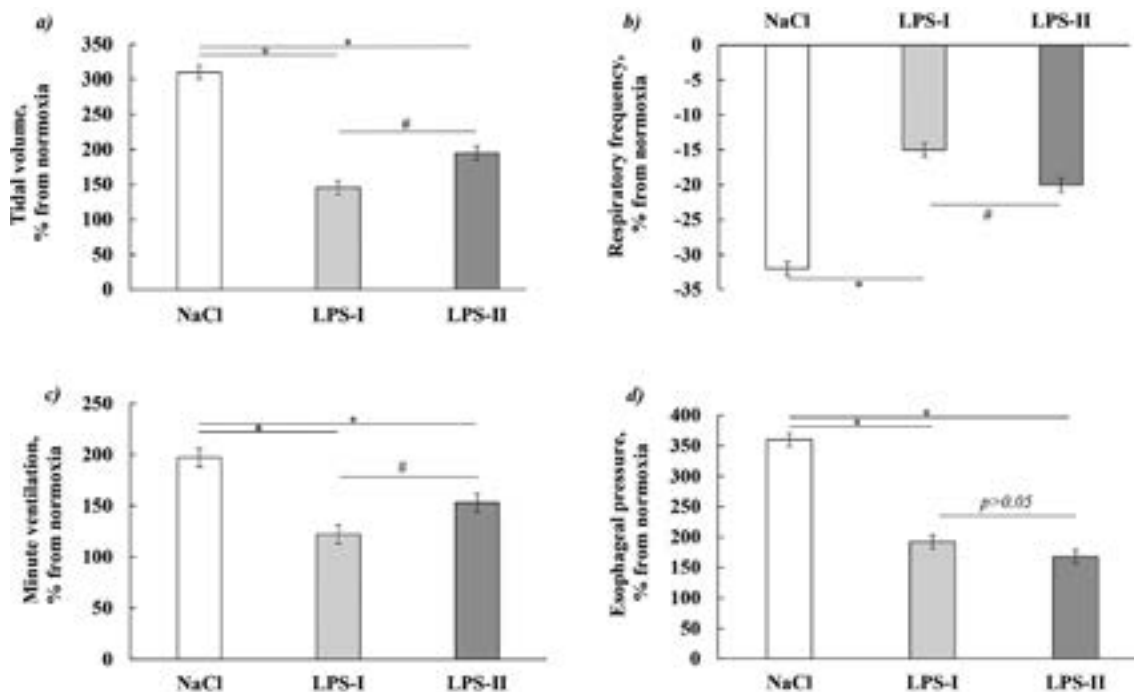


Рис. 1. Компенсаторные реакции параметров вентиляционной реакции на гипоксию (8%) в зависимости от дозы ЛПС. По оси абсцисс – экспериментальные группы: контроль (физ. р-р), ЛПС-1 (0,7 мг/кг), ЛПС-2 (7 мг/кг). По оси ординат – приросты показателей в % от нормоксии; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$ по сравнению ЛПС-1 с ЛПС-2 панель а) – дыхательный объем, б) – частота дыхания, в) – минутный объем дыхания, д) – внутригрудное давление.

Fig. 1. Compensatory reactions of ventilation parameters response to hypoxia (8%) depending on the dose of LPS. On the abscissa axis – experimental groups: control (NaCl), LPS-1 (0.7 mg/kg), LPS-2 (7 mg/kg). On the ordinate axis – increases in indicators in % from normoxia. – $p < 0.05$ compared to the control; # – $p < 0.05$ compared between LPS-1 and LPS-2, panel a) – tidal volume, b) – respiratory frequency, c) – minute ventilation, d) – esophageal pressure.

[24, 25]. Об этом свидетельствует повышение внутригрудного давления (отражающего общее инспираторное усилие), что указывает на увеличение сопротивления дыханию, связанное с накоплением клеточных элементов и жидкости в дыхательных путях, отеком (обструкцией) бронхов, уменьшением легочных объемов и нарушением вентиляционно-перфузионных отношений в легких [11, 26, 27]. Дозозависимое снижение сатурации в ответ на введение ЛПС, свидетельствует о снижении эффективности оксигенации в условиях нормоксии (таблица). При гипоксии понижение сатурации не имело дозозависимого характера у крыс обеих экспериментальных групп, однако это падение было менее выраженным, чем у контрольных крыс с введением NaCl. Одной из причин выявленной стабилизации сатурации при септической реакции может явиться метаболический дисбаланс, приводящий к снижению потребления кислорода клетками [3, 15]. Кроме того, в ранее проведенном нами исследовании [22] инъекция аналогичных дозировок ЛПС через 40 мин вызывала гипотензивную реакцию, которая, как известно, является индикатором ранней стадии эндотоксического шока [28]. Следовательно, полученный в настоящей работе материал дает основание считать, что начальные патогенетические признаки ОРДС развиваются на ранней стадии инфекционного процесса в условиях нормоксии.

Как отмечалось ранее, важной особенностью течения эндотоксин-индуцированного патологического процесса является вызванное гипоксией усиление воспалительной реакции [29]. Отражением регуляторных

механизмов дыхательной системы, как известно, является вентиляционная реакция на действие разнообразных стимулов (гипоксия, гиперкапния, повышенное сопротивление дыханию и др.) [30]. Результаты наших опытов выявили существенное угнетение вентиляционной реакции на гипоксию у крыс с малой дозой ЛПС, тогда как у крыс с большей дозой компенсаторный прирост легочной вентиляции соответствовал контрольным значениям, что в данном случае позволяет

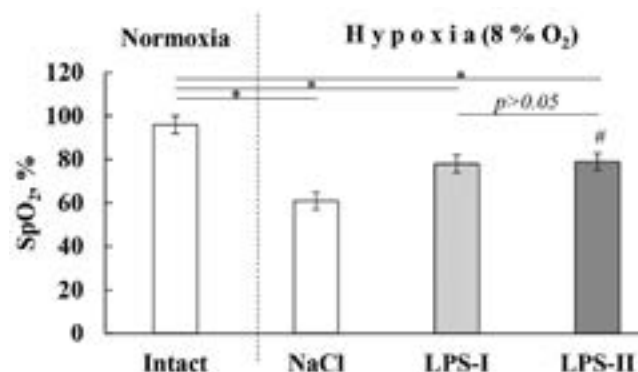


Рис. 2. Насыщение артериальной крови кислородом (SpO₂%, абсолютные значения) при гипоксии в зависимости от дозы ЛПС. По оси абсцисс – экспериментальные группы: контроль (Физ. р-р), ЛПС-1 (0,7 мг/кг), ЛПС-2 (7 мг/кг). По оси ординат – SpO₂%; – p<0,05 по сравнению с контролем; p>0,05 по сравнению ЛПС-1 с ЛПС-2.

Fig. 2. Saturation of arterial blood (SpO₂%, absolute values) in hypoxia, depending on the dose of LPS.

On the abscissa axis – experimental groups: control (NaCl), LPS-1 (0.7 mg/kg), LPS-2 (7 mg/kg). On the ordinate axis – SpO₂%. * – p<0.05 compared to the control; p>0.05 compared between LPS-1 and LPS-2.

Изменения показателей внешнего дыхания у крыс через 30 мин после введения низкой (I) и высокой дозы (II) ЛПС в условиях нормоксии (n=8 в каждой группе)

Changes in external respiration parameters in rats 30 minutes after administration of low (I) and high (II) doses of LPS under normoxic conditions (n=8 in each group)

Показатели Indicate	Контроль Control (NaCl)	ЛПС-1 LPS-I	ЛПС-2 LPS-II
Дыхательный объем, мл Tidal volume, ml	0.9±0.2	2.0±0.1*	1.7±0.2*
Частота дыхания, мин ⁻¹ Respiratory frequency, min ⁻¹	80±8	95±5	108±6*
Минутный объем дыхания, мл/мин Minute ventilation, ml/min	76±6	190±7*	187±6*
Внутригрудное давление, см вод. ст. Esophageal pressure, cm H ₂ O	0.5±0.05	1.4±0.1*	1.1±0.05*
Насыщение артериальной крови кислородом, % Saturation, %	96±1	92±1	83±6*

Примечание. * – p<0,05; по сравнению с контролем (физиологический раствор).

Note. * – p<0.05; compared with the control (NaCl).

говорить об отрицательной корреляционной связи между дозой ЛПС и интенсивностью вентиляционной реакции. Полученные данные свидетельствуют о снижении возможности возобновления дыхания и увеличении летальности после тяжелой гипоксии у крыс с высокой дозой ЛПС, несмотря на отсутствие существенных сдвигов со стороны дыхания при гипоксическом тестировании. Возможными причинами снижения выживаемости, по-видимому, является фатальное снижение артериального давления, обусловленное угнетающим влиянием ЛПС-индуцированной септической реакции на вазомоторный центр и эффективность оксигенации [22].

Рассматривая полученные результаты с позиции доза-эффект, прежде всего, следует отметить, что ФНО- α является ключевым медиатором токсичности ЛПС и одним из первых провоспалительных цитокинов, высвобождаемых макрофагами [16]. Гистологические признаки острого воспаления, вызванного ЛПС были обнаружены в каротидных телах артериальных хеморецепторов, инициирующих начальное усиление легочной вентиляции при гипоксии [30]. Было установлено, что каротидные тела экспрессируют рецептор ЛПС (TLR4), а также ФНО- α и его рецепторы (TNF-R1 и TNF-R2), повышение которых наблюдалось после введения ЛПС (Fernandes, 2008). При гипоксической стимуляции каротидных тел в опытах *in vitro* увеличение ФНО- α в дозо-зависимой степени снижало хемосенсорную активность. Авторы считают, что ФНО- α может модулировать хемосенсорную чувствительность каротидного тела в результате индукции гломусными клетками нейротрансмиттера дофамина, участвующего в регуляции иммунной функции [31, 32]. Дофамин, являясь предшественником норадреналина, оказывает стимулирующее или ингибирующее действие на различные адренергические рецепторы, в том числе и на легочное кровообращение, диаметр бронхов и вентиляцию легких. Благодаря сложным механизмам дофамин может приводить к неоднозначным последствиям в дыхательной системе — уменьшать развитие отека дыхательных путей и улучшать функцию дыхательных мышц, или угнетать легочную вентиляцию. Однако у пациентов в критическом состоянии при хронической обструктивной болезни легких негативного влияния дофамина на легочную вентиляцию не наблюдалось [32].

В настоящее время признано, что каротидные тельца, традиционно считавшиеся кислородным сенсором, обеспечивающим хеморефлекторные реакции, являются также и датчиком иммунного статуса

[33]. Имеются доказательства, что каротидные тельца модулируют кардиореспираторные взаимодействия, направленные на поддержание кислородного гомеостаза при патологических состояниях [34]. Наличие такого механизма могло явиться одной из причин снижения сатурации и ее стабилизации на одном уровне при действии двух разных доз ЛПС, несмотря на различную интенсивность гипоксической реакции легочной вентиляции, направленной на обеспечение адекватной оксигенации.

Кроме того, сложное взаимодействие про- и противовоспалительных цитокинов, огромное количество других биологически активных веществ и дополнительное влияние тяжелой гипоксии модифицирует хемосенсорную афферентацию от каротидного тельца, тем самым стимулирует или ингибирует инспираторную активность на уровне центральных структур регуляции дыхания. Как отмечает ряд авторов, ЛПС увеличивает продукцию ИЛ-1 β и ФНО- α в ядре солитарного тракта и вентролатеральном отделе продолговатого мозга, т.е. в структурах ЦНС, ответственных за регуляцию дыхания [35, 36]. Моррисон и соавт. [14] показали, что слабое и умеренное воспаление приводит к наибольшим нарушениям дыхательной функции.

При изучении молекулярных механизмов аллергической астмы (на мышах), вызванной введением ЛПС было обнаружено, что низкие дозы усиливают аллергическое воспаление дыхательных путей, вызывают значительную инфильтрацию легочной ткани мышцей, повышенную секрецию слизи в дыхательных путях и повышение уровня Т-хелперов2 (Th2), тем самым нарушая биомеханику дыхания. Высокая доза ЛПС, напротив, индуцировала увеличение Th1, отсутствие слизи в дыхательных путях и увеличение продукции интерферона-гамма (IFN- γ) [17].

Таким образом, наше предположение о возможном отсутствии прямого дозозависимого влияния ЛПС на развитие дыхательной недостаточности согласуется с данными литературы, что получило экспериментальное подтверждение. Полученные результаты позволяют сделать выводы, что внедрение нарастающих доз ЛПС в нормоксических условиях, вызывает непропорциональные изменения параметров, формирующих паттерн дыхания на ранней стадии инфекционного процесса. Сочетание ЛПС-индуцированных многочисленных медиаторов воспаления и тяжелой гипоксии вносит диспропорцию в активизацию структур нейроиммунных взаимодействий, вовлеченных в периферические и центральные механизмы регуляции дыхания.

Литература

(п.п. 1-10; 12-21; 23-36 см. References)

11. Шульга Е.В., Казак М.Э., Зинчук В.В. Кислородзависимые процессы при введении липополисахарида. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2011; 2: 29-34.
22. Дони́на Ж.А., Баранова Е.В., Александрова Н.П. Влияние различных доз липополисахарида на артериальное давление и насыщение крови кислородом у крыс в условиях нарастающей нормобарической гипоксии. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2017; 103: 1193-200.

References

1. Verbon A., Dekkers P.E., Ten Hove T., Hack C.E., Pribble J.P., Turner T., et al. IC14, an anti-CD14 antibody, inhibits endotoxin-mediated symptoms and inflammatory responses in humans. *The Journal of Immunology*. 2001; 166: 3599–05.
2. Fan H., Cook J. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *Journal of Endotoxin Research*. 2004; 10: 71–4.
3. Nardocci G., Martin A., Abarzua S., Rodriguez J., Simon F., Reyes E., et al. Sepsis progression to multiple organ dysfunction in carotid chemo/baro-denervated rats treated with lipopolysaccharide. *Journal of Neuroimmunology*. 2015; 278: 44–2.
4. Bhatia M., Mochhala S. (2004) Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *The Journal of Pathology*. 2004; 202: 145–56.
5. Hocker A.D., Stokes A.J., Powell F.L., Huxtable A.G. The impact of inflammation on respiratory plasticity. *Experimental Neurology*. 2017; 287: 243–53.
6. Behrens E.M., Koretzky G.A. Review: Cytokine storm syndrome: Looking toward the precision medicine era. *Arthritis & Rheumatology*. 2017; 69: 1135–43.
7. Agorreta J., Garayoa M., Montuenga L., Zulueta J. Effects of acute hypoxia and lipopolysaccharide on nitric oxide synthase-2 expression on acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2003; 168: 287–6.
8. Vuichard D., Ganter M., Schimmer R., Suter D., Booy C., Reyes L., et al. Hypoxia aggravates lipopolysaccharide-induced lung injury. *Clinical and experimental immunology*. 2005; 141: 248–60.
9. Rubenfeld G.D., Caldwell E., Peabody E., Weaver J., Martin D., Neff M., et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *The new England Journal of Medicine*. 2005; 353: 1685–93.
10. Goraca A.H., Piechota A., Huk-Kolega H. Effect of alfa-lipoic acid on LPS-induced oxidative stress in the heart. *Journal of Physiology and pharmacology*. 2009; 60: 61–8.
11. Shul'ga E.V., Kazak M.E., Zinchuk V.V. Oxygen-dependent processes with the introduction of lipopolysaccharide. *Zhurnal Grodenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2011; 2: 29-34. (In Russian)
12. Koh Y. Update in acute respiratory distress syndrome. *Journal of Intensive Care*. 2014; 2: 2–8.
13. Lorea-Hernández J.J., Morales T., Rivera-Angulo A.J., Alcántara-Gonzalez D., Pena-Ortega F. Microglia modulate respiratory rhythm generation and autoresuscitation. *Glia*. 2016; 64: 603–19.
14. Morrison N.R., Johnson S.M., Hocker A.D., Kimyon R.S., Watters J.J., Huxtable A.G. Time and dose-dependent impairment of neonatal respiratory motor activity after systemic inflammation. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2020; 272: 1033–14.
15. Fodor R.S., Georgescu A.M., Cioc A.D., Grigorescu B.L., Cotoi O.V., Pal Fodor P., et al. Time and dose-dependent severity of lung injury in a rat model of sepsis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 2015; 56: 1329–37.
16. Fernandez R., Gonzalez S., Rey S., Cortes P.P., Maisey K.R., et al. Lipopolysaccharide-induced carotid body inflammation in cats: functional manifestations, histopathology and involvement of tumor necrosis factor-alpha. *Experimental Physiology*. 2008; 93: 892–7.
17. Dong L., Li H., Wang S., Li Y. Different doses of lipopolysaccharides regulate the lung inflammation of asthmatic mice via TLR4 pathway in alveolar macrophages. *Journal of Asthma*. 2009; 46: 229–3.
18. Broug-Holub E., Toews G.B., van Iwaarden J., Strieter R.M., Kunkel S.L., Paine R., et al. Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defenses in murine Klebsiella pneumonia: elimination of alveolar macrophages increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival. *Infection and Immunity*. 1997; 65: 1139–46.
19. Hashimoto S., Pittet J.F., Hong K., Folkesson H., Bagby G., Kobzik L., et al. Depletion of alveolar macrophages decreases neutrophil chemotaxis to Pseudomonas airspace infections. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1996; 270: 819–28.
20. Xing Z., Jordana M., Kirpalani H., Driscoll K.E., Schall T.J., Gauldie J. Cytokine expression by neutrophils and macrophages in vivo. endotoxin induces tumor necrosis factor-alpha, macrophage inflammatory protein-2, interleukin-1 beta, and interleukin-6 but not RANTES or transforming growth factor-beta 1 mRNA expression in acute lung inflammation. *American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology*. 1994; 10: 148–53.
21. Matuschak G.M., Munoz C.F., Johanns C.A., Rahman R., Lechner A.J. Upregulation of postbacteremic TNF-alpha and IL-1alpha gene expression by alveolar hypoxia/reoxygenation in perfused rat lungs. *American Journal Respiratory and Critical Care Medicine*. 1998; 157: 629–37.
22. Donina Zh.A., Baranova E.V., Aleksandrova N.P. Influence of various doses of lipopolysaccharide on arterial blood pressure and oxygen saturation under progressive normobaric hypoxia in rats. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2021; 103: 1193–200. (In Russian)
23. Donina Zh.A., Baranova E.V., Aleksandrova N.P. A comparative assessment of effects of major mediators of acute phase response (IL-1, TNF-α, IL-6) on breathing pattern and survival rate in rats with acute progressive hypoxia. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2021; 57: 936–44.
24. DeClue F., Williams K., Sharp C., Haak C., Lechner E., Reinero C. Systemic response to low-dose endotoxin infusion in cats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2009; 132: 167–74.
25. Kumar S., Adhikari A. Dose-dependent immunomodulating effects of endotoxin in allergic airway inflammation. *Innate Immunity* 2017; 23: 249–7.
26. Jacono F.J., Mayer C.A., Hsieh Y-H., Wilson C.G., Dick T.E. Lung and brainstem cytokine levels are associated with breathing pattern changes in a rodent model of acute lung injury. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2011; 178: 429–38.
27. Nair M., Jagadeeshan S., Katselis G., Luan X., Momeni Z., Henao-Romero N., et al. Lipopolysaccharides induce a RAGE-mediated sensitization of sensory neurons and fluid hypersecretion in the upper airways. *Scientific report*. 2021; 11: 8336.
28. Lee R.P., Wang D., Lin N.T., Chen H.I. Physiological and chemical indicators for early and late stages of sepsis in conscious rats. *Journal of Biomedical Science*. 2002; 9: 613–21.

29. Madjdpour C., Jewell U.R., Kneller S., Ziegler U., Schwendener R., Booy C., et al. Decreased alveolar oxygen induces lung inflammation. *Lung cellular and molecular physiology*. 2003; 284: 360–67.
30. Teppema L.J., Dahan A. The ventilatory response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurement, and analysis. *Physiological Reviews*. 2010; 90: 675–54. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2009>
31. Ciarka A., Vincent J.L., van de Borne P. The effects of dopamine on the respiratory system: friend or foe? *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2007; 20: 607–15.
32. Matt S., Gaskill P. Where is dopamine and how do immune cells see it? Dopamine-mediated immune cell function in health and disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2020; 15: 114–64.
33. Zapata P., Larrain C., Reyes P., Fernandez R. Immunosensory signalling by carotid body chemoreceptors. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 2011; 178: 370–4.
34. Del Rio R., Moya E.A., Parga M.J., Madrid C., Itturiga R. Carotid body inflammation and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia. *European Respiratory Journal*. 2012; 39: 1492-00.
35. Probert L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*. 2015; 302: 2–22.
36. Yee-Hsee H., Litvin D.G., Abigail R.Z., Nethery D.E., Thomas E.D., Jacono F.J. Brainstem inflammation modulates the ventilatory pattern and its variability after acute lung injury in rodents. *Journal of Physiology*. 2020; 598: 2791 –801.

Сведения об авторах:

Допина Жанна Альбертовна, доктор биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. физиологии дыхания, ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН;

Баранова Елизавета Владимировна, мл. науч. сотр., лаб. физиологии дыхания, ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, e-mail: liza.vetta-89@yandex.ru

© Коллектив авторов, 2023

УДК 612.092

Иванов А.Н., Сахань М.А., Ермаков А.В., Ленгерт Е.В., Савкина А.А., Степанова Т.В., Кириязи Т.С., Лойко Д.Д.

Влияние полилактидного микрокамерного раневого покрытия, нагруженного таниновой кислотой, на состояние микроциркуляции в области экспериментальной острой эксцизионной кожной раны

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России, 410012, Саратов, Россия, Большая Казачья ул., д. 112

Введение. Широкая распространенность открытых повреждений кожи вынуждает искать новые подходы к лечению кожных ран. Перспективным, с точки зрения эффективности и экономической целесообразности, является применение полилактидного микрокамерного раневого покрытия, нагруженного таниновой кислотой. Динамика заживления кожных ран тесно коррелирует с изменениями в системе микроциркуляции. **Цель исследования** – оценка состояния микроциркуляции при применении полилактидного микрокамерного раневого покрытия, нагруженного таниновой кислотой.

Методика. Исследование проведено на 55 белых крысах самцах, разделенных на 4 группы: интактные животные ($n=10$), группа сравнения ($n=15$), группа «плацебо» ($n=15$) и опытная группа ($n=15$). У животных группы сравнения оперативным путем моделировали острую эксцизионную кожную рану размером 10×10 мм, которая не подвергалась в дальнейшем лечению. Животным группы «плацебо» на рану однократно укладывалось полилактидное микрокамерное раневое покрытие без активных компонентов, крысам опытной группы на сформированный кожный дефект однократно укладывалось полилактидное раневое покрытие идентичного размера, микрокамеры которого были нагружены таниновой кислотой. Состояние микроциркуляции во всех группах оценивалось методом лазерной доплеровской флоуметрии. Оценивался средний показатель перфузии, а также эндотелиальные, вазомоторные, нейрогенные, пульсовые и дыхательные колебания на 7-е и 14-е сут эксперимента. Сравнение результатов проводилось попарно между группами с использованием непараметрических критериев Манна–Уитни для независимых выборок и Вилкоксона для сравнений внутри группы, на основании которых рассчитывали показатель статистической значимости p с критическим уровнем равным 0,05.

Результаты. Повреждение кожного покрова крыс вызывает стойкие изменения микроциркуляции на периферии раневого дефекта, сопровождается перераспределением роли активных и пассивных механизмов модуляции микрокровотока, а также увеличением показателя перфузии на 27-28% на 7-е и 14-е сут исследования. Закрытие дефекта кожи раневым покрытием без активных компонентов вызывает снижение повышенного показателя перфузии относительно группы сравнения на 5,3% к 7-м и на 13% к 14-м сут. Загрузка камер покрытия таниновой кислотой повышает эффективность нормализации перфузионного показателя к 7-м сут на 11,3%, а уже на 14-е сут данный показатель статистически значимо не отличим от группы контроля. Так же в данной группе к 14-м сут происходит полная нормализация эндотелиальных, нейрогенных и миогенных колебаний.

Заключение. Применение полилактидного микрокамерного раневого покрытия, нагруженного таниновой кислотой, повышает его эффективность в нормализации показателей микроциркуляции кожи краев раневого дефекта и позволяет ускорить темпы заживления раны.

Ключевые слова: лазерная доплеровская флоуметрия; полилактид; раневые покрытия; микроциркуляция; таниновая кислота; раневой дефект кожи

Для цитирования: Иванов А.Н., Сахань М.А., Ермаков А.В., Ленгерт Е.В., Савкина А.А., Степанова Т.В., Кириязи Т.С., Лойко Д.Д. Влияние полилактидного микрокамерного раневого покрытия, нагруженного таниновой кислотой, на состояние микроциркуляции в области экспериментальной острой эксцизионной кожной раны. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(3): 97-108.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.97-108

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Иванов А.Н., Ермаков А.В.; сбор и обработка материала – Савкина А.А., Ленгерт Е.В., Степанова Т.В.; статистическая обработка материала – Кириязи Т.С., Лойко Д.Д.; написание текста – Сахань М.А., Кириязи Т.С.; редактирование – Иванов А.Н. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Сахань Максим Алексеевич, e-mail: maksimsahan425@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России «Разработка микрокамерных раневых покрытий, обеспечивающих локальную модуляцию оксидативного гомеостаза тканей» (регистрационный номер 122031600259-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.03.2023

Принята к печати 12.07.2023

Опубликована 20.09.2023

Ivanov A.N., Sahan M.A., Ermakov A.V., Lengert E.V., Savkina A.A., Stepanova T.V., Kiriyaži T.S., Loiko D.D.

The effect of polylactide microchamber wound dressing loaded with tannic acid on the microcirculation in the area of acute experimental excision skin wound defect

Razumovsky Saratov State Medical University,
Bolshaya Kazachya St. 112, Saratov, 410012, Russian Federation

Introduction. The high prevalence of open skin lesions calls for new approaches to treatment of skin wounds. Considering therapeutic and cost efficiency, a polylactide microchamber wound dressing loaded with tannic acid is promising. The dynamics of skin wound healing closely correlates with changes in the microcirculatory system.

Aim. To evaluate microcirculatory changes during the application of a polylactide microchamber wound dressing loaded with tannic acid.

Methods. The study was performed on 55 white male rats divided into four groups: intact animals ($n=10$), comparison group ($n=15$), placebo group ($n=15$), and experimental group ($n=15$). An acute, 10×10 mm, excisional skin wound was created in the animals, and it was not subjected to any treatment. Animals of the placebo group were subjected to one application of a microchamber polylactide biodegradable coating without active components on the full-thickness experimental skin defect. Rats of the experimental group were subjected to one application of polylactide biodegradable coating of the same size with microchambers loaded with tannic acid. The state of microcirculation in all experimental groups was assessed by laser Doppler flowmetry. The mean perfusion rate was determined along with the amplitudes of endothelial, neurogenic, myogenic, pulse, and respiratory oscillations on the 7th and 14th days of the experiment. Results were compared using non-parametric Mann-Whitney test for independent samples and Wilcoxon test for dependent variables. A critical p-value of 0.05 was used.

Results. The skin damage caused persistent microcirculatory changes at the wound defect periphery. These changes were accompanied by redistribution of the roles of active and passive mechanisms that modulate the microcirculation and by an increase in the perfusion rate by 27–28% by the 7th and 14th days of the study. Closure of a skin defect with a wound dressing without active ingredients caused a decrease in the increased perfusion rate by 5.3% by the 7th day and by 13% by the 14th day vs. comparison group. Loading the coating chambers with tannic acid increased the effectiveness of perfusion rate normalization by 11.3% by the 7th day and caused complete normalization by the 14th day. Also, in this group by the 14th day, there was complete normalization of endothelial, neurogenic, and myogenic fluctuations.

Conclusion. Loading a polylactide microchamber wound dressing with tannic acid increases its effectiveness in normalizing the skin microcirculation at the edges of a wound defect and facilitates wound healing.

Keywords: laser Doppler flowmetry; polylactic acid; wound coverings; microcirculation; tannic acid; skin wound defect

For citation: Ivanov A.N., Sahan M.A., Ermakov A.V., Lengert E.V., Savkina A.A., Stepanova T.V., Kiriyaži T.S., Loiko D.D. The effect of polylactide microchamber wound dressing loaded with tannic acid on the microcirculation in the area of acute experimental excision skin wound defect. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(3): 97–108. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.97-108

Author's contribution: The concept and design of the study – Ivanov A.N., Ermakov A.V.; collection and processing of material – Savkina A.A., Lengert E.V., Stepanova T.V.; statistical processing of the material – Kiriyaži T.S., Loiko D.D.; text writing – Sahan M.A., Kiriyaži T.S.; editing – Ivanov A.N. Approval of the final version of the article – all authors.

For correspondence: Maksim A. Sahan, Assistant of the Department of Physiology named after I.A. Chuevsky of the SSMU named after V.I. Razumovsky, e-mail: maksimsahan425@gmail.com

Information about the authors:

Ivanov A.N., <https://orcid.org/0000-0003-4061-5221>

Sahan M.A., <https://orcid.org/0009-0004-3909-657X>

Ermakov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-8105-5932>

Lengert E.V., <https://orcid.org/0000-0002-6447-2811>

Stepanova T.V., <https://orcid.org/0009-0002-3203-4021>

Savkina A.A., <https://orcid.org/0000-0003-2357-400X>

Kiriyaži T.S., <https://orcid.org/0000-0003-1180-5560>

Loiko D.D., <https://orcid.org/0000-0003-4299-1108>

Financing. The study was performed within the framework of the state assignment of the Saratov State Medical University named after Razumovsky of the Ministry of Health of Russia (Grant No. 122031600259-9).

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

Received 18.03.2023

Accepted 12.07.2023

Published 20.09.2023

Введение

Травматизм в России является одной из ведущих проблем здравоохранения. В структуре травматизма на долю поверхностных повреждений и открытых ран приходится 18.4 % [1]. С возросшим количеством вооруженных конфликтов в мире ожидается кратное увеличение как травматизма, в целом, так и открытых поверхностных повреждений, в частности. Поэтому проблема поиска новых методов лечения раневых дефектов кожи стоит особо остро. Очевидно, что современные средства лечения должны соответствовать определенным критериям: эффективность (скорость заживления раны, отсутствие осложнений), экономическая целесообразность (стоимость производства средств лечения.), удобство применения.

Общим трендом при создании современных раневых покрытий является использование биodeградируемых полимеров, что препятствует дополнительному повреждению тканей при смене повязок и способствует ускорению репаративных процессов. В настоящее время продемонстрирована эффективность применения покрытий из природных и синтетических полимеров. Синтетические полимеры по сравнению с природными обладают рядом преимуществ, включая простоту изменения механических характеристик и структуры, отсутствие набухания и низкую антигенную нагрузку [2]. В полной мере этим критериям соответствуют раневые покрытия на основе синтетического полимера молочной кислоты (полилактида). С одной стороны, в экспериментальных исследованиях показано, что применение полилактида в качестве раневого покрытия позволяет ускорять процесс заживления ран при минимальном количестве осложнений, с другой стороны отмечена невысокая стоимость его производства, и, наконец, физико-химические свойства полимолочной кислоты **способствуют** удобству ее использования. Дальнейшее развитие данного направления безусловно имеет перспективы практического применения.

На сегодняшний день отечественными и зарубежными авторами была убедительно продемонстрирована эффективность применения покрытий из полилактида с фибриллярной структурой для стимуляции заживления ран [3, 4]. Вместе с тем, простые монокомпонентные покрытия в настоящее время эволюционно уступают

сложным системам адресной доставки, позволяющим активно влиять на все стадии течения репаративных процессов от остановки кровотечения -- до формирования рубца. Фибриллярная структура покрытия имеет ряд ограничений по загрузке в него активных компонентов за счет включения последних в состав фибрилл при формировании или их абсорбции на поверхности фибрилл. В частности, способы загрузки компонентов в покрытия существенно зависят от химической структуры, стабильности, устойчивости к нагреванию активного компонента и могут быть использованы не для всех классов веществ. Одним из возможных направлений развития технологий создания полилактидных покрытий представляется модификация микроархитектоники полимера, за счет изменения технологии формирования. Так, показана возможность модификации трехмерной структуры полилактида, с формированием в ней микрорезервуаров (микрокамер) [5, 12]. Наличие микрокамер позволяет использовать их в качестве емкостей для биологически активных веществ практически без ограничений по химическому строению активного компонента, и тем самым эффективнее влиять на течение раневого процесса.

Известно, что раневой процесс включает в себя 3 последовательные фазы (стадии): фаза воспаления, фаза пролиферации (регенерации) и фаза ремоделирования [6]. Очевидно, что срок заживления раны напрямую зависит от скорости сменяемости фаз. В этой связи подбор биологически активного вещества должен осуществляться с учетом его влияния на разные стадии раневого процесса. В качестве биологически активного вещества перспективным представляется использование таниновой кислоты. Из данных литературы известно, что таниновая кислота обладает выраженным противовоспалительным действием, способствует индукции репаративных процессов, а также задействована в процессах ремоделирования коллагена [7–9], т.е. эффекты таниновой кислоты осуществляются на всем протяжении заживления раны.

Динамика раневого процесса тесно связана с состоянием сосудистого русла в области раны [10]. Мониторинг реакций в системе микроциркуляции позволяет комплексно оценивать механизмы репаративной регенерации на всех стадиях заживления.

Оценка влияния полилактидного микрокамерного раневого покрытия загруженного таниновой кислотой на функциональное состояние микроциркуляции в области раневого дефекта кожи явилось целью настоящего исследования.

Методика

Исследование проводилось на беспородных крысах — самцах (масса 180–240 г, возраст от 6 до 12 мес). Было сформировано 4 группы: 1-я группа — интактные животные (контроль, $n=10$); 2-я — группа сравнения (модель острой эксцизионной кожной раны без лечения, $n=15$); 3-я — группа «плацебо» (модель острой эксцизионной кожной раны + закрытие раны полилактидным микрокамерным раневым покрытием без активных компонентов, $n=15$); 4-я — опытная группа (модель острой эксцизионной кожной раны + закрытие раны полилактидным микрокамерным раневым покрытием загруженным таниновой кислотой).

Все лабораторные животные содержались в условиях вивария в соответствии с СанПиНом 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» вместе с ГОСТ 33215–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными».

Эксперименты проводились в соответствии с регламентом декларации ЕС от 22 сентября 2010 г. об использовании лабораторных животных в научных целях и с Федеральным законом от 27.12.2018 N 498-ФЗ (ред. от 27.12.2019) «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации». Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского (протокол №12 от 30.06.2022 года).

Все хирургические манипуляции проводились под общей анестезией (раствор тилетамина и золазепам 10 мг/кг (0,1 мл/кг массы тела животного) и ксилазина гидрохлорида — 1 мг/кг (0,05 мл/кг) массы тела.

Животным группы сравнения, опытной группы и группы «плацебо» моделировалась острая эксцизионная кожная рана [11]. Манипуляция проводилась в условиях операционной вивария с соблюдений всех правил асептики и антисептики. Крысу фиксировали в положении на животе. После депиляции, кожу трёхкратно обрабатывали растворами антисептиков. При помощи квадратного трафарета 10 x 10 мм и 5% раствора йода в межлопаточной области наносилась разметка будущей раны. Проводилось иссечение всей толщины эпидермиса и дермы по разметке. Гемостаз осуществлялся путем аппликации сухим сте-

рильным марлевым тампоном. Крысам 3-й и 4-й групп на кожный дефект накладывалось раневое покрытие идентичного размера.

Раневые покрытия из полилактида (полимолочная кислота) в виде массивов полимерных микрорезервуаров (микрокамер) были изготовлены с применением специально изготовленного шаблона с рельефом в виде лунок микрокамерного размера [5].

Оценку системы микроциркуляции крови проводили методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) [13]. Использовали лазерный анализатор микроциркуляции «ЛАКК-02» (ООО НПП «ЛАЗМА») с программным обеспечением LDF 3.0.2.395. Зондировался участок ткани, расположенный на 1 мм выше кожного дефекта по сагиттальной линии. Регистрацию показателей микроциркуляции производили на 7-е и 14-е сут эксперимента. Регистрация параметров в указанные сроки обусловлена необходимостью оценки в условиях эксперимента биосовместимости покрытия, целью оценки возможности его практического применения. Интервал времени между 7-ми и 14-ми сут соответствует развитию полноценной иммунной реакции на антигены. В более ранние сроки оценка микроциркуляция не целесообразна, поскольку в большей степени зависит от альтерации при формировании раны, чем от параметров раневого покрытия.

Длительность записи одного исследования составляла 8 мин. На первом этапе анализировался показатель средней перфузии в микроциркуляторном русле (М). Затем на основе записанных ЛДФ-грамм исследовали ритмы колебаний перфузии. Для этих целей проводили вейвлет-преобразование записанного амплитудно-частотного спектра. Данное преобразование позволяло изолировано оценивать вклад каждого звена, принимающего участие в модуляции микрокровотока. Оценивались активные (эндотелиальные, нейрогенные, миогенные) и пассивные (дыхательные, пульсовые) механизмы модуляции кровотока.

Так же на 7-е и 14-е сут эксперимента оценивалась динамика регенерации раневой поверхности. Для этого на раневой дефект накладывалась стерильная полимерная пленка, затем маркером на пленку наносилась линия по краю раневого дефекта, после данной манипуляции пленка накладывалась на миллиметровую бумагу, по которой проводилось вычисление площади раневого дефекта на момент исследования

Для статистической обработки полученных результатов использовали программный пакет «Statistica 10» (StatSoft, США). Большинство данных не соответствовали закону нормального распределения, поэтому рассчитывали медиану, верхний и нижний

квартили. Сравнение результатов проводилось попарно между группами с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни для независимых выборок и Вилкоксона для сравнений внутри группы, на основании которых рассчитывали показатель статистической значимости p с критическим уровнем равным 0,05.

Результаты

В ходе проводимого исследования, на основании анализа ЛДФ-грамм установлено, что к 7-м сут эксперимента у животных, которым выполнена модель острой эксцизионной кожной раны (группа сравнения), происходит повышение показателя средней перфузии в микроциркуляторном русле на 27,8%, по сравнению с группой контроля (таблица 1). При анализе

амплитудно-частотного спектра выявлено, что рост перфузии на границе раневого дефекта связан с вкладом как активных, так и пассивных механизмов модуляции кровотока. Так, отмечен статистически значимый рост амплитуд миогенных (на 57%), дыхательных (на 45%) и пульсовых колебаний (в 4,3 раза). В то же время, произошло падение амплитуд в эндотелиальном спектре частотного диапазона на 56%. Обращает на себя внимание тот факт, что вклад в модуляцию нейрогенных флуксуаций минимален, и не имеет значимых изменений относительно контроля.

Следует отметить, что на 7-е сут эксперимента у крыс группы сравнения отмечалось сокращение площади раневого дефекта, которая в среднем составила 32,3 (28; 46) мм² (рисунок).

Таблица 1/Table 1

Показатели микроциркуляции в области раневого дефекта кожи у крыс разных групп на 7-е сут

Indicators of microcirculation in the area of the wound defect of the skin in rats of different groups on the 7th day

Параметры Indicates	Контроль Control (n=10)	Группа сравнения Comparison group (n=15)	Группа «плацебо» «Placebo» group (n=15)	Опытная группа Experimental group (n=15)
Показатель перфузии, перф. ед. Perfusion index perf. unit.	10,4 (9,6; 12,3)	13,3 (12,8; 14,1) $p_1 < 0,001$	12,6 (12,4; 13,5) $p_1 = 0,002$ $p_2 = 0,022$	11,8 (10,7; 12,6) $p_1 = 0,080$ $p_2 < 0,001$ $p_3 = 0,009$
Амплитуда эндотелиальных колебаний, усл. ед. Amplitude of endothelial oscillations, units	15,2 (11,5; 17,7)	6,6 (5,3; 6,9) $p_1 < 0,001$	5,2 (4,2; 6,2) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,051$	5,9 (4,1; 13,2) $p_1 = 0,007$ $p_2 = 0,678$ $p_3 = 0,534$
Амплитуда нейрогенных колебаний, усл. ед. Amplitude of neurogenic oscillations, units.	6,8 (6,7; 8,2)	6,1 (5,8; 7,5) $p_1 = 0,063$	6,7 (5,9; 10,7) $p_1 = 0,802$ $p_2 = 0,184$	6,7 (5,1; 15,1) $p_1 = 0,718$ $p_2 = 0,648$ $p_3 = 0,772$
Амплитуда миогенных колебаний, усл. ед. Amplitude of myogenic oscillations, units	6,7 (5,9; 7,9)	10,5 (8,7; 11,2) $p_1 < 0,001$	8,4 (7,4; 9,5) $p_1 = 0,024$ $p_2 < 0,001$	8,4 (8,1; 9,7) $p_1 = 0,080$ $p_2 = 0,002$ $p_3 = 0,648$
Амплитуда дыхательных колебаний, усл. ед. Amplitude of respiratory oscillations, units	9,1 (7,9; 11,6)	13,2 (11,4; 16,2) $p_1 = 0,002$	14,5 (13,1; 18,7) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,105$	12,0 (11,3; 12,8) $p_1 = 0,037$ $p_2 = 0,097$ $p_3 < 0,001$
Амплитуда пульсовых колебаний, усл. ед. Amplitude of pulse oscillations, units	3,8 (3,3; 4,7)	16,5 (13,1; 28,6) $p_1 < 0,001$	19,7 (16,3; 21,5) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,455$	20,7 (14,0; 27,8) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,868$ $p_3 = 0,709$

Примечание. Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей.

p_1 – уровень значимости по сравнению с контролем; p_2 – уровень значимости относительно значений группы сравнения на 7-е сут эксперимента; p_3 – уровень значимости относительно значений группы «плацебо» на 7-е сут эксперимента.

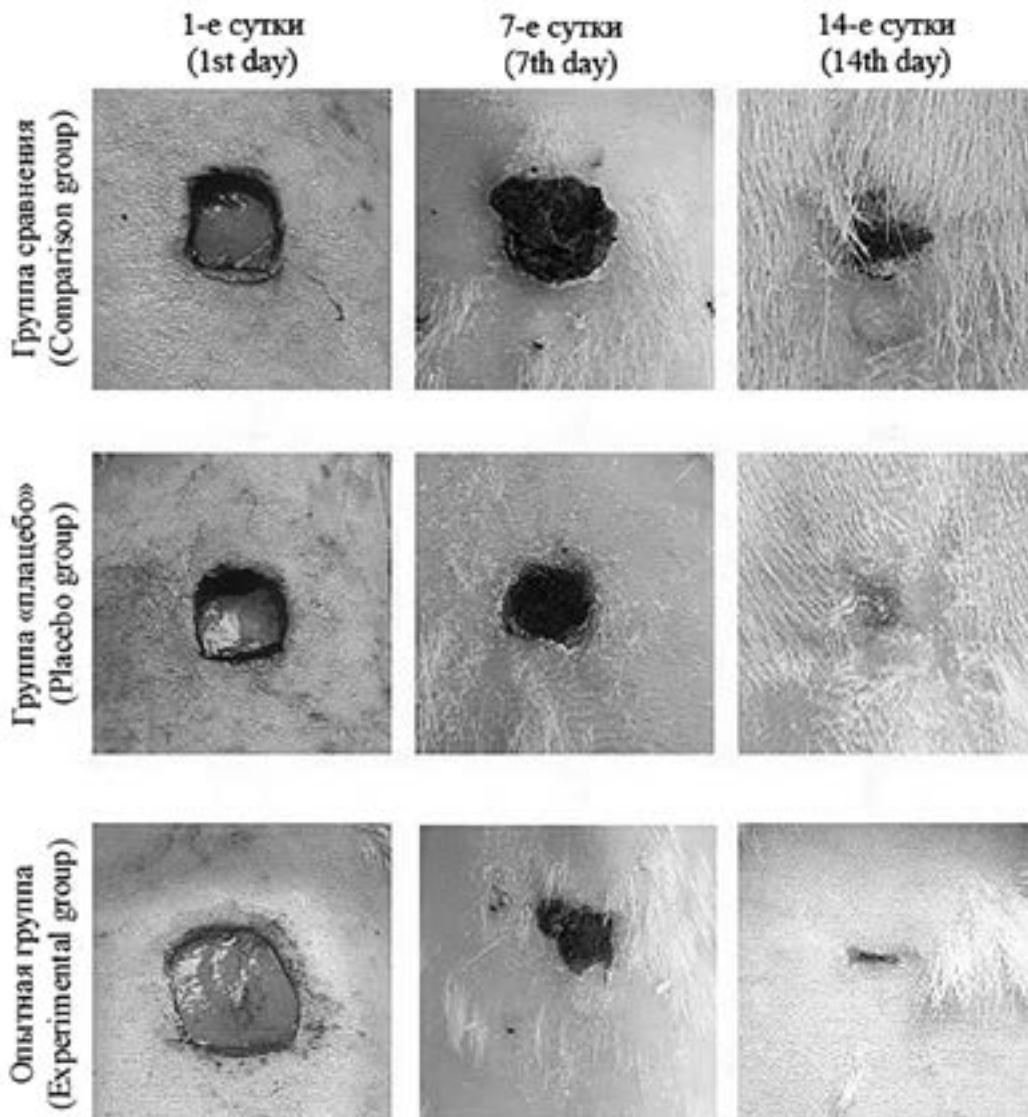
Notes. Data are presented as median, upper and lower quartiles.

p_1 – significance level compared to control; p_2 – significance level relative to the values of the comparison group on the 7th day of the experiment; p_3 – significance level relative to the values of the “placebo” group on the 7th day of the experiment.

К 14-м сут исследования площадь раны у животных группы сравнения значимо ($p < 0,001$) уменьшалась по сравнению с 7-ми сут и составляла 6,3 (5;16) мм². При анализе ЛДФ-грамм установлено, что 14-м сут эксперимента в группе сравнения не происходит принципиальной смены тенденций в механизмах регуляции микрокровотока, относительно 7-х сут (таблица 1). По сравнению с группой контроля, по-прежнему сохраняется повышенный показатель средней перфузии (на 26,9%), по-прежнему наблюда-

ется рост амплитуд миогенных (на 58%) дыхательных (на 61%) и пульсовых (в 4,8 раза) колебаний при неизменном статусе нейрогенных влияний. При этом продолжается падение амплитуд эндотелиальных колебаний, статистически значимое как по отношению к контролю, так и по отношению к 7-м сут группы сравнения.

Таким образом, у животных, которым воспроизведена модель острой эксцизионной кожной раны происходят стойкие изменения функциональных харак-



Эпителлизация ран.
Epithelization of wounds.

теристик микроциркуляторного русла на периферии кожного дефекта. Отмеченные изменения, происходят за счет перераспределения активных и пассивных механизмов модуляции кровотока и сохраняются, вплоть до 14-х сут.

Данные, представленные в **таблице 1**, свидетельствуют, что наложение полилактидного раневого покрытия без активных компонентов у крыс группы

«плацебо» приводит к статистически значимому снижению перфузии кожи краев раны относительно таковой у животных группы сравнения на 5,3%. Вместе с тем, у крыс опытной группы «плацебо» на 7-е сут эксперимента перфузионный показатель кожи краев раны превышает уровень значений группы контроля на 21,1%. У крыс данной группы через 7 сут после наложения раневого покрытия без активных компо-

Таблица 2/ Table 2

Показатели микроциркуляции в области раневого дефекта кожи у крыс разных групп на 14-е сут**Indicators of microcirculation in the area of the wound defect of the skin in rats of different groups on the 14th day**

Параметры Indication	Контроль Control (n=10)	Группа сравнения Comparison group (n=15)	Группа «плацебо» «Placebo» group (n=15)	Опытная группа Experimental group (n=15)
Показатель перфузии, перф. ед. Perfusion index perf. unit.	10,4 (9,6; 12,3)	13,2(11,3; 14,1) $p_1 = 0,015$	11,4 (11,1; 11,7) $p_1 = 0,304$ $p_2 = 0,022$ $p_3 < 0,001$	11,5 (10,7; 12,0) $p_1 = 0,375$ $p_2 = 0,022$ $p_4 = 1$ $p_5 = 0,351$
Амплитуда эндотелиальных колебаний, усл. ед. Amplitude of endothelial oscillations, units	15,2 (11,5; 17,7)	5,3 (4,04; 6,1) $p_1 < 0,001$	4,9 (3,3; 5,3) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,299$ $p_3 = 0,340$	8,1 (5,0; 18,0) $p_1 = 0,157$ $p_2 = 0,020$ $p_4 = 0,006$ $p_5 = 0,184$
Амплитуда нейрогенных колебаний, усл. ед. Amplitude of neurogenic oscillations, units.	6,8 (6,7; 8,2)	6,7 (5,4; 7,5) $p_1 = 0,157$	7,5 (6,9; 12,1) $p_1 = 0,212$ $p_2 = 0,034$ $p_3 = 0,198$	9,3 (6,8; 11,6) $p_1 = 0,174$ $p_2 = 0,031$ $p_4 = 0,913$ $p_5 = 0,678$
Амплитуда миогенных колебаний, усл. ед. Amplitude of myogenic oscillations, units	6,7 (5,9; 7,9)	10,6 (7,3; 11,6) $p_1 < 0,001$	9 (8,2; 12,1) $p_1 = 0,003$ $p_2 = 0,740$ $p_3 = 0,105$	8,2 (7,2; 9,4) $p_1 = 0,157$ $p_2 = 0,022$ $p_4 = 0,047$ $p_5 = 0,281$
Амплитуда дыхательных колебаний, усл. ед. Amplitude of respiratory oscillations, units	9,1 (7,9; 11,6)	14,7 (12,5; 18,8) $p_1 < 0,001$	11,8 (11,1; 15,1) $p_1 = 0,008$ $p_2 = 0,012$ $p_3 < 0,001$	13,3 (10,0; 14,3) $p_1 = 0,005$ $p_2 = 0,062$ $p_4 = 0,982$ $p_5 = 0,147$
Амплитуда пульсовых колебаний, усл. ед. Amplitude of pulse oscillations, units	3,8 (3,3; 4,7)	18,6 (16,4; 20,1) $p_1 < 0,001$	19,6 (17,9; 20,7) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,361$ $p_3 = 0,740$	18,2 (15,7; 19,8) $p_1 < 0,001$ $p_2 = 0,709$ $p_4 = 0,284$ $p_5 = 0,320$

Примечание. Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей. p_1 – уровень значимости по сравнению с контролем. p_2 – уровень значимости относительно значений группы сравнения на 14-е сут эксперимента. p_3 – уровень значимости относительно значений группы «плацебо» на 7-е сут эксперимента. p_4 – уровень значимости различий по сравнению с группой «плацебо» на 14-е сут эксперимента. p_5 – уровень значимости различий по сравнению с опытной группой через 7 суток после формирования раневого дефекта и наложения раневого покрытия, содержащего таниновую кислоту.

Notes. Data are presented as median, upper and lower quartiles. p_1 – significance level compared to control. p_2 – significance level relative to the values of the comparison group on the 14th day of the experiment. p_3 – level of significance relative to the values of the “placebo” group on the 7th day of the experiment. p_4 – significance level of differences compared with the placebo group on the 14th day of the experiment. p_5 – level of significance of differences compared to the experimental group 7 days after the formation of the wound defect and the application of a wound dressing containing tannic acid.

нентов так же, как и в группе сравнения отмечается перераспределение вклада активных и пассивных механизмов модуляции кровотока, что проявляется значимым повышением нормированных амплитуд сердечных колебаний в 5,2 раза, дыхательных колебаний на 59,3%, миогенных колебаний на 25% и снижением нормированных амплитуд эндотелиальных колебаний на 65,7% относительно значений группы контроля. При сопоставлении характеристик амплитудно-частотного спектра ЛДФ-грамм у крыс с раневым дефектом кожи на 7-е сут эксперимента обнаружено, что наложение полилактидного покрытия, не содержащего активных компонентов, вызывает значимое снижение величины нормированной амплитуды миогенных колебаний у животных опытной группы на 20% относительно таковой в группе сравнения. Различия параметров амплитуд колебаний в других регуляторных диапазонах у животных группы «плацебо» и группы сравнения не выявлены.

Данные, представленные в **таблице 2**, свидетельствуют, что у крыс группы «плацебо» на 14-е сут отмечается снижение перфузионного показателя кожи краев раны на 9,5% по сравнению со значениями, зарегистрированными на 7-е сут эксперимента. Это сопровождается статистически значимым снижением нормированной амплитуды дыхательных колебаний на 18,6%.

Результаты, представленные в **таблице 2** отражают, что значимой динамики величины нормированных амплитуд эндотелиальных, нейрогенных, миогенных и сердечных колебаний в спектре ЛДФ-грамм у крыс группы «плацебо» в период с 7-х по 14-е сут эксперимента не обнаружено. Следует отметить, что на 14-е сут показатель перфузии кожи краев раны у животных группы «плацебо» находится в пределах вариабельности значений группы контроля. Вместе с тем, на 14-е сут эксперимента у животных группы «плацебо» отмечается увеличение нормированных амплитуд сердечных колебаний в 5,2 раза, дыхательных на 29,6%, миогенных на 34,3 %, а также снижение величины нормированных колебаний в эндотелиальном диапазоне на 67,7% относительно значений группы контроля. В ходе сравнительного анализа установлено, что на 14-е сут показатель перфузии у крыс группы «плацебо» статистически значимо ниже на 13,6%, чем у животных группы сравнения. При сопоставлении параметров амплитудно-частотного спектра ЛДФ-грамм обнаружено, что у крыс группы «плацебо» нормированные амплитуды дыхательных колебаний на 19,7% ниже, чем у крыс группы сравнения. Значимых различий величин нормирован-

ных амплитуд колебаний в эндотелиальном, нейрогенном, миогенном и сердечном диапазонах у крыс группы «плацебо» и группы сравнения на 14-е сут после формирования раневого дефекта кожи не обнаружено.

Макроскопически отмечается, что у животных группы «плацебо» на 7-е сут эксперимента площадь раны сокращалась в среднем до 23,4 (20; 36) мм², что статистически значимо меньше ($p = 0,008$), чем у крыс группы сравнения. Через 2 недели у 40% животных группы «плацебо» кожная рана эпителизировалась полностью, площадь раны в группе в среднем составила 4,4 (0;10) мм² (**рисунок**).

Таким образом, у крыс группы «плацебо» использование полилактидного покрытия без активных компонентов на 14-е сутки эксперимента снижает повышенную перфузию кожи краев раневого дефекта относительно значений группы сравнения, что сопровождается уменьшением значений нормированной амплитуды дыхательных колебаний.

Анализ ЛДФ-грамм крыс опытной группы показал, что на 7-е сут у животных, рана которых была закрыта полилактидным микрокамерным раневым покрытием, загруженным таниновой кислотой, не отмечается повышения показателя средней перфузии по отношению к группе контроля, что характерно для группы сравнения (**табл. 1**). Но при анализе амплитудно-частотного спектра отмечается перераспределение ролей в звеньях модуляции микрокровотока. При сравнении показателей микроциркуляции в контрольной и опытной группах, в последней происходит резкий рост вклада пассивных механизмов (дыхательных колебаний на 31,8%, пульсовых колебаний в 5,4 раза). В общей структуре микрокровотока данный рост компенсируется резким снижением амплитуд эндотелиальных колебаний (на 61,2%).

При сопоставлении показателей микроциркуляции в области раневого дефекта у крыс опытной группы, с показателями группы сравнения, отмечается статистически значимое снижение показателя средней перфузии (на 11,3%) и нормированной амплитуды миогенных колебаний (на 20%). В других диапазонах амплитудно-частотного спектра статистически значимых изменений не выявлено (**табл. 1**).

При сравнении показателей микрокровотока на 7-е сут эксперимента у животных опытной группы и группы «плацебо» установлено, что загрузка таниновой кислоты в микрокамеры покрытия приводит к уменьшению перфузии кожи краев раневого дефекта на 6,3% и уменьшению нормированных амплитуд дыхательных колебаний на 17,2% (**табл. 1**).

На 14-е сут исследования у животных опытной группы показатель средней перфузии статистически значимо ниже, относительно крыс группы сравнения в те же сроки, и находится в пределах вариации показателя средней перфузии контрольной группы (**табл. 2**). Анализ амплитудно-частотного спектра показал, что у крыс рана которых была покрыта полилактидом с микрокамерами заполненными таниновой кислотой происходит повышение амплитуд эндотелиальных (на 52,8%) и нейрогенных колебаний (на 38,8%), при этом снижается роль вазомоции (на 22,6%), по сравнению с животными без раневого покрытия. Данные показатели статистически значимых отличий от контрольных значений не имеют (**табл. 2**). Пульсовые и дыхательные флуксуации у опытной группы остались в тех же значениях, что и группы сравнения, значительно превышая аналогичные показатели контрольной группы (**табл. 2**).

При сравнении параметров амплитудно-частотного спектра ЛДФ-грамм у животных опытной группы и группы «плацебо» выявлено, что загрузка таниновой кислоты в микрокамеры раневого покрытия вызывает увеличение амплитуд эндотелиальных колебаний на 65,3% и снижение на 8,8% амплитуд миогенных колебаний перфузии кожи краев раневого дефекта на 14-е сут эксперимента (**табл. 2**).

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что у животных опытной группы, которым выполнялось закрытие раневого дефекта полилактидным покрытием с таниновой кислотой, на 7-е сут эксперимента площадь раны сокращалась (**рисунок**) в среднем до 15,6 (10,8; 21,2) мм². Площадь раны у животных опытной группы была значимо меньше ($p = 0,008$), чем у крыс группы сравнения и крыс группы «плацебо» ($p = 0,032$). Через 2 нед у 60% животных опытной группы кожная рана эпителизировалась полностью (**рисунок**), площадь раны в группе в среднем составила 5,1 (0;8) мм². Значимых различий площади раны через 14 сут после наложения покрытий без активных компонентов и покрытий с микрокамерами, загруженными таниновой кислотой, не выявлено ($p=0,927$).

Таким образом, результаты исследования показывают, что полилактидные раневые покрытия с микрокамерами заполненными таниновой кислотой оказывают значительное влияние на активные механизмы модуляции кровотока, нормализуя перфузионный показатель. Нормализация микроциркуляции кожи краев раневого дефекта сопровождается ускорением темпов эпителизации раны на первой неделе эксперимента.

Обсуждение

Изменения в системе микроциркуляции в области острых эксцизионных кожных ран широко представлены в доступной литературе и тесно связаны с развитием воспалительного процесса [14–17]. При повреждении клеточных элементов ткани происходит высвобождение фосфолипидов мембран, в частности арахидоновой кислоты. Под действием ферментов (фосфолипаза А2), запускается каскад реакций с образованием метаболитов арахидоновой кислоты (PGE2, PGI2, PAF, LTВ4 и др.) [18]. Диффузия вышеуказанных субстанций за пределы зоны первичной альтерации способствуют снижению базального тонуса в мелких артериях и крупных артериолах на входе в микроциркуляторное русло. Происходит усиление притока артериальной крови, что выражается *увеличением амплитуды пульсовых колебаний*. В то же время, PAF и LTВ4, являясь мощными хемоаттрактантами, стимулируют миграцию тканевых фагоцитов и форменных элементов крови к зоне поражения [19]. Мигрирующие клетки начинают активно продуцировать множество вазоактивных соединений (гистамин, NO, IL-1 β , TNF- α и др.). Под действием указанных соединений меняется сосудистая проницаемость, что ведет к выходу жидкой части крови через сосудистую стенку микроциркуляторного русла [19]. Скопление жидкости в интерстиции вызывает сдавление мелких вен и лимфатических сосудов, что обуславливает ухудшение венозного оттока. Ухудшение венозного оттока закономерно приводит к увеличению объема крови в веноулярном звене микроциркуляции, а соответственно и к *росту амплитуды дыхательной волны*. Нарушения микроциркуляторного кровообращения в зоне повреждения (смешанная гиперемия), приводят к локальному дефициту кислорода, что в свою очередь, вызывает тканевую гипоксию с накоплением недоокисленных метаболитов – метаболический ацидоз [20]. В условиях метаболического ацидоза меняется базальный тонус сосудов прекапиллярного звена микроциркуляции, что отражается в *увеличении амплитуды миогенных колебаний или вазомоций*.

Следует отметить, что при анализе амплитудно-частотного спектра ЛДФ-грамм крыс, которым выполнена модель острой эксцизионной кожной раны, выявлено снижение амплитуды эндотелиальных колебаний, что отражает снижение синтеза NO эндотелием сосудов. Данный феномен может иметь под собой несколько причин. Во-первых, происходит снижение активности эндотелиальной NOS за счет обратной связи по конечному продукту. Это обусловлено

усиленным синтезом NO кератиноцитами эпидермиса (NOS-1 изоформа), а также мигрировавшими в область воспаления макрофагами (mNOS изоформа), фибробластами (NOS-3 изоформа) [21]. Во-вторых метаболический ацидоз, который сформировался в зоне раневого дефекта, приводит к поражению эндотелиальных клеток с нарушением их функций, за счет прямого цитотоксического действия (набухание эндотелия) [22].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют, что наличие эксцизионной кожной раны способствует перераспределению активных и пассивных факторов контроля микроциркуляции в области раневого дефекта, что в конечном итоге выражается *ростом средней перфузии* при ЛДФ.

Результаты исследования микроциркуляции кожи краев раневого дефекта свидетельствуют, что наложение микрокамерного полилактидного покрытия не провоцирует воспалительных изменений микроциркуляции. Так, перфузия краев раны у животных группы «плацебо» ниже таковой в группе сравнения на 7-е и на 14-е сут эксперимента. При этом нормированные амплитуды миогенных колебаний у крыс группы «плацебо» на 7-е сут эксперимента значимо ниже, а на 14-е сут имеют тенденцию к уменьшению среднего значения относительно таковых в группе сравнения. Отсутствие признаков увеличения перфузии и миогенных колебаний в тканях под влиянием полилактидного покрытия свидетельствует в пользу того, что оно биосовместимо и не вызывает дополнительной продукции цитокинов и/или альтерации тканей [23].

Представленные данные свидетельствуют, что применение полилактидного микрокамерного раневого покрытия загруженного таниновой кислотой позволяет ускорить темпы заживления и эффективно нормализовать перфузию краев кожного дефекта. Согласно данным литературы, в условиях живого организма полилактид путем гидролиза сложноэфирных связей разлагается до мономеров молочной кислоты с последующим образованием H_2O и CO_2 [24]. Скорость гидролиза напрямую зависит от кислотности среды окружающей полимер (чем выше кислотность, тем ниже темпы биodeградации). Указанное свойство, с одной стороны препятствует накоплению молочной кислоты, а соответственно и образованию локального ацидоза, с другой стороны способствует контролируемому выделению таниновой кислоты из микрокамер. Последнее обстоятельство особенно важно, так как танины в больших концентрациях могут явиться причиной оксидативного стресса за счет автоокисления [25].

Выделившаяся в рану таниновая кислота обладает рядом эффектов, способных благотворно влиять на

течение раневого процесса. Танины обладают противовоспалительным действием за счет ЦОГ-1 ингибирующей активности, что способствует снижению синтеза PGE₂, PGI₂ [24]. Так же установлено, что таниновая кислота способствует усилению экспрессии транскрипционного фактора (KLF2) в эндотелиальных клетках. KLF2 вызывает индукцию eNOS, а также блокирует синтез провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α , снижая проницаемость сосудистой стенки [26]. Танинам присущи выраженные антиоксидантные свойства. За счет антиоксидантных эффектов угнетается влияние свободных радикалов, что предохраняет клетки, в частности эндотелия, от повреждения [25].

Описанные эффекты естественным образом оказывают влияние на состоянии микроциркуляции. Выявлено, что уже к 7-м сут у животных опытной группы *амплитуды вазогенных флуксуаций опускаются до интактных значений*, а к 14-м сут *полностью восстанавливаются амплитуды эндотелиальных колебаний*. К 14-м сут исследования выявлено *усиление амплитуды нейрогенных колебаний*, что отражает повышение уровня шунтирующего кровотока через артериоло-венулярные анастомозы [13]. Известно, что в интактной коже до 60% всех шунтов включено в работу. Следовательно, повышение амплитуд нейрогенных колебаний может косвенно свидетельствовать о восстановлении нормального физиологического состояния ткани на периферии раны.

Отдельно следует отметить что восстановление кровотока у животных опытной группы ассоциировано с ускорением темпов регенерации тканей кожного дефекта и сокращения площади раны, особенно выраженным на первой неделе эксперимента. Известно, что полилактидное микроокружение усиливает деятельность дермальных фибробластов за счет активации трансформирующего фактора роста (TGF- β) [27]. Это способствует усиленному синтезу коллагена. Коллаген необходим для формирования каркаса (межклеточного матрикса), в который встраиваются клетки для дальнейшей пролиферации. Очевидно, что для формирования такого каркаса, важен не только синтез коллагена, но и его правильное распределение в пространстве. Формированию правильной трехмерной структуры среды способствуют несколько факторов. Во-первых, само полимерное раневое покрытие выполняет опорную функцию, препятствуя механической деформации тканей. Во-вторых, таниновая кислота, обладая вяжущими свойствами, обуславливает связывание аминокрупп структурных белков (коллагеновых волокон) [25].

Таким образом, полилактидные микрокамерные раневые покрытия, загруженные таниновой кислотой, оказывают влияние на все фазы раневого процесса, обеспечивая их быструю сменяемость: от фазы воспаления к фазе пролиферации (регенерации), от фазы пролиферации к фазе ремоделирования.

Заключение

Эксцизионное повреждение кожи приводит к развитию стойких изменений в системе микроциркуляции на периферии раневого дефекта. Указанные изменения связаны с перераспределением роли активных и пассивных механизмов модуляции микрокровотока. Выраженность изменений прямо коррелирует с течением раневого процесса.

Применение полилактидных микрокамерных раневых покрытий, загруженных таниновой кислотой способствует более быстрому заживлению ран, что отражается в нормализации показателей микроциркуляции.

Литература

(п.п. 1-5; 7-10; 12; 14-20; 22- 24; 27 см. References)

6. Муромцева Е.В., Сергацкий К.И., Никольский В.И., Шабров А.В., Альджабр М., Захаров А.Д. Лечение ран в зависимости от фазы раневого процесса. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки.* 2022; 3(63): 93-109.
11. Тихвинская О.А., Волкова Н.А., Рогольская Е.Ю., Ревенко Е.Б., Мазур С.П. Заживление эксцизионных кожных ран у мышей в присутствии матриц из плазмы крови. *Вісник проблем біології і медицини.* 2018; 2(4(147)): 307-12.
13. Крупаткин А.И. Колебания кровотока – новый диагностический язык в исследовании микроциркуляции. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* 2014; 13(1(49)): 83-99.
21. Смирнова И.Ю., Огородова Л.М., Деев И.А. Роль оксида азота в развитии заболеваний кожи. *Вопросы современной педиатрии.* 2009; 8(4): 90-4.
25. Орлова А.А., Повывдыш М.Н. Обзор методов качественного и количественного анализа танинов в растительном сырье. *Химия растительного сырья.* 2019; 4: 29-45.
26. Турпаев К.Т. Транскрипционный фактор KLF2 и его роль в регуляции воспалительных процессов. *Биохимия.* 2020; 85(1): 64-79.

References

1. *Russian Statistical Yearbook 2022.* Stat. book/Rosstat. 2022.
2. Verdolino D.V., Thomason H.A., Fotticchia A., Cartmell S. Wound dressings: curbing inflammation in chronic wound healing. *Emerg Top Life Sci.* 2021 Oct 29; 5(4): 523-37.
3. Bi H., Feng T., Li B., Han Y. In vitro and in vivo comparison study of electrospun
4. PLA and PLA/PVA/SA fiber membranes for wound healing. *Polymers (Basel).* 2020; 12(4): 839.
4. Bogdanova A.S., Sokolova A.I., Pavlova E.R., Klinov D.V., Bagrov D.V. Investigation of cellular morphology and proliferation on patterned electrospun PLA-gelatin mats. *Journal of Biological Physics.* 2022; 47: 205-14.
5. Ermakov A.V., Kudryavtseva V.L. Demina P.A., Verkhovskii R.A., Zhang J., Lengert E.V., et al. Site-specific release of reactive oxygen species from ordered arrays of microchambers based on polylactic acid and carbon nanodots. *Journal of materials chemistry* 2020; 8: 7977-86.
6. Muromtseva E.V., Sergatskiy K.I., Nikol'skiy V.I., Shabrov A.V., Al'dzhabr M., Zakharov A.D. Treatment of wounds depending on the phase of the wound process. *News of higher educational institutions. Povolzhskiy region. Meditsinskie nauki.* 2022; 3(63): 93-109. (In Russian)
7. Xu G., Xu N., Ren T., Chen C., Li J., Ding L., et al. Multifunctional chitosan/silver/tannic acid cryogels for hemostasis and wound healing. *International journal of biological macromolecules.* 2022; 208: 760–71.
8. Fang K., Gu Q., Zeng M., Huang Z., Qiu H., Miao J., et al. Tannic acid-reinforced zwitterionic hydrogels with multi-functionalities for diabetic wound treatment. *Journal of materials chemistry. B.* 2022; 10(22): 4142–52.
9. Kong W., Du Q., Qu Y., Shao C., Chen C., Sun J., et al. Tannic acid induces dentin biomineralization by crosslinking and surface modification. *RSC advances.* 2022; 12(6): 3454–64.
10. Ivanov A.N., Saveleva M.S., Kozadaev M.N., Matveeva O.V., Sal'kovskiy Yu E., Lyubun G.P., et al. New Approaches to Scaffold Biocompatibility Assessment. *BioNanoSci.* 2019; 9: 395–405.
11. Tikhvinskaya O.A., Volkova N.A., Rogul'skaya E.Yu., Revenko E.B., Mazur S.P. Healing of excisional skin wounds in mice in the presence of plasma matrices. *Bulletin of problems of biology and medicine.* 2018; 2(4 (147)): 307-12. (In Russian)
12. Mordovina E.A., Plastun V.O., Abdurashitov A.S., Proshin P.I., Raikova S.V., Bratashov D.N., et al. "Smart" Polylactic Acid Films with Ceftriaxone Loaded Microchamber Arrays for Personalized Antibiotic Therapy. *Pharmaceutics.* 2021; 14(1): 42.
13. Krupatkin A.I. Fluctuations in blood flow – a new diagnostic language in the study of microcirculation. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya.* 2014; 13(1(49)): 83-99. (In Russian)
14. Grambow E., Sorg H., Sorg C.G.G., Strüder D. Experimental Models to Study Skin Wound Healing with a Focus on Angiogenesis. *Medical sciences (Basel, Switzerland).* 2021; 9(3): 55.
15. Held M., Medved F., Petersen W., Tolzmann D.S., Rahmanian-Schwarz A., Schaller H.E., et al. A Quantitative Analysis of Microcirculation in Skin Defects Covered with Topical Wound Dressings or a Newly Developed Collagen Matrix. *Advances in skin & wound care.* 2017; 30(11): 517–21.
16. Rousselle P., Montmasson M., Garnier C. Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology.* 2019; 75-76: 12–26.
17. Zhao R., Liang H., Clarke E., Jackson C., Xue M. Inflammation in Chronic Wounds. *International journal of molecular sciences.* 2016; 17(12): 2085.
18. Sugimoto M., Arai I., Futaki N., Hashimoto Y., Honma Y., Nakaike S. Role of COX-1 and COX-2 on skin PGs biosynthesis by mechanical scratching in mice. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids.* 2006; 75(1): 1–8.
19. Artuc M., Hermes B., Steckelings U.M., Grützkau A., Henz B.M. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing-active participants or innocent bystanders. *Experimental dermatology.* 1999; 8(1): 1–16.

20. Haller H.L., Sander F., Popp D., Rapp M., Hartmann B., Demircan M., et al. Oxygen, pH, Lactate, and Metabolism-How Old Knowledge and New Insights Might Be Combined for New Wound Treatment. *Meditsina (Kaunas, Lithuania)*. 2021; 57(11): 1190.
21. Smirnova I.Yu., Ogorodova L.M., Deev I.A. The role of nitric oxide in the development of skin diseases. *Voprosy sovremennoy pediatrii*. 2009; 8(4): 90-4. (In Russian)
22. Crimi E., Taccone F.S., Infante T., Scolletta S., Crudele V., Napoli C. Effects of intracellular acidosis on endothelial function: an overview. *Journal of critical care*. 2012; 27(2): 108–18.
23. Ivanov, A.N., Saveleva, M.S., Kozadaev, M.N., Matveeva O.V., Sal'kovskiy Yu E., Lyubun G. P., et al. New Approaches to Scaffold Biocompatibility Assessment. *BioNanoScience*. 2019; 9: 395–405.
24. Humberto V.C. Hydrolytic degradation and in vivo resorption of poly-l-lactic acid-chitosan biomedical devices in the parietal bones of Wistar rats. *The Journal of international medical research*. 2019; 47(4): 1705–16.
25. Orlova A.A., Povydysh M.N. Review of methods for qualitative and quantitative analysis of tannins in plant materials. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2019; 4: 29-45. (In Russian)
26. Turpaev K.T. Transcription factor KLF2 and its role in the regulation of inflammatory processes. *Biokhimiya*. 2020; 85(1): 64-79. (In Russian)
27. Min Q., Liu J., Li J., Wan Y., Wu J. Chitosan-Poly lactide/Hyaluronic Acid Complex Microspheres as Carriers for Controlled Release of Bioactive Transforming Growth Factor- β 1. *Pharmaceutics*. 2018; 10(4): 239.

Сведения об авторах:

Иванов Алексей Николаевич, доктор мед. наук, зав. отд.-нием лабораторной диагностики НИИ травматологии, ортопедии и нейрохирургии, зав. Центральной научно-исследовательской лаб., зав. каф. нормальной физиологии им. И.А. Чувского ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

Сахань Максим Алексеевич, ассистент каф. нормальной физиологии им. И.А. Чувского ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

Ермаков Алексей Вадимович, мл. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаб. ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

Ленгерт Екатерина Владимировна, мл. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаб. ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

Савкина Ангелина Альбертовна, мл. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаб. ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, e-mail: sawkina.ange@yandex.ru;

Степанова Татьяна Вячеславовна, мл. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаб. ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

Кириязи Татьяна Святославовна, канд. мед. наук, доцент каф. нормальной физиологии им. И.А. Чувского ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России;

Лойко Дарья Дмитриевна, ассистент каф. нормальной физиологии им. И.А. Чувского, мл. науч. сотр. Центральной научно-исследовательской лаб. ФГБОУ ВО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России.

Обзоры

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092

Онищенко Н.А.¹, Никольская А.О.¹, Шагидулин М.Ю.^{1,2}

Прогрессирующая дисфункция иммунитета как фактор, препятствующий восстановительной регенерации печени при хронических фиброзирующих заболеваниях

¹ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России, 123182, Москва, Россия, ул. Щукинская, д. 1;

²ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Минздрава России, 119048, Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С целью выявления критериев прогнозирования тяжести повреждения печени и эффективности корректирующей терапии в обзоре обсуждаются особенности прогрессирования дисфункции иммунитета при хронических фиброзирующих заболеваниях печени. Несмотря на различия в этиопатогенезе хронических заболеваний печени, развитие фиброза и цирроза печени происходит на фоне однотипно прогрессирующих проявлений дисфункции компонентов врождённого и адаптивного иммунитета, а также изменений костного мозга – центрального органа иммуногенеза. Наблюдаемые сдвиги формируются как следствие хронического воздействия на организм интоксикации, транслокации бактерий из кишечника, нарушенного метаболизма и прогрессирующего системного воспаления. Уже на раннем этапе активации процессов фиброирования печени клетки врождённого и адаптивного иммунитета становятся длительно гиперактивированными, появляются субпопуляции с профиброгенными иммуносупрессирующими свойствами (стадия субкомпенсации). По мере прогрессирования деструктивных процессов в печени (переход фиброза в цирроз) в состоянии иммунных клеток появляются признаки истощения функции, выраженного цитокинового дисбаланса и стойкой иммуносупрессии (стадия декомпенсации или «иммунного паралича»). Иммуносупрессия при этом становится фактором повышенной восприимчивости организма к бактериальным инфекциям и септическим осложнениям, а также фактором глубокого торможения регуляции восстановительных процессов (второй важнейшей функции иммунитета) и развития необратимости повреждения печени. Стадийность развития иммунного дисбаланса при прогрессировании фиброза в цирроз может быть выявлена с помощью маркеров врождённого и адаптивного иммунитета, а также по содержанию в крови CD34⁺ клеток костного мозга. Обсуждается значение выявления стадий иммунного дисбаланса для прогнозирования тяжести (обратимости) повреждения печени и эффективности применения корректирующей терапии.

Ключевые слова: врождённый и адаптивный иммунитет; костный мозг; фиброз печени; цирроз печени

Для цитирования: Онищенко Н.А., Никольская А.О., Шагидулин М.Ю. Прогрессирующая дисфункция иммунитета как фактор, препятствующий восстановительной регенерации печени при хронических фиброзирующих заболеваниях.

Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2023; 67(3): 109–123.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.109-123

Участие авторов: концепция, подбор материала, интерпретация и дизайн исследования – Онищенко Н.А.; сбор материала и участие в его обсуждении, подготовка иллюстративного материала и подготовка рукописи в печать – Никольская А.О., Шагидулин М.Ю. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Шагидулин Мурат Юнусович, e-mail: dr.shagidulin@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.07.2023

Принята к печати 12.07.2023

Опубликована 20.09.2023

Onishchenko N.A.¹, Nikolskaya A.O.¹, Shagidulin M.Yu.^{1,2}**Progressive dysfunction of the immune system as a factor preventing recoverable regeneration of the liver in chronic fibrosing diseases**¹Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Shchukinskaya St. 1, Moscow, 123182, Russian Federation;²Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya St. 8, Bldg. 2, Moscow, 119048, Russian Federation

This review discusses features of progressive immune dysfunction in chronic fibrosing liver diseases to identify criteria for predicting the severity of liver (L) damage and the effectiveness of corrective therapy. Despite differences in the etiopathogenesis of chronic L disease, the development of L fibrosis and cirrhosis is associated with similarly progressing manifestations of dysfunction of innate and adaptive immunity components, as well as changes in the bone marrow, the central organ of immunogenesis. These changes result from chronic intoxication, bacterial translocation from the gut, impaired metabolism, and progressive systemic inflammation. Already at the early stage of L fibrosis activation, innate and adaptive immune cells become chronically hyperactivated, and subpopulations with profibrogenic immunosuppressive properties emerge (subcompensation stage). With the progression of hepatic destructive processes (evolution of fibrosis to cirrhosis), the immune cells display signs of functional exhaustion, pronounced cytokine imbalance, and persistent immunosuppression (decompensation stage or "immune paralysis"). In this case, immunosuppression becomes a factor of increased susceptibility of the body to bacterial infections and septic complications, as well as a factor of deep inhibition of the regenerative process (the second most important immunity function) and the development of irreversible L damage. The staging of the immune imbalance during the progression of L fibrosis to cirrhosis can be detected with markers of innate and adaptive immunity and by the blood content of CD34+ bone marrow cells. The authors discussed the importance of identifying the stages of immune imbalance for predicting the severity (reversibility) of L damage and the effectiveness of corrective therapy.

Keywords: innate and adaptive immunity; bone marrow; liver fibrosis and cirrhosis**For citation:** Onishchenko N.A., Nikolskaya A.O., Shagidulin M.Yu. Progressive dysfunction of the immune system as a factor preventing recoverable regeneration of the liver in chronic fibrosing diseases. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(3): 109–123. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.109-123

Author's contribution: research concept and design – Onishchenko N.A.; material collecting, data analysis and interpretation – Onishchenko N.A., Nikolskaya A.O., Shagidulin M.Yu.;

Preparation of manuscript and illustrative material for printing – Shagidulin M.Yu., Nikolskaya A.O.; text writing – Onishchenko N.A. Approval of the final version of the article – all co-authors.

For correspondence: Murat Yu. Shagidulin, e-mail: dr.shagidulin@mail.ru**Information about the authors:**Onishchenko N.A., <https://orcid.org/0000-0002-0889-8674>Nikolskaya A.O., <https://orcid.org/0000-0001-7410-6500>Shagidulin M.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-4627-6208>**Financing.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict interest.

Received 05.07.2023

Accepted 12.07.2023

Published 20.09.2023

Список сокращений, использованных в статье:

CAID – цирроз-ассоциированная иммунная дисфункция

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный фактор печени

LBP – липополисахарид-связывающий белок

MBL – маннозосвязывающий лектин

MCP – моноцитарный хемоаттрактантный протеин

MDSC – миелоидные деривированные супрессивные клетки

MERTK – ген, кодирующий MER – фермент тирозинпротеинкиназа

PD-1 – мембранный белок, входящий в семейство CD28/CD152, к которому относятся регуляторы Т-лимфоцитов

PRRs – паттерн-распознающие рецепторы

SCF – фактор стволовых клеток

SCDF-1 – фактор деривации стволовых клеток

sIL-2R – растворимый рецептор IL-2

sCD163 – растворимый рецептор CD163

Неуклонный рост хронических заболеваний печени вирусной, токсической, аутоиммунной и метаболической природы и малоэффективность лечения таких пациентов указывает на необходимость разработки и применения новых терапевтических стратегий, основанных на использовании результатов углублённого изучения особенностей участия клеточных и молекулярных механизмов в прогрессировании хронических заболеваний печени [1].

Известно, что на этапе прогрессирования хронических фиброзирующих процессов в печени ведущая патогенетическая роль принадлежит уже не этиологическим факторам [2, 3], которые способны лишь усиливать и ускорять процесс необратимого повреждения печени, а развитию глубоких структурных и функциональных нарушений иммунной системы. Иммунная система, являясь одной из важнейших регуляторных систем организма (наряду с нервной и гуморальной), ответственна не только за поддержание иммунного гомеостаза, но и за регуляцию восстановительных регенераторных процессов [4–6], а также за реализацию защитно-приспособительных реакций организма, не связанных с иммунным ответом [7]. Между тем, при хронических фиброзирующих заболеваниях печени в системе иммунитета формируется состояние дизадаптации и дисрегуляции, которое проявляется развитием не восстановительной, а заместительной регенерации печени (развитие соединительной ткани, процессов фиброзирования и цирроза), что свидетельствует о глубокой депрессии второй важнейшей функции иммунной системы – регенераторной, ответственной за процессы пролиферации и восстановительного роста паренхиматозных органов.

С целью поиска ориентиров для прогнозирования обратимости повреждения печени и эффективности корригирующей терапии ниже мы рассмотрим закономерности (этапы) развития иммунных дисфункций при прогрессировании хронических фиброзирующих заболеваний печени на примере жировой болезни печени [3, 8–10] и вирусных гепатитов (HBV, HCV, HDV и др.) [11–16], как наиболее часто встречающейся патологии печени.

1. К патогенезу хронических фиброзирующих заболеваний печени

По современным представлениям развитие хронических фиброзирующих заболеваний печени является следствием отклонений в активации функций паренхиматозных, иммунных и эндотелиальных клеток печени в ответ на серию провоспалительных медиаторов, поступающих в организм из повреждённой

печени, жировой ткани и кишечника [17]. Нарушение регуляции функции гепатоцитов, купферовских клеток и синусоидальных эндотелиальных клеток печени способствует поступлению в печень клеток костномозгового происхождения: моноцитов, макрофагов и нейтрофилов, которые, приобретая супрессирующие свойства (MDSC), становятся ведущими участниками прогрессирования воспаления и активации процессов фиброзирования печени [18].

Развитие хронических заболеваний печени всегда связано с прогрессирующим повреждением гепатоцитов. Так при жировой болезни печени (алкогольная и неалкогольная жировая болезнь печени) повреждение печени является результатом накопления жирных кислот (ЖК) в гепатоцитах (развитие стеатоза). ЖК, становясь мишенями токсического воздействия недоокисленных продуктов жирового обмена, подвергаются влиянию оксидативного стресса с накоплением продуктов перекисного окисления и повреждением органелл гепатоцитов (митохондрий, лизосом и эндоплазматического ретикулума) при участии механизмов программируемой гибели клеток [8–10, 19]. Показано, что липотоксичность в гепатоцитах, снижая экспрессию иммунорегуляторного белка DDX58/RIG-1, повреждает механизмы аутофагии и становится, таким образом, фактором развития и взаимодействия программируемой гибели гепатоцитов и активации иммунных клеток в печени [9, 19, 20].

Полагают, что прогрессирование жировых заболеваний печени и переход от стеатоза к стеатогепатиту (неалкогольному и/или алкогольному) является следствием интоксикации организма, развивающейся на фоне массовой гибели и дисфункции гепатоцитов. При интоксикации повышается проницаемость кишечника, что способствует транслокации бактерий (ТБ) через кишечную стенку [21, 22]. Бактерии по системе воротной вены достигают печени, активируют в ней клетки врождённого и адаптивного иммунитета и формируют процесс воспаления в печени с участием гепатоцитов, экспрессирующих большое количество хемокинов и воспалительных медиаторов, образующихся при их повреждении и гибели [23, 24]. Результаты воспалительного ответа печени с первоначально избыточной активацией иммунных клеток и последующим снижением их активности, вносят существенный вклад в последующую стадийность прогрессирования хронической жировой болезни печени, вплоть до развития фиброза и цирроза [8].

Гепатиты вирусной этиологии (HBV, HCV, HDV и др.) и переход их в хроническое воспалительное повреждение печени целиком определяется биологиче-

скими свойствами этих вирусов и степенью резистентности организма к действию их повреждающих факторов. Персистенции вируса в организме и поддержанию хронического воспаления в печени способствуют, прежде всего, вирулентные свойства белков вируса [25], которые не только содействуют вирусной устойчивости, но также ослабляют и искажают иммунный ответ организма, препятствуя избавлению от вируса. Установлено, что важными участниками уклонения иммунной системы от выполнения функции защиты организма от вирусов, становятся рецепторы распознавания патогенов врождённого иммунитета – Толл-подобные рецепторы (TLRs 1–4 и TLRs 6–9), маннозсвязывающий лектин (MBL), С-реактивный белок и др. [14, 25, 26]. Для TLR-4, MBL и С-реактивного белка показано, что их экспрессия формирует механизмы уклонения иммунной системы за счёт возникающего изменения транскрипционного профиля белков этих рецепторов и их регуляторных свойств [26]. Кроме того, HCV-инфекция вызывает дисрегуляцию в системе комплемента, являющейся триггером взаимодействия врождённого и адаптивного иммунитета [15]. Вследствие ослабления рецепторного распознавания патогенов при HCV и HBV, а также нарушения регуляторного взаимодействия врождённого и адаптивного иммунитета развивается цитокиновый дисбаланс, который способствует нарушению дифференцировки Т-лимфоцитов и ингибированию специфических Т-клеточных ответов [12]. В результате невозможность осуществления полноценной супрессии репликации вирусов – HCV и HBV в гепатоцитах создаёт в организме условия для запуска их персистенции, массовой гибели гепатоцитов, а также условия для прогрессирования интоксикации, ТБ из кишечника, хронизации воспаления и развития хронической печёночной недостаточности (ХПН). Усиление деструктивных процессов в печени способствует дальнейшей активации иммунного дисбаланса (развитие иммуносупрессии) и формированию устойчивой иммунной патологии, которая ведёт к прогрессированию заболевания с исходом в фиброз и цирроз печени [27, 28].

Фиброзирование печени является результатом нарушения динамики раневого процесса в печени в ответ на её повреждение и характеризуется повышенной продукцией матриксных белков, а также торможением процессов матриксного ремоделирования [24]. Накопление внеклеточного матрикса происходит при активном участии гетерогенной популяции миофибробластов, появляющихся в печени в результате трансформации свойств печёночных звёздчатых (стеллатных) клеток (HSCs). В здоровой печени HSCs пред-

ставляют собой неактивный фенотип клеток, содержащий гладкомышечный α -актин и десмин, а в их вакуолях – жирорастворимый витамин-А. Повреждение паренхимы печени и возникающая воспалительная реакция способствуют активации и фенотипическому переходу спокойных, обогащенных витамином-А HSCs, в миофибробластический фиброгенный фенотип активированных HSCs (aHSCs) [29]. Такая трансформация связана с тем, что aHSCs начинают экспрессировать содержащиеся в них гладкомышечный α -актин и десмин, проявляют высокую пролиферативную и сократительную активность, а также продуцируют провоспалительные и профиброгенные медиаторы, белки внеклеточного матрикса и ингибиторы матриксной деградации. Клетки aHSCs фиброгенного типа, появляющиеся при хроническом повреждении печени, взаимодействуя с гепатоцитами, вызывают их апоптоз и/или некроптоз, тем самым способствуя прогрессирующему повреждению печени. В работах последних лет констатируется, однако, что воспаление, поддерживаемое в печени повреждением, представляет собой главный механизм реализации как прогрессирования фиброза так и его последующего нивелирования [8] и что комбинации различных субпопуляций врождённого и адаптивного иммунитета, контролируют как развитие фиброза так и его регресс [29–32]. Задача состоит в том, чтобы выявить тот критический уровень нарушений иммунных процессов в организме, при котором ещё может быть достигнуто устранение иммунного дисбаланса терапевтическими методами и созданы условия для регресса фиброзирующих процессов.

2. Иммунные дисфункции при прогрессировании хронических заболеваний печени

Дисбаланс врождённого и адаптивного иммунитета при хронических заболеваниях печени обусловлен нарушением в их клетках механизмов узнавания, а также реализации эффекторных и регуляторных функций [33]. На начальном этапе иммунный дисбаланс характеризуется повышенной чувствительностью и избыточным проявлением острого воспалительного ответа, а затем истощением иммунного реагирования и развитием иммунодефицита. Наиболее тяжёлым проявлением дисбаланса про- и противовоспалительных механизмов становится развитие ACLF (acute on chronic liver failure) – острого процесса на фоне хронически протекающего заболевания печени, который усугубляет сдвиги функционирования иммунной системы сначала в сторону усиления воспаления, а затем в сторону прогрессирования фиброза и цир-

роза печени [34] с развитием тяжёлых инкурабельных осложнений (портальная гипертензия, энцефалопатия и др.). Прогрессированию иммунного дисбаланса способствуют продолжающееся воздействие этиопатогенетических факторов (см. раздел 1), усиление ТБ через кишечную стенку, обусловленное эндотоксемией в условиях массовой гибели гепатоцитов, а также повышение частоты возникновения системных бактериальных инфекций [34, 35]. Степень выраженности иммунной дисфункции определяется также тяжестью течения ХПН, и в клинике это было подтверждено тем [36, 37], что у пациентов с циррозом печени проявления функциональных отклонений **иммунозависимых** генов врождённого иммунитета становятся более выраженными, чем у пациентов без цирроза.

2.1. Дисфункция врождённого иммунитета

2.1.1. Экспрессия и функция Толл-подобных рецепторов. В печени наиболее изучено семейство так называемых Толл-подобных рецепторов (TLRs), относящихся к мембранным паттерн-распознающим рецепторам (PRRs). Они экспрессируются в паренхиматозных и непаренхиматозных клетках печени и позволяют клеткам врождённого иммунитета выявлять поступившие в организм патогены путём активации клеточного звена врождённого иммунитета [38]. В опытах на грызунах, в частности было показано, что в патогенезе фиброобразования печени наиболее важная роль принадлежит активации TLR2-, TLR4- и TLR9 – опосредованным путям [39, 40], а при прогрессировании вирусных гепатитов – активации TLRs 1–4 и TLRs 6–9 [14, 38]. Основными эффекторами TLR-лиганд-опосредуемого фиброгенеза являются звездчатые клетки печени (HSCs), которые, как известно, регулируют структурный гомеостаз органа. Направленность регуляции зависит от степени исходной активации этих клеток и степени баланса секреции про- и антифибротических цитокинов, а также от состава активирующихся иммунных клеток [41]. Профибротические иммунные клетки (M1-макрофаги, нейтрофилы, Th17, CD8-Т клетки, естественные Т-киллеры (NTK) способствуют развитию фиброза печени. В то же время секреция IL-10, IL-22, IFN γ , TRAIL (апоптоз – индуцирующие лиганды TLRs, связанные с секрецией TNF-фактора), а также прямая ликвидация активированных HSCs (aHSCs) с помощью антифибротических иммунных клеток [M2-макрофагов, CD11b⁺Gr1⁺-клеток костного мозга, Treg, Th17, NKT, но особенно естественных киллеров (NK)], способны регулировать aHSCs в антифиброгенном и противовоспалительном направлении, главным образом, на ранней стадии развития фиброза [42].

Подчёркивается [41, 42], однако, что при регуляции структурного гомеостаза печени следует учитывать способность макрофагов, НК, Th17 и дендритных клеток проявлять и противоположно направленные свойства.

По мере прогрессирования ХПН и постепенного перехода фиброза в цирроз в организме развивается ослабление экспрессии и снижение восприимчивости TLRs сигнальных путей. Полагают, что эти изменения могут быть вызваны: длительной экспозицией TLRs к токсическим бактериальным продуктам, поступающим из кишечника в кровь в результате ТБ; экзогенно поступающими токсическими продуктами (этанол, недоокисленные продукты обмена потребляемых жиров и др.), а также повреждением и даже гибелью TLRs-лигандов, содержащихся в гепатоцитах [43, 44]. Перечисленные факторы признаны обязательными компонентами развивающейся тяжёлой цирроз-ассоциированной иммунной дисфункции (CAID) [45], которую характеризуют как «сепсис-подобный иммунный паралич» [46]. При циррозе печени отмечается также: снижение способности печёночных макрофагов (Купферовские клетки) фильтровать накапливающиеся бактериальные продукты, снижение липополисахарид-обезвреживающей функции альбумина, а также низкий уровень выработки в гепатоцитах липопротеинов высокой плотности и апо-липопротеина – A1 [47, 48]. В результате при циррозе снижение функции клеток печени ведёт к дальнейшему повышению в крови иммуногенных и токсичных продуктов, которые способствуют угнетению экспрессии и дисфункции TLRs, прежде всего, TLR-2 и TLR-4 [49, 50], что находит отражение в развитии дисфункции клеток врождённого иммунитета.

2.1.2. Моноциты. Нарушения функции моноцитов при ХПН включают повреждения процессов хемотаксиса, генерации супероксидных радикалов, фагоцитоза, киллерной активности и продукции лизосомальных энзимов [33]. У больных с ХПН обнаружено значительное увеличение циркулирующих моноцитов со сдвигом в сторону накопления неклассической субпопуляции CD14⁺CD16⁺M [51], обладающей провоспалительным и профиброгенным потенциалом. Эти клетки экспрессируют более высокие уровни CD183, HLA-Dr, низкоаффинные рецепторы Fc γ RII и IL-2R (CD25), чем классическая субпопуляция CD14⁺⁺CD16⁻ моноцитов [52, 53]. Полагают [54], что sIL-2R (sCD25) может служить маркером активации субпопуляции CD14⁺CD16⁺⁺M, как при ХПН, так и при формировании фиброза и цирроза печени, при которых уровень sIL-2R особенно повышен. У больных с разви-

вающимся циррозом и повышенной ТБ в моноцитах может выявляться повышенная экспрессия TNF α , HLA-D γ и CD80 [78]. В то же время имеются наблюдения возникновения функциональной деактивации моноцитов при ACLF и на поздней стадии цирроза [46, 56, 57]. Эта деактивация рассматривается как феномен «иммунного паралича» и характеризуется угнетением в моноцитах экспрессии HLA-D γ , iNOS (inducible nitric oxide synthase) и ко-стимуляторных молекул (CD40, CD86), а также сниженной секрецией TNF α . Полагают [46, 56], что снижение экспрессии HLA-D γ (< 40%) свидетельствует о неблагоприятном прогнозе. В целом состояние «иммунного паралича» характеризуется в организме супрессией провоспалительных (снижение уровня TNF α) и преобладанием противовоспалительных (повышение уровня IL-6 и IL-10) цитокинов в сыворотке крови, что создаёт благоприятные условия для развития фиброзирующих процессов. Показано, что у больных с сепсисом и сниженной HLA-D γ экспрессией функция моноцитов может быть восстановлена применением иммуномодулирующих факторов GM-CSF и INF- γ [56]. Однако, целесообразность использования этих факторов для коррекции функции моноцитов при CAID и ACLF нуждается в подтверждении.

2.1.3. Макрофаги. Развитие ХПН является в значительной степени результатом моноцит/макрофагально-опосредованного повреждения печени, которое запускается и поддерживается воспалительными медиаторами [57, 58]. В развитии хронического повреждения печени активно участвуют, прежде всего, резидентные макрофаги, которые представлены купферовскими клетками. Активация купферовских клеток, как и моноцитов осуществляется через PRRs сигнальные пути. Взаимодействуя с различными клетками врождённого иммунитета активированные купферовские клетки поддерживают воспаление в печени, привлекая фагоцитарные клетки в зоны повреждения через секрецию провоспалительных цитокинов и хемокинов, в частности через секрецию MCP-1 – моноцитарного-хемоаттрактантного протеина-1 [33]. Активированные купферовские клетки осуществляют также перекрёстный обмен информацией с aHSCs и через повышенную регуляцию адгезивных молекул способствуют развитию фиброгенеза печени и его прогрессированию в цирроз [59] на фоне стресс-индуцированного «иммунного паралича». Однако, активированные купферовские клетки способствуют прогрессированию фиброза и цирроза печени и другими путями.

В частности, была показана сильная корреляционная связь между sCD163 (растворимый рецептор

и биомаркер активации макрофагов) [60] и градиентом давления в воротной вене, что указывает на участие купферовских клеток в прогрессировании ХПН [61] и в формировании тяжёлых осложнений при циррозе печени (кровотечение из вен пищевода при компенсаторном развитии коллатерального кровотока). При прогрессировании цирроза наряду со снижением эффективности фагоцитарной функции купферовских клеток начинает проявляться недостаточность функции всей ретикуло-эндотелиальной системы организма [62]. Это обстоятельство вносит дополнительный вклад в дальнейшее снижение выведения из организма циркулирующих патогенов – бактерий и токсинов при ТБ из кишечника и способствует повышению риска развития тяжёлых бактериальных инфекций в организме, а также развитию токсемии и стресс-индуцированного «иммунного паралича» [33].

2.1.4. Полиморфноядерные лейкоциты. Полиморфноядерные лейкоциты (ПМЯЛ) – базофилы, эозинофилы и нейтрофилы, на ранних и поздних стадиях ХПН находятся в полностью активированном состоянии и, как полагают [63], это происходит из-за дисфункции TLRs-2, -4 и -9, развивающейся в условиях ТБ и эндотоксемии. Результатом длительной активации ПМЯЛ является снижение в них L-селектина, накопление продуктов перекисного окисления липидов и кислородных радикалов [64], а также повышение активности нейтрофильной эластазы [65], которые вызывают энергетическое истощение и повреждение ПМЯЛ со снижением их функциональной активности: хемотаксиса, фагоцитоза и бактерицидного потенциала на бактериальные стимулы [33]. Прогрессирование ХПН и развитие цирроза сопровождается дальнейшим снижением фагоцитоза и киллерной активности ПМЯЛ, что коррелирует с темпом развития тяжёлых инфекций в организме и наступлением смерти при явлениях полиорганной недостаточности. Подобно другим клеткам врождённого иммунитета ПМЯЛ на раннем этапе развития ХПН проявляют гиперактивность, а по мере её прогрессирования – депрессию, истощение и дисфункцию. Гиперактивные ПМЯЛ участвуют в процессах фиброгенеза и цирроза, тогда как истощённые ПМЯЛ проявляют повышенную адгезию к эндотелиальным клеткам и снижают свою миграцию в зоны инфекции [66, 67], что способствует развитию тяжёлого сепсиса. Дисфункция ПМЯЛ сопровождается также уменьшением объёма клеток и уменьшением их численности (нейтропения) в результате усиленного апоптоза и развивающейся гиперсплении [68, 69]. Указанные нарушения в состоянии ПМЯЛ являются типичными проявлениями их

дисфункции при ACLF и прогрессирующем развитии CAID [65, 69].

2.1.5. Естественные киллеры. Естественные киллеры (NK) – это особая популяция лимфоцитов, которая является компонентом врождённого иммунитета, т.к. способна спонтанно (без предварительной иммунизации) проявлять киллерные свойства (цитотоксичность) к инфекционным агентам и опухолевым клеткам [70, 71]. NK являются существенным компонентом врождённого иммунитета и обеспечивают поддержание структурного гомеостаза при заболеваниях печени путём элиминации активированных HSCs (аHSCs) главным образом на ранних стадиях развития фиброза [71, 72]. NK способствуют удалению аHSCs из печени, взаимодействуя с другими антифибротическими иммунными клетками (M2-макрофаги, CD11b⁺Gr1⁺ клетки костного мозга, Treg, Th17 и др.) [31]. Между тем, на стадии прогрессирующего фиброза и цитокинового дисбаланса, создаваемого профиброгенными иммунными клетками, антифиброгенные иммунные клетки начинают проявлять фиброгенную активность, что не позволяет NK в одиночку осуществлять элиминацию аHSCs [73]. Кроме того, на стадии прогрессирующего фиброза и цирроза печени у NK, как у всех клеток врождённого иммунитета, начинают проявляться депрессия, истощение и дисфункция, что также не способствует предотвращению процессов фиброобразования печени. В последнее время была выявлена новая субпопуляция лимфоидных клеток, относящихся к врождённому иммунитету – тип 3, имеющая маркер Lin CD127⁺RORγt⁻, которая обладает выраженными супрессирующими свойствами и способствует прогрессированию фиброза [30].

2.1.6. Система комплемента. Система комплемента в организме объединяет работу врождённого и адаптивного иммунитета. Она представлена сывороточными белками и несколькими белками клеточных мембран, синтезируемыми в печени и опосредующими воспалительные реакции с участием ПМЯЛ и макрофагов. При хронических фиброзирующих заболеваниях печени, особенно на стадии развития цирроза, в работе этой системы возникают глубокие нарушения [74], характеризующиеся низкой опсонической активностью и сниженными уровнями комплемента, особенно компонента C-3. В результате при циррозе печени происходит ослабление узнавания бактерий и связывания их с фагоцитами, а также снижение их бактерицидной способности [75]. Именно поэтому среди больных с циррозом повышена заболеваемость, особенно пневмококковой пневмонией, а смертность таких больных достоверно превышает смертность среди больных

без цирроза [76]. Полагают, что повышенная заражаемость инфекцией обусловлена нарушением функции рецепторов, распознающих инфекцию, а также снижением уровня белков в сыворотке крови, синтезируемых в печени, прежде всего, снижением уровня компонента C-3 системы комплемента и рецепторного острофазного белка – маннозосвязывающего лектина (MBL) [76, 77]. Сообщается, что у больных с продвинутой стадией цирроза уровень MBL значительно снижен, а при полном дефиците MBL повышается вероятность и сокращается время развития инфекций.

2.2. Дисфункция адаптивного иммунитета

2.2.1. В-лимфоциты и иммуноглобулины. Уже давно известно, что нарушения функции В-лимфоцитов (В-лф) при ХПН обусловлены ослаблением антигенпрезентирующих свойств купферовских клеток и самих В-лф. В последние годы появилась дополнительная информация о природе нарушений функции В-лф и участии их в развитии фиброза и цирроза печени. Методом проточной цитометрии было показано [78], что CD27⁺ В-лф (клетки памяти) выявляются в пуле В-лф намного реже у больных с фиброзом и циррозом печени и что снижение CD27⁺/CD19⁺ В-лф свидетельствует о прогрессировании заболевания печени и развитии иммунной декомпенсации. Известно, что в здоровом организме экспрессия CD27⁺ В-лф непосредственно связана с ко-стимуляторной активацией CD40/TLR9 [79], однако, В-лф, выделенные из крови больных с циррозом, не реагировали на CD40/TLR9 активацию (наступало снижение TNF-β секреции и IgG – продукции). Было установлено также, что присутствие бактериальных продуктов в крови при прогрессирующей ХПН играет определяющую роль в индукции изменений В-клеточных функций. Показано, что растворимые факторы, такие как липополисахарид-связывающий белок (LBP) [80] и бактериальная ДНК [81], связанные с ТБ и часто выявляемые в крови при алкогольном циррозе, способны активировать В-клетки. С повышенной TLR9 экспрессией в В-лф связывают также и избыточную продукцию иммуноглобулинов-А (IgA) этими клетками [82]. Полагают также, что повышенная продукция IgA, более выраженная у пациентов с циррозом по сравнению с контролем (без цирроза), обусловлена активационным воздействием бактериальной ДНК в условиях ТБ [83]. Повышенная продукция IgA при циррозе может быть также обусловлена появлением различных антител против белков кишечных бактерий в условиях ТБ [84] или против белков паци-

ента, имеющих перекрёстнореактивные эпитопы с бактериальным составом его сыворотки [85]. Такие антитела присутствуют, главным образом у больных с прогрессирующей ХПН сопровождающейся портальной гипертензией. Состав и выраженность бактериальной нагрузки в самом кишечнике при сохраняющейся ТБ также оказывает воздействие на продукцию так называемых «невоспалительных» антител класса IgA [85, 86]. В тоже время, продукция специфических иммуноглобулинов G у больных с алкогольным циррозом снижена [85]. Снижение выработки специфических иммуноглобулинов и Ig-ответа было выявлено также при гепатит-В [87] и гепатит-А вакцинации [88] у больных с алкогольным циррозом печени.

2.2.2. Т-лимфоциты. Известно, что различные популяции Т- лимфоцитов (Т-лф) могут обладать про-, антифиброгенными или двойственными свойствами в зависимости от сложившегося взаимодействия их с HSCs [41]. Повышенное количество CD8⁺ Тлф и снижение соотношения CD4⁺/CD8⁺ ассоциируется с усилением фибротических процессов в печени мышей и человека. Изучение свойств CD8-Тлф у больных циррозом позволило выявить среди этих клеток CD8-Тлф субпопуляцию с иммуносупрессирующей HLA-D γ экспрессией, присутствие которой коррелирует с неблагоприятным исходом болезни и развитием инфекции [89, 90]. Транскрипционный анализ HLA-D γ -CD8-Тлф позволил выявить в этих клетках сниженную регуляцию генов, вовлечённых в продукцию провоспалительных цитокинов. Кроме того, исследования показали, что HLA-D γ -CD8-Тлф от больных с тяжелой ХПН проявляют сниженную способность индуцировать пролиферацию аутологических мононуклеарных клеток периферической крови. Так при сокультивировании HLA-D γ -CD8-Т-клеток с моноцитами происходило образование иммуносупрессивного фенотипа моноцитов, характеризующегося повышенным уровнем экспрессии генов *MERTK* и *PD-1*. Образование иммуносупрессивного фенотипа моноцитов обычно возникало у больных при развитии ACLD и сопровождалось снижением продукции провоспалительных цитокинов, что коррелировало с тяжестью заболевания [89]. При сокультивировании HLA-D γ -CD8-Тлф с аутологичными нейтрофилами также наступало снижение активации их маркеров: выявлялась повреждённая фагоцитарная активность, а также сниженная способность продуцировать TNF α в условиях применения бактериального продукта – липополисахарида. Эти наблюдения подтверждают результаты более ранних исследований

[91], в которых показано, что нейтрофилы у больных с циррозом хронически активированы, но функционально истощены. Это проявлялось высоким уровнем продукции ими кислородных радикалов в покое, сниженным хемотаксисом и сниженной киллерной активностью. Установлено, что CD4⁺ Т-лф, продуцирующие IL17 (Th17), вместе с NKT-клетками также вовлечены в процесс фиброобразования печени; однако их участие в фиброгенезе зависело от цитокинового профиля. Показано, что продукция IL17, IL4 и IL13 способна активировать профиброгенные свойства клеток, в то время как секреция IFN γ , TNF α и IL22 – антифиброгенные. Регуляторные Т-лф (Treg) – CD4⁺CD25⁺ [FOX P3] в близком окружении с aHSCs через секрецию IL10 также могут проявлять антифиброгенные свойства, но не на стадии развития цирроза [41]. В исследовании М. Márquez и соавт. [92] описаны интенсивные нарушения Т-клеточных компартментов в иммунной системе у больных с циррозом. Указывается, что высокая антигенная нагрузка, как следствие повышенной ТБ, выявляемая повышенным уровнем липополисахарид-связанного белка (LBP), вносит вклад в пролонгированную активацию и последующее истощение функции Т-лф. Так у больных с циррозом наблюдалось значительное снижение общего количества Т-лф (CD3⁺ клеток) в периферической крови и значительное повышение отношения активированных CD4⁺Ткл к стареющим CD8⁺Ткл (CD8CD45RO⁺CD57 клеткам) и отношения нейтрофилов к лимфоцитам.

Содержание Treg лф (CD4⁺CD25⁺ [FOX P3]) также было повышенным при циррозе и коррелировало с уровнем LBP. Сниженная регуляция ко-стимуляторных молекул Тлф, таких как CD28, была также отмечена при прогрессирующем циррозе. Представленные сведения позволяют заключить, что при циррозе дисфункции В и Т- лимфоцитов после длительной и избыточной активации участвуют в формировании истощения и супрессии иммунитета наряду с клетками врождённого иммунитета. В результате повышается чувствительность организма к бактериальным инфекциям и септическим осложнениям, у Т-лф утрачивается роль переносчиков восстановительных регенерационных сигналов клеткам печени [5], а в печени активизируются процессы заместительного морфогенеза, усиливается цирроз; в организме нарастают признаки полиорганной недостаточности [93]. Длительная супрессия функций иммунных клеток крови сопровождается активацией в них механизмов программируемой гибели, в которые вовлекается и костный мозг, являющийся в организме центральным органом имму-

ногенеза, а также индуктором и регулятором восстановительного морфогенеза клеток паренхиматозных органов, в том числе печени [4, 6].

3. Дисфункция клеток и структурных компонентов ниш костного мозга при прогрессирующем циррозе печени

Прогрессирующая ХПН, переходящая в цирроз, а также сохраняющаяся токсемия и ТБ характеризуются не только глубокой дисфункцией клеток иммунной системы периферической крови (синдром CAID), но также дисфункцией всей системы клеток иммунитета, в том числе клеток костного мозга [94, 95]. Дисфункция клеток костного мозга проявляется структурными и функциональными нарушениями гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток, (о чём свидетельствует прогрессирующая дисфункция клеток врождённого и адаптивного иммунитета), а также нарушением их взаимодействия с компонентами ниш костного мозга (мезенхимальные/стромальные клетки, Шванновские клетки, нейрональные волокна и эндотелиальные клетки). Следствием развития этих нарушений в костном мозге становится устойчивая и тяжёлая дисрегуляция (торможение) процессов восстановительной регенерации клеток крови и иммунных клеток в центральном и периферических органах иммуногенеза (костный мозг, селезёнка и лимфоузлы), что проявляется цитопенией в периферической крови, гиперспленией и прогрессированием фиброза и цирроза печени [95]. Снижение регенераторного потенциала гемопоэтических и мезенхимальных стволовых/прогениторных клеток костного мозга при циррозе печени является также фактором ограниченной (слабо выраженной) эффективности активационного терапевтического воздействия на клетки костного мозга больного эндогенных и экзогенных факторов роста [96, 97], а также аутологических клеток костного мозга при их трансплантации [98]. При прогрессирующем циррозе печени терапия аутологичными или аллогенными клетками костного мозга [(гемопоэтические стволовые/прогениторные клетки или мезенхимальные/стромальные клетки (МСК)] от здорового донора не всегда оказывалась эффективной и даже была способна усилить эффект повреждения и фибрирования печени [99], что, возможно, обусловлено более интенсивной активацией дифференцировки отдельных субпопуляций МСК в миофибробласты в профибротическом микроокружении [100]. Полагают [101], что при ХПН состояние хронической интоксикации, ТБ, измененного метаболизма (повышение продукции кислородных радикалов и нарушение энергетического обмена), а также прогрессирующего системного воспаления вызывает в организме при циррозе жёсткий стресс клеток костного мозга, который ведёт к истощению функции и гибели гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток и МСК в компартментах костного мозга из-за развивающегося воспалительного старения и деструкции компонентов их ниш [102]. С. Bihari и соавт. [95], используя иммуногистохимические методы, установили снижение количества CD34⁺ гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток в костном мозге у больных с циррозом по сравнению с контролем. Из-за широкого диапазона значений CD34⁺ гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток в биоптатах костного мозга этих больных было проведено дополнительное исследование состояния костного мозга в зависимости от MELD – тяжести состояния больных с циррозом (MELD – model of End-Stage Liver Disease). Оказалось, что у больных с значениями MELD < 15 – (т.е. слабая или средняя степень выраженности ХПН и цирроза) уровень CD34⁺ гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток в биоптатах костного мозга был, хоть и незначительно, но повышен по сравнению с контролем. С повышением тяжести состояния больных уровень CD34⁺ клеток костного мозга прогрессивно снижался, и снижение становилось достоверным при MELD > 15. У больных с циррозом и MELD > 15 отмечалось значительное снижение гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток: CD34⁺, CD117⁺, Thy-1⁺ клеток, а также клеток Lin⁻/CD34⁺/CD39⁻/CD90⁺ по сравнению с больными, где MELD < 15. В этом исследовании авторы отметили, что на ранних стадиях цирроза в отличие от поздней стадии в костном мозге усиливается пролиферация гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток и гемопоэз – как проявление ещё сохраняющихся компенсаторных резервов костного мозга на ранних стадиях цирроза. Поскольку состояние гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток костного мозга находится под регуляторным контролем компонентов местных периартериоллярных ниш, было исследовано также состояние МСК с использованием анти-нестинных антител у больных с циррозом и в контрольной группе [95]. Было показано, что количество нестин⁺МСК в биоптатах у больных с циррозом становилось значительно ниже, чем в контроле, причём в отличие от CD34⁺ гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток снижение нестин⁺МСК у больных с циррозом наблюдалось даже на ранней стадии цирроза и было особенно значительным у больных, где MELD > 15. Компонентами ниш костного мозга являются также симпатические нервные

волокна и Шванновские клетки, которые обеспечивают сохранность структуры и функции нестин⁺МСК в костном мозге.

Иммуногистохимическое исследование шванновских клеток с помощью маркера S-100 и симпатических нервных волокон с помощью антиглиального фибриллярного кислого белка (GFAP) позволило установить значительное снижение в костном мозге и GFAP⁺ симпатических нервных волокон, и S-100⁺ шванновских клеток у больных с циррозом печени при значениях MELD < и >15. Можно предположить, что снижение нестин⁺МСК в нишах костного мозга обусловлено дегенерацией симпатических нервных волокон и шванновских клеток. Кроме того, снижение нестин⁺МСК может быть обусловлено дифференцировкой этих клеток в фибробласты. Установлено также [95], что у больных с циррозом печени в плазме крови из костного мозга определялись преимущественно повышенные уровни провоспалительных цитокинов и сниженные уровни гемопоэтических ростовых факторов. При MELD >15 было отмечено значительное увеличение содержания IL-6, моноцит – хемоаттрактантного белка-3 (MCP-3), TNF- α , IFN- γ , IL-1 β TGF- α и значительное снижение содержания онкостатина-моноцитов, а также стволовых клеточных факторов -SCF и SCDF-1 по сравнению с больными имеющими MELD <15. Ранее было показано, то хроническая и чрезмерная воспалительная цитокиновая сигнализация [103], особенно TNF- α и IFN γ , оказывает отрицательное воздействие на гемопоэтические стволовые/прогениторные клетки, вызывая их анергию и гибель. Известно также, что IL-1 β вносит вклад в повреждение симпатических нервных волокон и оказывает неблагоприятное воздействие на выживание МСК и шванновских клеток. Снижение ростовых факторов (SCF, SCDF-1) обусловлено снижением образования их в костном мозге, а также повышенным расходом их в условиях постоянно требуемой регенерационной поддержки повреждённой печени, что приводит к постепенному истощению функции всех клеток и деструкции компонентов ниш костного мозга [104]. Мультивариантный анализ, выполненный в работе [95], позволил установить, что содержание CD34⁺клеток в мазках клеток костного мозга менее 10 в поле зрения может служить достоверным предиктором развития сепсиса у больных с циррозом и что снижение CD34⁺ на 1 единицу повышает шанс развития сепсиса у этих больных на 16%. Повреждённый костный мозг у больных с прогрессирующим циррозом печени формирует низкие гематологические показатели, развитие анемии [105] и тром-

боцитопении, а также снижает регенерационный потенциал клеток всех тканей и органов при циррозе печени. На примере трансплантации печени [95] было показано, что при значениях CD34⁺<10 в мазках клеток костного мозга у реципиентов увеличивался срок госпитального периода; кроме того, в течение 6 мес наблюдения из 6 реципиентов печени у 2 развился сепсис (1 умер) и у 2 – острое отторжение; у 13 реципиентов с значениями CD34⁺>10 только у 1 развился острый криз отторжения и все выжили в течение 6 мес. В работе С.В. Готье и соавторов [106] также показано, что реципиенты с более низкими значениями CD34⁺ гемопоэтических стволовых/прогениторных клеток в периферической крови перед трансплантацией печени имели больший шанс развития ранней дисфункции трансплантата, чем те у кого уровень этих клеток был выше. Из этой работы следует также, что предварительное измерение содержания CD34⁺ клеток в периферической крови больного может быть использовано для прогнозирования эффективности не только результатов трансплантации печени, но и результатов применения методов регенерационной терапии у пациентов с тяжёлым повреждением печени.

Заключение

Проведенный анализ показал, что прогрессирующая дисфункция врождённого и адаптивного иммунитета играет определяющую роль в патогенезе хронического фиброзирующего повреждения печени, переходящего в цирроз. Возникновение и прогрессирование иммунной дисфункции является также следствием стрессорного повреждения и истощения функции клеток и структурных компонентов ниш костного мозга на воздействие – хронической интоксикации, ТБ, изменённого метаболизма и прогрессирующего системного воспаления, сопутствующих хронически прогрессирующему повреждению печени (**рисунок**). Уже на ранней стадии формирования процессов фиброирования клетки врождённого и адаптивного иммунитета становятся в разной степени выраженности длительно гиперактивированными и среди них появляются субпопуляции с профиброгенными иммуносупрессирующими свойствами (стадия субкомпенсации). По мере прогрессирования процессов фиброирования и цирроза печени в состоянии иммунных клеток нарастают признаки истощения их функций, развития цитокинового дисбаланса и выраженной иммуносупрессии (стадия декомпенсации). Иммуносупрессия как проявление прогрессирующей дисфункции иммунной системы – важнейшей регуляторной системы организма (наряду с нервной и гуморальной системами), на фоне ТБ

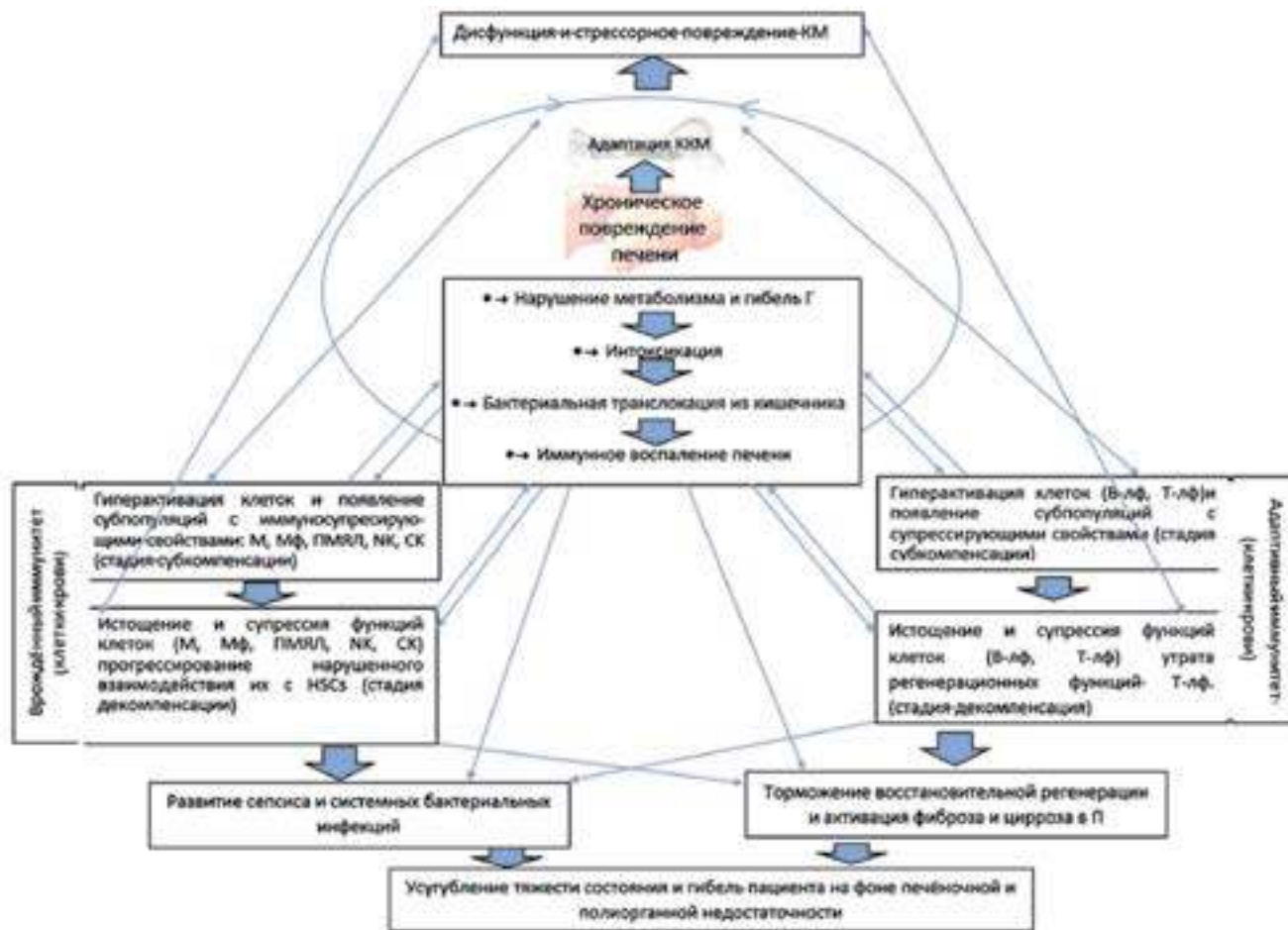


Схема патогенеза прогрессирующей иммунной дисфункции при хронических фиброзирующих заболеваниях печени (по данным современной литературы).

Scheme of the pathogenesis of progressive immune dysfunction at chronic fibrosing liver diseases.

и системной эндотоксемии становится фактором, формирующим состояние повышенной восприимчивости организма бактериальных инфекций и септических состояний. Кроме того, иммуносупрессия становится фактором, препятствующим включению системных иммунных механизмов в регуляцию процессов восстановительной регенерации печени, и становится фактором активации в ней местных тканевых процессов – заместительной регенерации с прогрессирующим развитием фиброза и цирроза. Торможение восстановительной регенерации в печени наступает как результат ослабления или утраты регуляторной функции клеток адаптивного иммунитета, прежде всего, Т-лф, являющихся переносчиками регенерационных сигналов повреждённым паренхиматозным клеткам печени [107], а также как результат истощения функ-

ции всех клеток врождённого иммунитета и, прежде всего, NK, которые становятся неспособными осуществлять элиминацию из ткани печени – фиброгенный фенотип клеток – активированных HSCs.

Стадийность в динамике развития иммунного дисбаланса при формировании цирроза печени, характеризуемая различными маркерами врождённого и адаптивного иммунитета, а также количеством содержащихся в периферической крови CD34⁺ клеток костного мозга указывает на целесообразность использования этих показателей для оценки тяжести (обратимости) повреждения печени, а также для прогнозирования эффективности применяемой терапии в зависимости от стадии иммунной дисфункции и степени развития деструктивных процессов в костном мозге.

Литература

(п.п. 1–3; 8–99; 101–106 см. References)

4. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А. Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. 2009; М., Изд-во РАМН.
5. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Роль Т-лимфоцитов в гормональной регуляции морфогенетических процессов. *Успехи современной биологии*. 2015; 135(2): 189–202.
6. Бабаева А.Г., Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах. М.; 2016, Изд-во НИИ морфологии человека РАН.
7. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Влияние морфогенетической активности лимфоцитов на реактивность и резистентность организма. *Онтогенез*. 2018; 49(1): 54–66.
100. Арбатский М.С., Вигровский М.А., Басалова Н.А., Дьячкова У.Д., Григорьева О.А., Ефименко А.Ю. Выявление субпопуляций мезенхимальных стромальных клеток с различными ответами на профибротические стимулы с помощью анализа транскриптома отдельных клеток. Материалы V Национального конгресса по регенеративной медицине. Москва, 23–25 ноября 2022 г. *Гены и клетки*. 2022; 17(3): 14.
107. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Роль лимфоцитарных РНК в межклеточном информационном обмене и регуляции регенеративных процессов. *Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова*. 2016; 102(11): 1280–301.

References

1. Chun-Liang Chen, Yu-Cheng-Lin. Autophagy dysregulation in metabolic associated fatty liver disease: a new therapeutic target. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, Sep. 2; 23(17): 10055. doi: 10.3390/ijms231710055
2. Sargenti K., Johansson A., Bertilsson S., Mattsby-Baltzer I., Klintman D., Kalaitzakis E. Dysfunction of circulating polymorphonuclear leukocytes and monocytes in ambulatory cirrhotic predicts patient outcome. *Dig. Dis. Sci.* 2016; 61: 2294–302. doi: 10.1007/s10620-016-4132-3
3. Osna N.A., New-Aaron M., Dagur R.S., Thomes P., Simon L., Levitt D., et al. A review of alcohol – pathogen interactions: New insights into combined disease pathomechanisms. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2022, Mar; 46(3): 359–70. doi: 10.1111/acer.14777
4. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Zotikov E.A. *The role of lymphocytes in the operational change in the tissue development program. 2009. [Rol' limfocitov v operativnom izmenenii programmy razvitiya tkaney]*. Moscow Publishing House of the Russian Academy of Medical Sciences. (In Russian)
5. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. The role of T-lymphocytes in the hormonal regulation of morphogenetic processes. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015; 135(2): 189–202. (In Russian)
6. Babaeva A.G., Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M. *On the morphogenetic properties of RNA in lymphoid and stem cells during recovery processes. [O morfogeneticheskikh svoystvakh RNK limfoidnykh i stvolovykh kletok pri vosstanovitel'nykh processakh]*. 2016 Moscow, Publishing House of the Research Institute of Human Morphology RAS. (In Russian)
7. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. The influence of the morphogenetic activity of lymphocytes on the reactivity and resistance of the organism. *Ontogenез*. 2018; 49(1): 54–66. (In Russian)
8. Gual P., Gilgenkrantz H., Lotersztajn S. Autophagy in chronic liver diseases: the two faces of Janus. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017; 312: 263–73. doi: 10.1152/ajpcell.00295.2016
9. Xiaojin Wu, Xiude Fan, Tatsunori Miyata, Adam Kim, Christina K Cajigas-Du Ross, Semanti Ray, et al. Recent Advances in Understanding of Pathogenesis of Alcohol-Associated Liver Disease. *Annu Rev Pathol.* 2022 Oct 21. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-031521-030435
10. Yoon Mee Yang, Ye Eun Cho, Seonghwan Hwang. Crosstalk between Oxidative Stress and Inflammatory Liver Injury in the Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 11; 23(2): 774. doi: 10.3390/ijms23020774
11. Stephanie Jung, Sebastian Maximilian Altstetter, Ulrike Protzer. Innate immune recognition and modulation in hepatitis D virus infection. *World J Gastroenterol.* 2020; 26(21): 2781–91. doi: 10.3748/wjg.v26.i21.2781
12. Yu Yang, Zheng-Kun Tu, Xing-Kai Liu, Ping Zhang. Mononuclear phagocyte system in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2018; 24(44): 4962–73. doi: 10.3748/wjg.v24.i44.4962
13. Hui Peng, Zhigang Tian. NK cells in liver homeostasis and viral hepatitis. *Sci China Life Sci.* 2018 Dec; 61(12): 1477–85. doi: 10.1007/s11427-018-9407-2
14. Yang Gao, Narayan Nepal, Shi-Zhu Jin. Toll-like receptors and hepatitis C virus infection. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2021 Dec; 20(6): 521–9. doi: 10.1016/j.hbpd.2021.07.011
15. Ahmed El-Shamy, Andrea D Branch, Thomas D Schiano, Peter D Gorevic. The Complement System and C1q in Chronic Hepatitis C Virus Infection and Mixed Cryoglobulinemia. *Front Immunol.* 2018 May 29; 9: 1001. doi: 10.3389/fimmu.2018.01001
16. Maryam Dadmanesh, Mohammad Mehdi Ranjbar, Khodayar Ghorban. Inflammasomes and their roles in the pathogenesis of viral hepatitis and their related complications: An updated systematic review. *Immunol Lett.* 2019 Apr; 208: 11–18. doi: 10.1016/j.imlet.2019.03.001
17. Luci C., Bourinet M., Leclere P.S., Anty R., Gual P. Chronic inflammation in Non-Alcoholic Steatohepatitis: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Front Endocrinol. (Lausanne)*. 2020 Dec 14; 11: 597648. doi: 10.3389/fendo.2020.597648. e Collection
18. Luo X. Li H., Ma L., Zhou J., Guo X., Woo S.L., et al. Expression of STING is increased in liver tissue from patients with NAFLD and promotes macrophage-mediated hepatic inflammation and fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 2018 Dec; 155(6): 1971–84.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2018.09.010
19. Tatsunori Miyata, Laura E Nagy. Programmed cell death in alcohol-associated liver disease. *Clin Mol Hepatol.* 2020 Oct; 26(4): 618–25. doi: 10.3350/cmh.2020.0142 Epub 2020 Sep 21
20. Frietze K., Brown A.M., Das D., Franks R.G., Cunningham J.L., Hayward M., et al. Lipotoxicity reduces DDX58/Rig-1 expression and activity leading to impaired autophagy and cell death. *Autophagy*. 2022 Jan; 18(1): 142–60. doi: 10.1080/15548627.2021.1920818
21. Puneet Puri, Arun J Sanyal. The Intestinal Microbiome in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Liver Dis.* 2018 Feb; 22(1): 121–32. doi: 10.1016/j.cld.2017.08.009
22. Cyriac Abby Philips, Philip Augustine, Karthik Ganesan, Shatakshi Ranade, Varun Chopra, Kunal Patil, et al. The role of gut microbiota in clinical complications, disease severity, and treatment response in severe alcoholic hepatitis. *Indian J Gastroenterol.* 2022 Feb; 41(1): 37–51. doi: 10.1007/s12664-021-01157-9
23. Bin Gao, Maleeha F Ahmad, Laura E Nagy, Hidekazu Tsukamoto. Inflammatory pathways in alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2019 Feb; 70(2): 249–59. doi: 10.1016/j.jhep.2018.10.023

24. Sudeep Tanwar, Freya Rhodes, Ankur Srivastava, Paul M. Trembling, William M. Rosenberg. Inflammation and fibrosis in chronic liver diseases including non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2020 Jan 14; 26(2): 109–33. doi: 10.3748/wjg.v26.i2.109
25. DeGaulle I Chigbu, Ronak Loonawat, Mohit Sehgal, Dip Patel, Pooja Jain. Hepatitis C Virus Infection: Host-Virus Interaction and Mechanisms of Viral Persistence. *Cells.* 2019 Apr 25; 8(4): 376. doi: 10.3390/cells8040376
26. Orlando de Souza Pires-Neto, Ednelza da Silva Graça Amoras, Maria Alice Freitas Queiroz, Sâmia Demachki, Simone Regina da Silva Conde, Ricardo Ishak. Hepatic TLR4, MBL and CRP gene expression levels are associated with chronic hepatitis C. *Infect Genet Evol.* 2020 Jun; 80: 104200. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104200
27. Tian-Yang Li, Yang Yang, Guo Zhou, Zheng-Kun Tu. Immune suppression in chronic hepatitis B infection associated liver disease: A review World J Gastroenterol. 2019 Jul 21; 25(27): 3527–37. doi: 10.3748/wjg.v25.i27.3527
28. Daniel Sepulveda-Crespo, Salvador Resino, Isidoro Martinez. Strategies Targeting the Innate Immune Response for the Treatment of Hepatitis C Virus-Associated Liver Fibrosis Drugs. 2021 Mar; 81(4): 419–43. doi: 10.1007/s40265-020-01458-x
29. Mallat A., Lotersztajn S. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 5. Novel insights into liver fibrosis. //Am. J. Physiol Cell Physiol. 2013; 305: 789–99. Doi: 10.1152/ajpcell.00230.2013
30. Siqi Wang, Jing Li, Shengdi Wu, Lisha Cheng, Yue Shen, Wei Ma Type 3 innate lymphoid cell: a new player in liver fibrosis progression. *Clin Sci (Lond).* 2018 Dec 13; 132(24): 2565–82. doi: 10.1042/CS20180482 Print 2018 Dec 21.
31. Yang Zhang, Yuan Wu, Wenjuan Shen, Bingyu Wang, Xingxing Yuan. Crosstalk between NK cells and hepatic stellate cells in liver fibrosis (Review). *Mol Med Rep.* 2022 Jun; 25(6): 208. doi: 10.3892/mmr.2022.12724
32. Daniel S Smyk, Athanasios Mavropoulos, Giorgina Mieli-Vergani, Diego Vergani, Marco Lenzi, Dimitrios P Bogdanos. The Role of Invariant NKT in Autoimmune Liver Disease: Can Vitamin D Act as an Immunomodulator? *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018 Jun 26; 2018: 8197937. doi: 10.1155/2018/8197937 eCollection 2018
33. Sipeki N., Antal – Szalmas P., Lakatos P.L., Papp M. Immune dysfunction in cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2014 Mar 14; 20(10): 2564–77. Doi: 10.3748/wjg.v20.i10.2564
34. Mireia Casulleras, Ingrid W Zhang, Cristina López-Vicario, Joan Clària. Leukocytes, Systemic Inflammation and Immunopathology in Acute-on-Chronic Liver Failure. *Cells.* 2020 Dec 8; 9(12): 2632. doi: 10.3390/cells9122632
35. Wiest R., Lawson M., Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J. Hepatol.* 2014; 60: 197–209.
36. Tandon P., Garcia – Tsao G. Bacterial infections, sepsis and multi-organ failure in cirrhosis. *Semin Liver Dis.* 2008; 28: 26–42.
37. Duddempudi A.T. Immunology in alcoholic liver disease. *Clin. Liver Dis.* 2012; 16: 687–98.
38. Żeromski Jan, Kierepa Agata, Brzezicha Bartosz, Kowala-Piaskowska Arleta, Mozer-Lisewska Iwona. Pattern Recognition Receptors: Significance of Expression in the Liver Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2020 Sep 17; 68(5): 29. doi: 10.1007/s00005-020-00595-1
39. Seki E., Schnabl B. Role of innate immunity and microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *J. Physiol.* 2012; 590: 447–58.
40. Testro A.G., Visvanathan K. Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease. *J. Gastroenterol Hepatol.* 2009; 24: 943–54.
41. Yi H.S., Jeong W.I. Interaction of hepatic stellate cells with diverse types of immune cells: foe or friend? *J. Gastroenterol Hepatol.* 2013; 28 Suppl 1: 99–104.
42. Claria J. Natural killer cell recognition and killing of activated hepatic stellate cells. *Gut.* 2012; 61: 792–3.
43. Li L., Chen L., Hu L., Liu Y., Sun H.Y., Tang J., et al. Nuclear factor high- mobility group box 1 mediating the activation of Toll-like receptor 4 signaling in hepatocytes in the early stage of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology.* 2011; 54: 1620–30.
44. Bellot P., Frances R., Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int.* 2013; 33: 31–9.
45. Bonnel A.R., Bunchorntavakul C., Reddy K.R. Immune dysfunction and infections in patients with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011; 9: 727–38.
46. Wasmuth H.E., Kunz D., Yagmur E., Timmer- Stranghoner A., Vidacek D., Siewert E. et al., Patients with acute on chronic liver failure display sepsis-like immune paralysis. *J. Hepatol.* 2005; 42: 195–201.
47. Oettl K, Birner-Gruenberger R, Spindelboeck W, Stueger HP, Dorn L, Stadlbauer V, et al. Oxidative albumin damage in chronic liver failure: relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival. *J. Hepatol.* 2013; 59: 978–83.
48. Galbois A., Thabut D., Tazi K.A., Rudler M., Mohammadi M.S., Bonnefont- Rousselot D., et al., Ex vivo effects of high-density lipoprotein exposure on the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in patients with severe cirrhosis. *Hepatology* 2009; 49: 175–84.
49. Pimentel-Nunes P., Roncon-Albuquerque R., Dinis-Ribeiro M., Leite-Moreira A.F. Role of Toll-like receptor impairment in cirrhosis infection risk: are we making progress? *Liver Int.* 2011; 31: 140–1.
50. Testro A.G., Gow P.G., Angus P.W., Wongseelashote S., Skinner N., Markovska V., et al. Effects of antibiotics on expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 on mononuclear cells in patients with advanced cirrhosis. *J. Hepatol.* 2010; 52: 199–205.
51. Zimmermann H.W., Seidler S., Nattermann J., Gassler N., Hellerbrand C., Zerneck A., et al., Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS One.* 2010; e11049.
52. Tacke F. Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012; 5 Suppl. 1: S27.
53. Liaskou E., Zimmermann H.W., Li K.K., Oo Y.H., Suresh S., Stamataki Z., et al. Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics. *Hepatology.* 2013; 57: 385–98.
54. Seidler S., Zimmermann H.W., Weiskirchen R., Trautwein C., Tacke F. Elevated circulating soluble interleukin-2 receptor in patients with chronic liver diseases is associated with non-classical monocytes. *BMC Gastroenterol.* 2012; 12: 38.
55. Leber B., Mayrhauser U., Rybczynski M., Stadlbauer V. Innate immune dysfunction in acute and chronic liver disease. *Wien Klin Wochenschr.* 2009; 121: 732–44.
56. Antoniadis C.G., Wendon J., Vergani D. Paralyzed monocytes in acute on chronic liver disease. *J. Hepatol.* 2005; 42: 163–5.
57. Riva A., Mehta G. Regulation of Monocyte- Macrophage responses in Cirrhosis – Role of Innate Immune Programming and Checkpoint Receptors. *Front Immunol.* 2019 Feb 5; 10: 167. doi: 10.3389/fimmu.2019.00167 eCollection 2019
58. Yang Y., Ying G., Wu F., Chen Z. sTim-3 alleviates liver injury via regulation of the immunity microenvironment and autophagy. *Cell Death Discov.* 2020 Jul 22; 6: 62. DOI: 10.1038/s41420-020-00299-7 eCollection 2020

59. Kolios G., Valatas V., Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol*. 2006; 12: 7413–20.
60. Möller H.J. Soluble CD163. *Scand J Clin Lab Invest*. 2012; 72: 1–13.
61. Grønbaek H., Sandahl T.D., Mortensen C., Vilstrup H., Möller H.J., Möller S. Soluble CD163, a marker of Kupffer cell activation, is related to portal hypertension in patients with liver cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012; 36: 173–180.
62. Rimola A., Soto R., Bory F., Arroyo V., Piersa C., Rodes J. Reticuloendothelial system phagocytic activity in cirrhosis and its relation to bacterial infections and prognosis. *Hepatology*. 1984; 4: 53–8.
63. Stadlbauer V., Mookerjee R.P., Wright G.A., Davies N.A., Jürgens G., Hallström S., et al. Role of Toll-like receptors 2, 4, and 9 in mediating neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009; 296: G15–G22.
64. Bruns T., Peter J., Hagel S., Herrmann A., Stallmach A. The augmented neutrophil respiratory burst in response to *Escherichia coli* is reduced in liver cirrhosis during infection. *Clin Exp Immunol*. 2011; 164: 346–56.
65. Kai Liu, Fu-Sheng Wang, Ruonan Xu. Neutrophils in liver diseases: pathogenesis and therapeutic targets. *Cell Mol Immunol*. 2021 Jan; 18(1): 38–44. doi: 10.1038/s41423-020-00560-0 Epub 2020 Nov 6.
66. Fiuza C., Salcedo M., Clemente G., Tellado J.M. In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. *J Infect Dis*. 2000; 182: 526–33.
67. Fiuza C., Salcedo M., Clemente G., Tellado J.M. Granulocyte colony-stimulating factor improves deficient in vitro neutrophil transendothelial migration in patients with advanced liver disease. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9: 433–9.
68. Kusaba N., Kumashiro R., Ogata H., Sata M., Tanikawa K. In vitro study of neutrophil apoptosis in liver cirrhosis. *Intern Med*. 1998; 37: 11–7.
69. Kalambokis G., Tsianos E.V. Endotoxaemia in the pathogenesis of cytopenias in liver cirrhosis. Could oral antibiotics raise blood counts? *Med Hypotheses*. 2011; 76: 105–9.
70. Hui Peng, Zhigang Tian. NK cells in liver homeostasis and viral hepatitis. *Sci China Life Sci*. 2018 Dec; 61(12): 1477–85. doi: 10.1007/s11427-018-9407-2 Epub 2018 Nov 2.
71. Yang Zhang, Yuan Wu, Wenjuan Shen, Bingyu Wang, Xingxing Yuan. Crosstalk between NK cells and hepatic stellate cells in liver fibrosis (Review). *Mol Med Rep*. 2022 Jun; 25(6): 208. doi: 10.3892/mmr.2022.12724 Epub 2022 May 4
72. Clària J. Natural killer cell recognition and killing of activated hepatic stellate cells. *Gut*. 2012; 61: 792–793.
73. Yi H.S., Jeong W.I. Interaction of hepatic stellate cells with diverse types of immune cells: foe or friend? *J Gastroenterol Hepatol*. 2013; 28 Suppl 1: 99–104.
74. Ahmed El-Shamy, Andrea D Branch, Thomas D Schiano, Peter D Gorevic. The Complement System and C1q in Chronic Hepatitis C Virus Infection and Mixed Cryoglobulinemia *Front Immunol*. 2018 May 29; 9: 1001. doi: 10.3389/fimmu.2018.01001 eCollection 2018.
75. Homann C., Varming K., Högåsen K., Mollnes T.E., Graudal N., Thomsen A.C., et al. Acquired C3 deficiency in patients with alcoholic cirrhosis predisposes to infection and increased mortality. *Gut*. 1997; 40: 544–549.
76. Propst-Graham K.L., Preheim L.C., Vander Top E.A., Snitily M.U., Gentry-Nielsen M.J. Cirrhosis-induced defects in innate pulmonary defenses against *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Microbiol*. 2007; 7: 94.
77. Altorjay I., Vitalis Z., Tornai I., Palatka K., Kacska S., Farkas G., et al. Mannose-binding lectin deficiency confers risk for bacterial infections in a large Hungarian cohort of patients with liver cirrhosis. *J Hepatol*. 2010; 53: 484–91.
78. Doi H., Iyer T.K., Carpenter E., Li H., Chang K.M., Vonderheide R.H., Kaplan D.E. Dysfunctional B-cell activation in cirrhosis resulting from hepatitis C infection associated with disappearance of CD27-positive B-cell population. *Hepatology*. 2012; 55: 709–19.
79. Carpenter E.L., Mick R., Rüter J., Vonderheide R.H. Activation of human B cells by the agonist CD40 antibody CP-870,893 and augmentation with simultaneous toll-like receptor 9 stimulation. *J Transl Med*. 2009; 7: 93.
80. Albillos A., de la Hera A., González M., Moya J.L., Calleja J.L., Monserrat J., et al. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology*. 2003; 37: 208–17.
81. Such J., Francés R., Muñoz C., Zapater P., Casellas J.A., Cifuentes A., et al. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology*. 2002; 36: 135–41.
82. Massonnet B., Delwail A., Ayrault J.M., Chagneau-Derode C., Lecron J.C., Silvain C. Increased immunoglobulin A in alcoholic liver cirrhosis: exploring the response of B cells to Toll-like receptor 9 activation. *Clin Exp Immunol*. 2009; 158: 115–24.
83. Poeck H., Wagner M., Battiany J., Rothenfusser S., Wellisch D., Hornung V., et al. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood*. 2004; 103: 3058–64.
84. Nolan J.P., DeLissio M.G., Camara D.S., Feind D.M., Gagliardi N.C. IgA antibody to lipid A in alcoholic liver disease. *Lancet*. 1986; 1: 176–9.
85. Papp M., Sipeki N., Vitalis Z., Tornai T., Altorjay I., Tornai I., et al. High prevalence of IgA class anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) is associated with increased risk of bacterial infection in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 2013; 59: 457–66.
86. Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat Rev Immunol*. 2012; 12: 821–32.
87. De Maria N., Idilman R., Colantoni A., Van Thiel D.H. Increased effective immunogenicity to high-dose and short-interval hepatitis B virus vaccination in individuals with chronic hepatitis without cirrhosis. *J Viral Hepat*. 2001; 8: 372–6.
88. Arguedas M.R., Johnson A., Eloubeidi M.A., Fallon A., Habtesion, et al. The Lipopolysaccharide-Sensing Caspase(s)-4/11 Are Activated in Cirrhosis and Are Causally Associated With Progression to Multi-Organ Injury *Front Cell Dev MB*. Immunogenicity of hepatitis A vaccination in decompensated cirrhotic patients. *Hepatology*. 2001; 34: 28–31.
89. Lebossé F., Gudd C, Tunc E. CD8+ t cells from patients with cirrhosis display a phenotype that may contribute to cirrhosis-associated immune dysfunction. *EbioMedicine*. (2019), doi: 10.1016/j.ebiom.2019.10.011
90. Liaskou E., Hirschfield GM Cirrhosis-associated immune dysfunction: Novel insights in impaired adaptive immunity. *EbioMedicine*. 2019 Dec; 50: 3–4. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.10.056 Epub 2019 Nov 11
91. Fiuza C., Salcedo M., Clemente G., Tellado J.M. In vivo neutrophil dysfunction in cirrhotic patients with advanced liver disease. *J Infect Dis*. 2000; 182(2): 526–33.
92. Márquez M., Fernández-Gutiérrez C., Montes-de-Oca M., Blanco M.J., Brun F., Rodríguez-Ramos C., Girón-González J.A. Chronic antigenic stimuli as a possible explanation for the immunodepression caused by liver cirrhosis. *Clin Exp Immunol*. 2009; 158: 219–29.

93. Soffientini U., Beaton N., Baweja S., Weiss E., Bihari C. Biol. 2021 Jul 15; 9: 668459. doi: 10.3389/fcell.2021.668459 eCollection 2021
94. Sheikh M.Y., Raoufi R., Atla P.R., Riaz M., Oberer C., Moffett M.J. Prevalence of cirrhosis in patients with thrombocytopenia who receive bone marrow biopsy. *Saudi J Gastroenterol.* 2012; 18: 257–62.
95. Bihari C., Anand L., Rooge S., Kumar D., Saxena P., Shubham S. Bone marrow stem cells and their niche components are adversely affected in advanced cirrhosis of the liver. *Hepatology.* 2016 October, 64(4): 1273–88. |DOI: 10.1002/hep.28754
96. Kedarisetty C.K., Anand L., Bhardwaj A., Bhadoria A.S., Kumar G., Vyas A.K., et al. Combination of granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin improves outcomes of patients with decompensated cirrhosis. *Gastroenterology.* 2015; 148: 1362–70.
97. Bihari C., Baweja S., Shasthry S., M D., Negi P, Thangariyal S., et al. CEACAM-1 Induced CSF3-receptor Downregulation in Bone Marrow Associated With Refractory Neutropenia in Advanced Cirrhosis. *J Clin Transl Hepatol.* 2022 Feb 28; 10(1): 53–62. doi: 10.14218/JCTH.2021.00331 Epub 2022 Jan 4.
98. Spahr L., Chalandon Y., Terraz S., Kindler V., Rubbia-Brandt L., Frossard J.L., et al. Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with decompensated alcoholic liver disease: a randomized controlled trial. *PLoS One.* 2013; 8: e53719.
99. Carvalho A.V., Quintannilha L.F., Dias N., et al. Bone marrow multipotent mesenchymal stem cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. *Stem cells.* 2008; vol. 26: 1307–14.
100. Arbatsky M.S., Vigovsky M.A., Basalova N.A., Dyachkova U.D., Grigorieva O.A., Efimenko A.Yu. Identification of subpopulations of mesenchymal stromal cells with different responses to profibrotic stimuli using individual cell transcriptome analysis. Proceedings of the V National Congress on Regenerative Medicine. *Genes and cells.* 2022; 17(3): 14. (In Russian)
101. Lee P.C., Yang Y.Y., Huang C.S., Hsieh S.L., Lee K.C., Hsieh Y.C., et al. Concomitant inhibition of oxidative stress and angiogenesis by chronic hydrogen-rich saline and *N*-acetylcysteine treatments improves systemic, splanchnic and hepatic hemodynamics of cirrhotic rats. *Hepatol Res.* 2015; 45: 578–88.
102. Kumar D., Maheshwari D., Nautiyal N., Shubham S., Rooge S., Anand L., et al. Defects in energy metabolism are associated with functional exhaustion of bone marrow mesenchymal stem cells in cirrhosis. *Am J Stem Cells.* 2022 Feb 15; 11(1): 12–27. eCollection 2022.
103. Mirantes C., Passequé E., Pietras E.M. Pro-inflammatory cytokines: emerging players regulating HSC function in normal and diseased hematopoiesis. *Exp Cell Res.* 2014; 329: 248–54.
104. Gemery J.M., Forauer A.R., Silas A.M., Hoffer E.K. Hypersplenism in liver disease and SLE revisited: current evidence supports an active rather than passive process. *BMC Hematol.* 2016; 9: 3.
105. Varadarajan A., Lal D., Kapil R., Bihari C. Bone marrow dyspoiesis associated with severe refractory anaemia in liver cirrhosis. *Frontline Gastroenterol.* 2020 Feb 4; 12(1): 39–43. doi: 10.1136/flgastro-2019-101350 eCollection 2021
106. Gautier S.V., Shevchenko O.P., Tsirulnikova O.M., Kurabekova R.M., Lugovskaya S.A., Naumova E.V., et al. The hematopoietic stem cell number in the peripheral blood of pediatric recipients correlates with the outcome after living donor liver transplantation. *Pediatr Transplant.* 2015; 19: 531–7.
107. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. The role of lymphocytic RNA in intercellular information exchange and regulation of regenerative processes. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova.* 2016; 102(11): 1280–301. (In Russian)

Сведения об авторах:

Онищенко Н.А., доктор мед. наук, проф., гл. специалист отд-ния подготовки научных и медицинских кадров ФГБУ «НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России;

Никольская А.О., канд. биол. наук, лаборант-исследователь, отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии, ФГБУ «НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России;

Шагидулин М.Ю., доктор мед. наук, проф., зав. отделом экспериментальной трансплантологии и искусственных органов ФГБУ «НМИЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России; зав. учебной частью каф. трансплантологии и искусственных органов лечебного факультета ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет).

© Геворкян Н.М., 2023

УДК 616-092

Геворкян Н.М.

Повышение эффективности терапии стволовыми клетками при содействии суммарных РНК лимфоцитов здоровых доноров

ФГБНУ «НИИ биомедицины им. В.Н. Ореховича» РАН,
119121, Москва, Россия, ул. Погодинская, д. 10

Очевидно, что в организме стволовые клетки нуждаются в особо жесткой регуляции их активности со стороны интегральных систем. Из представленного ранее анализа клеточной основы патогенеза самых разных заболеваний, его взаимосвязи с нарушениями регуляторной функции Т-лимфоцитов, следует, что в условиях патологии всегда имеют место функциональные нарушения в ряду контролирующих гомеостаз морфогенетических репаративных Т-лимфоцитов. Ранее на разных экспериментальных моделях *in vivo* и *in vitro* были получены качественные и количественные доказательства того, что препараты суммарной РНК лимфоцитов селезенки, тимуса или периферической крови обладают регуляторными свойствами, соответствующими свойствам самих лимфоцитов, проявляемым в восстановительных процессах при разнообразных нарушениях в органах и тканях. И показано, что препарат суммарной РНК аллогенных или ксеногенных лимфоцитов здоровых особей способствует «репрограммированию» лимфоцитов реципиента, их нормализации и, соответственно, восстановлению нарушенных функций у подопытных животных. В этой связи, с целью повышения эффективности восстановления нарушенных функций той или иной органной системы, здесь предлагается предварять введение стволовых клеток введением суммарных РНК лимфоидных клеток здоровых доноров.

Ключевые слова: регенерация; лимфоидные клетки; репаративные Т-лимфоциты; экзогенная суммарная РНК; репрограммирование *in vivo*; профилактика старения

Для цитирования: Геворкян Н.М. Повышение эффективности терапии стволовыми клетками при содействии суммарных РНК лимфоцитов здоровых доноров. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(3): 124–136.
DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.124-136

Участие автора: подбор и анализ материалов; написание и редактирование статьи – Геворкян Н.М.

Для корреспонденции: Геворкян Нина Михайловна, e-mail: gevorkiann@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800499–5). (ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.06.2023

Принята к печати 12.07.2023

Опубликована 20.09.2023

Gevorkyan N.M.

Enhancing the effect of stem cell therapy by healthy donor total lymphocyte RNA support

Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry,
Pogodinskaya St. 10, Moscow 119121, Russian Federation

It is obvious that stem cells in the body require particularly strict regulation of their activity by integral systems. Previous analysis of the cellular pathogenesis of various diseases and its relationship with disorders of the T-lymphocyte regulation showed that, in pathological conditions, there are always functional disorders in a series of morphogenetic reparative T-lymphocytes that control the homeostasis. Previously, *in vivo* and *in vitro* experiments have provided qualitative and quantitative evidence that regulatory properties of total RNA from the spleen, thymus or peripheral blood lymphocytes are consistent with the properties of the lymphocytes themselves, and these properties are manifested in recovery processes of organs and tissues. It has also been shown that preparations of total RNA from allogeneic or xenogeneic lymphocytes of a healthy donor contribute to the “reprogramming” of the recipient’s lymphocytes, their normalization, and, thus, the restoration of impaired functions in experimental animals. Accordingly, we suggest to precede the administration of stem cells by the administration of total RNA from lymphoid cells of healthy donors to enhance the recovery of disordered functions of a specific organ system.

Keywords: regeneration; lymphoid cells; reparative T-lymphocytes; exogenic total RNA; *in vivo* reprogramming; aging prevention

For citation: Gevorkyan N.M. Enhancing the effect of stem cell therapy by healthy donor total lymphocyte RNA support. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2023; 67(3): 124–136. (in Russian)

Author's contribution: concept and design, collection and processing of material, text writing and editing – Gevorkyan N.M.

For correspondence: *Nina M. Gevorkyan*, researcher, laboratory for protein biosynthesis of «V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry», Pogodinskaya St. 10, Moscow, 119121, Russian Federation, e-mail: gevorkiann@yandex.ru

Information about the author:

Gevorkyan N.M., <https://orcid.org/0000-0002-0386-4010>

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

Financing. This work was done in the framework of the Russian Federation fundamental research Program for the long-term period for 2021–2030 (№ 122022800499–5).

Received 25.06.2023

Accepted 12.07.2023

Published 20.09.2023

Введение

Стремительное развитие терапии с использованием генетически модифицированных клеток, генных и тканеинженерных технологий с целью усовершенствования способов восстановления органов и тканей, поистине, ошеломляюще. При этом самыми перспективными в регенеративной медицине в настоящее время считаются способы, связанные с использованием стволовых клеток, их перепрограммированием *in vitro*, созданием уникальных конструкций на их основе. Положительные эффекты, вызванные стволовыми клетками, отражены в большом количестве публикаций, при этом опыт клинического применения стволовых клеток весьма разнообразен: от значительного улучшения состояния больных до полного отсутствия эффекта или его сопоставимости с традиционными способами лечения. Но в целом бесспорно по меньшей мере то, что, способствуя повышению адаптивных возможностей организма, стволовые клетки достоверно повышают общую выживаемость пациентов при острых угрожающих жизни состояниях [1]. То есть, несмотря на обнадеживающие прорывы в области регенеративной медицины, связанные с применением стволовых клеток, повышение эффективности восстановительных процессов по-прежнему остается приоритетной задачей.

Одна из развиваемых в настоящее время стратегий связана с изучением эффектов комплексного воздействия различных факторов, продуцируемых стволовыми клетками [2] и индуцируемых в тканях той или иной органной системы в период регенерации, с целью коррекции с их помощью происходящих в организме процессов [3]. Однако, если учесть многочисленность таких факторов, продуцируемых *in vivo*, и динамичность их транзитного появления на той или иной стадии восстановительного процесса, а также то, что поиск и тестирование их эффективности в основном осуществляют *in vitro*, выбор искусственного, но во всех

отношениях оптимального состава потребует длительного периода комбинаторики и клинических испытаний. Другой подход связывают с перспективой открытия возможных аутоантигенов и их сочетаний, способных индуцировать адаптивный иммунный ответ, например при мышечных дистрофиях, с целью создания новых терапевтических средств формирования благоприятного окружения мышечным сателлитным клеткам для реализации процессов дифференцировки и регенерации при повреждениях мышц [4].

Наряду с этим в последние 2 десятилетия в зарубежных публикациях стали все больше внимания уделять иммуноопосредованной стратегии повышения эффективности регенеративных процессов на основе системы специфических популяций Т-лимфоцитов [4–7]. На существенную роль воспаления, а значит, и активного участия иммунной системы в репаративных процессах стали обращать внимание, в частности, в связи с наблюдением, что применение ингибирующих иммунный ответ факторов сопровождается ослаблением также и репаративных процессов [8] и что для осуществления полноценной регенерации необходимо своевременное разрешение процесса воспаления [5, 9]. При этом удивление и досаду вызывает тот факт, что хотя в нашей стране, начиная с 1968 года, в многочисленных публикациях подробно освещалось открытие и многостороннее обоснование регуляторной роли Т-лимфоцитов в процессах регенерации: способности этих клеток при их адаптивном переносе воспроизводить у интактного реципиента любую стадию регенерационного процесса, происходящего в организме донора, то есть осуществлять регуляцию пролиферации и/или дифференцировки клеток тканей того или иного органа [10–15] – все то, что могло бы на десятилетия ускорить развитие регенеративной медицины – не было учтено!

В настоящее время стволовые клетки широко применяются в экспериментальной медицине в обла-

сти неврологии, кардиологии, гематологии, травматологии, дерматологии, хирургии. Так, эффективная доставка мезенхимных стромальных клеток (МСК) в поврежденные области центральной нервной системы может быть решающим фактором, определяющим результативность терапии. МСК, трансплантированные внутриартериально, способны заселять периваскулярное пространство, составную часть нервно-сосудистого узла, что может способствовать замене поврежденных перицитов, критического элемента, участвующего в восстановлении функции ЦНС. Однако показано [16], что после трансплантации эти клетки оставались внутри сосудистого просвета в течение первых 2 дней, после чего лишь часть этих клеток обнаруживалась в периваскулярном пространстве в области повреждения, и наблюдалось выведение пересаженных клеток из церебральных сосудов в результате иммунной атаки хозяина. Причем *in vitro* гомогенат из поврежденного мозга активно ингибировал миграцию МСК костного мозга человека, подтверждая неполную экстравазацию, наблюдаемую *in vivo* [16]. В 2021 г. Е.В. Парфёнова на Заседании президиума РАН обратила внимание участников на «абсолютно круциальную проблему для клеточной терапии: *выживаемость* клеток после трансплантации, так как это определяет её эффективность. Независимо от способа трансплантации клеток, введения интрамиокардиально или в коронарные сосуды, количество введенных клеток уже через день падает в несколько раз, а через неделю остаются лишь единичные проценты. Между тем, эффективность клеточной терапии инфаркта напрямую зависит от того, какое количество жизнеспособных клеток задерживается в миокарде». (Портал «Научная Россия», <https://scientificrussia.ru/articles/elena-parfyonova-o-probleme-kletochnoj-terapii>). Здесь предлагается подход к решению этой проблемы с использованием препаратов суммарной РНК лимфоцитов и/или стволовых клеток здоровых доноров.

T-лимфоциты как основа регенераторных и патологических процессов. В настоящее время развитие концепции стволовых клеток и связанных с этим современных технологий привело к абсолютизации роли этих клеток в процессах регенерации, хотя и очевидно, что именно стволовые клетки нуждаются в особо жесткой регуляции их активности со стороны интегральных систем организма. В этой же связи, и абсолютизация «регуляторной функции МСК, их критической роли в регуляции процессов заживления тканей» [17] также преувеличена, поскольку давно уже установлена, а позже подтверждена, выраженная зависимость дифференцировки и функциональной актив-

ности стволовых кроветворных клеток (СКК) [18–20] и МСК от воздействия Т-лимфоцитов [21–23], то есть обоснована принципиальная возможность целенаправленной регуляции Т-лимфоцитами функций стволовых и стромальных клеток в процессах регенерации самых разных органов и тканей [4, 7, 24–30]. Хотя понятие «иммунитет» обычно ассоциируется с защитной функцией иммунной системы, предохраняющей от чужеродных внешних воздействий, однако процессы роста, развития, физиологической и репаративной регенерации, также находящиеся под контролем иммунной системы и осуществляемые морфогенетическими Т-лимфоцитами, являются первичными по существу. Так, очевидно, что для управления процессами несинхронной пролиферации разных типов клеток на уровне целого организма, то-есть для осуществления системной регуляции процессов морфогенеза, необходима возможность оперативного влияния на все звенья этих процессов, с целью своевременной тканеспецифической стимуляции или торможения каждого из звеньев [13]. Такие «вожжи» можно получить, по-видимому, только имея в арсенале средств систему вездесущих (в организме млекопитающего каждая десятая клетка – лимфоцит [31]) подвижных клеток, таких как тканеспецифичные клоны морфогенетических хелперных ($CD4^+$) и супрессорных, или цитотоксических, ($CD8^+$) Т-лимфоцитов, обладающих, соответственно, стимулирующей и тормозящей активностями в отношении пролиферации и дифференцировки клеток своей ткани-мишени [24]. Очевидно, что в такой системе клональное нарушение регуляторной функции лимфоцитов приведет к функциональным изменениям их органа-мишени. И в настоящее время все больше исследователей склоняется к тому, что обнаруживаемые при разных нозологических формах функциональные нарушения именно в ряду Т-лимфоцитов, подвижных и наиболее чувствительных к внешним воздействиям представителей оперативной гуморальной подсистемы организма, являются ведущим звеном патогенеза [24]. Так, выявлена патогенетическая роль лимфоцитов в усилении эритропоэза при истинной полицитемии [32], патогенетическая роль Treg при ревматоидном артрите и способность определенных клонов $CD4^+$ -Treg здоровых доноров тормозить некоторые патологические ответы при артритах у человека и в экспериментальных моделях ревматоидного артрита [33]. Показано, что адоптивный перенос Foxp3-Т-лимфоцитов памяти, продуцирующих IL-10, вызывает периферическую иммунотолерантность и может быть эффективен против острой реакции трансплантат-против-хозяина [34],

а активированные Treg-клетки Foxp3⁺CD4⁺ способствуют разрешению воспаления в заживающем миокарде путем индукции дифференцировки макрофагов, связанной с активацией миофибробластов [35]. Полученные у здоровых доноров аллогенные дважды отрицательные Т-лимфоциты CD4⁺CD8⁻ *in vitro* проявляли противолейкемическую активность в отношении клеток большей части больных (36/48) первичным острым миелолейкозом, 9 из которых были резистентны к химиотерапии, и снижали лейкемическую нагрузку *in vivo* [36]. Интересны результаты публикации [37], где показано, что при инфекционном повреждении легких главную роль в восстановлении и поддержании тканей играют Treg, которые отвечают на совсем иные сигналы, нежели Treg, участвующие в подавлении иммунных реакций и воспаления. Это является подтверждением наличия в иммунной системе двух сопряженных подсистем – морфогенетического контроля и иммунного надзора – и свидетельствует о том, что каждая из этих подсистем располагает полным набором обслуживающих ее клеток.

Суммарная РНК лимфоидных клеток как молекулярная основа процессов регенерации и патогенеза. Ранее нами на различных крысиных моделях *in vivo* и *in vitro* было показано, что препараты суммарной РНК, выделенной из лимфоцитов селезенки, тимуса или периферической крови, обладают регуляторными свойствами, адекватными таковым, проявляемым самими лимфоцитами в восстановительных процессах в тканях при разнообразных нарушениях, с сохранением фазовости этих процессов [32, 40, 41]. Для сравнения, морфогенетические эффекты органных РНК ограничены их действием на гомологичные органы и ткани, из которых эти РНК выделены [43, 44], тогда как регуляторное действие лимфоцитов селезенки, тимуса или периферической крови здоровой особи, также как и полученных из них препаратов суммарных РНК, в силу поликлональности морфогенетических Т-лимфоцитов, обеспечивает нормализацию регуляторной функции в отношении пролиферации и дифференцировки клеток любой нуждающейся в этом ткани организма реципиента.

В пользу того, что в восстановительных процессах первична регуляторная роль не стромальных, а именно лимфоидных клеток, свидетельствуют, в частности, данные, полученные нами при решении вопроса о том, оказывает ли суммарная РНК костного мозга (как органа кроветворения, отвечающего на кровопотерю) столь же сильное и ярко выраженное торможение эритропоэза *in vivo* и *in vitro* (в культуре эритробластических островков (ЭО) костного

мозга [20, 45]), как и препараты суммарной РНК лимфоцитов тимуса или селезенки здоровых крыс, на супрессорной стадии восстановления кроветворения (через 96 часов после 2%-й кровопотери) [46]. Выяснилось (см. «Приложение»), что суммарная РНК, выделенная на этой стадии из костного мозга тех же животных, что и РНК лимфоцитов тимуса и селезенки, супрессорного действия на эритропоэз по сравнению с контролем не оказывает, несмотря на наличие в костном мозге достаточного количества МСК [40]! То есть речь идет о направленном митостатическом эффекте подавления кроветворных клеток со стороны иммунной системы (в отличие от действия цитостатиков, которое распространялось бы и на Т-лимфоциты). Здесь очевиден выраженный эффект торможения активности самих кроветворных (стволовых) клеток костного мозга со стороны Т-лимфоцитов тимуса и селезенки, поскольку во всех остальных наших опытах морфогенетический эффект, оказываемый препаратами суммарной РНК костного мозга интактного животного, всегда превосходит таковые, оказываемые препаратами РНК лимфоцитов тимуса и селезенки [40, 47–50].

Нарушениями регуляторной функции Т-лимфоцитов обусловлена также и их патогенетическая роль [24]. Так, на крысиной модели гипопластической бензолной анемии нами продемонстрирована патогенетическая роль *лимфоцитов* больных эритремией [32, 39, 40], которую относят к хроническим неопластическим заболеваниям крови с нарушенными механизмами регуляции пролиферации и дифференцировки *эритроидных* клеток. Показано, что суммарная РНК ксеногенных лимфоцитов периферической крови больного эритремией вызывает активацию эритропоэза у подопытных крыс, вдвое превышающую таковую, оказываемую суммарной РНК из смеси лимфоцитов периферической крови здоровых доноров. Субпопуляционный анализ Т-клеток этого больного выявил у него нарушение соотношения и увеличение содержания Т-лимфоцитов фенотипа CD3⁺CD45⁺CD4⁺ до 62,3% (в норме 31–49%) и Т-лимфоцитов фенотипа CD3⁺CD45⁺CD8⁺ до 35% (в норме 12–30%), а также снижение числа регуляторных Т-клеток CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ до 3,3% (при норме 5–10%). Изменение регуляторных свойств Т-лимфоцитов больных эритремией (называемой также истинной полицитемией, или плеторой) показано также и другими исследователями [51].

Суммарная клеточная РНК как инструмент для расширения возможностей экспериментальных исследований путем отказа от линейных животных и как

путь к клиническому применению. С помощью препаратов суммарной РНК лимфоцитов тимуса, селезенки или периферической крови можно воспроизвести не только полностью всю последовательность явлений, возникающих в процессе регенерации той или иной ткани, но и любую стадию этого процесса, то есть как фазу стимуляции пролиферации, так и стадию ее торможения, с сопутствующей дифференцировкой клеток регенерирующей ткани. При этом действие суммарных РНК и проявляется быстрее, и эффективность их выше, чем самих клеток, из которых они получены. Так, сравнительный анализ активности клеток костного мозга и препаратов суммарной РНК, выделенной из этих клеток, в отношении регенерации печени показал, что препараты РНК значительно более эффективны в процессах восстановления, чем сами клетки этого центрального лимфоидного органа, способствуя более ранней интенсификации процессов регенерации и обеспечивая более высокие темпы восстановительных процессов: пик митотической активности клеток печени под действием РНК наступает на 2-е сут, а под действием клеток костного мозга — на 3-и сут, при этом первый из них в 2,3 раза выше второго (23,45% и 10,3%, соответственно) [52]. Этот эффект ускорения может быть полезен и в решении указанной выше проблемы *выживаемости* клеток после трансплантации. В этой связи, в ряде случаев можно вместо трансплантации стволовых клеток вводить препарат их суммарной РНК, имеющей еще и главное преимущество: отсутствие аллогенного и ксеногенного ограничений (в отличие от самих клеток) [32, 39, 40, 53, 54]. Это чрезвычайно расширит границы применимости регенераторных свойств лимфоидных, стволовых и прочих соматических клеток, создавая принципиально новые возможности в практической медицине. В качестве самого скромного примера можно привести вынужденный отказ от предложенной ранее идеи о целесообразности лечения состояний, требующих пересадки стволовых кроветворных клеток (СКК), смесью таких клеток от нескольких генетически различающихся доноров — как выяснилось, в такой смеси происходит взаимная инактивация аллогенных СКК и их инактивация лимфоцитами [55].

Руководствуясь той же логикой, то есть тем, что влияние клеток нескольких здоровых доноров повысит вероятность успеха лечения, мы в своих опытах использовали РНК, выделенную из смеси клеток костного мозга и/или РНК из смеси лимфоцитов селезенки или тимуса, полученных от нескольких беспородных белых крыс, а также РНК из смеси лимфоцитов периферической крови от разных доноров. А в ряде опы-

тов вводили крысам препараты РНК из лимфоцитов селезенки, тимуса, костного мозга свиньи, лимфоцитов бычьей селезенки или лимфоцитов периферической крови человека [32, 40, 53, 54]. Все эти препараты на разных крысиных моделях вызывали у животных исключительно положительные лечебные эффекты. Таким образом, использование вместо самих стволовых кроветворных клеток препаратов их суммарной РНК позволит избежать необходимости подбора гистосовместимого донора, а также обойти не только аллогенные, но и ксеногенные ограничения.

Заменяв адоптивный перенос клеток введением их суммарных РНК, можно в большой степени отказаться от выведения линейных животных: кроме того, что получение и поддержание тех или иных линий сопряжено с дополнительными временными и финансовыми потерями, практика близкородственного скрещивания еще более отдаляет таких животных от системы, на которой стоит тестировать те или иные активные соединения в расчете на адекватность эффектов их воздействия на организм человека. Что же касается моделирования заболеваний человека на животных, то и эти модели в большой мере являются условными (возможно, за исключением тех случаев, когда решаются задачи по выяснению генетических причин наследственных заболеваний и способов их устранения), тогда как перенос суммарной РНК лимфоцитов периферической крови больного даст возможность воспроизведения у животного всего комплекса патологических изменений, имеющих место в организме пациента [56, 57], и подбора наиболее адекватного лечения [48].

Более того, выделив из лимфоцитов препараты их суммарных РНК на начальной и поздней стадиях регенерации того или иного органа (для разных органов длительность хелперной и время начала супрессорной фаз разные [11, 15, 41]), можно значительно быстрее и эффективнее осуществлять адресную регуляцию указанных процессов, причем в нужном направлении, к тому же не заботясь о гистосовместимости! Полученные таким образом стимулирующие и тормозящие препараты суммарных РНК лимфоидных клеток являются уникальным средством для направленной регуляции локальных морфогенетических процессов, с помощью которых можно особенно эффективно корректировать недостаточность или избыточность пролиферативного пула клеток любой ткани и в организме, и вне его. Указанные препараты РНК могут служить прежде всего уникальным набором средств для воспроизведения и подробного изучения *in vivo* и *in vitro* всех особенностей и этапов восстановительных процессов, происходящих в разных органах и тканях. Однако для

клинического применения предпочтительны исключительно благоприятные нормализующие эффекты, оказываемые при самых разных нарушениях в организме препаратами суммарных РНК лимфоцитов периферической крови молодых здоровых доноров, а также суммарных РНК тимуса, селезенки и лимфоцитов периферической крови здоровых молодых животных, находящихся под контролем ветеринарной службы. Чрезвычайно эффективны препараты суммарных РНК костного мозга, плаценты и пуповины, которые можно рекомендовать всегда использовать совместно с регуляторными препаратами суммарных РНК селезенки, тимуса или лимфоцитов периферической крови здоровых животных или лимфоцитов человека. Говоря о нормализации нарушенных функций, мы имеем в виду не только эффекты их усиления или ослабления как таковые, но и замечательную способность лимфоцитов здоровых особей (также, как и препаратов их суммарной РНК) стабилизировать показатели в рамках физиологической нормы [39, 40].

Перепрограммирование Т-лимфоцитов *in vivo*

Как правило, клеточные технологии используют стратегию перепрограммирования стволовых клеток *in vitro*, выделения, выращивания и модификации Т-клеток и их рецепторов в искусственных условиях после изъятия этих клеток из организма пациента, а затем возврата в кровяное русло. Однако можно использовать более простой и естественный способ перепрограммирования Т-клеток *in vivo* [56], который проиллюстрирован нами следующим образом. Однократное введение 15–30 мкг/100 г веса тела суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки крыс со стойким аллоксановым диабетом вызывало у интактных животных выраженную гипергликемию [57]. Это однозначно свидетельствует об изменении (перепрограммировании) донорских лимфоцитов, которые, следовательно, также чувствительны к токсическому действию аллоксана. К 21 дню после введения крысам с аллоксановым диабетом препаратов суммарных РНК лимфоидных клеток здоровых особей у этих животных устанавливалась стойкая нормогликемия (перепрограммирование) [57, 48]. Более того, последующее введение суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки этих крыс со стойко нормализовавшимся уровнем глюкозы крови не вызывало ни у одного из интактных животных гипергликемии [57], что очевидно свидетельствует о естественном перепрограммировании лимфоцитов крыс, перенесших аллоксановый диабет.

Описанный подход перепрограммирования стволовых и Т-клеток *in vivo* имеет ряд очень ценных пре-

имуществ, обеспечивающих их клиническое применение. Прежде всего, он не требует подбора гистосовместимых донорских клеток и вовсе не ограничен ни стволовыми клетками донора, ни Т-лимфоцитами пациента. Чрезвычайно ценно и то, что, не зная всех подробностей динамических изменений, возникающих в процессах нормальной регенерации функции органов и тканей, можно с помощью тканевых и/или лимфоцитарных суммарных РНК здоровых молодых доноров инициировать полностью все этапы этих процессов. Такое вмешательство не только эффективно, но и проще в исполнении, поскольку препараты суммарных РНК разного свойства можно заготавливать заранее, вводить их можно не только внутривенно, но и интраназально, без значимых результативных потерь [58]. Более того, препараты эти весьма стабильны, особенно в лиофилизированной форме [53].

Органые препараты РНК пятидесяти разновидностей из тканей крупного рогатого скота под общим названием *Regeneresen* в течение нескольких лет успешно производила и продавала по всему миру для клинического применения немецкая компания *Dyserhoff Pharma*, однако в последние годы производство прекратили в связи с «недостаточно стойкими и не столь выраженными эффектами», вызываемыми этими препаратами. Мы полагаем, что разочарование связано с несколько упрощенным (хоть в целом и логичным) посылом и отсутствием достаточно обоснованной концепции, лежащей в основе происходящих в организме процессов регенерации. То есть разработчики исходили только из соображений вполне оправданной потребности организма в восстановлении количества и качества поврежденной ткани, при этом совершенно не учитывая уже развитую и всесторонне описанную к тому времени концепцию, связанную с иммунологической природой регуляторных механизмов процессов регенерации. Эта практика — очередное доказательство того, что в условиях патологии для восстановления нарушенных функций тех или иных органов недостаточно введения РНК органических клеток, поскольку их вводят в организм с заведомо измененным нейроиммунофизиологическим статусом [59]. Поэтому мы считаем необходимым, наряду с препаратами органических, тканеспецифических РНК и/или РНК стволовых клеток, вводить также и нормализующие препараты суммарных РНК регуляторных морфогенетических лимфоидных клеток тимуса, селезенки или периферической крови здоровых особей. Ровно то же самое, но в еще большей степени, относится и к необходимости предварять трансплантацию стволовых клеток введением суммарной РНК лимфоцитов

донора стволовых клеток. В недавней публикации F. D'Alessio и соавт. [7] такие популяции Т-лимфоцитов, обеспечивающие регуляторный морфогенетический эффект, удачно названы *репаративными*, что позволяет обойти неоднозначность названия «регуляторные», возникшую в связи с появлением категории Treg.

Адресная доставка экзогенных РНК *in vivo*

Хотя в настоящее время и считается, со ссылкой на известную публикацию Н. Valadi и соавт. [60], что естественными носителями РНК, адресно доставляющими ее в клетки-мишени, являются экзосомы [61], однако не исключено, что этот активный механизм обеспечивает именно *внутренний* обмен малыми РНК и мРНК между клетками. Что же касается *экзогенной* РНК, то механизмы не только доставки, но и вообще реагирования на нее могут быть принципиально иными, если учесть стратегию максимально оперативного реагирования клеток иммунной системы на всевозможные внешние воздействия. При этом наиболее чувствительными клетками иммунной системы являются «приближенные к среде» лимфоидные клетки [24]. Так, есть данные о том, что уже через 45 секунд инкубации наблюдается максимум поглощения меченой транспортной РНК *E. coli* лимфобластами человека, с сохранением ее функциональных свойств [62], что так же быстро в лимфоидные клетки селезенки проникает и гомологичная суммарная РНК, стимулируя их синтетическую активность [63], и что уже через 3 мин инкубации 3%, а через 15 мин – 8% радиоактивно меченой экзогенной РНК, выделенной из лимфоцитов периферической крови здоровых доноров, обнаруживается внутри аллогенных лимфоцитов и ксеногенных лимфоидных клеток селезенки мышей, а также и то, что гранулоциты, например, такую лимфоидную РНК не поглощают [64]. С этим согласуются и наши данные, когда, наряду с исключительной эффективностью экзогенного воздействия лимфоцитарных РНК *in vivo*, эти же препараты в культурах клеток, не содержащих лимфоцитов, не вызывали никаких эффектов. И в целом результаты наших исследований дают основания предполагать, что адресная доставка лимфоцитарной РНК осуществляется тканеспецифическими клоонами морфогенетических Т-лимфоцитов к их тканям-мишеням. Так, нами показана способность суммарной РНК нормальных лимфоцитов селезенки, тимуса или периферической крови в количестве 15–30 мкг/100 г веса тела стимулировать эритропоэз даже у животных с экспериментальной полицитемией [65], значительно ускорять нормализацию количества форменных элементов крови у крыс при гипопластической бензолной анемии [39, 47], ока-

зывать профилактическое и лечебное действие в отношении постлучевой регенерации кроветворной ткани [49, 50], а также стимулировать процесс регенерации скелетных мышц путем активации пролиферации клеток-миосателлитов [54], обеспечивать стойкий эффект нормализации уровня глюкозы крови крыс с аллоксановым диабетом [48], регресс гиперплазии предстательной железы [38] и прочие эффекты нормализации нарушенных функций организма и предотвращения гибели экспериментальных животных [40, 49, 50].

Влияние экзогенных РНК на процесс морфогенеза в период эмбрионального развития было впервые исследовано М. Niu [66], который показал, что имплантация развивающимся головастикам эпидермальных культур, выращенных в присутствии РНК тимуса теленка, приводила к образованию у зародышей в этом месте полноценного тимуса, морфологически неотличимого от нормально развивающегося органа. Имплантированные контрольные культуры, выращенные без добавления РНК тимуса, в большинстве случаев через несколько недель бесследно исчезали. В этой связи, если учесть рекапитуляцию, всегда наблюдаемую в процессах регенерации, то можно ожидать и повышения *выживаемости* стволовых клеток (а следовательно, и эффективности их трансплантации), если предварительно вводить реципиенту суммарную РНК лимфоцитов тимуса, селезенки или периферической крови здоровых доноров. К тому же было обнаружено [67, 68], что экзогенная РНК, выделенная из мышинной печени, инициировала в клетках асцитной карциномы мышей синтез несвойственных им веществ – сывороточного альбумина, триптофанпирролазы, глюкозо-6-фосфатазы, аргиназы и др. При этом функциональные изменения в клетках-реципиентах были удивительно стабильными. Глюкозо-6-фосфатазу синтезировала даже 244 генерация асцитных клеток, то есть индукционный эффект экзогенной РНК поддерживался в клеточной линии на протяжении 21–29 пассажей [цит. по 43, 44]. Таким образом, высокая стабильность эффектов, индуцируемых экзогенной суммарной РНК лимфоидных клеток, наряду с указанным выше ускоренным проявлением этих эффектов по сравнению с эффектами, вызываемыми самими клетками [52], тоже могут быть полезны в решении указанной выше проблемы *выживаемости* клеток после трансплантации.

Заключение

То, что указанное разнообразие эффектов можно вызвать одним и тем же набором препаратов суммарных РНК нормальных лимфоидных клеток, мы объясняем

наличием в организме системы многочисленных поликлональных лимфоцитов. В этой системе особые клоны тканеспецифических *репаративных* Т-лимфоцитов адресно воспринимают из экзогенной донорской суммарной РНК компоненты лимфоидных клеток, соответствующие каждому из клонов, и доставляют их к своим тканям-мишеням, осуществляя таким образом тканеспецифическую репаративную функцию. Такая избирательность должна свидетельствовать о высоком сродстве рецепторов поверхности морфогенетического Т-лимфоцита как к экзогенной лимфоидной РНК, соответствующей его клональной принадлежности, так и к клеткам его ткани-мишени, к которой он эту РНК доставляет. В этой связи хотелось бы отметить, что наблюдаемое в настоящее время стремление выделить из совокупности Т-лимфоцитов популяцию клеток, которые после искусственной индукции их функциональности должны стать максимально эффективными в той или иной ситуации, представляется нам не очень оправданным. Действительно, на данном этапе все еще в недостаточной мере оценена пластичность ответов иммунных клеток на происходящие в организме взаимодействия с клетками разных тканей и с нейро-гормональной системой, также, как и участие иммунной системы в процессах, выходящих далеко за рамки явлений, которые принято связывать с системой иммунитета [69]. Тогда как уже сейчас полноценный терапевтический эффект может быть обеспечен комплексным действием суммарной РНК тимоцитов, спленоцитов или лимфоцитов периферической крови, в состав которых входит оптимальное соотношение нормально функционирующих разновидностей лимфоидных клеток [24, 41]. Поэтому экзогенное введение препаратов суммарных РНК из совокупности клеток интегральной лимфоидной системы, столь эффективно организованной природой, дает нам уникальную возможность предоставить организму исключительное право оказывать нормализующее воздействие одновременно на все те системы, которые при том или ином патологическом состоянии претерпевают деформацию. Для реализации такой программы необходимы клинические испытания для отработки оптимальных схем восстановления функций при тех или иных патологических состояниях, а также для профилактического введения препаратов суммарных РНК лимфоидных клеток, способствующих замедлению процессов старения и увеличению продолжительности активной жизни индивида.

Приложение

Эритропоэтическую активность суммарной РНК оценивали по ее влиянию на темп формирования эритробластических островков (ЭО) в костном мозге,

используя исключительно адекватную и наглядную модель изучения процесса эритропоэза *in vitro* [21, 45]. ЭО — это морфофункциональные единицы эритропоэза, представляющие собой ассоциацию клеток двух гемопоэтических линий — эритроидной и моноцитарной. Каждый ЭО состоит из макрофага и «короны» окружающих его эритроидных клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки. Разделение ЭО на классы зрелости [21, 45] основано на морфологической оценке последовательности удвоения эритроидных клеток в «короне» ЭО, начинающегося от колониеобразующей единицы эритроцитарной (КОЕ-Э) или проэритробласта и заканчивающегося последним делением оксифильных эритробластов:

ЭО1 — ЭО 1-го класса: макрофаг + от 2 до 8 проэритробластов и/или базофильных эритробластов (результат амплификации 1:2:4:8, отражает процесс новообразования ЭО на основе контакта свободных костномозговых макрофагов и КОЕ-Э и скорость пролиферации молодых эритроидных клеток, т.е. эритропоэз *de novo*)

ЭО2 — ЭО 2-го класса: макрофаг + от 9 до 16 базофильных и полихроматофильных эритробластов (следствие удвоения 8:16, отражает скорость пролиферации и дифференцировки эритроидных клеток)

ЭО3 — ЭО 3-го класса: макрофаг + от 17 до 32 полихроматофильных и оксифильных эритробластов (следствие удвоения 16:32, отражает скорость дифференцировки и созревания эритроидных клеток)

ЭОинв — инволюцирующий ЭО: макрофаг + менее 16 оксифильных эритробластов + ретикулоциты (отражает скорость дифференцировки и денуклеации эритроидных клеток)

ЭОрек — реконструирующийся ЭО: ЭОинв + проэритробласты и/или базофильные эритробласты (отражает процесс повторного образования ЭО на основе контактов КОЕ-Э с макрофагами, уже участвующими в эритропоэзе, т.е. эритропоэз *de repeto*).

Ранее было установлено, что адаптивный перенос лимфоцитов селезенки мышей через 96 ч после 2%-й кровопотери (модель компенсационного эритропоэза) вызывает в костном мозге реципиентов торможение развития эритроидных клеток [70]. Вопрос — угнетают ли эритропоэз также и препараты суммарных РНК, выделенных методом Хомчинского [71] из лимфоцитов селезенки, лимфоцитов тимуса, а также из клеток костного мозга (РНКс, РНКт и РНКкм, соответственно), через 96 ч после 2%-й кровопотери у белых беспородных крыс. Для ответа на него через 1 ч после 2%-й кровопотери опытным группам крыс однократно вну-

Таблица 1/ Table 1

Содержание ретикулоцитов

Reticulocyte content

Показатели Indicates	Контроль Control	РНКс Spleen lymphocyte RNA	РНКт Thymus lymphocyte RNA	РНКкм Bone marrow cell RNA
Ретикулоциты (×10 ⁹ /л) Reticulocytes (×10 ⁹ /l)	57,2±1,8	38,1±4,8*	26,8±1,1*	59,2±1,8

Примечание. В таблицах звездочкой обозначены статистически значимые различия между опытными и контрольной группами, *p*<0,05.
Note. In the tables, asterisk indicates statistically significant differences between experimental and control groups, *p*<0.05.

Таблица 2 / Table 2

Картина эритропоэза

Picture of erythropoiesis

Показатели Indicates	Контроль Control	РНКс Spleen lymphocyte RNA	РНКт Thymus lymphocyte RNA	РНКкм Bone marrow cell RNA
Абсолютное количество ЭО (×10 ³ /бедр. кость) Absolute number of EI (×10 ³ /femur)	345,4±4,3	324,6±6,7*	300,8±5,5*	355,0±8,9
% ЭО1 % EI1	7,6±0,4	5,1±0,3*	5,0±0,5*	8,0±0,3
% ЭО2 % EI2	8,3±0,4	6,2±0,4*	6,0±0,3*	8,2±0,4
% ЭО3 % EI3	30,2±0,9	34,4±1,6	32,6±2,5	30,6±1,6
% ЭОинв. % of involutional EI	36,2±1,2	41,2±2,8	42,8±3,1	35,4±2,1
% ЭОрек. % of reconstructing EI	17,7±0,6	13,2±0,7*	13,6±0,7*	17,8±0,6

тривенно вводили указанные препараты РНК из расчета 30 мкг/100 г массы тела, а контрольным животным – по 0,1 мл 0,9% раствора NaCl.

На 5-е сут после кровопотери и введения РНК в периферической крови животных определяли количество ретикулоцитов (**табл. 1**), а в подготовленных препаратах ЭО костного мозга [21, 40] – картину эритропоэза (**табл. 2**):

Литература

(п.п. 2; 4–9; 16; 20; 22–23; 25–30; 33–37; 51; 60; 62–63; 66–69; 71 см. References)

- Кузьмина Л.А., Петинати Н.А., Васильева В.А. и др. Применение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток для лечения острой реакции «трансплантат против хозяина». *Терапевтический архив*. 2020; 92(7): 23-30. DOI: 10.26442/00403660.2020.07.000757
- Карагаюр М.Н., Макаревич П.И., Шевченко Е.К. и др. Современные подходы к регенерации периферических нервов после травмы: перспективы генной и клеточной терапии. *Гены & Клетки*. 2017; 12(1): 6-14. DOI: 10.23868/201703001

- Бабаева А.Г. *Иммунологические реакции в процессах нормального и восстановительного роста*. В сб.: *Регенерация и клеточное деление*. М.: Медицина, 1968; 11-6.
- Бабаева А.Г. Регенерация и система иммуногенеза. М.: Медицина, 1985.
- Бабаева А.Г., Зотиков Е.А. Иммунология процессов адаптивного роста, пролиферации и их нарушений. М.: Наука, 1987.
- Донцов В.И. Применение теории гиперцикла для анализа процессов межклеточной регуляции пролиферации тканей: доказательства существования специализированной клеточной системы регуляции пролиферации тканей. *Успехи современной биологии*. 1986; 101(1): 1-29.
- Бабаева А.Г., Бляхер М.С., Федорова И.М. и др. Динамика изменений численности различных субпопуляций лимфоцитов в селезенке и митотической активности эпителия почки у односторонне нефрэктомированных мышей. *Актуальные вопросы общей и частной патологии*. 2000; 176-8.
- Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А. Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. М.: Изд-во РАМН, 2009.
- Ефименко А.Ю., Сорокина А.Г., Григорьева О.А. и др. Участие некодирующих регуляторных РНК, секретируемых мезенхимными стромальными клетками, в процессах регенерации и репарации тканей. *Материалы IV Национального Конгресса*

- по Регенеративной Медицине. Москва, 20-23 ноября 2019 года. *Гены & Клетки*. Том XIV, Приложение, 2019, 90-1.
18. Манько В.М., Петров Р.В. Лимфоцитарный контроль дифференцировки кроветворных стволовых клеток. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2006; 2(4): 63-75.
 19. Хаитов Р.М., Рябова Л.В. Зависимость дифференцировки стволовых кроветворных клеток от функционального состояния тимуса. *Онтогенез*. 1978; 9(4): 406-10.
 21. Тишевская Н.В. Культивирование эритробластических островков костного мозга. Челябинск, 2016.
 24. Геворкян Н.М., Тишевская Н.В. Патогенез как проблема функциональной несостоятельности и дисбаланса в популяции Т-лимфоцитов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2021; 65(2): 109-19. DOI: 10.25557/0031-2991.2021.02
 31. Полетаев А.Б. *Имунофизиология и иммунопатология*. Москва, 2008.
 32. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В. и др. О стимулирующих эритропоз свойствах суммарной РНК лимфоцитов периферической крови при эритремии. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2015; 1(13): 33-7.
 38. Бабаева А.Г., Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. и др. Регресс экспериментальной гиперплазии предстательной железы под действием лимфоцитарных и органных РНК. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2018; 1(25): 61-6.
 39. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В. и др. О гемопоэтических свойствах рибонуклеиновой кислоты лимфоцитов периферической крови больных истинной полицитемией и здоровых доноров. *Онкогематология*. 2015; 10(2): 58-62.
 40. Бабаева А.Г., Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. *О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах*. М.; 2016.
 41. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В. *Очерки об особенностях изучения эффектов РНК-терапии*. М.; 2019.
 42. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Комарова И.А. Влияние препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки крыс на эритропоз *in vitro*. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2014; 4(12): 35-9.
 43. Белоус А.М., Годин В.П., Панков Е.Я. *Экзогенные нуклеиновые кислоты и восстановительные процессы*. М.: Медицина, 1974.
 44. Смирнов А.В. Специфические эффекты и возможные механизмы действия экзогенных РНК. *Успехи современной биологии*. 1988; 105, Вып. 1(4): 20-36.
 45. Захаров Ю.М., Тишевская Н.В. Культура эритробластических островков – новый инструмент для исследования эритропоза. *Вестник Уральского медицинского академического науки*. 2003; 1: 65-8.
 46. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Особенности супрессорного действия суммарной рибонуклеиновой кислоты лимфоцитов, выделенных из селезенки крыс на начальном этапе торможения эритропоза. *Успехи современного естествознания*. 2015; 6: 61-4.
 47. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М. Сравнительный анализ гемопоэтической активности суммарной РНК костного мозга и лимфоидных клеток селезенки при хронической бензолной анемии у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(2): 56-64. DOI: 10.25557/0031-2991.2019.02.56-64
 48. Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Бабаева А.Г. Роль суммарных РНК лимфоидных и стволовых клеток в коррекции уровня глюкозы в крови при экспериментальном сахарном диабете. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019; 63(3): 88-95. DOI: 10.25557/0031-2991.2019.3.88-95
 49. Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Болотов А.А. Влияние предварительного введения суммарной РНК клеток костного мозга на динамику восстановления эритропоза у крыс после острого гамма-облучения. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016; 161(5): 670-3.
 50. Тишевская Н.В., Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Захаров Ю.М. Коррекция постлучевых нарушений эритропоза суммарной РНК клеток костного мозга и тимуса. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2017; 57(4): 384-90. DOI: 10.7868/S086980311704004X
 52. Гоникова З.З., Никольская А.О., Кирсанова Л.А. и др. Сравнительный анализ эффективности стимуляции процессов регенерации печени клетками костного мозга и общей РНК этих клеток. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019; 21(1): 113-21. DOI: 10.15825/1995-1191-2019-1-113-121
 53. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Позина А.А. Лиофилизированная форма ксеногенной суммарной РНК стимулирует гемопоэз при постлучевой миелосупрессии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2021; 65(4): 42-6. DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.42-46
 54. Тишевская Н.В., Головнева Е.С., Галлямутдинов Р.В. и др. Ксеногенная лимфоцитарная РНК стимулирует физиологическую регенерацию скелетных мышц. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2021; 21(3): 134-41. DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-134-141
 55. Хаитов Р.М. Репопуляция костномозговых клеток в реципиентах различных линий мышей при совместной трансплантации от трех генетически различающихся доноров. *Радиобиология*. 1971; 11(5): 767-71.
 56. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. Альтернативный способ «перепрограммирования» лимфоцитов. *Гены & Клетки*. 2022; 17(3). ISSN 2313-1829. Материалы V национального конгресса по регенеративной медицине. М., 23-25 ноября 2022 г.
 57. Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Бабаева А.Г. О феномене повышенной чувствительности крыс, ранее перенесших аллоксановый диабет, к диабетогенному воздействию суммарной РНК. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(2): 85-8. DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.85-88
 58. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М. Степень активации гемопоэза с помощью суммарной РНК зависит от способа ее парентерального введения. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2020; 106(8): 1016-24. DOI: 10.31857/S0869813920080099
 59. Корнева Е.А. Пути взаимодействия нервной и иммунной систем: история и современность, клиническое применение. *Медицинская иммунология*. 2020; 22(3): 405-18. DOI: 10.15789/1563-0625-PON-1974
 61. Николин В.П., Попова Н.А. Биологические эффекты экзогенной РНК. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022; 8(2): 206-13. DOI: 10.18699/LettersVJ-2022-8-09
 64. Блинов М.Н., Луганова И.С., Владимиров А.Д. Включение экзогенной РНК в лейкоциты человека. *Проблемы гематологии и переливания крови*. 1981; 26(1): 38-40.
 65. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Комарова И.А. Влияние препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки крыс на эритропоз в культуре эритробластических

островков крыс с полицитемией. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2014; 4(12): 40-3.

70. Бабаева А.Г., Белан Е.И. Лимфоцитарно-макрофагальная регуляция репаративного эритропоэза. *Вестник АМН СССР*. 1990; 9: 27-36.

References

- Kuzmina L.A., Petinati N.A., Vasilieva V.A., et al. Multipotent mesenchymal stromal cells application for acute graft versus host disease treatment. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2020; 92(7): 23-30. DOI: 10.26442/00403660.2020.07.000757 (In Russian)
- Markidakis M., Roubelakis M.G., Vlahou A. Stem cells: insights into the secretome. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013; 1834(11): 2380-4.
- Karagyaur M.N., Makarevich P.I., Shevchenko E.K., et al. Modern approach to peripheral nerve regeneration after injury: the prospects of gene and cell therapy. *Genes & Cells*. 2017; 12(1): 6-14. DOI: 10.23868/201703001 (In Russian)
- Madaro L., Bouche M. From Innate to Adaptive Immune Response in Muscular Dystrophies and Skeletal Muscle Regeneration: The Role of Lymphocytes. *Bio Med Res. Int*. 2014; 2014:438675. DOI: 10.1155/2014/438675
- Duraes F., Lafont A., Beibel M., et al. Immune cell landscaping reveals a protective role for regulatory T cells during kidney injury and fibrosis. *JCI Insight*. 2020; 5(3): e130651. DOI: 10.1172/jci.insight.130651
- Aurora A.B., Olson E.N. Immune Modulation of Stem Cells and Regeneration. *Cell Stem Cell*. 2014; 15: 13-25. DOI: 10.1016/j.stem.2014.06.009
- D'Alessio F.R., Kurzhagen J.T., Rabb H. Reparative T lymphocytes in organ injury. *The Journal of Clinical Investigation*. 2019; 129(7): 2608-18. <https://doi.org/10.1172/jci124614>
- Huang W.C., Yang C.C., Chen I.H., et al. Treatment of glucocorticoids inhibited early immune responses and impaired cardiac repair in adult zebrafish. *PLoS One*. 2013; 8(6): e66613.
- Serhan C.N., Brain S.D., Buckley Ch.D., et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J*. 2007; 21(2): 325-32.
- Babaeva A.G. *Regeneration and cell division. [Immunologicheskie reaktsii v protsessakh normalnogo i vosstanovitel'nogo rosta. V sb. Regeneratsiya i kletochnoe delenie]*. Moscow, Meditsina, 1968; 11-6. (In Russian)
- Babaeva A.G. Regeneration and immunogenesis system. *[Regeneratsiya i sistema immunogeneza]*. Moscow, Meditsina, 1985. (In Russian)
- Babaeva A.G., Zotikov E.A. *Immunology of the processes of adaptive growth, proliferation and their disorders. [Immunologiya protsessov adaptivnogo rosta, proliferatsii i ikh narusheniy]*. Moscow, Nauka, 1987. (In Russian)
- Doncov V.I. Application of the hypercycle theory to analyze the processes of intercellular regulation of tissue proliferation: evidence of the existence of a specialized cellular system for the regulation of tissue proliferation. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 1986; 101(1), 1-29. (In Russian)
- Babaeva A.G., Blyaher M.S., Fedorova I.M., et al. Dynamics of changes in the number of different subpopulations of lymphocytes in the spleen and mitotic activity of the epithelium of the kidney in unilaterally nephrectomized mice. *Aktualnye voprosy obshchey i chastnoy patologii*. 2000; 176-8. (In Russian)
- Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Zotikov E.A. *The role of lymphocytes in the rapid change in the program of tissue development. [Rol lim-*

fotsitov v operativnom izmenenii programmy razvitiya tkaney]. Moscow, Izd-vo RAMN, 2009. (In Russian)

- Andrzejewska A., Dabrowska S., Nowak B., et al. Mesenchymal stem cells injected into carotid artery to target focal brain injury home to perivascular space. *Theranostics*. 2020; 10(15): 6615-28. doi: 10.7150/thno.43169
- Efimenko A.Y., Sorokina A.G., Grigorieva O.A., et al. *Participation of non-coding regulatory RNA secreted by mesenchymal stromal cells in the processes of tissue regeneration and repair. Proceedings of the IV National Congress on Regenerative Medicine*. Moscow, November 20-23, 2019. *Genes & Cells, XIV (Appl)*. 2019, 90-1. *[Materialy IV Natsional'nogo Kongressa po Regenerativnoy Meditsine. Moscow, 20-23 noyabrya 2019 goda]*. *Geny & Kletki*. Tom XIV, Prilozhenie, 2019, 90-1. (In Russian)
- Manko V.M., Petrov R.V. Lymphocyte control of hematopoietic stem cell differentiation. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2006; 2(4): 63-75. (In Russian)
- Haitov R.M., Ryabova L.V. Dependence of differentiation of hematopoietic stem cells on the functional state of the thymus. *Ontogenez*. 1978; 9(4): 406-10. (In Russian)
- Di Rosa F. T-lymphocyte interaction with stromal, bone and hematopoietic cells in the bone marrow. *Immunology and Cell Biology*. 2009; 87: 20-9. DOI: 10.1038/icb.2009.84
- Tishevskaya N.V. *Cultivation of erythroblastic islets in the bone marrow. [Kultivirovanie eritroblasticheskikh ostrovkov kostnogo mozga]*. Chelyabinsk, 2016. (In Russian)
- Grassi F., Cattini L., Gambari L., et al. T cell subsets differently regulate osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells *in vitro*. *J. Tissue Eng. Regen. Med*. 2013; 10(4): 305-14. DOI: 10.1002/term.1727
- Rifas L., Arackal S., Weitzmann M.N. Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2003; 88 (4): 650-9. DOI: 10.1002/jcb.10436 650-659
- Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V. Pathogenesis as a problem of functional incompetence and imbalance in the population of T-lymphocytes. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2021; 65(2): 109-19. (In Russian) DOI: 10.25557/0031-2991.2021.02
- Dombrowski Y., O'Hagan Th., Dittmer M., et al. Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. *Nat. Neurosci*. 2017; 20(5): 674-80. DOI: 10.1038/nn.4528
- Liu J., Tian S., Zhang L., et al. T cells promote the regeneration of neural precursor cells in the hippocampus of Alzheimer's disease mice. *Neural Regeneration Research*. 2014; 9(16): 1541-47. DOI: 10.4103/1673-5374.139481
- Burzyn D., Kuswanto W., Kolodin D., et al. A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell*. 2013; 155(6): 1282-95. DOI: 10.1016/j.cell.2013.10.054
- Meng H., Zhao H., Cao X. et al. Double-negative T cells remarkably promote neuroinflammation after ischemic stroke. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A*. 2019; 116(12): 5558-63. DOI: 10.1073/pnas.1814394116
- Ali N., Zirak B., Rodriguez R.S., et al. Regulatory T cells in skin facilitate epithelial stem cell differentiation. *Cell*. 2017; 169(6): 1119-29. e11. DOI: 10.1016/j.cell.2017.05.002
- Singer B.D., King L.S., D'Alessio F.R. Regulatory T cells as immunotherapy. *Front Immunol*. 2014; 5:46. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00046
- Poletaev A.B. *Immunophysiology and immunopathology. [Immunofiziologiya i immunopatologiya]*. Moscow, 2008. (In Russian)

32. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., et al. Erythropoiesis-stimulating properties of total RNA from peripheral blood lymphocytes during erythremia. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya*. 2015; 1(13): 33-7. (In Russian)
33. Gol-Ara M., Jadidi-Niaragh F., Sadria R., et al. The role of different subsets of regulatory T cells in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis*. 2012; 2012:805875.
34. Jeon Y.W., Lim J.-Y. et al. Enhancement of graft-versus-host disease control efficacy by adoptive transfer of type 1 regulatory T cells in bone marrow transplant model. *Stem Cells Dev*. 2019; 28(2): 129-40. DOI: 10.1089/scd.2018.0113
35. Weirather J., Hoffman U.D.W., Beyersdorf N., et al. Foxp3⁺CD4⁺ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circ. Res*. 2014; 115(1): 55-67. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.303895
36. Lee J., Minden M.D., Chen W.C., et al. Allogenic human double negative T cells as a novel immunotherapy for acute myeloid leukemia and its underlying mechanisms. *Clin. Cancer Res*. 2018; 24(2): 370-82. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2228
37. Arpaia N., Green J.A., Moltedo B., et al. (2015) A distinct function of regulatory T cells in tissue protection. *Cell*. 2015; 162(5): 1078-89. DOI: 10.1016/j.cell.2015.08.021
38. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., et al. Regression of experimental benign prostatic hyperplasia under the influence of RNA from lymphocytes and organs. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya*. 2018; 1(25): 61-6. (In Russian)
39. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., et al. On the hematopoietic properties of ribonucleic acid of peripheral blood lymphocytes in patients with true polycythemia and healthy donors. *Oncogematologiya*. 2015; 10(2): 58-62. (In Russian)
40. Babaeva A.G., Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M. *On the morphogenetic properties of RNA in lymphoid and stem cells during regenerative processes. [O morfogeneticheskikh svoystvakh RNK limfoidnykh i stvolovykh kletok pri vosstanovitel'nykh protsessakh]*. Moscow, 2016. (In Russian)
41. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V. *Essays on features of study effects of RNA and RNA-therapy. [Essays on the peculiarities of studying the effects of RNA therapy]*. Moscow, 2019. (In Russian)
42. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Komarova I.A. The effect of rat spleen lymphoid cell total RNA preparations on *in vitro* erythropoiesis. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya*. 2014; 4(12): 35-9. (In Russian)
43. Belous A.M., Godin V.P., Pankov E.Ya. *Exogenous nucleic acids and recovery processes. [Ehkzogennye nukleinovye kisloty i vosstanovitelnye protsessy]*. Moscow: Meditsina, 1974. (In Russian)
44. Smirnov A.V. Specific effects and possible mechanisms of action of exogenous RNA. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 1988; 105 Vyp. 1(4): 20-36. (In Russian)
45. Zakharov Yu.M., Tishevskaya N.V. *Erythroblastic islet culture is a new tool for studying erythropoiesis*.
46. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2003; 1: 65-8. (In Russian)
47. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. Features of Suppressor Action of Total Ribonucleic Acid from Lymphocytes Isolated from the Spleen of Rats in the Beginning of Braking Erythropoiesis. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2015; 6: 61-4. (In Russian)
48. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M. Comparative analysis of hematopoietic activity of bone marrow and splenocyte total RNA in chronic benzene anemia in rats. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2019; 63(2): 56-64. (In Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2019.02.56-64
49. Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G. The role of lymphoid and stem cell total RNAs in correction of blood glucose levels in experimental diabetes mellitus. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2019; 63(3): 88-95. (In Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2019.3.88-95
50. Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Bolotov A.A. Effect of preliminary introduction of bone marrow cell total RNA on the dynamics of erythropoiesis restoration in rats after acute gamma-irradiation. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2016; 161(5): 670-3. (In Russian)
51. Tishevskaya N.V., Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Zakharov Y.M. Correction of post-radiation disorders of erythropoiesis with the total RNA of bone marrow and thymus cells. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*. 2017; 57(4): 384-90. DOI:10.7868/S086980311704004X (In Russian)
52. Ishii T., Zhao Y., Shi J., Sozer S., Hoffman R., Xu M. T cells from patients with polycythemia vera elaborate growth factors which contribute to endogenous erythroid and megakaryocyte colony formation. *Leukemia*. 2007; 21(12): 2433-41. DOI: 10.1038/sj.leu.2404899
53. Gonikova Z.Z., Nikolskaya A.O., Kirsanova L.A., et al. The comparative analysis of the effectiveness of stimulation of liver regeneration by bone marrow cells and total RNA of these cells. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2019; 21(1): 113-21. (In Russian). DOI: 10.15825/1995-1191-2019-1-113-121
54. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Pozina A.A. Lyophilized form of xenogeneic total RNA stimulates hematopoiesis in post-radiation myelosuppression. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2021; 65(4): 42-6. (In Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.42-46
55. Tishevskaya N.V., Golovneva E.S., Gallyamutdinov R.V. et al. Xenogeneic lymphocytic RNA stimulates skeletal muscle regeneration. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2021; 21(3): 134-41. (In Russian). DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-134-141
56. Haitov R.M. Repopulation of bone marrow cells in recipients of different strains of mice during joint transplantation from three genetically different donors. *Radiobiologiya*. 1971; 11(5): 767-71. (In Russian)
57. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M. An alternative way to "reprogram" lymphocytes. Proceedings of the V National Congress on Regenerative Medicine. Moscow, November 20-23. Genes & Cells. 2022; 17(3). (In Russian)
58. Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Babaeva A.G. On the phenomenon of hypersensitivity of rats that previously underwent alloxan diabetes to the diabetogenic effect of total RNA. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2020; 64(2): 85-8. (In Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.85-88
59. Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M. Comparative Analysis of the Effectiveness of Various Routes of Administration of Total RNA. *Rossiyskiy fiziologicheskij zhurnal im. Sechenova*. 2020; 106(8): 1016-24. (In Russian). DOI:10.31857/S0869813920080099
60. Korneva E.A. Pathways of neuro-immune communication: past and present time, clinical application. *Meditsinskaya immunologiya*. 2020; 22(3): 405-18. DOI: 10.15789/1563-0625-PON-1974 (In Russian)
61. Valadi H., Ekström K., Bossios A., et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and micro RNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell. Biol*. 2007; 9(6): 654-9.

62. Nikolin V.P., Popova N.A. Biological effects of exogenous RNA. *Pisma v Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii*. 2022; 8(2): 206-13. (In Russian). DOI: 10.18699/LettersVJ-2022-8-09
63. Herrera F., Adamson R.H., Gallo R.C. Uptake of transfer ribonucleic acid by normal and leukemic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1970; 67(4): 1943-50.
64. Wang S.R., Giacomoni D., Dray S. Physical and chemical characterization of RNA incorporated by rabbit spleen cells. *Exp. Cell Res.* 1973; 78(1): 15-24.
65. Blinov M.N., Lukanova I.S., Vladimirova A.D. Incorporation of exogenous RNA into human leukocytes. *Problemy gematologii i perelivaniya krovi*. 1981; 26(1): 38-40. (In Russian)
66. Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Komarova I.A. The effect of rat spleen lymphoid cell total RNA preparations on in vitro erythropoiesis. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya*. 2014; 4(12): 40-3. (In Russian)
67. Niu M.C. Thymus ribonucleic acid and embryonic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1958; 44(12): 1264-74.
68. Niu M.C., Cordova S.S., Niu L.C. Ribonucleic acid-induced changes in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1961; 47(10): 1689-700.
69. Niu M.C., Cordova S.S., Niu L.C., Radbill C.L. RNA-induced biosynthesis of specific enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1962; 48(11): 1964-9.
70. Vivier E., Artis D., Colonna M., et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*. 2018; 174: 1054-66. doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017
71. Babaeva A.G., Belan E.I. Limfocitarno-makrofagalnaya regulyaciya reparativnogo ehritropoehza. *Vestnik AMN SSSR*. 1990; 9: 27-36. (In Russian)
72. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162(1): 156-9.

Сведения об авторе:

Геворкян Нина Михайловна, науч. сотр., лаб. биосинтеза белков ФГБНУ «НИИ биомедхимии им. В.Н. Ореховича» РАН, e-mail: gevorgiann@yandex.ru

© Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б., 2023

УДК 616-092

Пальцын А.А.^{1,2}, Свиридкина Н.Б.¹

Сила кисти

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, 2/1, стр. 1

Человека создал труд. Он осуществляется определением мозгом ментально задачи, а затем её материальным, физическим выполнением преимущественно руками, кистями рук. Мысль материальна, она создается в результате физико-химических процессов в клетках мозга. Её материализация на бытовом уровне чаще всего выражается перевоплощением молекулярных процессов в клетках мозга в движения кистей рук. Поэтому динамические характеристики кистей рук – важный показатель когнитивного и двигательного здоровья человека.

Ключевые слова: мысль; кисть руки; движение; сила кисти; ментальный образ движения

Для цитирования: Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б. Сила кисти. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(3): 137–141.

DOI: 10 25557/0031-2991.2023.03.137-141

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Пальцын А.А.; сбор и обработка материала – Свиридкина Н.Б., Пальцын А.А.;
написание текста Пальцын А.А.; редактирование – Свиридкина Н.Б. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

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 15.03.2023

Принята к печати 12.07.2023

Опубликована 20.09.2023

Paltsyn A.A.^{1,2}, Sviridkina N.B.¹

Hand power

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

Labor created man. Labor is produced by determining a task mentally by the brain followed by accomplishing the task physically, mostly with the hands and wrists. The thought is material; it is created by physico-chemical processes in brain cells. At the everyday level, materialization of thoughts most often occurs by the transformation of molecular processes in the brain into movements of the hands. Therefore, dynamic characteristics of the hands are an important indicator of the cognitive and motor human health.

Keywords: thought; hand; movement; hand strength; mental image of movement

For citation: Paltsyn A.A., Sviridkina N.B. Hand power. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2023; 67(3): 137–141. (in Russian)

DOI: 10 25557/0031-2991.2023.03.137-141

Author's contribution: concept and design of the study – Paltsyn A.A.; collection and processing of material – Sviridkina N.B.; writing the text – Paltsyn A.A.; editing – Sviridkina N.B. Approval of the final version of the article – all authors.

For correspondence: Aleksandr A. Paltsyn, Doctor of Biol. sciences, prof., ch. scientific co-author, Scientific Research Institute of Physical Education and Production, prof. department general pathology and pathophysiology Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, e-mail: lrrp@mail.ru

Financing. The study had no sponsorship.

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

Received 15.03.2023

Accepted 12.07.2023

Published 20.09.2023

Человека создал труд. Близким предшественником современного человека разумного — *Homo sapiens* был человек умелый — *Homo habilis*. Первое название выражает интеллект, второе — тоже интеллект, но не абстрактный, а ориентированный на практику, способность не только придумать, но и сделать что-то в трудном для выживания времени. Осуществляется применение интеллекта — делание руками, точнее, поражающими своими возможностями кистями рук. Пример — пианисты. Сказанным мы хотим напомнить о месте кисти в жизни человека.

В 2022 г. международная группа авторов опубликовала отчет по результатам исследования в Британском биобанке, (в русле его программы по болезни Альцгеймера) силы кисти и её связи с заболеваемостью деменцией и смертностью от любых причин [1]. В анализ было включено 466 788 участников (средний возраст 56,5 лет, 54,5% женщины). Силу кисти — хвата оценивали с помощью гидравлического ручного динамометра. Срок наблюдения; 8,3–9,7 лет. За это время у 4087 участников развилась деменция, а 1309 умерли от нее. Сниженная сила хвата оказалась связанной с повышенным риском развития деменции и смертностью независимо от других сопутствующих факторов ($p < 0,001$). Лица, находящиеся в самом низком квинтиле (1/5 диапазона результатов) силы хвата, имели повышенный (на 72%) риск развития деменции и повышенный риск смертности (на 87%) от деменции по сравнению с лицами из самого высокого квинтиля.

На первый взгляд, столь тесная связь физических и когнитивных функций кажется неестественной — кисть не воспринимается сознанием в качестве необходимого для интеллектуального обеспечения жизни органа, — жить без неё, а тем более думать, трудно, но можно. А когнитивность сознание человека связывает не с руками, а с головой. На «первый взгляд» в обсуждаемом контексте точнее назвать поверхностным, недалеким, куцым и, конечно, ошибочным, учитывающим лишь первичное знание, а именно то, что движение *совершается* мышцами и игнорирующим факт не меньшей важности, что движение *управляется* сознанием, мозгом, который обеспечивает моторные достижения тела: игру пианиста, фокусы актера цирка и карточного шулера, возможность штангиста держать над головой штангу весом 200 кг. Соответственно этому динамометрия кистей рук может служить «мерой функционального благополучия мозга» для людей любого возраста [2]. Сегодня очевидно: различия в «силе хвата» между людьми зависят от индивидуального нервно-костно-мышечного статуса человека. Следовательно, изменение силы хвата в течение

жизни исследуемого человека обязательно свидетельствует, кроме собственно силы, и о соответственном изменении регулирующего силу (нервного) стимула. Таким образом, тесная и всеобъемлющая взаимосвязь между возрастным снижением силы хвата и проявлениями когнитивного снижения, дисфункции может быть понята в аспекте конвергентного функционального и структурного отражения когнитивных и двигательных процессов в человеческом мозге. Процессов, обеспечиваемых нейроиммуноэндокринной интеграцией регулирования движения [3].

Из Британского биобанка, известного масштабно-стью исследований, вышла статья [4] с результатами показавшими, что большая сила кисти связана с лучшими когнитивными функциями, большей удовлетворенностью жизнью, большим субъективным благополучием, снижением проявлений тревожности и депрессии. Эти связи были ярче выражены у женщин.

Наблюдали положительную связь силы кисти с объемом серого вещества в темпоральной коре и субкортикальных областях.

В лонгитюдном анализе исходная сила хвата была связана с когнитивными показателями в течение 9 лет наблюдения. При учете многих демографических, антропометрических и социально-экономических факторов большая сила кисти была положительно связана с лучшей когнитивной функцией, более полной удовлетворенностью жизнью, хорошим самочувствием, снижением и отсутствием симптомов депрессии и тревожности.

Из того же Британского биобанка, сообщают результаты анализа более 40 тыс. пациентов, соответствовавших условиям отбора, со сроком наблюдения 5,4 года, полученные F. Petermann-Rocha и соавт. [5]. Деменция развилась у 726 исследуемых. Она сочеталась со снижением силы кисти, веса тела, скорости ходьбы, быстрой утомляемостью. Слабые кисти повышают риск развития любых других дефектов движения.

Авторы заключают, что ранние вмешательства в виде упражнений для кистей — способ отодвинуть в поздний возраст развитие деменции, малоподвижности, телесной слабости, падений, госпитализации, смертности от всех причин. Полученные с помощью МРТ показатели объема серого вещества головного мозга служат индикаторами лежащих в основе нейроструктурных изменений.

Это исследование показало, что у пожилых исследуемых асимметрия силы двух кистей (Handgrip strength HGS) была связана с замедлением скорости ходьбы и ухудшением баланса в положении стоя. Авторы рекомендуют использовать в клинических и трансляцион-

ных исследованиях асимметрию силы кистей как еще один показатель нарушения функции регулирования движений верхних и нижних конечностей. Широко используемый в повседневной практике тест на силу хвата HGS представляет собой недорогой, количественный, простой в использовании, выразительный по значению и портативный тест для оценки общей мышечной функции, универсальный показатель силы.

Демонстрация того, что сила кисти имеет прогностическое значение в отношении ряда состояний здоровья, порой даже спустя десятилетия, мотивировала заявления о том, что динамометрия кистей может служить «индексом современного и будущего здоровья» для людей среднего и старшего возраста. Центральным в этом убеждении было предположение, что сила хвата является простой мерой физической работоспособности, которая служит маркером состояния мышц и угрозы саркопении, в частности. Авторы считают, что связь силы кисти с когнитивной функцией есть проявление «конвергентного функционального и структурного опосредования когнитивных и двигательных процессов человеческим мозгом»

Прагматичный биомаркер преclinical деменции нужен для масштабного и легкого скрининга риска в популяциях. Такие физические параметры, как сила кисти и скорость походки умозрительно адекватные биомаркеры, но как они соотносятся с маркерами нейродегенерации и болезни Альцгеймера неизвестно.

Этот вопрос исследовали Mini E. Jacob и соавт. [6]. В анализе продолжительностью 5 лет участвовали 2336 человек со средним возрастом 61 год. Измеряли силу кисти, скорость быстрой походки, скорость вставания со стула, концентрацию тау-белка. Определили, что неблагоприятные изменения этих показателей выявляются у пожилых людей без деменции, но могут и должны быть использованы как свидетельства риска развития деменции и болезни Альцгеймера. В частности Jacob с сотрудниками представили результаты исследования проведенного среди обитателей пансионата в городе Фремингеме (штат Массачусетс) и заключили, что нагрузки на кисти и ходьба способствуют если не полной профилактике, то, как минимум, задержке развития болезни Альцгеймера.

Японские врачи выясняли прогностическую «дальнорочность» определений силы кисти и скорости ходьбы [7]. Среди обитателей пансионатов снижения величин этих критериев проявлялись за 10 лет до когнитивного снижения.

В следующем году появилась американская публикация, сообщившая о синхронном развитии двигательной и когнитивной недостаточности [8].

Асимметрия силы кисти связана со снижением скорости походки. Оба критерия указывают на мышечную дисфункцию, риск падений, неблагоприятные для здоровья последствия. Неопределенны количественные соотношения асимметрии силы кисти с другими нарушениями движения. Авторы сообщают лишь общеизвестное – что при асимметрии > 30% движения медленнее, чем при асимметрии 10% [9].

Индивиды, семьи и общество находятся под постоянным эмоциональным, бытовым, психологическим и экономическим бременем когнитивных расстройств. Это определяет высокую приоритетность изучения механизмов старения. J. Luo и соавт. [10] исследовали 9268 обитательниц пансионатов США в возрасте 65 лет и старше, лечившихся по поводу остеопоротических переломов и наблюдаемых потом в течение 20 лет. В течение этого времени модифицированные мини-ментальные исследования производились до 6 раз. По ходу каждого такого исследования шестикратно определяли скорость ходьбы и силу кисти. Полученные результаты подтвердили, что скрининг на медленную скорость походки или слабую силу хвата может быть полезен для выявления пожилых людей с риском снижения когнитивных функций, когда они еще когнитивно нормальны или имеют лишь легкие нарушения. Программы упражнений для увеличения скорости ходьбы и мышечной силы могут отсрочить или предотвратить развитие когнитивных нарушений у пожилых людей. Мини-ментальное исследование заключалось констатацией состояния: норма, умеренная или тяжелая недостаточность.

Результаты работы [11] убедили исследователей, что медленная ходьба и слабая кисть первичные, достаточно убедительные показатели развивающегося или грядущего когнитивного снижения. Организация и соблюдение разумной программы упражнений позволяют повысить скорость ходьбы, силу мышц рук и ног, отсрочить и, нередко, предотвратить развитие старческого маразма.

Следует иметь в виду, что по ряду наблюдений поза человека при измерении силы кисти заметно влияет на результат. Zheng-Yang Xu и соавт. [11] сообщили результаты по данным 764 испытуемых (409 мужчин) и измерении в 4 позах: 1 – стоя с распрямленным локтем, 2- стоя с поднятой рукой, 3- сидя, с локтем согнутым до 90 градусов, 4- сидя с распрямленным локтем. У мужчин и женщин максимальная и существенно большая, чем в других вариантах, сила проявлялась в первой позе. Результаты мужчин, и правых рук, конечно, были выше.

Главная или, по крайней мере, одна из главных целей жизни большинства старых людей: сохранить здоровье. В контексте нашей темы это можно переформулировать как понимание необходимости всемерного противодействия ослаблению кисти и замедлению походки [12].

Способность поддержать функцию движения, адекватную условиям среды – важная составляющая благополучной старости. Однако в США, например, треть (31.7%) населения в возрасте 65 лет и старше сообщает о трудности для них пройти 3 квартала [12]. Эти исследователи считают, что в обсуждаемой ситуации поиск и разработка приемов нейтрализации риск-факторов, менее эффективны, чем стимуляция защитных реакций организма. В нашем контексте – работы кистями и ходьбы.

Население Земли увеличивается и стареет – в нем возрастает количество старых людей. Это превратилось в глобальную социальную и медицинскую проблему. По мере старения населения определение факторов, способствующих поддержанию силы и подвижности адекватно условиям жизни в пожилом возрасте, имеет решающее значение. Снижение этих функциональных возможностей связано с повышенным риском инвалидности, заболеваемости, госпитализации и смертности. Не менее важно, что способность сохранять физическую активность на достаточном уровне – неперенный компонент благополучной, здоровой старости. Способом достижения высокой цели может стать разумная амбициозность, сознательно и ответственно принятой для себя исполнителем задачи. Высокая и убедительная, основанная на фактах, самооценка и жизненная важность цели могут мобилизовать на энергичные усилия с благоприятным результатом в её достижении пожилых и даже старых людей [13]. Связь убеждение – движение действует в обоих направлениях. Воображение и наблюдение моторных действий приводят к активации тех же областей мозга (нейронных цепей) что и их физические осуществляемые мышцами аналогичные. Воображением можно вызвать двигательную реабилитацию. Наблюдение, воображение и физическое исполнение одного и того же движения (или моторного действия) вызывают очень похожие церебральные активации. Есть четкие доказательства, что наблюдение, воображение, выполнение моторного действия могут вызывать сходные паттерны церебральной активности [14]. Убежденность в важности двунаправленной связи мысль – действие может обеспечить мышечный двигательный эффект представлению движению, созданному мозгом.

В сингапурском (с участием Австралии) исследовании выполнен кросс-секционный анализ действия асимметрии (авторы используют слово – «латеральности – laterality») хвата, а также силы хвата и тела на когнитивную функцию и мобильность [15]. Триста тридцать обитателей пансионата (55.2% женщин) в возрасте ≥ 55 лет участвовали в исследовании. Низкой силой кисти считали < 28 кг для мужчин и < 18 кг для женщин. Различие между руками в 10% считали показателем асимметрии. Снижение когнитивной функции и мобильности, немедленной и отсроченной памяти было связано со снижением силы, но не асимметрией хвата. Асимметрия наиболее заметно проявлялась замедлением «вставания с кресла». Тест, отражающий по набору движений мобильность, силу и баланс, осуществлялся подъемом с кресла, проходом 3 метров, поворотом, возвратом в кресло.

Снижение работоспособности может не только определяться, но и прогнозироваться биохимическим анализом [16] выявляющем критерии переутомления и перспективу стойкого снижения работоспособности даже молодого и в высшей степени тренированного человека, спортсмена, лыжника сверхвысокой квалификации – члена сборной команды России.

Объединенный итог многих анализов связи между силой хвата и когнитивной функцией у пожилых людей, осуществленный большим (26 авторов) международным коллективом исследователей [17] определил коэффициент корреляции равный 0,55, т.е. умеренную положительную связь изменений когнитивной функции с изменениями силы хвата.

Воображение эффективно при использовании в сочетании с традиционной лечебной физкультурой для функциональной реабилитации как верхних, так и нижних конечностей, а также для восстановления повседневной деятельности и навыков. Из-за неоднородности исследований в отношении протокола вмешательства, конкретной техники визуализации, времени, затрачиваемого на практику, характеристик пациентов и т.д., необходимы дополнительные исследования для определения оптимального протокола лечения для конкретного пациента.

Основываясь на множестве литературных свидетельств, частично представленных в нашем обзоре, можно с существенной для современного уровня знаний вероятностью заключить, что сила кисти отражает общую силу тела. Применение силы хвата для оценки когнитивных функций представляется сравнительно с другими физическими приемами более простым технически и информационно убедительным способом контроля. Сегодня можно констатировать, что даже

у пожилых (но без деменции) людей сила кисти, и динамика её изменений в большинстве случаев адекватно отражает состояние и изменения когнитивного статуса исследуемого — способность восприятия новой вербальной информации, беглость речи. Конечно, анализ когнитивного статуса измерением силы кисти неполный. И может использоваться только как предварительный, черновой. Нет оснований возводить кистевой динамометр в ранг разумно обоснованного и вполне достаточного выразителя такого сложного явления как ментальность. Когнитивная функция состоит из сочетания множества взаимосвязанных психических процессов, поэтому для её серьёзного анализа требуются более совершенные, более органичные и, по-видимому, разнообразные инструменты оценки.

Литература (п.п. 1; 2; 4-13; 15; 17 см. References)

3. Кветной И.М., Миронова Е.С. Нейроиммуноэндокринология: интеграция знаний о сигнальных механизмах регуляции гомеостаза. *Патогенез*. 2022; 20(3): 94-5.
14. Столбков Ю.К. Герасименко Ю.П. Когнитивная двигательная реабилитация: воображение и наблюдение моторных действий. *Физиология человека*. 2021; 47(1): 123-32.
16. Дикунец М.А., Дудко Г.А., Вирюс Э.Д., Крючков А.С. Применение расширенного биохимического профиля спортсмена сверхвысокой квалификации для прогнозирования стойкого снижения работоспособности. *Патол. физиол. и эксперим. тер.* 2022; 66(4): 86-93.

References

1. Irene Esteban Cornejo, Frederic K. Ho, Fann Petermann Rocha, Donald M. Lyall, David Martinez Gomez, Verónica Cabanas Sánchez, et al. Handgrip strength and all cause dementia incidence and mortality: findings from the UK Biobank prospective cohort study. *Jcachexia Sarcopenia Muscle*. 2022; 13(3): 1514-25.
2. Richard G Carson. Get a grip: individual variations in grip strength are a marker of brain health. *Neurobiol Eating*. 2018; 71: 189-222.
3. Kvetnoy I.M., Mironova E.S. Neuroimmunoendocrinology: integration of knowledge about signaling mechanisms of homeostasis regulation. *Patogenez*. 2022; 20(3): 94-5. (In Russian)
4. Rongtao Jiang, Margaret L. Westwater, Stephanie Noble, Matthew Rosenblatt, Wei Dai, Shile Qi, et al. Associations between grip strength, brain structure, and mental health in 40 000 participants from the UK Biobank. *BMC Med*. 2022; 20: 286.
5. Peterman-Rocha F., Lyall D.M., Gray S.R., Esteban-Cornejo I., Quinn T.J., Ho F.K., et al. Associations between physical frailty and

- dementia incidence: a prospective study from UK Biobank. *Lancet Health Langed*. 2020; 1(2): E58-E68.
6. Mini E. Jacob A. O'Donnell J. Samra M.M. Gonzales C. Satizabal M.P. Pasetal. Grip Strength, Gait Speed and Plasma Markers of Neurodegeneration in Asymptomatic Middle-aged and Older Adults. *The Journal of Frailty & Aging*. 2022; v. 11: 291-8.
7. Ming-Yueh Chou, Yukiko Nishita, Takeshi Nakagawa, Chikako Tange, Makiko Tomida, Hiroshi Shimokata, et al. Role of gait speed and grip strength in predicting 10-year cognitive decline among community-dwelling older people. *BMC Geriatric*. 2019; Jul 5; 19(1): 186.
8. Ryan McGrath, Brenda M Vincent, Kyle J Hackney, Soham Al Snihi, James Graham, Laura Thomas, et al. Weakness and cognitive impairment are independently and jointly associated with functional decline in aging. *Americans Aging Clin Exp Res*. 2020; 32(9): 1723-30.
9. Pedro Pugliesi Abdalla, Lucimere Boh, Emerson Sebastião, André Pereira Dos Santos, Marcio Fernando Tasinafo Junior, Leonardo Santos Lopesda Silva, et al. Handgrip strength asymmetry cut points to identify slow gait speed in six low- and middle-income countries: A cross-sectional analysis with 12,669 older adults. *Arch Gerontol Geriatr*. 2023; 106: 104869.
10. Joshua Luo, Le Sun, Jonas M Nduka, Fanged Wang, Michael Hendryx. Gait speed, handgrip strength, and cognitive impairment among older women – A multistate analysis. *Exp Gerontol*. 2022; 169: 111947.
11. Zheng-Yang Xu, Deng-Fa Gao, Ke Xu, Zi-Qi Zhou, Ying-Kun Guo. The Effect of Posture on Maximum Grip Strength Measurements. *J Clin Densitom*. 2021; 24(4): 638-44.
12. Eric S. Kim, Ichiro Kawachi, Ying Chen, Laura D. Kubzansky. Association Between Purpose in Life and Objective Measures of Physical Function in Older Adults. *JAMA Psychiatry*. 2017; 74(10): 1039-45.
13. Dorota Weziak-Bialowolska, Piotr Bialowolski. Can adherence to moral standards and ethical behaviors help maintain a sense of purpose in life? Evidence from a longitudinal study of middle-aged and older adults. *Plows One*. 2022; 17(8): e0273221.
14. Stolbkov Yu. K. Gerasimenko Yu. P. Cognitive motor rehabilitation: imagination and observation of motor actions. *Fiziologiya cheloveka*. 2021; 47(1): 123-32.
15. Keung Kenneth Chen, Shumen Yee Lee, Benedict Wei Jun Pang, Lay Khoon Lau, et al. Associations of low handgrip strength and hand laterality with cognitive function and functional mobility – the Yishun Study. *BMC Geriatr*. 2022; 22: 677.
16. Dikunets M.A., Dudko G.A., Viryus E.D., Kryuchkov A.S. Application of an extended biochemical profile of an athlete of ultra-high qualification to predict a persistent decrease in performance. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya*. 2022; 66(4): 86-93.
17. Zammit A., Piccinin A., Duggan E., Koval A., Clouston S., Robitaille A. et al. A Coordinated Multi-study Analysis of the Longitudinal Association Between Handgrip Strength and Cognitive Function in Older Adults. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*. 2021; 76(2): 229-41. DOI: 10.1093/geronb/gbz072

Сведения об авторах:

Пальцын Александр Александрович, доктор биол. наук, проф., лауреат Государственной премии СССР, гл. науч. сотр., ФГБНУ НИИОПП, проф. каф. общей патологии и патофизиологии РМАНПО;
Свиридкина Надежда Борисовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП.

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-01/09:616-02

**Громенко И.Д.¹, Галимова Э.Ф.¹, Громенко Р.И.¹, Галимов Ш.Н.¹,
Громенко Д.Д.¹, Галимов К.Ш.², Литвицкий П.Ф.²****Фрагментация ДНК сперматозоидов: связь с мужским бесплодием и методы коррекции**¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 450008, Уфа, Россия, ул. Ленина, д. 3;²ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет),

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

В 2021 г. оценка масштаба фрагментации ДНК сперматозоидов вошла в руководство Всемирной Организации Здравоохранения в качестве метода диагностики мужского бесплодия. Невозможность естественного зачатия, аномальное развитие эмбрионов, рост частоты выкидышей, уменьшение частоты живорождения, снижение эффективности экстракорпорального оплодотворения, интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов и внутриматочной инсеминации – все это связывают с высоким уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов. К основным причинам, нарушающим целостность генетического материала гамет, относят ошибки при конденсации хроматина, незавершенный апоптоз и окислительный стресс. Среди методов преодоления бесплодия, связанного с высоким уровнем ДНК-фрагментации, выделяют: устранение модифицируемых факторов риска (курение, варикоцеле, ожирение), антиоксидантную терапию, короткий срок абстиненции, применение донорских ооцитов в программах ВРТ, а также методы селекции клеток в программах ИКСИ (ICSI – Intracytoplasmic sperm injection) и применение тестикулярных сперматозоидов, полученных при биопсии яичка.

Ключевые слова: мужское бесплодие; фрагментация ДНК сперматозоидов; невынашивание беременности**Для цитирования:** Громенко И.Д., Галимова Э.Ф., Громенко Р.И., Галимов Ш.Н., Громенко Д.Д., Галимов К.Ш., Литвицкий П.Ф. Фрагментация ДНК сперматозоидов: связь с бесплодием и методы коррекции (обзор литературы). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(3): 142–148. DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.142-148**Участие авторов:** концепция и дизайн работы – Галимова Э.Ф.; сбор данных – Громенко Д.Д., Громенко Р.И.; анализ и интерпретация данных – Галимов К.Ш.; написание статьи – Громенко И.Д., Галимова Э.Ф.; редактирование статьи – Галимов Ш.Н., Литвицкий П.Ф. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.**Для корреспонденции:** Галимова Эльмира Фанисовна, e-mail: efgalimova@mail.ru**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-25-00140.**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.07.2023

Принята к печати 12.07.2023

Опубликована 20.09.2023

Gromenko I.D.¹, Galimova E.F.¹, Gromenko R.I.¹, Galimov Sh.N.¹, Gromenko D.D.¹, Galimov K.Sh.², Litvitskiy P.F.²**Sperm DNA fragmentation: association with infertility and methods of correction**¹Bashkir State Medical University, Lenina St. 3, Ufa, 450008, Russian Federation;²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Trubetskaya St., Bldg. 2, Moscow, 119991, Russian Federation

In 2021, the assessment of sperm DNA fragmentation level was included in the World Health Organization guidelines as a diagnostic method for male infertility. The inability to conceive naturally, abnormal embryo development, increased miscarriage rates, decreased live birth rates, and decreased effectiveness of in vitro fertilization, intracytoplasmic sperm injection, and intrauterine insemination are all associated with high levels of sperm DNA fragmentation. The major causes that compromise the integrity of the genetic material of gametes include errors in chromatin condensation, incomplete apoptosis, and oxidative stress. Among the methods to overcome infertility associated with high levels of DNA fragmentation are: elimination of modifiable risk factors (smoking, varicocele, obesity), antioxidant therapy, short withdrawal period, use of donor oocytes in ART programs, as well as cell selection methods in ICSI programs and use of testicular spermatozoa obtained by testicular biopsy.

Keywords: male infertility; sperm DNA fragmentation; pregnancy failure**For citation:** Gromenko I.D., Galimova E.F., Gromenko R.I., Galimov Sh.N., Gromenko D.D., Galimov K.Sh., Litvitskiy P.F. Sperm DNA fragmentation: association with infertility and methods of correction. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(3): 142–148. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2023.03.142-148

Author's contribution: the concept and design of the work – Galimova E.F.; data collection – Gromenko D.D., Gromenko R.I.; analysis and interpretation of data – Galimov K.Sh.; article writing – Gromenko I.D., Galimova E.F.; article editing – Galimov Sh.N., Litvitskiy P.F. 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; Bashkir State Medical University, e-mail: efgalimova@mail.ru

Information about the authors:

Gromenko I.D., <https://orcid.org/0000-0001-8582-660X>

Galimova E.F., <https://orcid.org/0000-0002-3351-7669>

Gromenko R.I., <https://orcid.org/0000-0002-5355-4184>

Galimov Sh.N., <https://orcid.org/0000-0002-5871-5151>

Gromenko D.D., <https://orcid.org/0000-0001-5638-1779>

Galimov K.Sh., <https://orcid.org/0000-0002-0148-4380>

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

Financing. This work was supported by the Russian Science Foundation under grant no. 23-25-00140.

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

Received 06.07.2023

Accepted 12.07.2023

Published 20.09.2023

Введение

Каждая шестая семейная пара репродуктивного возраста в развитых странах страдает бесплодием. Мужской фактор является основополагающим в 50% случаев. Стандартом диагностики мужского бесплодия является анализ эякулята (спермограмма). Данный анализ позволяет оценить морфокинетические параметры сперматозоидов, но не дает представления о функциональном потенциале спермы и не всегда способен отразить состояние фертильности мужчин объективно. В связи с этим существует потребность в поиске и применении других методов его выявления [1]. Одним из таких методов стала оценка фрагментации ДНК сперматозоидов (Sperm DNA Fragmentation – SDF), позволяющая выявить долю сперматозоидов с поврежденной ДНК. Целостность генетического материала гамет необходима для эффективного оплодотворения и нормального течения эмбриогенеза [2, 3]. Ежегодно растет число исследований, демонстрирующих связь бесплодия с уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов. Учитывая растущую доказательную базу, Всемирная Организация Здравоохранения в 2021 г. внесла тест по оценке ДНК-фрагментации в шестое руководство ВОЗ по обработке и исследованию эякулята [4].

Механизмы фрагментации ДНК сперматозоидов. Фрагментация ДНК представляет собой разделение нитей ДНК на части из-за одноцепочечных и двуцепочечных разрывов [5]. Большинство современных исследователей сходятся во мнении, что существует три основных механизма SDF: нарушение конденсации хроматина, незавершенный апоптоз и окислительный стресс [1, 2, 6].

Во время созревания гамет происходит плотная конденсация генетического материала, суть которой заключается в замене гистоновых белков на протамины во время сперматогенеза [7]. Описанный процесс поддерживается благодаря действию ферментов топоизомераз, которые обеспечивают временные разрывы цепей ДНК, чтобы уменьшить торсионное сопротивление из-за суперспирализации нуклеиновых кислот [8]. Различные причины могут приводить к нарушению восстановления целостности цепей ДНК и персистенции двуцепочечных ДНК-фрагментов в созревающей клетке [2].

Другим механизмом, ответственным за фрагментацию ДНК, является незавершенный апоптоз. Связь незавершенного апоптоза с фрагментацией ДНК сперматозоидов подтверждается наличием в клетках, помимо разрывов цепей ДНК, признаков апоптоза: повышенной активности каспаз, инактивирования поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP), экспрессии на поверхности мембран Fas-рецепторов и неполного протаминирования [5, 8].

Эффект окислительного стресса на целостность ДНК обусловлен прямым повреждающим действием активных форм кислорода (АФК) на цепи нуклеиновых кислот или стимуляцией апоптоза через активацию каспаз и эндонуклеаз, а также стимуляцию сигнального MAPK (mitogen-activated protein kinase) пути [1]. Следует упомянуть, что АФК играют важную роль в физиологических процессах, таких как капацитация, акросомальная реакция, гиперактивация и оплодотворение, однако если их концентрация превосходит возможности антиоксидантной системы спермы, окислительный стресс становится чрезмерным [9].

Сперматозоиды чаще всего претерпевают воздействие избытка АФК во время транзита через мужские половые пути, в то время как апоптоз и нарушение созревания гамет происходит в яичках.

В связи с тем, что сперматозоиды с фрагментированной ДНК не всегда утрачивают жизнеспособность, сохраняется вероятность переноса поврежденного генетического материала в яйцеклетку при оплодотворении, это может нарушить нормальное развитие эмбриона и привести к клиническим последствиям в виде привычного невынашивания и бесплодия [10].

Факторы риска фрагментации ДНК сперматозоидов. Согласно последнему мета-анализу A. Szabo и соавт., к наиболее значимым факторам риска увеличения фрагментации ДНК сперматозоидов можно отнести: наличие варикоцеле (средняя разница с группой здоровых мужчин составила 13,62%), нарушение толерантности к глюкозе (средняя разница 13,75%), опухоли яичек (средняя разница 11,3%), курение (средняя разница 9,19%), возраст старше 50 (средняя разница 12,58%) и уровень загрязнения окружающей среды (средняя разница 9,68%) [2]. Некоторые факторы риска продемонстрировали дозозависимый характер влияния на уровень SDF. К ним относятся курение, злоупотребление алкоголем и ожирение [11]. Применение некоторых лекарственных препаратов также может отразиться на повреждении ДНК сперматозоидов. Например, как высокие, так и низкие терапевтические дозы ципрофлоксацина повышают уровень ДНК-фрагментации [12].

Методы исследования фрагментации ДНК сперматозоидов. К общепризнанным методам лабораторного исследования, позволяющим оценить уровень фрагментации ДНК сперматозоидов, относят: TUNEL-тест (The terminal deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick end labeling assay), анализ SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), метод SCD (sperm chromatin dispersion test) и метод ДНК-комет. В основу вышеперечисленных методов заложены различные принципы детекции ДНК-фрагментов, однако существует высокая корреляция между получаемыми с их помощью результатами [4, 5, 13].

Несмотря на то, что число исследований фрагментации ДНК сперматозоидов ежегодно растет, сохраняются трудности с интерпретацией полученных результатов. Нет четких границ или предельно допустимых значений для уровня SDF, чтобы отличить фертильных мужчин от бесплодных. Согласно экспертному мнению различных авторов, на уровень верхней границы нормы влияет тип исследования. Большинство исследователей сходится во мнении, что доля сперма-

тозоидов с фрагментированной ДНК у фертильного мужчины должна составлять менее 15-20% [2, 8, 14]. Остаются неясными и показания для проведения исследования. Большинство экспертов недавнего глобального опроса рекомендовано оценивать уровень ДНК-фрагментации при необъяснимом бесплодии с нормальными показателями эякулята (51,5%), при идиопатическом мужском бесплодии после неудачной программы ВРТ (43,7%), при повторных выкидышах (40%), при наличии факторов риска, особенно курения (62,2%), а также у супружеских пар, вступающих в программу ВРТ и имеющих в анамнезе невынашивание (75,6%) [15].

Связь фрагментации ДНК сперматозоидов с бесплодием. Современными исследованиями все чаще демонстрируется связь между повышенным уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов и репродуктивными исходами. Степень повреждения ДНК у бесплодных мужчин значительно выше, чем у фертильных. При этом около 20% мужчин с идиопатическим бесплодием имеют повышенный уровень SDF [5]. В настоящее время многочисленные исследования показали, что при уровне фрагментации ДНК более 30% вероятность естественного зачатия стремится к нулю [13, 16]. Результаты внутриматочной инсеминации так же, как и успех естественного зачатия, сильно зависят от степени повреждения генетического материала. Эффективность процедуры значительно снижается, если уровень SDF превосходит 12% и полностью отсутствует при его значениях более 30%.

В одном из современных и самых крупных мета-анализов, в который вошли 78 исследований, установлено статистически значимое влияние степени повреждения ДНК на показатели эффективности ЭКО: уменьшение частоты имплантации яйцеклетки (ОШ=0.68; ДИ 0.52-0.89) и снижение числа наступивших беременностей (ОШ=0.72; ДИ 0.55-0.95) [17]. Также продемонстрирована незначительная, но тревожная тенденция к снижению эффективности программ ИКСИ: снижение частоты имплантаций (ОШ=0.79; ДИ 0.60-1.04), наступления беременности (ОШ=0.89; ДИ 0.78-1.02) и живорождения (ОШ=0.92; ДИ 0.67-1.27).

Ряд исследований связывает повышенный уровень фрагментации ДНК сперматозоидов с развитием повторных выкидышей у семейных пар. Repalle D. et al. обнаружили двукратный рост частоты выкидышей в группе пациентов с высоким уровнем ДНК-фрагментации в программах ИКСИ [18]. В другой работе была продемонстрирована положительная корреляция привычного невынашивания с уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов [19].

Лечение бесплодия, связанного с фрагментацией ДНК сперматозоидов. Оптимальной стартовой терапией мужского бесплодия является устранение модифицируемых факторов риска. К таким факторам можно отнести курение, высокий уровень загрязнения воздуха, воздействие ионизирующей радиации, бактериальные инфекции и инфекции, передающиеся половым путем [1, 2, 8]. Несмотря на отсутствие масштабных исследований по теме положительного влияния устранения факторов риска на долю фрагментации ДНК сперматозоидов, данные рекомендации остаются общепризнанными.

Одним из путей снижения уровня ДНК-фрагментации путем устранения факторов риска с наличием обширной доказательной базой является проведение операции варикоцелеэктомии у пациентов с пальпаторно определяемым варикоцеле [16, 20]. Операция снижает уровень активных форм кислорода, воздействующих на сперму, тем самым уменьшает повреждение ДНК и способствует восстановлению фертильности [21]. Данное утверждение подтверждается рядом крупных исследований. Р. Birowo и соавт. обнаружили значимое уменьшение SDF у пациентов, перенесших операцию варикоцелеэктомии [22]. Два крупных мета-анализа, проведенных в 2021 г., показали сходные результаты [23, 24]. Многими исследователями предлагается использовать масштаб фрагментации ДНК сперматозоидов в качестве показателя для проведения операции и как средство оценки полученных результатов [1, 6, 13].

В связи с тем, что окислительный стресс является одной из основных причин повреждения ДНК сперматозоида, возникла гипотеза, по которой применение антиоксидантов способно снизить уровень SDF. Несмотря на логичность этого предположения, данные исследований остаются противоречивыми. Так, например, в рандомизированном мультицентровом исследовании FAZST (Folic Acid and Zinc Supplementation Trial), в котором оценивалось влияние антиоксидантов на мужскую фертильность, было обнаружено значимое уменьшение уровня фрагментации ДНК (средняя разница 2,4%, 95% ДИ 0,5% до 4,4%), в то время как в другом двойном слепом рандомизированном исследовании MOXI (Males, Antioxidants and Infertility) не было продемонстрировано хоть сколь-либо значимых изменений SDF или параметров эякулята [25, 26]. Тем не менее, антиоксиданты применяются в современной терапии бесплодия, связанного с фрагментацией ДНК сперматозоидов, хотя доказательность данных назначений остается низкой [8].

Еще одним способом улучшения качества эякулята может стать сокращение длительности половой

абстиненции. Согласно рекомендациям Всемирной Организации Здравоохранения, анализ эякулята берут после 2 и до 7 дней воздержания. Данные ограничения созданы для стандартизации анализов и не имеют большого клинического значения [1]. В мета-анализе Р. Sokol и соавт. [27] выявлена корреляция между длительностью периода воздержания и уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов. F. Barbagallo и соавт. [28] продемонстрировали, что короткий срок воздержания (несколько часов) у мужчин с олигоастенозооспермией способствует снижению уровня SDF у пациентов с изначально повышенной степенью повреждения генетического материала. Таким образом, краткий срок полового воздержания может стать значимым дополнительным средством преодоления бесплодия, связанного с фрагментацией ДНК сперматозоидов.

Применение яйцеклеток молодых женщин также рассматривается современными учеными как способ преодоления мужского бесплодия, связанного с высоким уровнем ДНК-фрагментации [29]. Точный механизм этого феномена не известен, Н. Newman и соавт. высказывают предположение о наличии материнских репаративных механизмов в ооците, способных к восстановлению генетического материала сперматозоида на этапе формирования зиготы и в период раннего эмбриогенеза [30]. В некоторых исследованиях демонстрируется значимое повышение эффективности процедуры ИКСИ у мужчин с высоким уровнем SDF [31, 32]. На основании вышеперечисленных данных ряд ученых предложил гипотезу, что при проведении ИКСИ и использовании высококачественных ооцитов возможно преодоление проблемы, связанной с фрагментацией ДНК сперматозоидов [1, 30].

Учитывая современный уровень развития ВРТ, лечение бесплодия, связанного с фрагментацией ДНК сперматозоидов, очень часто сводится к возможности отбора их в программах ИКСИ с целостной структурой генетического материала. Выделяется несколько методов селекции сперматозоидов, облегчающих эмбриологам отбор гамет с нужными характеристиками. К ним относят: центрифугирование в градиенте плотности, техника всплывания спермы, физиологическая ИКСИ – ПИКСИ (PICSИ – Physiologic Intra Cytoplasmic Sperm Injection), применение микрофлюидных чипов, сортировка магнитно-активированных клеток (MACS – Magnetic-activated cell sorting).

Целая серия исследований посвящена оценке эффективности описанных выше методов как способа отбора сперматозоидов без поврежденной ДНК. Так, в ряде исследований продемонстрировано улучше-

ние клинических результатов у пациентов с высоким уровнем фрагментации ДНК при применении современных методов PCSI и MACS по сравнению со стандартными процедурами центрифугирования в градиенте плотности и техникой всплывания спермы [33–35]. Стандартные методы показывают значимую эффективность в качестве техники отбора сперматозоида лишь при отсутствии повреждений генетического материала.

Применение микрофлюидных чипов стало новым перспективным направлением селекции сперматозоидов в программах ВРТ. Такая технология позволяет отбирать сперматозоиды с максимально высоким уровнем прогрессивной подвижности [4, 33]. Недавние работы демонстрируют обнадеживающие результаты применения данной технологии. Так, F. Anbari и соавт. отмечали значительное снижение уровня фрагментации ДНК и улучшение клинических исходов в группе, в которой была использована новая технология селекции сперматозоидов [36]. При применении микрофлюидных чипов у пациентов с уровнем SDF более 60% обнаружено снижение его уровня до 34,9% и высокая эффективность программ ИКСИ [37].

Результаты современных исследований показали, что масштаб повреждения ДНК в гаметях, полученных при биопсии яичка, значительно ниже, чем в эякуляте [38]. Учитывая, что тестикулярные сперматозоиды не проходили по мужским половым путям, они в меньшей степени подвергались действию окислительного стресса. При оценке эффективности применения тестикулярных сперматозоидов в программах ИКСИ у мужчин с высоким уровнем фрагментации ДНК сперматозоидов было показано значительное улучшение клинических результатов [2, 37]. Несмотря на высокую эффективность, продемонстрированную в этих исследованиях, применение тестикулярных гамет в лечении бесплодия, связанного с фрагментацией ДНК, остается дискуссионным методом, что связано с его инвазивностью [1, 8].

Новым аспектом рассматриваемой проблемы является поиск взаимосвязи фрагментации ДНК сперматозоидов и уровней некоторых микроРНК в эякуляте у мужчин в парах, проходящих процедуры ВРТ, для оценки корреляций с вероятностью оплодотворения, качеством и развитием эмбрионов, а также исходами беременности [39]. Так, обнаружена положительная корреляция между фрагментацией ДНК и процентом некачественных эмбрионов и отрицательная корреляция с жизнеспособностью эмбрионов. При превышении доли мужских гамет с SDF > 2,9% увеличивается риск получения нежизнеспособного эмбриона почти в 4 раза. При анализе молекулярного профиля

miR-34c-5p и miR-449b-5p сперматозоидов установлена связь как с SDF, так и с концентрацией сперматозоидов. Более высокие уровни miR-34c-5p по сравнению с miR-449b-5p увеличивают в 14 раз вероятность получения жизнеспособных эмбрионов. Это исследование показывает, что SDF, miR-34c-5p и miR-449b-5p сперматозоидов играют многообещающую роль в качестве биомаркеров качества спермы и результатов ВРТ.

В настоящее время продолжается активный поиск новых предикторов мужской infertility, в частности, в ряду представителей т.н. некодирующих РНК, прежде всего, микроРНК (miRNA), малых интерферирующих РНК (siRNA), piРНК (piwiRNA, piRNA) и длинных некодирующих РНК (lncRNA), имеющих прямое отношение к регуляции активности и сохранению нативной структуры ДНК сперматозоидов и семенников [40, 41].

Заключение

Таким образом, оценка масштаба фрагментации ДНК сперматозоидов дает возможность характеризовать репродуктивную способность мужчины. Это позволяет корректировать тактику ведения пациента с бесплодием, уменьшая степень повреждения генетического материала гамет и/или способствуя отбору клеток без генетических дефектов.

Вместе с тем, в настоящее время отсутствуют надежные согласованные клинические показания для оценки масштаба фрагментации ДНК сперматозоидов. Еще не разработан метод, позволяющий гарантированно исключить участие сперматозоидов с поврежденной ДНК в оплодотворении. Нет также единого мнения о том, как дифференцировать фертильных и бесплодных мужчин на основе значений этого показателя [42]. В связи с этим необходимы дополнительные тщательные исследования клинической значимости результатов оценки степени фрагментации ДНК сперматозоидов и их ассоциаций с экспрессией различных классов РНК.

Литература (п.п. 1–2; 4–5; 7–40; 42 см. References)

3. Галимов Ш.Н., Божедомов В.А., Галимова Э.Ф., Павлов В.Н., Сухих Г.Т. *Мужское бесплодие: молекулярные и иммунологические аспекты*. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2020.
6. Епанчинцева Е.А., Селятицкая В.Г., Божедомов В.А. Индекс фрагментации ДНК сперматозоидов – необходимость для современной клинической практики. *Андрология и генитальная хирургия*. 2020; 21(1): 14–21.
41. Галимов Ш.Н., Громенко Ю.Ю., Галимов К.Ш. и др. Молекулярные механизмы мужского бесплодия: основные направления научного поиска. *Урология*. 2022; 4: 114–7. DOI 10.18565/urology.2022.4.114-117

References

1. Marinaro J., Schlegel P. Sperm DNA Damage and Its Relevance in Fertility Treatment: A Review of Recent Literature and Current Practice Guidelines. *Int J Mol Sci.* 2023; 24(2): 1446.
2. Szabo A., Váncsa S., Hegyi P., Váradi A., Forintos A., Filipov T., et al. Lifestyle-, environmental-, and additional health factors associated with an increased sperm DNA fragmentation: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2023; 21(1): 5.
3. Galimov Sh.N., Bozhedomov V.A., Galimova E.F., Pavlov V.N., Suhih G.T. *Male Infertility: Molecular and Immunological Aspects. [Muzhskoe besplodie: molekulyarnye i immunologicheskie aspekty].* Moscow: GEOTAR-Media, 2020. (in Russian)
4. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.* 6th ed. World Health Organization, Geneva. 2021.
5. Qiu Y., Yang H., Li C., Xu C. Progress in Research on Sperm DNA Fragmentation. *Med Sci Monit.* 2020; 26: e918746.
6. Epanchintseva E., Selyatitskaya V., Bozhedomov V. Sperm DNA Fragmentation Is A Necessity For Modern Clinical Practice. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya.* 2020; 21(1): 14-21. (in Russian)
7. Farkouh A., Salvio G., Kuroda S., Saleh R., Vogiatzi P., Agarwal A. Sperm DNA integrity and male infertility: a narrative review and guide for the reproductive physicians. *Transl Androl Urol.* 2022; 11(7): 1023-44.
8. Agarwal A., Majzoub A., Baskaran S., Panner Selvam M., Cho C., Henkel R., et al. Sperm DNA Fragmentation: A New Guideline for Clinicians. *World J Mens Health.* 2020; 38(4): 412-71.
9. Panner Selvam M., Baskaran S., O'Connell S., Almajed W., Hellstrom W., Sikka S. Association between Seminal Oxidation-Reduction Potential and Sperm DNA Fragmentation-A Meta-Analysis. *Antioxidants (Basel).* 2022; 11(8): 1563.
10. Muratori M., Marchiani S., Tamburrino L., Baldi E. Sperm DNA Fragmentation: Mechanisms of Origin. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1166: 75-85.
11. Mir J., Franken D., Andrabi S., Ashraf M., Rao K. Impact of weight loss on sperm DNA integrity in obese men. *Andrologia.* 2018; 50: e12957. doi: 10.1111/and.12957
12. Tímermans A., Vázquez R., Otero F., Gosálvez J., Johnston S., Fernández J. Antibiotic toxicity on human spermatozoa assessed using the sperm DNA fragmentation dynamic assay. *Andrologia.* 2022; 54(2): e14328.
13. Agarwal A., Farkouh A., Parekh N., Zini A., Arafá M., Kandil H. et al. Sperm DNA Fragmentation: A Critical Assessment of Clinical Practice Guidelines. *World J Mens Health.* 2022; 40(1): 30-7.
14. Santi D., Spaggiari G., Simoni M. Sperm DNA fragmentation index as a promising predictive tool for male infertility diagnosis and treatment management – meta-analyses. *Reprod Biomed Online.* 2018; 37(3): 315-26.
15. Agarwal A., Farkouh A., Saleh R. Controversy and Consensus on Indications for Sperm DNA Fragmentation Testing in Male Infertility: A Global Survey, Current Guidelines, and Expert Recommendations. *World J Mens Health.* 2023; 10.5534/wjmh.220282.
16. Kim G. What should be done for men with sperm DNA fragmentation? *Clin Exp Reprod Med.* 2018; 45(3): 101-9.
17. Ribas-Maynou J., Yeste M., Becerra-Tomás N., Aston K., James E., Salas-Huetos A. Clinical implications of sperm DNA damage in IVF and ICSI: updated systematic review and meta-analysis. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2021; 96(4): 1284-300.
18. Repalle D., Saritha K., Bhandari S. Sperm DNA fragmentation negatively influences the cumulative live birth rate in the intracytoplasmic sperm injection cycles of couples with unexplained infertility. *Clin Exp Reprod Med.* 2022; 49(3): 185-95.
19. Dai Y., Liu J., Yuan E., Li Y., Shi Y., Zhang L. Relationship Among Traditional Semen Parameters, Sperm DNA Fragmentation, and Unexplained Recurrent Miscarriage: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022; 12: 802632.
20. Alahmar A., Singh R., Palani A. Sperm DNA Fragmentation in Reproductive Medicine: A Review. *J Hum Reprod Sci.* 2022; 15(3): 206-18. doi: 10.4103/jhrs.jhrs_82_22.
21. Roque M., Esteves S. Effect of varicocele repair on sperm DNA fragmentation: a review. *Int Urol Nephrol.* 2018; 50: 583-603.
22. Birowo P., Rahendra Wijaya J., Atmoko W., Rasyid N. The effects of varicolectomy on the DNA fragmentation index and other sperm parameters: A meta-analysis. *Basic Clin. Androl.* 2020; 30: 15.
23. Qiu D., Shi Q., Pan L. Efficacy of varicolectomy for sperm DNA integrity improvement: A meta-analysis. *Andrologia.* 2021; 53: e13885.
24. Lira Neto F., Roque M., Esteves S. Effect of varicolectomy on sperm deoxyribonucleic acid fragmentation rates in infertile men with clinical varicocele: A systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril.* 2021; 116: 696-712.
25. Schisterman E., Sjaarda L., Clemons T., Carrell D.T., Perkins N.J., Johnstone E. et al. Effect of folic acid and zinc supplementation in men on semen quality and live birth among couples undergoing infertility treatment: A randomized clinical trial. *JAMA.* 2020; 323: 35-48.
26. Steiner A., Hansen K., Barnhart K., Cedars M.I., Legro R.S., Diamond M.P., et al. The effect of antioxidants on male factor infertility: The Males, Antioxidants, and Infertility (MOXI) randomized clinical trial. *Fertil. Steril.* 2020; 113: 552-560.e553.
27. Sokol P., Drakopoulos P., Polyzos N.P. The effect of ejaculatory abstinence interval on sperm parameters and clinical outcome of ART. A systematic review of the literature. *J. Clin. Med.* 2021; 10: 3213.
28. Barbagallo F., Cannarella R., Crafa A., Manna C., La Vignera S., Condorelli R., et al. The Impact of a Very Short Abstinence Period on Conventional Sperm Parameters and Sperm DNA Fragmentation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med.* 2022; 11(24): 7303.
29. Esteves S., Zini A., Coward R., Evenson D., Gosálvez J., Lewis S., et al. Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia.* 2021; 53: e13874.
30. Newman H., Catt S., Vining B., Vollenhoven B., Horta F. DNA repair and response to sperm DNA damage in oocytes and embryos, and the potential consequences in ART: A systematic review. *Mol. Hum. Reprod.* 2022; 28: gaab071.
31. Antonouli S., Papatheodorou A., Panagiotidis Y., Petousis S., Prapas N., Nottola S.A. et al. The impact of sperm DNA fragmentation on ICSI outcome in cases of donated oocytes. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2019; 300: 207-15.
32. Hervás I., Pacheco A., Gil Julia M., Rivera-Egea R., Navarro-Gomezlechón A., Garrido N. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation (by terminal deoxynucleotidyl transferase biotin dUTP nick end labeling assay) does not impair reproductive success measured as cumulative live birth rates per donor metaphase II oocyte used. *Fertil. Steril.* 2022; 118: 79-89.
33. Keskin M., Pabuçcu E., Arslanca T. Does Microfluidic Sperm Sorting Affect Embryo Euploidy Rates in Couples with High Sperm DNA Fragmentation? *Reprod. Sci.* 2022; 29: 1801-8.

34. Ahmadi A., Sobhani A., Khalili M., Agha-Rahimi A., Nabi A., Findikli N. Comparison of the Efficiency of Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) and Physiological Intracytoplasmic Sperm Injection (PICS) for Sperm Selection in Cases with Unexplained Infertility. *J Reprod Infertil.* 2022; 23(3): 184-91.
35. Pacheco A., Blanco A., Bronet F. Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS): A Useful Sperm-Selection Technique in Cases of High Levels of Sperm DNA Fragmentation. *J Clin Med.* 2020; 9: 3976. doi: 10.3390/jcm9123976.
36. Anbari F., Khalili M.A., Sultan Ahamed A., Mangoli E., Nabi A., Dehghanpour F. et al. Microfluidic sperm selection yields higher sperm quality compared to conventional method in ICSI program: A pilot study. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2021; 67: 137-43.
37. Pujol A., García-Peiró A., Ribas-Maynou J., Lafuente R., Mataró D., Vassena R. A microfluidic sperm-sorting device reduces the proportion of sperm with double-stranded DNA fragmentation. *Zygote.* 2022; 30(2): 200-5.
38. Esteves S., Roque M., Bradley C., Garrido N. Reproductive outcomes of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with high levels of DNA fragmentation in semen: Systematic review and meta-analysis. *Fertil. Steril.* 2017; 108: 456-467. e451.
39. Conflitti A., Cicolani G., Buonacquisto A., Pallotti F., Faja F., Bianchini S., et al. Sperm DNA Fragmentation and Sperm-Borne miRNAs: Molecular Biomarkers of Embryo Development? *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(2): 1007. doi: 10.3390/ijms24021007
40. Joshi M., Rajender S. Long non-coding RNAs (lncRNAs) in spermatogenesis and male infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020; 18:103 doi: 10.1186/s12958-020-00660-6
41. Galimov Sh., Gromenko Y., Galimova E., Galimov K., Bulygin K., Litvitsky P. Molecular Mechanisms of Male Infertility: Main Directions of Scientific Research. *Urologiya.* 2022; 4: 114-7.
42. Björndahl L., Barratt C., Mortimer D., et al. *Hum. Reprod.* 2022; 37(11): 2497-502. doi: 10.1093/humrep/deac189

Сведения об авторах

Громенко Иван Дмитриевич, ассистент каф. биологической химии, ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, e-mail: z28ivan@mail.ru;

Галимова Эльмира Фанисовна, доктор мед. наук, проф., каф. патологической физиологии, ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, e-mail: efgalimova@mail.ru;

Громенко Регина Ильдаровна, ассистент каф. акушерства и гинекологии № 1, ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, e-mail: z28ivan@mail.ru;

Галимов Шамиль Нариманович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. биологической химии, ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, e-mail: sngalim@mail.ru;

Громенко Дарья Дмитриевна, студент лечебного факультета, ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, e-mail: dasha.gromenko@mail.ru;

Галимов Камил Шамилович, ординатор 2-го года обучения, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), e-mail: kamil9819@mail.ru;

Литвицкий Петр Францевич, чл.-корр. РАН, доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), e-mail: litvicki@mma.ru.